



universidad
de león

TESIS DOCTORAL

Microbiota digestiva del cerdo: determinación del patrón en condiciones de salud y enfermedad

Swine gut microbiota: composition and diversity in healthy and diseased animals

Rubén Miranda Hevia

Programa de doctorado: Ciencias veterinarias y de los alimentos

Tutor: Pedro Rubio Nistal

Directores: Pedro Rubio Nistal

Ana Carvajal Urueña

León, 2018

A mio pá y mio güelu.

A mio ma y mio cariellu.

Índice

Agradecimientos	7
Resumen	9
Abstract	10
Abreviaturas	11
1.- Introducción	15
1.1.- Microbiota del tracto gastrointestinal	17
1.1.1.- Establecimiento y evolución del microbiota intestinal	17
1.1.2.- Composición de la microbiota intestinal.....	20
1.1.2.- Funciones de la microbiota intestinal.....	23
1.2.- Técnicas para la determinación de la microbiota digestiva	23
1.2.1.- Reacción en cadena de la polimerasa en tiempo real.....	25
1.2.2.- Secuenciación de próxima generación.....	28
1.3.- Lactoferrina.....	29
2.- Objetivos.....	32
3.- Material y métodos	33
3.1.- Diseño experimental	33
3.1.1.- Estudios para la comparación de la secuenciación masiva y las PCRc para la caracterización de la microbiota intestinal	33
3.1.2.- Estudios para la caracterización de la microbiota digestiva en animales con cuadros clínicos asociados a disbiosis y con diferente estatus sanitario.....	34
3.1.3.- Estudios para la caracterización de la microbiota digestiva en animales sometidos a diferentes cambios en la dieta	36
3.2.- Cuantificación de la microbiota mediante PCRc	40
3.2.1.- Extracción del ADN.....	40
3.2.2.- Curvas de cuantificación de las poblaciones bacterianas.....	40
3.2.3.- Amplificación del ADN mediante PCRc	41
3.2.4.- Análisis estadístico.....	45
3.3.- Secuenciación masiva mediante amplificación del gen que codifica para el ARNr 16S 46	
3.3.1.- Preparación de las muestras	46
3.3.2.- Preparación de la biblioteca 16S.....	47
3.3.3.- Secuenciación	48
3.3.4.- Procesamiento de las secuencias.....	48
3.3.5.- Análisis de los resultados.....	49
3.4.- Determinación de lactoferrina en las heces.....	50
3.4.1.- Obtención y purificación de lactoferrina porcina.....	50

3.4.2.- Obtención de los anticuerpos	50
3.4.3.- ELISA sándwich	51
3.4.4.- Cuantificación de la lactoferrina en heces	51
4.- Resultados	53
4.1.- Puesta a punto de las técnicas de PCRc	53
4.1.1.- Extracción del ADN.....	53
4.1.2.- Curvas de cuantificación de las poblaciones bacterianas.....	54
4.1.3.- Amplificación del ADN	54
4.2.- Comparación entre la secuenciación masiva y las PCRc para la caracterización de la microbiota digestiva	55
4.2.1.- Determinación de la microbiota durante la lactación.....	55
4.2.2.- Determinación de la microbiota durante la transición	73
4.3.- Caracterización de la microbiota digestiva en animales con disbiosis o diferente estatus sanitario	92
4.3.1.- Estudio de disbiosis 1	92
4.3.2.- Estudio de disbiosis 2.....	94
4.3.3.- Estudio de disbiosis 3.....	97
4.3.4.- Estudio de disbiosis 4.....	99
4.3.5.- Estudio de estatus sanitario 1	102
4.4.- Caracterización de la microbiota digestiva en animales sometidos a diferentes modificaciones en la composición de la dieta	110
4.4.1.- Estudio de dieta 1	110
4.4.2.- Estudio de dieta 2.....	114
4.4.3.- Estudio de dieta 3.....	118
4.4.4.- Estudio de dieta 4.....	122
4.4.5.- Estudio de dieta 5.....	132
5.- Discusión	139
5.1.- Comparación de las técnicas empleadas: PCRc y NGS.....	139
5.2.- Evolución de la microbiota	143
5.3.- Comparación de la composición de la microbiota en animales sanos y con disbiosis, y entre granjas con diferente estatus sanitario.....	148
5.4.- Comparación de la composición de la microbiota digestiva en lechones sometidos a diferentes modificaciones de la dieta	151
5.5.- Concentración de lactoferrina en las heces	158
6.- Conclusiones	163
7.- Conclusions.....	165
8.- Bibliografía	165

Agradecimientos

Aunque soy persona de pocas palabras y soy de la idea de que los agradecimientos no se reflejan en palabras sino en actos, nunca está demás dejar constancia del agradecimiento por el apoyo de todas aquellas personas que me han ayudado de las más diversas formas a lo largo de estos últimos años.

En primer lugar a mis directores, por ser mis maestros y profesores, en todas las acepciones de los términos. A Pedro por darme la oportunidad durante la carrera de introducirme en el apasionante y desolador mundo de la investigación, además de su modo de ver la investigación, que gracias a los numerosos “chollos” me han permitido ampliar mi formación de una forma no imaginable. A Ana por mostrarme siempre los otros puntos de vista u opciones posibles en los más diversos ámbitos, tanto dentro como fuera de la investigación, pero sobretodo por ser un referente del trabajo constante al que difícilmente llegaremos la mayoría de los mortales.

A todas las personas que forman parte del área de Enfermedades Infecciosas y al grupo de investigación Digesporc, donde he pasado demasiadas horas, la gran mayoría con agrado (sarna con gusto no pica), en estos últimos años. Como sé de las “envidias” existentes no voy hacer mención a nadie en particular salvo, haciendo un poco de “escarabajo”, a Gloria, por todas esas riñas, consejos, ayudas y horas intentando entender el aparato del agua o a Manolito junior, y por supuesto, por dejarme desarmar (y armar) medio laboratorio.

Quisiera agradecer también a todas aquellas personas por su cálida acogida durante mi estancia en el IPLA. A Miguel Gueimonde y su grupo de investigación por ayudarme a comprender los entresijos de la PCR cuantitativa además de ese agujero negro llamado microbiota, especialmente a Alicja por ser quien me ha sufrido de cerca.

Also, I would like to thank to the staff of Vision 1 Lab in Teagasc Food Research of Moorepark, specially to Paul Cotter by give me the opportunity to learn the secrets of massive sequencing and another way of understand the research. Moreover, thanks to Ronan Whiston by introduce to me the world of the bioinformatic, Raul Cabrera by his valuable advices and Edgar Manzanilla by show me the another black hole, the biostatistics.

Agradecer al Ministerio de Educación, Cultura y Deporte por la inestimable ayuda recibida para mi formación doctoral y la realización de esta Tesis (FPU13/01443).

Finalmente, y aunque nun menos importante, a toes aquellos persones qu'intentaron qu'esta Tesis nun fuera posible, porque ensin ellos nun fuera una realidá.

Gracias a todos. Thanks to all. Gracias a toos.

Resumen

La microbiota digestiva tiene un gran impacto en la salud de los animales participando en diversas funciones fisiológicas. En los últimos años, en el ganado porcino han cobrado especial relevancia los problemas digestivos no específicos asociados a las alteraciones de esta microbiota denominadas disbiosis. Por otra parte, el control de las infecciones digestivas en el cerdo se basa, fundamentalmente, en el empleo de antimicrobianos aunque la legislación es cada vez más restrictiva respecto a su uso con fines profilácticos o metafilácticos. Por este motivo es necesario desarrollar nuevas opciones terapéuticas como los cambios en la dieta, ácidos orgánicos, el empleo de extractos vegetales o de pro y prebióticos que modifiquen, restauren o corrijan los desequilibrios de la microbiota intestinal. Sin embargo, antes de aplicar estas nuevas estrategias de control es necesario ampliar el conocimiento sobre la microbiota intestinal y desarrollar herramientas que permitan valorar su composición en condiciones de campo de forma sistemática y eficaz.

El objetivo del presente trabajo ha sido el estudio de la microbiota digestiva del cerdo durante las primeras semanas de vida en animales sanos y con problemas digestivos asociados a disbiosis para avanzar en el desarrollo y evaluación de nuevas intervenciones para el control de estos procesos o en la reducción del empleo de antimicrobianos.

La técnica elegida para el estudio de la composición y evolución de la microbiota intestinal fue la PCR cuantitativa o PCRc, un método más rápido y económico que la secuenciación masiva del ADN de la microbiota. Se cuantificaron las poblaciones de bacterias totales, bacteroides, lactobacilos, enterobacterias, bifidobacterias y clostridios de los clúster I, IV y XIV en un total de doce estudios experimentales que abarcaron las etapas de lactación, destete, transición y primera mitad de cebo.

Además, se desarrolló y optimizó una técnica ELISA para la cuantificación de lactoferrina, un biomarcador de inflamación intestinal, en las heces de los lechones.

La comparación de los resultados proporcionados por las PCRc desarrolladas en esta Tesis con los de la secuenciación masiva basada en la amplificación del ARNr 16S, técnica de referencia para el estudio de la microbiota digestiva, demostró una alta correlación entre las estimaciones obtenidas por ambas técnicas.

El seguimiento longitudinal de la microbiota de los lechones, desde el nacimiento hasta el periodo de cebo, evidenció un incremento progresivo de bacteroides, una disminución de lactobacilos y enterobacterias, aunque éstas se elevaron ligeramente en el destete, y concentraciones relativamente estables de bifidobacterias y de los tres clúster de clostridios, aunque los clúster IV y XIV presentaron una concentración inferior durante los primeros días de vida.

La comparación entre lechones sanos y lechones con signos clínicos compatibles con disbiosis permitió demostrar diferencias significativas. La microbiota de los lechones sanos presentó un número inferior de enterobacterias y mayores concentraciones de lactobacilos y clostridios del clúster IV y XIV. Sin embargo, la concentración de

lactoferrina en las heces fue similar en ambos grupos de animales, por lo que no se pudo demostrar la existencia de inflamación intestinal asociada a esta disbiosis.

Se observaron escasas diferencias en la composición de la microbiota en lechones con la misma genética y alimentación pero estabulados en granjas con diferente estatus sanitario. Los lechones de las granjas con un estatus alto presentaron una mejor microbiota al nacimiento mientras que los animales de las granjas de estatus sanitario bajo presentaron, a lo largo de todo el seguimiento, una menor diversidad en su microbiota, hecho que ha sido asociado a una mayor receptividad a las infecciones.

Finalmente, se evaluaron diferentes intervenciones en la dieta. El empleo de óxido de zinc en lechones destetados redujo las enterobacterias presentes en las heces, disminuyendo, por tanto, el riesgo de diarreas posdestete. La reducción del uso de antibióticos en la dieta tuvo un efecto limitado en la composición bacteriana de la microbiota, destacando tan solo la reducción de la concentración de bacteroides. La adición de ácidos grasos de cadena media se relacionó con un aumento significativo de bacteroides y clostridios del clúster IV y XIV, microorganismos, a su vez, productores de ácidos grasos de cadena corta, mientras que el incremento de la fibra en la dieta mediante la administración de avena no incrementó la riqueza de la microbiota, contrariamente a lo propuesto en otros estudios, y se asoció a una reducción de los clostridios del clúster IV en uno de los estudios.

Abstract

Gut microbiota has a great impact on animal health participating in several physiological functions. In recent years, non-specific digestive diseases associated with dysbiosis or microbial imbalance of this microbiota have gained significant relevance in swine. Moreover, the control of the most common swine digestive infections is mainly based on the use of antimicrobials, although the legislation is increasingly restrictive regarding its use for prophylactic or metaphylactic purposes. For this reason, there is an urgent need to develop new therapeutic approaches such as changes in the diet or supplementing it with organic acids, plant extracts or probiotics and prebiotics which modify, restore or correct imbalances of this gut microbiota. However, before the implementation of these new control strategies, it will be necessary to expand our knowledge on the swine gut microbiota and to develop tools that will allow the evaluation of its composition in field conditions in a systematic and efficient way.

This study focuses on the characterization of gut microbiota in swine during the first weeks of life in both healthy and diseased animals suffering from digestive disorders associated with dysbiosis as well as the animals receiving different diets. The final aim is to advance in the development and evaluation of new interventions for the control of enteric disorders avoiding the use of antimicrobials in swine production.

Quantitative PCR or qPCR was the chosen technique for the study of the composition and evolution of gut microbiota, a faster and more economical method than the massive sequencing of the microbiota DNA. Populations of total bacteria, bacteroides, lactobacilli, enterobacteria, bifidobacteria and *Clostridium* clusters I, IV and XIV were quantified in twelve experimental studies which included lactation, weaning, nursing and the first half of the fattening period.

An ELISA for the quantification of lactoferrin, a biomarker of intestinal inflammation, was also developed and optimized in piglet faeces.

The comparison of the results given by the qPCR assays and those of the massive sequencing based on the amplification of the 16S rRNA, gold-standard for the study of gut microbiota, showed a high correlation between the estimates obtained using both techniques.

Monitoring of gut microbiota from birth to the fattening period showed a progressive increase in bacteroides and a decrease in lactobacilli and enterobacteria, although this latter population was slightly higher at weaning. Populations of bifidobacteria and the three *Clostridium* clusters remained relatively stable throughout the follow-up period, although *Clostridium* clusters IV and XIV showed a lower concentration during the first few days of life.

The comparison between healthy and diseased piglets with clinical signs compatible with dysbiosis detected several significant differences. Gut microbiota of the healthy piglets showed lower numbers of enterobacteria and higher concentrations of

lactobacilli and *Clostridium* clusters IV and XIV. However, lactoferrin concentration in faeces was similar in both groups of animals, with no evidence of intestinal inflammation.

There were also limited differences in the composition of gut microbiota in piglets sharing genetics and diet but reared on farms with different healthy standards. Piglets from farms with a high health standard presented a better microbiota composition at birth while piglets from low standard farms showed, throughout the follow-up, a lower diversity in their microbiota, a fact that has been associated with a greater susceptibility to infections.

Finally, different diet interventions were evaluated. The supplementation with zinc oxide reduced enterobacteria population in the faeces of weaned piglets and thus decreasing the risk of post-weaning diarrhoea. The reduction of antibiotics in the diet had a limited effect on the bacterial composition of gut microbiota, with lower numbers of bacteroides. The addition of medium chain fatty acids was associated with a significant increase of bacteroides and *Clostridium* clusters IV and XIV, microorganisms which produce short chain fatty acids, while the increase of fiber in the diet through the supplementation with oatmeal did not increase the richness of the microbiota, the opposite to that previously proposed, and was associated with a reduction in the population of *Clostridium* cluster IV in one of our experimental studies.

Abreviaturas

AGCM: ácidos grasos de cadena media

ARN: Ácido RiboNucleico

ATCC: American Type Culture Collection (colección americana de cultivos tipo)

Bact: bacteroides-Prevotella

BCA: BiCinchoninic Acid (ácido bicinconínico)

Bif: bifidobacterias

BT: bacterias totales.

CECT: Colección Española de Cultivos Tipo

cI: clostridios clúster I

cIV: clostridios clúster IV

Ct: cycle threshold (ciclo umbral)

cXIV: clostridios clúster XIV

DGGE: Denaturing Gradient Gel Electrophoresis (electroforesis en gel con gradiente desnaturalización)

DNA/ADN: DeoxyRibonucleic Acid /Ácido DesoxiriboNucleico

ELISA: Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay (ensayo por inmunoabsorción ligado a enzimas)

EN: Energía Neta

Ent: enterobacterias

FAA: Fastidious Anaerobe Agar (agar para anaerobios fastidiosos)

FAB: Fastidious Anaerobe Broth (caldo para anaerobios fastidiosos)

FDR: False Discovery Rate (tasa de descubrimientos falsos)

FISH: Fluorescence In Situ Hybridation (hibridación fluorescente in situ)

FLASH, Fast Length Adjustment of SHort reads (ajuste de longitud rápida de lecturas cortas)

HPLC: High Performance Liquid Chromatography (cromatografía líquida de alto rendimiento)

Lact: lactobacilos

Lys: Lisina

MG-AGCM: monoglicéridos de ácidos grasos de cadena media

MGB: Minor Groove Binder (ligando de unión al surco menor)

MRS: Man Rogosa Sharpe

MSD: Deutsche Sammlung von Mikroorganismen (colección alemana de microorganismos)

NA: no asignado

NGS: Next-Generation Sequencing (secuenciación de próxima generación)

OTU: Operational Taxonomic Unit (unidad taxonómica operativa)

PAS: Periodic Acid-Schiff (ácido periódico de Schiff o leucofucsina)

pb: pares de bases

PBS: Phosphate Buffered Saline (solución salina tamponada)

PBST: PBS suplementado con 0,05 % de Tween 20

PRRS: Porcine Reproductive and Respiratory Syndrome (síndrome reproductivo y respiratorio porcino)

QIIME: Quantitative Insights Into Microbial Ecology (información cuantitativa en ecología microbiana)

qPCR/PCRc: quantitative Polymerase Chain Reaction (reacción en cadena de la polimerasa en tiempo real cuantitativa)

RFLP: Restriction Fragment Length Polymorphism (polimorfismo de la longitud de fragmentos de restricción)

rRNA/ARNr: Ribosomal RiboNucleic Acid / Ácido RiboNucleico Ribosómico

SDS-PAGE: Sodium Dodecyl Sulfate PolyAcrylamide Gel Electrophoresis (electroforesis en gel de poliacrilamida con dodecilsulfato sódico)

SID: Standard Ileal Digestible (digestible ileal estandarizada)

TSA: Tryptone Soya Agar (agar triptona soja)

TSB: Tryptone Soya Broth (caldo triptona soja)

ufc: unidades formadoras de colonias

v.: versión

1.- Introducción

La importancia de la microbiota digestiva ha hecho incluso plantear que los seres pluricelulares no son estrictamente individuos sino más bien superorganismos formados por la unión necesaria del propio ser pluricelular con su microbiota asociada que se desarrollan en conjunto anatómicamente, metabólicamente e inmunológicamente y que evolucionan conjuntamente (Zilber-Rosenberg y Rosenberg, 2008; Eberl, 2010; Gilbert *et al.*, 2012; Rosenberg y Zilber-Rosenberg, 2018).

La microbiota digestiva tiene un gran impacto en la salud de animales y humanos (Barko *et al.*, 2018) ya que participa en la regulación de diferentes funciones metabólicas e inmunológicas del hospedador (Hooper *et al.*, 2012; Dantzer *et al.*, 2018). Además, numerosos estudios han demostrado su asociación con diversas enfermedades, tanto digestivas como sistémicas, e incluso está demostrada una clara asociación entre la microbiota y trastornos de la conducta y enfermedades psiquiátricas o neurodegenerativas humanas (Endres y Schäfer, 2018).

En el caso del cerdo, las infecciones digestivas continúan siendo una de las principales causas de pérdidas económicas en la producción porcina. Algunas de estas infecciones, como por ejemplo la diarrea epidémica porcina o la disentería, están causadas por agentes específicos pero cada día es más frecuente, como indica la bibliografía consultada (Fouhse *et al.*, 2016; Gresse *et al.*, 2017) así como la propia experiencia del grupo de investigación en el que se encuadra este trabajo de Tesis Doctoral (Digesporc), la aparición de problemas en los cuales se aíslan uno o más agentes que están también presentes en los animales sanos, como *Escherichia coli*, rotavirus o *Clostridium perfringens*. Estos problemas digestivos no específicos están generalmente asociados a situaciones de disbiosis en la microbiota digestiva, un estado inestable caracterizado por cambios cuantitativos y cualitativos en la microbiota intestinal, en su actividad metabólica o en su distribución local (Hawrelak y Myers, 2004), que se asocia a efectos perjudiciales para la salud del hospedador.

En medicina humana se ha establecido la relación existente entre la disbiosis de la microbiota intestinal y diferentes enfermedades (Sekirov *et al.*, 2010; Cani y Delzenne, 2011; Shanahan, 2012; Shreiner *et al.*, 2015; Wang *et al.*, 2017). En el ganado porcino, aunque los estudios han aumentado considerablemente en los últimos años, aún se desconoce en gran medida el efecto de la microbiota en las enfermedades sistémicas pero no cabe duda que la disbiosis a nivel del tubo digestivo tiene un gran impacto en la aparición de las diarreas (Gresse *et al.*, 2017).

El control de las infecciones digestivas en el ganado porcino se ha basado fundamentalmente en el empleo de antimicrobianos debido a las especiales dificultades que tiene la obtención de vacunas eficaces contra muchas infecciones digestivas. Sin embargo, tanto la legislación nacional como la europea son cada vez más restrictivas respecto al empleo de éstos en producción animal con fines profilácticos y metafilácticos (European Commission, 2003; MAPAMA, 2015). Además, la eficacia de los antibióticos en la disbiosis es muy discutida ya que en muchos casos agravan el desequilibrio existente. De acuerdo a Krause y colaboradores (2005), el efecto positivo de las dosis

sub-terapéuticas de antibióticos se debe a la inhibición de las infecciones subclínicas, la reducción de los metabolitos microbianos que disminuyen el crecimiento, la reducción del uso de los nutrientes por parte de los microorganismos y la mejor absorción y uso de los nutrientes a través de la pared intestinal asociados a animales alimentados con antibióticos.

De acuerdo a estos efectos y debido a la legislación cada día más restrictiva para reducir su uso, se ha producido un aumento de las diarreas post-destete que lleva aparejado un incremento del uso de antibióticos a dosis terapéuticas y la disminución de distintos parámetros productivos: aumento del índice de conversión, incremento del consumo diario de pienso y disminución de la ganancia media diaria (Stein, 2002; Yan y Gilbert, 2004; Gresse *et al.*, 2017).

Estas restricciones al uso de antimicrobianos en producción animal se han implementado a consecuencia del incremento de las resistencias y la posibilidad de transmisión de las mismas a los humanos. El nivel de resistencia a los antibióticos varía entre los aislados bacterianos de origen animal y humano; algunos trabajos indican que un 10 % de las cepas de *E. coli* de origen animal presenta resistencia mientras que esta proporción se eleva hasta el 30-45 % cuando se trata de aislados que causan infección en el hombre, por lo que probablemente la resistencia esté más originada por un mal uso de los antibióticos en medicina humana, aunque no hay que descartar el origen animal (Stein, 2002; Yan y Gilbert, 2004). Otros trabajos, por el contrario, describen una elevada frecuencia de resistencia antimicrobiana en los aislados de origen animal (Sáenz *et al.*, 2001; García-Feliz *et al.*, 2008). Además, hay que tener en cuenta que la aparición de resistencias no es un hecho reciente sino que éstas existen desde hace millones de años (D'Costa *et al.*, 2011; Bhullar *et al.*, 2012).

Por tanto, es necesario el desarrollo de nuevas opciones terapéuticas, como pueden ser los cambios en la dieta, el empleo de probióticos y prebióticos, ácidos orgánicos y fitoquímicos entre otros (Krause *et al.*, 2005; Stanton, 2013; Dowarah *et al.*, 2017; Lillehoj *et al.*, 2018), que permitan modificar, restaurar o corregir estos desequilibrios de la microbiota intestinal. Sin embargo, para la aplicación sistemática y eficaz de estas herramientas terapéuticas que van a incidir y modificar la microbiota se requiere de un mayor conocimiento tanto de la misma como de los efectos de cualquier intervención que pueda modificarla.

La limitación en el estudio de la microbiota intestinal hasta hace unos años era la necesidad de herramientas adecuadas aunque con la aplicación de técnicas moleculares basadas en la amplificación de los genes que codifican el ARNr 16S se ha avanzado a pasos agigantados (Fraher *et al.*, 2012; Highlander, 2012; Willner y Hugenholtz, 2013). Empleando estas herramientas, en medicina humana, se han podido determinar, por ejemplo, patrones de composición de la microbiota (Arumugam *et al.*, 2011), diferencias en la composición debido al modo de vida o la alimentación (De Filippo *et al.*, 2010) o alteraciones debidas al uso de antibióticos (Perez-Cobas *et al.*, 2012).

En el caso del porcino, existía un número razonable de estudios que abordan la composición y características de esta microbiota previamente al inicio de esta Tesis, aunque durante estos años se han incrementado sustancialmente. Aunque las técnicas de secuenciación masiva del ADN de la microbiota digestiva son, sin duda, la herramienta

más potente para el estudio de esta microbiota y de sus cambios ante cualquier factor, estas técnicas tienen dos desventajas. A pesar de que su coste ha disminuido considerablemente en los últimos años, continúa siendo elevado y, además, proporcionan una cantidad de información tan enorme que hace necesaria una etapa muy compleja de procesado, algo que puede ser más costoso que la propia técnica en sí.

Además, existen otros indicadores como los ácidos grasos volátiles u otros biomarcadores que nos permiten conocer el estado en el que se encuentra el tracto gastrointestinal y que nos pueden dar pistas acerca del funcionamiento de este sistema en conjunto, es decir, del intestino y de su microbiota.

1.1.- Microbiota del tracto gastrointestinal

Como hemos mencionado, el tubo digestivo alberga un complejo ecosistema de microorganismos que constituye la microbiota intestinal. Esta microbiota, también denominada digestiva o gastrointestinal, convive en una relación simbiótica con el individuo y ejerce funciones nutricionales, metabólicas y de protección que la convierten en indispensable (Rodríguez-González, 2009; Rosenberg *et al.*, 2009; Rosenberg y Zilber-Rosenberg, 2011; Gilbert *et al.*, 2012; Schokker *et al.*, 2014).

Con el crecimiento exponencial de los estudios de la microbiota intestinal se ha podido reconocer su gran importancia en la evolución de su hospedador y viceversa. Según la teoría del superorganismo anteriormente citada, la combinación del material genético de ambos, animal y microbiota, constituye el individuo superior u holobionte. Su información genética, hologenoma, está formado por una parte estática (genoma del hospedador) y una parte dinámica (microbioma). Este microbioma da al holobionte la capacidad para sobrevivir en condiciones ambientales cambiantes que influyen en la selección natural y la supervivencia de su hospedador (Zilber-Rosenberg y Rosenberg, 2008; Rosenberg *et al.*, 2009; Eberl, 2010; Rosenberg y Zilber-Rosenberg, 2011; Gilbert *et al.*, 2012; Rosenberg y Zilber-Rosenberg, 2018).

1.1.1.- Establecimiento y evolución del microbiota intestinal

La microbiota digestiva no permanece estable a lo largo de la vida del animal sino que va cambiando hasta llegar a la edad adulta cuando se estabiliza (Odamaki *et al.*, 2016). Estos cambios están influidos por multitud de factores (Figura 1.1) como son la microbiota de la madre, el ambiente o la dieta entre otros, y, aunque la microbiota tiene una gran capacidad de resiliencia, cambios prolongados en algún factor pueden modificar la composición de la misma.

Los cerdos reciben gran parte de su microbiota intestinal de su madre y del ambiente en el que viven durante los primeros días de sus vidas (Quilodrán-Vega *et al.*, 2016; Sommer, 2015; Chen *et al.*, 2018). Aunque para una parte de los investigadores el tracto gastrointestinal de los lechones que no han nacido es estéril, en los últimos años se ha refutado en diversos estudios la esterilidad del meconio y del líquido amniótico al

aislarse, mediante cultivo, o identificarse, a través de su material genético, bacterias comensales o patógenas en gestaciones fisiológicas (Bearfield *et al.*, 2002; Buduneli *et al.*, 2005; Jiménez *et al.*, 2008; Satokari *et al.*, 2009; Hong *et al.*, 2010; Mshvildadze *et al.*, 2010; Gosalbes *et al.*, 2013).

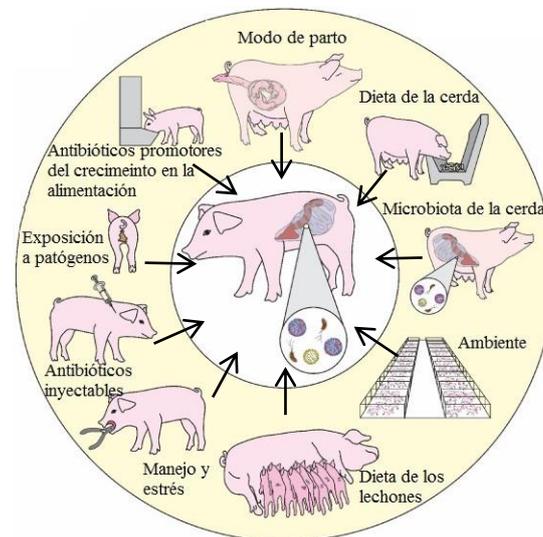


Figura 1.1- Principales factores que afectan a la composición de la microbiota digestiva de los lechones durante las primeras etapas de la vida. Adaptado de Niederwerder (2017).

Existe, por tanto, un flujo de bacterias desde el intestino de las madres hacia sus crías, por vía sistémica. En un primer momento este flujo sería cualitativa y cuantitativamente pequeño, tanto en el número de especies implicadas como en su concentración, pasando a través de la placenta hacia el intestino prenatal. En un segundo momento, el tránsito sería superior, principalmente a través del calostro y la leche materna (Jiménez-Quintana, 2010), mediante la ruta enteromamaria (Langa-Marcano, 2006).

La translocación desde el intestino hacia los tejidos extraintestinales es un fenómeno fisiológico beneficioso dirigido por las células dendríticas, que captan las bacterias a través de las zonas de oclusión para introducirlas en la lámina propia sin perder la integridad del epitelio intestinal (Rescigno *et al.*, 2001). Esta translocación está asociada a la estimulación del sistema inmunitario, a la formación del sistema inmunitario neonatal o como vía de comunicación materno-filial (Guerra *et al.*, 2007), lo que explicaría los efectos extraintestinales que tienen algunos probióticos.

Además de la colonización por vía uterina o láctea, parte de los microorganismos presentes en la microbiota de los lechones durante los primeros momentos de vida provienen de la microbiota del canal del parto de la madre, que colonizan al lechón durante el nacimiento, y de las bacterias presentes en las heces o sobre la piel de la madre.

En las primeras 12 horas de vida de los lechones se pueden aislar bacterias como *E. coli*, *Lactobacillus* y *Streptococcus*, en el intestino delgado mientras que las bacterias anaerobias como *Bacteroides* tardan un par de días en aparecer (Tajima y Aminov, 2015). Así, la primera colonización por parte de aerobios y anaerobios facultativos permite

reducir la concentración de oxígeno y el potencial redox en el tracto gastrointestinal de los cerdos, creando las condiciones adecuadas para la colonización por anaerobios estrictos (*Clostridium*, *Eubacterium*). Sin embargo, para otros autores el entorno anaerobio se establece rápidamente tras el nacimiento y las bacterias anaerobias simplemente superan numéricamente a las anaerobias facultativas (Gosalbes *et al.*, 2013). En este sentido, un estudio de Costillas y colaboradores (2015) permitió detectar a *Megasphaera elsdenii*, un anaerobio estricto, en las heces o el meconio de más del 70 % de los lechones durante el primer día de vida, elevándose al 100 % de los animales al cuarto día.

De acuerdo a Swords y colaboradores (1993) la colonización del tracto gastrointestinal de los cerdos puede dividirse en 3 fases principales (Figura 1.2):

a) Primera fase, desde el parto hasta la primera semana de edad, se caracteriza, como se ha descrito anteriormente, por los cambios de las condiciones y la composición de las bacterias del intestino.

b) Segunda fase, durante la lactación de los lechones existe gran abundancia de lactobacilos y estreptococos que pueden utilizar los sustratos presentes en la leche aunque también están presentes clostridios, bifidobacterias o bacteroides, en menor número. Además, la presencia de inmunoglobulinas de la madre presentes en la leche aporta protección frente a microorganismos patógenos y, por tanto, puede influir en la composición en la microbiota intestinal (Tajima y Aminov, 2015).

c) Tercera fase, comienza con el destete, en el cual los lechones, que tienen en este momento un sistema inmunitario inmaduro, se ven sometidos a un importante estrés causado por la separación de la madre y el cambio del ambiente en el que se encuentran. Además hay un cambio brusco en la alimentación, pasando de una dieta láctea a una dieta sólida, hecho que contribuye al incremento de la diversidad de la microbiota (Inoue *et al.*, 2005; Chen *et al.*, 2017), haciendo que ésta se parezca cada vez más a la composición de los animales adultos. También cabe reseñar que alrededor del destete se produce una reducción de la diversidad con cambios en las poblaciones microbianas y que con este cambio de la alimentación se favorece el establecimiento de nuevas poblaciones bacterianas (Konstantinov *et al.*, 2006). Tras este periodo de grandes cambios, la microbiota cada vez se hace más estable, reduciéndose la cantidad de Bacteroidetes e incrementándose la de Firmicutes (Kim *et al.*, 2011). Estos dos filos contribuyen con más del 90 % de la diversidad de la microbiota en los cerdos adultos (Tajima y Aminov, 2015).

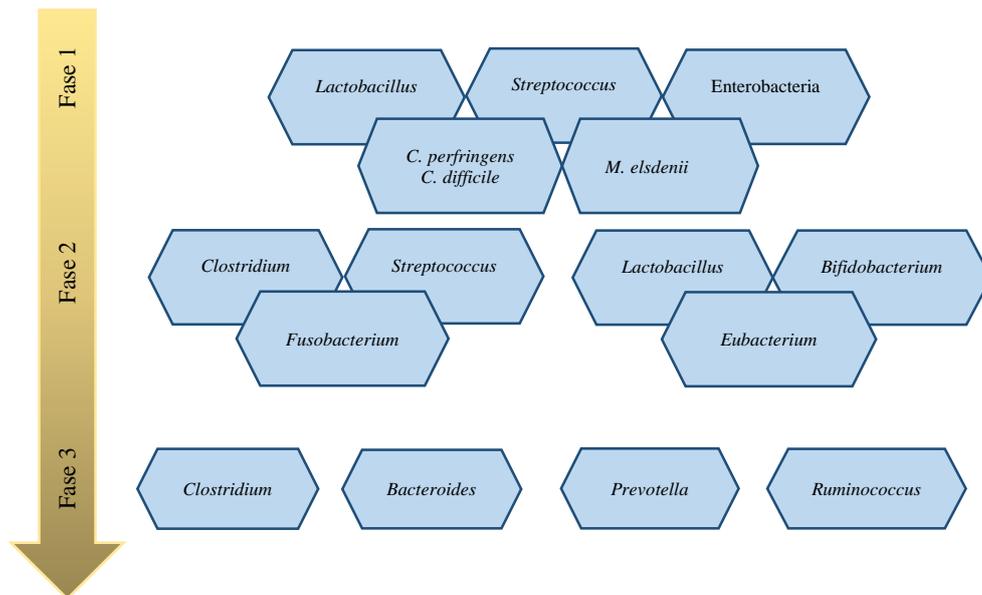


Figura 1.2- Composición de la microbiota digestiva de los lechones durante las primeras etapas de la vida: 1 (0-7 días), 2 (7-21/28 días) y 3 (destete-cebo).

1.1.2.- Composición de la microbiota intestinal

La microbiota digestiva es una parte especialmente importante de la microbiota total que está presente en el hospedador. Es un ecosistema constituido por todo el conjunto de microorganismos (virus, arqueas, bacterias, protozoos y hongos) que colonizan el tracto gastrointestinal. Por tanto, incluye microorganismos beneficiosos, oportunistas o potencialmente patógenos que se mantienen en un equilibrio más o menos estable (homeostasis). Además, se podrían clasificar estos microorganismos como autóctonos, aquellos que colonizan y permanecen durante gran parte de la vida de los animales, o no autóctonos, aquellos que solo colonizan de forma temporal o se encuentran en tránsito con la dieta ingerida.

Las bacterias que forman parte de la microbiota gastrointestinal no se distribuyen de forma uniforme a lo largo de todo el tracto gastrointestinal, incrementándose en cantidad y complejidad a medida que se avanza en el recorrido del tubo digestivo (Figura 1.3), con excepción de la cavidad oral. Esta distribución depende principalmente de factores como la presión de oxígeno, el pH y el tránsito del contenido digestivo (Monteagudo-Mera, 2011).

En el ganado porcino, en el estómago y la zona más craneal del duodeno, donde el pH es ácido, existen elevadas concentraciones de enzimas digestivas y el tránsito es rápido; solo se alcanzan concentraciones de 10^5 bacterias/g de contenido (superiores a las descritas en el hombre $<10^3$ bacterias/g) aunque algunos estudios como el de Castillo y colaboradores (2007) elevan este recuento hasta las 10^8 bacterias/g. Estas bacterias son, en su mayor parte, bacterias que resisten el pH ácido como los *Lactobacillus*, *Streptococcus* y *Enterococcus*. Cabe decir que aunque estos géneros se mantienen a lo

largo de la vida de los animales no son las mismas especies las que se encuentran durante la lactación (por ejemplo *L. fermentum* y *S. salivarius*) o tras el destete (por ejemplo *L. acidophilus* y *S. bovis*) (Tajima y Aminov, 2015).

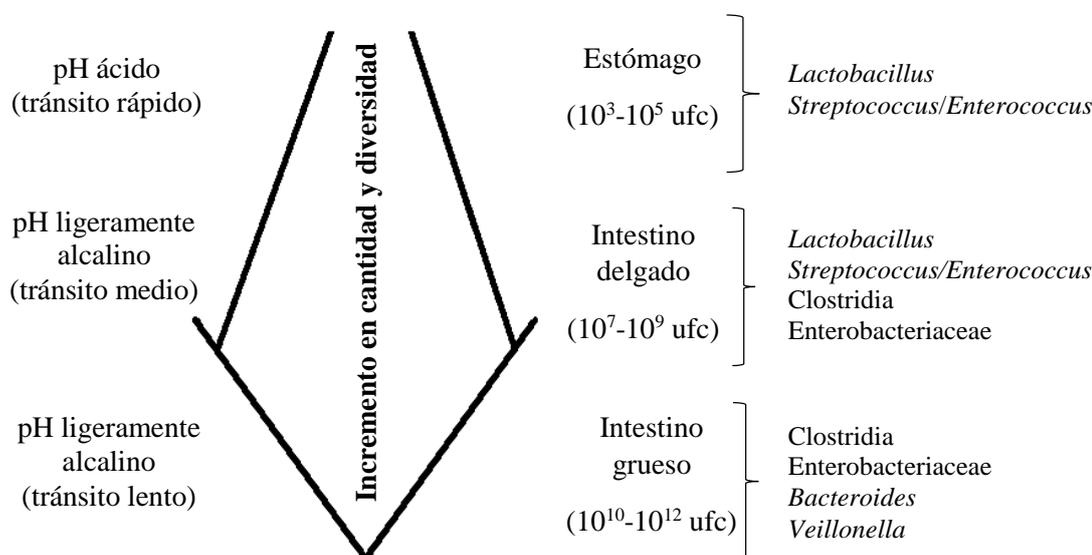


Figura 1.3.- Características de los diferentes tramos del tracto gastrointestinal así como las bacterias más relevantes. Adaptado de Hermann-Bank (2014).

A lo largo del intestino delgado se van incrementando tanto la cantidad como la diversidad de bacterias, al igual que lo que ocurre en el global del tracto gastrointestinal, desde concentraciones próximas a 10^7 ufc/g en la parte más proximal hasta 10^8-10^9 ufc/g en las zonas distales (Jensen y Jorgensen, 1994; Canibe *et al.*, 2005). El peristaltismo, el pH ligeramente básico y las sales biliares favorecen a bacterias como *Lactobacillus*, *Clostridium*, *Escherichia* o *Streptococcus* (Crespo-Piazuelo *et al.*, 2017; Holman *et al.*, 2017; Wang *et al.*, 2013; Hermann-Bank, 2014).

El intestino grueso presenta condiciones más apropiadas y estables para el crecimiento bacteriano al ser más lento el tránsito intestinal, más neutro el pH y disponer de un ambiente anaerobio y de una mayor disponibilidad de nutrientes, por lo que se llegan a alcanzar concentraciones de $10^{10}-10^{12}$ bacterias/g (Jensen y Jorgensen, 1994; Ohashi y Ushida, 2009; Monteagudo-Mera, 2011). El filo más abundante en esta parte del intestino es el Firmicutes (70-88 %) seguido, ya de lejos, por Bacteroidetes (4-25 %), Spirochaetes (1-3 %), Actinobacteria (0-2 %), Proteobacteria (0-1 %), Verrucomicrobia (0-1 %) o Acidobacteria (0-1 %) (Rescigno *et al.*, 2001; Isaacson y Kim, 2012; Holman *et al.*, 2017; Crespo-Piazuelo *et al.*, 2018) (Figura 1.4).

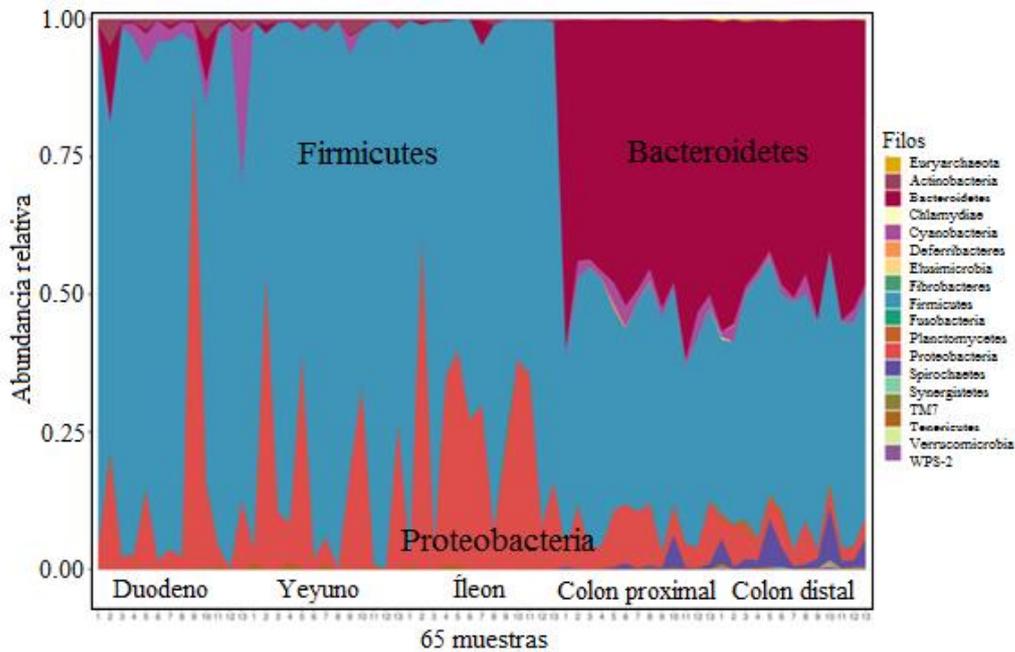


Figura 1.4.- Abundancia relativa de los principales filos presentes en los diferentes tramos del intestino del cerdo. Adaptado de Crespo-Piazuelo y colaboradores (2018).

Además de las diferencias observadas entre las distintas partes del tracto gastrointestinal, se ha comprobado que existen diferencias en la composición de la microbiota presente en el lumen y en la mucosa de cada una de estas partes, como se puede observar en la Figura 1.5 (Simpson *et al.*, 1999; Tajima y Aminov, 2015; Holman *et al.*, 2017).

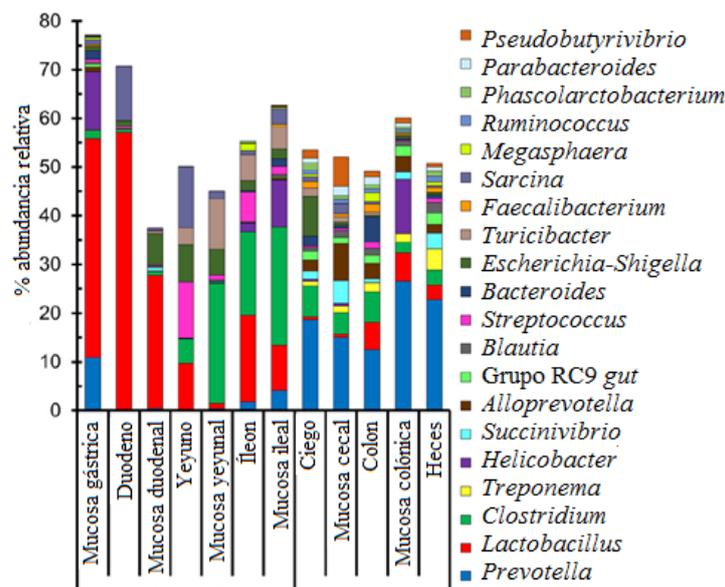


Figura 1.5.- Abundancia relativa de los principales géneros de la microbiota intestinal en el lumen y en la mucosa de diferentes tramos del intestino. Adaptado de Holman y colaboradores (2017).

1.1.2.- Funciones de la microbiota intestinal

La microbiota digestiva es esencial para la digestión de los alimentos pero también interviene en el desarrollo del sistema inmunitario, la defensa contra las infecciones (Stokes, 2017; Gensollen *et al.*, 2016), la angiogénesis o la biotransformación de componentes de la dieta (Sommer y Bäckhed, 2013; Wang *et al.*, 2017). De hecho, la microbiota digestiva tiene una actividad metabólica muy importante por lo que estudios recientes la consideran en sí misma como un órgano más con una destacable actividad metabólica (O'Hara y Shanahan, 2006).

Esta actividad metabólica la lleva a cabo de diversas formas. Participa en la fermentación de componentes de la dieta no digeribles o que no han sido digeridos por el hospedador dando lugar a la síntesis de vitaminas (K, grupo B), aminoácidos y ácidos grasos de cadena corta (acético, butírico, ...) por parte de géneros como *Megasphaera*, *Lactobacillus* o *Ruminococcus*, que son beneficiosos para el animal, llegando a aportar entre el 10 y el 30 % de los requerimientos energéticos de los cerdos (Collinder *et al.*, 2003). También participa en la absorción de iones (Mg^{2+} , Ca^{2+} , Fe) o en la degradación de tóxicos.

La presencia de la microbiota intestinal es un factor fundamental para el desarrollo del sistema inmunitario, tanto a nivel local como a nivel sistémico. Además, la propia microbiota puede competir por nutrientes o receptores con los microorganismos patógenos (exclusión competitiva), producir sustancias con actividad antimicrobiana (reuterina, peróxido, etc.) o favorecer las uniones oclusivas de los enterocitos (función barrera) (Pluske *et al.*, 2018).

1.2.- Técnicas para la determinación de la microbiota digestiva

Los estudios realizados para el estudio de la microbiota del tracto gastrointestinal de humanos y animales se realizaban, hasta aproximadamente hace una década, empleando métodos basados en el cultivo de las bacterias que forman parte de este ecosistema. Para ello, se empleaban medios generales y selectivos, así como diferentes condiciones de cultivo (aerobiosis, microanaerobiosis y anaerobiosis), para el buscar el crecimiento de las bacterias que posteriormente se identificaban fenotípica o molecularmente.

Estos métodos basados en cultivos presentan limitaciones debido al tiempo y el trabajo necesarios para el aislamiento de las bacterias así como a la menor sensibilidad y reproducibilidad de los resultados obtenidos (Dutta *et al.*, 2001; Rajilić-Stojanović, Smidt y de Vos, 2007; Sommer, 2015). Además, estos métodos no permiten detectar aquellas bacterias que no crecen en los medios de cultivo empleados ni tampoco pueden identificar las bacterias desconocidas que no están caracterizadas fenotípica o molecularmente. La magnitud de estas limitaciones queda demostrada por el hecho de que los estudios de microbiota digestiva no dependientes del cultivo han puesto de manifiesto que solo entre un 10 y un 40 % de las bacterias presentes en el tracto

gastrointestinal habían podido ser cultivadas e identificadas anteriormente por métodos clásicos de cultivo microbiológico (Suau *et al.*, 1999; Lagier *et al.*, 2015).

Debido a los inconvenientes de estas técnicas cultivo-dependientes y gracias al desarrollo de nuevas técnicas basadas en la identificación del ADN de las bacterias se ha logrado un gran avance en el conocimiento de la microbiota presente en los animales, aunque es importante mencionar que, en la actualidad, se están volviendo a emplear técnicas dependientes de cultivo para profundizar en la interpretación de los resultados obtenidos por las técnicas no dependientes de cultivo (Lagier *et al.*, 2015; Hiergeist *et al.*, 2015; Sommer, 2015; Bilen *et al.*, 2018).

Las técnicas basadas en la identificación de las especies bacterianas a través del estudio de su ADN se basan, fundamentalmente, en el estudio de la secuencia del ARNr 16S o del gen que la codifica. Esta secuencia se emplea ampliamente en los estudios filogenéticos de la microbiota debido a la presencia de regiones conservadas y de regiones variables que permiten la diferenciación entre microorganismos (Clarridge 2004).

Además, estos métodos moleculares no dependientes de cultivo se pueden clasificar en cualitativos o cuantitativos. Dentro de los primeros nos encontramos con el polimorfismo de la longitud de fragmentos de restricción (RFLP) o la electroforesis en gel con gradiente desnaturalización (DGGE), y entre los segundos se encuentran la hibridación fluorescente *in situ* (FISH) y la PCR cuantitativa a tiempo real (PCRc).

Los métodos cualitativos, como su nombre indica, nos permiten realizar estudios de la microbiota gastrointestinal de forma cualitativa. El RFLP se basa en la amplificación de un gen diana del ADN extraído, generalmente el que codifica para el ARNr 16S, y la posterior digestión con enzimas de restricción y visualización en un gel de agarosa, observándose fragmentos de diferente tamaño debido a la presencia o ausencia de los lugares de unión de las enzimas empleadas (Pérez de Rozas *et al.*, 2003). La DGGE emplea la amplificación del gen diana y la posterior lectura en gel de poliacrilamida en el cual se van a separar los fragmentos amplificados mediante el incremento lineal de agentes desnaturalizantes (Petersson *et al.*, 2009; Simpson *et al.*, 1999).

Los métodos cuantitativos permiten enumerar la cantidad de bacterias presentes en una muestra. La técnica FISH permite cuantificar las bacterias en base a la unión de una sonda marcada con fluorescencia al ADN o ARN diana y posterior conteo, bien de forma manual o bien mediante citometría de flujo. Empleando varias sondas marcadas con diferentes fluorocromos es posible diferenciar las bacterias entre sí. La ventaja de esta técnica frente a otras basadas en la amplificación del material genético es que no es necesario extraer dicho material, pudiendo realizarse sobre las bacterias directamente (Vaahtovuori *et al.*, 2005). La PCRc, como iremos desarrollando más adelante, se basa en la amplificación de un fragmento diana de ADN o ARN y la lectura de dicha reacción de forma simultánea.

1.2.1.- Reacción en cadena de la polimerasa en tiempo real

En contraposición a las técnicas de PCR convencional, la PCRc permite detectar y cuantificar el fragmento del material genético amplificado en cada uno de los ciclos de amplificación. Para la detección de este proceso se emplea una sustancia fluorescente que se une al fragmento y se cuantifica gracias al incremento de la señal de fluorescencia emitida que es proporcional a la cantidad del fragmento diana (Pryor y Wittwer, 2006).

La cinética de amplificación de la PCRc se puede dividir en cuatro fases, tal y como se muestra en la Figura 1.6, inicial o basal, exponencial o geométrica, lineal y estacionaria o *plateau* (Costa, 2004). Durante la primera fase, la fluorescencia es insuficiente para discriminar el ruido basal pero permite calcular el límite a partir del cual el incremento en la fluorescencia pasa a ser significativo (umbral). En la fase exponencial la PCR tiene una eficiencia próxima al 100 %, es decir, en cada ciclo de amplificación la cantidad de ADN se duplica. La fase lineal tiene lugar cuando los reactivos empiezan a ser limitantes de la reacción de amplificación y la fase estacionaria tiene lugar cuando la señal de fluorescencia se satura.

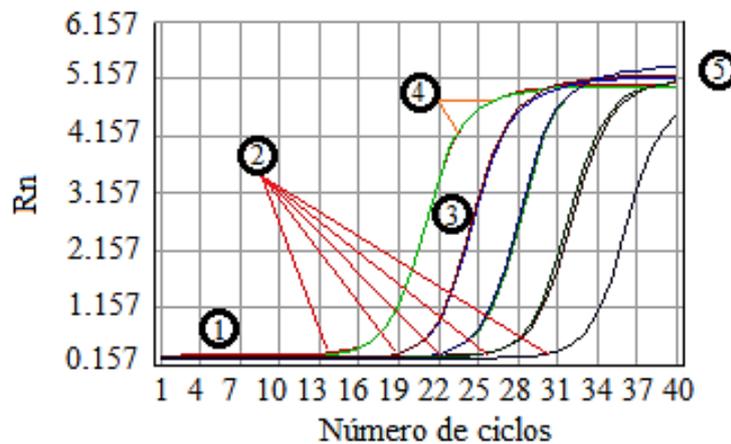


Figura 1.6.- Cinética de amplificación mediante PCRc: 1 fase basal, 2 ciclo umbral, 3 fase exponencial, 4 fase lineal y 5 fase de *plateau*.

Se define el ciclo umbral (C_t) como el número de ciclos de amplificación necesarios para que la curva de fluorescencia alcance el umbral de la señal por encima del cual la cinética pasa a ser exponencial. La diferencia entre los valores de C_t permite calcular la diferencia en la cantidad inicial del material genético ya que el C_t es directamente proporcional a la cantidad inicial del ADN diana. Al introducir una curva preparada con diluciones conocidas del ADN diana se puede calcular una pendiente de esta curva para poder extrapolar los datos de fluorescencia de las muestras problema y, así, conocer la concentración inicial en la muestra problema (Figura 1.7) (Sánchez-Díaz, 2012).

Existen dos grandes grupos de tecnologías para la detección de la amplificación del fragmento diana (Sánchez-Díaz, 2012; Costa, 2004): 1) inespecífica, al unirse el fluoróforo a la doble hebra de ADN amplificado, independientemente de la secuencia de nucleótidos (SYBR Green, Eva Green, SYTO, YOYO, BEBO, etc.); 2) específica, al

unirse a la hembra de ADN amplificada con una secuencia diana (sondas Taq-Man, Molecular Beacons, Scorpion, etc.). Ambas tecnologías serán empleadas durante los estudios de esta Tesis doctoral.

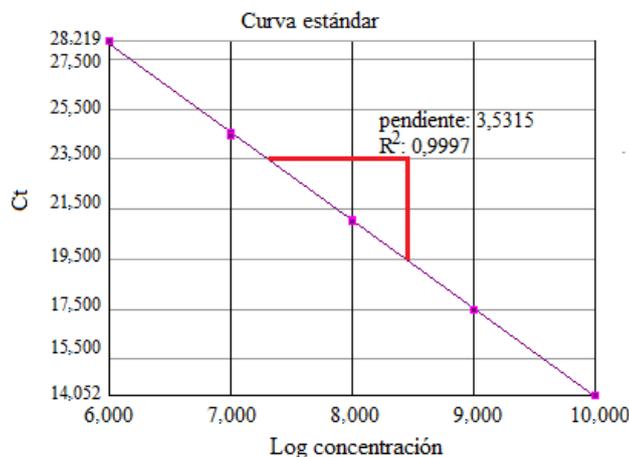


Figura 1.7.- Curva estándar con concentraciones decimales decrecientes (10^{10} - 10^6) que permite calcular la eficiencia de la PCRc así como la pendiente de la curva.

1.2.1.1.- Detección inespecífica

La PCR convencional usaba habitualmente bromuro de etidio para detectar la doble hembra de ADN, pero con el comienzo de PCRc y la búsqueda de alternativas a esta sustancia por su potencial mutagénico se sintetizaron sustitutos pertenecientes en su mayoría al grupo de las acinas asimétricas. La gran ventaja de estas moléculas es que apenas emiten fluorescencia cuando no están unidas al ADN mientras que cuando se unen emiten fluorescencia. Entre las características que deseablemente tienen que presentar estas sustancias se encuentran la eficiencia y reproducibilidad así como que la unión al ADN afecte lo menos posible a la integridad de esta molécula y que, por tanto, pueda continuar la reacción (Sánchez-Díaz, 2012). Dentro de los sistemas de detección no específicos el SYBR Green es la opción más frecuentemente empleada en la PCRc ya que es más afín al ADN que el bromuro de etidio.

El principal inconveniente de estas moléculas de unión inespecífica es que tienen la misma afinidad por cualquier molécula de ADN de doble cadena, por lo que se van a unir al fragmento diana amplificado pero también a otros productos de amplificación inespecíficos o a dímeros de cebadores que pudieran haberse formado durante el proceso, lo que origina un incremento en la fluorescencia que puede llevar a cuantificaciones erróneas. Este inconveniente también imposibilita la amplificación de varios fragmentos diana diferentes en una misma PCR. Por este motivo, tras la PCRc propiamente dicha, se añade un ciclo de disociación que permite conocer la curva de temperatura de fusión; se incrementa paulatinamente la temperatura lo que origina una reducción gradual de la fluorescencia ya que la doble hebra de ADN se separa y la molécula unida se libera, desapareciendo la fluorescencia medida cuando las dobles hebras de ADN se separan por completo (Figura 1.8). La temperatura a la que ocurre este fenómeno se denomina temperatura de fusión (T_m) y está influida por el contenido guanina/citosina, la longitud

y la secuencia del fragmento diana. Esto dará lugar a curvas de diferente morfología y T_m que permiten diferenciar los fragmentos amplificados.

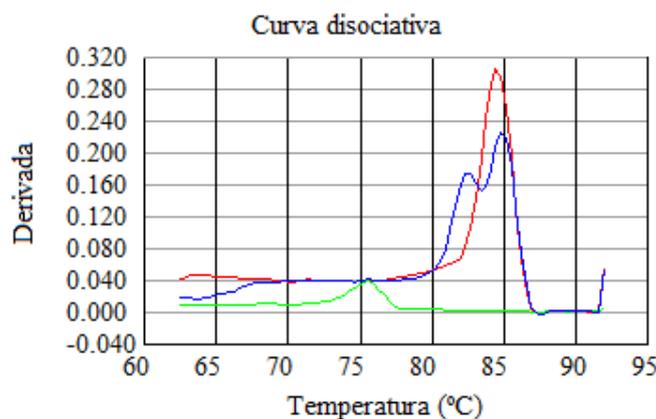


Figura 1.8.- Curva de disociación de tres muestras problema: fragmento de amplificación diana (línea roja), fragmento de amplificación diana más otro no específico (línea azul) y dímeros de cebadores (línea verde).

Por el lado contrario, el SYBR Green es un reactivo relativamente económico, en comparación con los empleados en métodos de detección específica, se puede utilizar para la detección de cualquier fragmento diana de doble hebra y no necesita un diseño previo del mismo como ocurre con las sondas.

1.2.1.1.- Detección específica

Los sistemas de detección específica permiten superar el principal inconveniente de la tecnología inespecífica, es decir, permiten la detección del fragmento diana sin que interfieran fragmentos amplificados inespecíficos o dímeros de cebadores.

Existe una multitud de sondas (secuencias de unión específicas marcadas con fluoróforos) de diferentes tecnologías: Taq-Man, Molecular Beacon, Light-up, Scorpion, cebadores amplifluor, sondas de hibridación adyacente, etc. (Figura 1.9). Todas se basan en el principio FRET que consiste en la transferencia de energía entre dos fluoróforos, un donador y un aceptor, que emiten fluorescencia a diferente longitud de onda. Cuando ambos se encuentran próximos el aceptor absorbe la fluorescencia del donador y cuando se separan, deja de absorberla por lo que puede ser detectada (Kubista *et al.*, 2006).

Las sondas Taq-Man son secuencias específicas del fragmento diana que se unen a la secuencia entre los dos cebadores empleados para su amplificación. Además, poseen un fluoróforo unido al extremo 5' como donador (FAM, TET, NED o VIC) y otro unido al extremo 3' como aceptor (TAMRA o BHQ). Esta sonda se une al fragmento diana previamente a los cebadores al tener una temperatura de anillamiento superior a los mismos y cuando tiene lugar la elongación de la cadena de ADN por parte de la Taq ADN polimerasa se produce la hidrólisis de la sonda mediante la actividad exonucleasa de la polimerasa, produciendo la emisión de la fluorescencia al separarse ambos fluoróforos (Sánchez-Díaz, 2012). De esta forma, la fluorescencia emitida solo proviene de la unión

de la sonda con el fragmento amplificado. Al poder emplear donadores diferentes (distinto espectro de emisión) se pueden amplificar varios fragmentos en una misma reacción de amplificación.

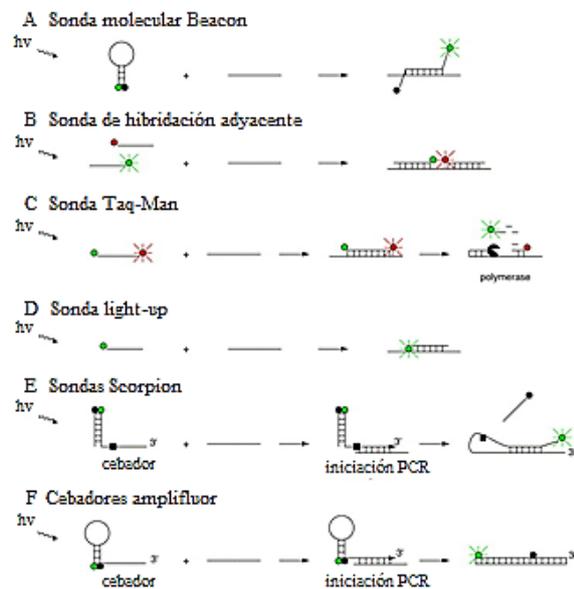


Figura 1.9.- Funcionamiento esquemático de algunos de los sistemas de detección específica. Adaptado de Marras *et al.* (2006).

Además, para incrementar la especificidad de las sondas Taq-Man se han desarrollado las sondas Taq-Man-MGB (Ott *et al.*, 2004), incorporando en el extremo 3' la molécula MGB que se une al surco menor de la doble hebra de ADN formada por la sonda y la secuencia diana, dando lugar a una hibridación más estable, e incrementando la temperatura de anillamiento, por lo que se pueden diseñar sondas con secuencias de nucleótidos más cortas. Además, se sustituye el aceptor fluorescente por otro no fluorescente (NFQ) que realiza la misma función pero sin emitir fluorescencia detectable por sí mismo, reduciendo la fluorescencia de fondo.

Como inconvenientes de este tipo de sondas nos encontraríamos con las ventajas de la detección inespecífica, es decir, las sondas tienen una mayor dificultad de diseño así como un coste, en principio, más elevado.

1.2.2.- Secuenciación de próxima generación

Los avances en las técnicas moleculares en la última década han llevado al desarrollo de la secuenciación de próxima generación (*Next Generation Sequencing* o NGS) que, a su vez, ha ido mejorando la capacidad de secuenciación y, por lo tanto, reduciendo el tiempo de análisis. Se podrían separar dos grandes grupos de plataformas de secuenciación, las denominadas de segunda generación que se basan en la amplificación previa del ADN y las de tercera generación que no requieren ninguna amplificación previa a la secuenciación.

En nuestro caso hemos utilizado la tecnología Illumina que emplea nucleótidos terminadores marcados con fluorescencia, como los empleados en la secuenciación de

Sanger. Una vez unidos estos nucleótidos marcados se realiza una captura de imagen de la fluorescencia y se desbloquea el extremo 3' para continuar con la siguiente reacción de secuenciación. Además, la secuenciación se realiza de forma paralela para millones de secuencias en una sola tanda. La producción de este gran número de secuencias en un corto periodo de tiempo produce una reducción drástica del coste, permitiendo secuenciar genomas completos, realizar metagenómica o identificar marcadores epigenéticos.

Las primeras aplicaciones de la secuenciación masiva de próxima generación han sido los análisis filogenéticos de la microbiota intestinal basados en la secuenciación del gen que codifica el ARNr 16S. Este abordaje ha sido empleado en esta Tesis, ya que para conocer la composición de la microbiota proporciona una buena relación entre los resultados y el coste de los mismos.

Con la evolución de estas técnicas y la mejora en los análisis informáticos posteriores es posible llevar a cabo estudios de metagenómica secuenciando mayor información genética de cada bacteria y no solo la información relativa al ARNr 16S, y eliminando las amplificaciones previas a la secuenciación, lo que permite reducir el error cometido por este motivo. Estas técnicas de metagenómica llevan asociado un incremento de las necesidades de potencia de cálculo informático para poder realizar los ensamblajes y, consecuentemente, incrementan el tiempo de análisis y el coste asociado al análisis de cada muestra.

1.3.- Lactoferrina

Los biomarcadores son sustancias endógenas o exógenas que se pueden medir en diferentes tejidos o secreciones, como la sangre o las heces, y cuyos niveles se pueden correlacionar con la presencia de una enfermedad o con su gravedad (Abraham y Kane, 2012). Por lo tanto, pueden ser usados para diferenciar entre condiciones fisiológicas o patológicas así como para monitorizar la evolución de la enfermedad.

En el caso de algunas enfermedades intestinales, en medicina humana se emplean algunos biomarcadores puesto que no existen síntomas o signos patognomónicos asociados a estos procesos. Así, en enfermedades intestinales crónicas como la enfermedad de Crohn o la colitis ulcerosa se emplean, desde hace años, biomarcadores fecales que tienen, teóricamente, una especificidad superior a la de marcadores sanguíneos como la proteína C reactiva o la velocidad de sedimentación globular (Gisbert *et al.*, 2007). Se ha comprobado que estos procesos entéricos cursan con una elevación en los leucocitos presentes en las heces y, consecuentemente, con una mayor concentración de moléculas como la calprotectina o la lactoferrina en esta matriz. Por tanto, estas moléculas son empleadas en medicina humana como marcadores de inflamación intestinal (Ministro y Martins, 2017) tanto con fines diagnósticos como para la predicción de recidivas o para el seguimiento de la respuesta de los pacientes a los tratamientos instaurados (Gisbert *et al.*, 2007),

La lactoferrina es una glicoproteína globular perteneciente a la familia de las transferrinas con afinidad por el hierro y que es secretada por las células epiteliales glandulares (Sánchez *et al.*, 1992), encontrándose también en los gránulos de los neutrófilos (Actor *et al.*, 2009) (Figura 1.10). Es un componente principal del calostro y la leche humana, bovina o porcina, además de encontrarse en las secreciones que recubren la mayoría de las superficies de la mucosa (Ministro y Martins, 2017). Debido a su fuerte capacidad de unión al hierro, la lactoferrina participa en el transporte y el metabolismo del hierro, pero también tiene una amplia gama de funciones biológicas (García-Montoya *et al.*, 2012), como la actividad antimicrobiana al secuestrar el hierro, actividad antiinflamatoria, inmunomoduladora e inmunoestimulante (Actor *et al.*, 2009; Siqueiros-Cendón *et al.*, 2014; Legrand, 2016; Mayeur *et al.*, 2016).

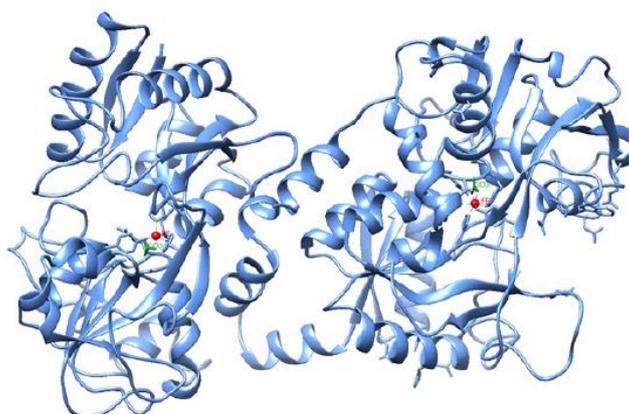


Figura 1.10. Estructura tridimensional de la lactoferrina bovina (los átomos de Fe aparecen indicados en color rojo mientras que los iones de carbonato se muestran en color verde). Tomado de Luna-Castro y colaboradores (2017).

En producción porcina se ha utilizado lactoferrina bovina administrada en las fórmulas de pienso para lechones durante las primeras semanas, habiéndose descrito que incrementa la proliferación de enterocitos (Reznikov *et al.*, 2014). También modifica la microbiota intestinal al incrementar las poblaciones de bacterias beneficiosas como *Bifidobacterium* o *Lactobacillus*, al tiempo que reduce las poblaciones de bacterias potencialmente patógenas como *Salmonella* y *E. coli* (W. Hu *et al.*, 2012) e influye en el desarrollo del sistema inmunitario tanto a nivel sistémico como intestinal (Donovan 2016). En un estudio realizado por Jahan y colaboradores (2017) administraron lactoferrina bovina a cerdas durante la gestación y lactación demostrando un incremento en la producción láctea de las cerdas y en la concentración de IgA a nivel sérico al igual que un incremento en el peso al destete y la ganancia media diaria de los lechones.

La lactoferrina, además de ser secretada por las células glandulares, es un componente principal de los gránulos secundarios de los leucocitos neutrófilos y se libera en grandes cantidades por estas células después de la inflamación (Chen *et al.*, 2011; Abraham y Kane, 2012; Siddiqui *et al.*, 2017). Como es resistente a la proteólisis y relativamente estable en las heces, se utiliza como un biomarcador de inflamación intestinal altamente sensible y específico en medicina humana (Gisbert *et al.*, 2007; Ministro y Martins, 2017). La concentración de lactoferrina fecal en el hombre aumenta en la enfermedad inflamatoria intestinal crónica (Abraham y Kane, 2012), así como en

ciertas infecciones entéricas como la salmonelosis o la campilobacteriosis (Chen *et al.*, 2011). De acuerdo a Gisbert y colaboradores (2007), la sensibilidad y especificidad medias de la lactoferrina son del 82 y 93 %, respectivamente, cuando esta molécula es empleada como biomarcador en el diagnóstico de la enfermedad intestinal crónica en medicina humana. Sin embargo, por el momento no existen experiencias que describan la posible utilidad de este biomarcador fecal en el diagnóstico de procesos entéricos en el ganado porcino en particular o en medicina veterinaria en general.

2.- Objetivos

El objetivo de la presente tesis es el estudio, en profundidad, de la microbiota digestiva del cerdo durante las primeras semanas de vida, tanto en condiciones de salud como en problemas digestivos inespecíficos asociados a disbiosis, para poder avanzar en el desarrollo y evaluación de nuevas intervenciones para el control de los problemas digestivos o en la reducción del empleo de antibióticos.

Este objetivo general se abordó a través de los siguientes objetivos:

1.- Diseño y optimización de una técnica basada en PCR cuantitativa para la detección y cuantificación de los grupos bacterianos más significativos en las heces de los cerdos.

2.- Comparación de los resultados de composición de la microbiota obtenidos mediante PCRc y mediante secuenciación masiva.

3.- Diseño y optimización de una técnica basada en un ELISA para la detección y cuantificación de la lactoferrina porcina en las heces de los cerdos.

4.- Determinación de la composición de la microbiota intestinal en lechones sanos de diferentes edades.

5.- Determinación de la composición de la microbiota intestinal en cerdos afectados por procesos entéricos asociados a disbiosis intestinal.

6.- Determinación de la composición de la microbiota intestinal en cerdos que han recibido un cambio en la dieta con el fin de mejorar el control de los problemas digestivos o ver el efecto de la reducción del uso de antibióticos.

3.- Material y métodos

3.1.- Diseño experimental

3.1.1.- Estudios para la comparación de la secuenciación masiva y las PCRc para la caracterización de la microbiota intestinal

Los dos estudios se realizaron en una granja sitiada en la provincia de A Coruña, con un sistema productivo en dos puntos, lactación y transición por un lado y el cebo se realiza en cebaderos asociados fuera de la granja. Las instalaciones y las condiciones de la granja son muy adecuadas para la producción porcina, como se refleja en el espacio disponible para cada lechón durante el destete (0,6 m²). Además, los lechones tienen un alto estatus sanitario durante la lactación y el destete como se refleja en los parámetros productivos con un peso al destete superior a los 6,4 kg a los 21 días y un peso al final de transición (59 días de vida) que se acerca a los 23 kg. Adicionalmente, se realizó muestreo inicial para determinar la presencia de patógenos en las madres y en los lechones, no encontrándose muestras positivas para *E. coli* enterotoxigénico, *Brachyspira hyodysenteriae*, *B. pilosicoli*, *Lawsonia intracellularis* y *Salmonella enterica* subsp. *enterica*.

Primer estudio (comparación 1)

Se realizó en 16 camadas de lechones durante la fase de lactación. La mitad de las camadas se seleccionaron aleatoriamente y se incluyeron en el grupo testigo, que recibieron la pauta utilizada de forma rutinaria en la explotación que consiste en la lactación y el suplemento con un pienso de iniciación sin medicación a partir del día 7 de vida de los lechones. Los lechones de las 8 camadas del grupo experimental recibieron el mismo alimento pero con la incorporación de un lactorreemplazante sin reconstituir entre los días 3 y 12 de vida y la administración del pienso de iniciación un día antes (a partir del día 6 de vida).

De cada camada se envió una muestra de heces de un pool de lechones en tres momentos: al principio de la lactación tras la toma del calostro (tiempo 1), a mitad de lactación (tiempo 2) y 7 días posdestete (tiempo 3).

Segundo estudio (comparación 2)

Se realizó en 24 corrales de lechones durante la fase de transición sometidos a tres tratamientos y muestreados en tres momentos a lo largo del estudio. Los animales se distribuyeron aleatoriamente, una vez eliminados los de mayor y menor tamaño del grupo (cabezas y colas), en un grupo testigo con la alimentación y medicación empleada en la explotación en ese momento y dos grupos experimentales en los cuales se redujo el nivel de lisina. Adicionalmente en uno de estos grupos de lechones se eliminó la medicación en pienso (Tabla 3.1).

De cada corral se envió una muestra de heces de un macho y de una hembra, realizando en el laboratorio una mezcla de ambas muestras previamente a la realización

de la extracción. Los muestreos se llevaron a cabo el día siguiente al destete (tiempo 1, 23 días de edad), a los 8 días del destete (tiempo 2, 30 días de edad) y el día anterior a la salida de los animales hacia el cebadero (tiempo 3, 59 días de edad).

Tabla 3.1.- Diferencias en la composición del pienso administrado a los tres grupos de animales durante la fase de transición del estudio comparación 2.

	Composición del pienso		
	Grupo testigo	Grupo experimental 1	Grupo experimental 2
Pienso prearranque (del día 22 al 40 de vida)	SID Lisina 1,25 % Lys/EN 0,56 Tilmicosina 200 ppm	SID lisina 1,10 % Lys/EN 0,50 Avena 15 % Tilmicosina 200 ppm	SID lisina 1,10 % Lys/EN 0,50 Avena 15 %
Pienso arranque (del día 40 al 59 de vida)	SID Lisina 1,20 % Lys/EN 0,54 Doxiciclina 250 ppm	SID Lisina 1,08 % Lys/EN 0,49 Avena 15 % Doxiciclina 250 ppm	SID Lisina 1,28 % Lys/EN 0,49 Avena 15 %

3.1.2.- Estudios para la caracterización de la microbiota digestiva en animales con cuadros clínicos asociados a disbiosis y con diferente estatus sanitario

El primer grupo de estudios fueron realizados en explotaciones con animales con un cuadro clínico asociado a disbiosis y con animales que no presentaban este cuadro. En total se llevaron a cabo cuatro estudios en explotaciones porcinas afectadas de disbiosis.

Primer estudio (disbiosis 1)

Se realizó en el año 2014 sobre animales de 6-7 semanas de edad de cuatro granjas; en dos de ellas se presentaba un cuadro no específico caracterizado por la hinchazón de los párpados sin llegar a ser edema, la presencia de legañas en los ojos, disnea más o menos importante y una fase crónica caracterizada por un desmedro importante en los animales que sobrevivían al proceso (Tabla 3.2). Este cuadro clínico, con una etiología desconocida a pesar de las numerosas aproximaciones diagnósticas realizadas, fue descrito por el veterinario de la explotación, con años de experiencia. Los animales empleados como testigo procedían de otras dos granjas sin este cuadro clínico pero con animales de la misma línea genética así como la misma alimentación (pienso de iniciación de transición o pienso starter con 2500 ppm de óxido de zinc además de amoxicilina y colistina). Se realizó un único muestreo en el cual se tomaron muestras de heces en botes estériles y se enviaron al laboratorio de forma urgente y refrigerada.

Segundo estudio (disbiosis 2)

Se realizó un año después (2015) en una de las granjas afectadas por disbiosis muestreada en el primer estudio. En este caso, se investigaron animales afectados con una edad comprendida entre las 7 y las 10 semanas de vida, perteneciendo a 4 destetes sucesivos y alimentados con el mismo pienso que en el primer ensayo. Se muestrearon 22 animales, tanto machos como hembras, de 5 salas de transición. Ocho animales se encontraban en la fase precoz o con presencia de legañas, ocho animales presentaban un incremento de la temperatura corporal pero ningún otro signo clínico asociado, dos

animales estaban en una fase final o de desmedro y cuatro animales eran sanos y no presentaban signos clínicos.

Tabla 3.2.- Descripción de los lechones muestreados para el primer estudio de la microbiota en animales con un cuadro asociado a disbiosis.

Granjas afectadas					Granjas control				
Lechón	T ^a rectal (°C)	Sexo	Fase clínica	Aspecto de las heces	Lechón	T ^a rectal (°C)	Sexo	Fase clínica	Aspecto de las heces
1	41,5	M	FR	Duras	1	39,6	H	Sano	Formadas
2	41	M	FR	Duras	2	39,5	H	Sano	Formadas
3	40,6	M	FR	Blandas	3	39,3	M	Sano	Formadas
4	40,3	H	FR	Duras	4	39,8	M	Sano	Formadas
5	40,8	M	FR	Duras	5	39,7	H	Sano	Formadas
6	40,7	M	FL	Diarrea	6	39,5	H	Sano	Formadas
7	40,2	H	FL	Duras	7	39,4	M	Sano	Formadas
8	40,5	H	FR	Duras	8	39,5	M	Sano	Formadas
9	40,4	M	FR	Duras					
10	39,9	M	FL	Duras					
11	40	M	FL	Duras	9	39,8	H	Sano	Formadas
12	38,9	H	FR	Estreñimiento	10	39,7	H	Sano	Pastosas
13	40,9	H	FR	Diarrea	11	39,6	M	Sano	Formadas
14	39,8	H	FR	Estreñimiento	12	39,6	M	Sano	Formadas
15	41,5	H	FR	Formadas	13	39,7	H	Sano	Formadas
16	39,2	H	FR	Estreñimiento	14	39,6	M	Sano	Formadas
17	40,9	H	FR inicial	Formadas	15	39,8	M	Sano	Formadas
18	40,3	H	FR inicial	Formadas	16	39,8	H	Sano	Formadas
19	40,5	H	FR	Estreñimiento					
20	40,5	M	FR inicial	Formadas					
21	41	M	FR	Diarrea					

Fase clínica: FL: fase legañas o precoz, FR: fase rana o hinchazón de los párpados.

Tercer estudio (disbiosis 3)

Se realizó en una de las dos granjas muestreadas para obtener muestras de animales sanos del estudio inicial, dos años después del mismo (2016). En esta granja, con la misma alimentación y genética que en el resto de granjas incluidas, apareció un cuadro clínico asociado a disbiosis similar al descrito en los estudios previos, aunque la fase severa o fase de rana (hinchazón de los párpados) se sustituyó por un cuadro caracterizado por la necrosis de los extremos de las orejas en animales de 9 semanas de edad. Se muestrearon 20 animales, de los cuales tres no presentaban signos clínicos, cuatro solo mostraban un incremento de la temperatura y el resto, trece lechones, presentaban necrosis de las orejas.

Cuarto estudio (disbiosis 4)

Para la caracterización de la microbiota en lechones afectados por un cuadro asociado a disbiosis se estudiaron animales durante la fase de transición de una

explotación con un alto estatus sanitario que presentaba diarreas con elevada morbilidad dentro de los corrales afectados pero sin que se hubiese podido determinar la participación de ningún agente etiológico específico de diarrea de naturaleza infecciosa o parasitaria. Se tomaron muestras de heces de 12 animales con diarrea de cuatro corrales distintos así como de 10 animales de otros corrales no afectados, con animales de la misma edad.

Estudio de estatus sanitario (estatus sanitario 1)

En el segundo grupo de estudios se determinó la composición de la microbiota mediante PCRc en varias granjas con una misma genética y alimentación pero con distinto estatus sanitario. Las granjas fueron clasificadas en base a este estatus sanitario como alto (negativas a disentería, PRRS, y *Mycoplasma hyopneumoniae*), medio (negativas a disentería, PRRS estables con vacunación en sabana, y positivas a *M. hyopneumoniae*) y bajo (positivas a disentería y *M. hyopneumoniae*, y positivas o negativas inestables a PRRS) por parte de los veterinarios de la empresa, seleccionándose aleatoriamente 3 explotaciones de cada uno de estos niveles. En cada explotación, se llevaron a cabo tres muestreos, al nacimiento de los lechones, al destete y a la entrada a cebo de los animales (Tabla 3.3).

Tabla 3.3.- Descripción de los muestreos llevados a cabo para la caracterización de la microbiota digestiva en granjas con diferente estatus sanitario.

Granja	Estatus	Número de muestras		
		Nacimiento	Destete	Entrada a cebo
A	Alto	5	5	5
B		1	1	1
C		5	4	5
D	Medio	5	5	5
E		5	5	4
F		5	5	5
G	Bajo	3	5	5
H		4	5	5
I		5	5	5

3.1.3.- Estudios para la caracterización de la microbiota digestiva en animales sometidos a diferentes cambios en la dieta

Se realizaron 5 estudios para determinar la composición de la microbiota mediante PCRc en cerdos que recibieron diferentes dietas o tratamientos antibióticos administrados como premezclas. Dos de estos estudios se han descrito en el apartado 3.1.1 puesto que fueron empleados para la comparación entre las dos principales técnicas empleadas, PCRc y secuenciación masiva. Las características de cada uno de estos estudios y las dietas empleadas se detallan a continuación.

Estudio 1 (dieta 1)

Se realizó en 24 corrales de lechones durante la fase de transición sometidos a tres tratamientos y muestreados en tres momentos a lo largo del periodo de seguimiento. Se

llevó a cabo en las mismas instalaciones que el estudio comparación 2. Los animales se dividieron en un grupo testigo, con la alimentación y medicación empleada en la explotación en ese momento, y dos grupos experimentales en los cuales se redujo el nivel de lisina. En uno de estos grupos experimentales, además, se redujo la medicación en pienso (Tabla 3.4).

Tabla 3.4.- Diferencias en la composición del pienso administrado a los tres grupos de animales durante la fase de transición del estudio dieta 1.

	Composición del pienso		
	Grupo testigo	Grupo experimental 1	Grupo experimental 2
Pienso prearranque (del día 22 al 40 de vida)	SID Lisina 1,33 % EN 2500 kcal/kg Lys/EN 0,575 Colistina 120 ppm Tilmicosina 200 ppm Amoxicilina 300 ppm	SID lisina 1,13 % EN 2500 kcal/kg Lys/EN 0,492 Colistina 120 ppm Tilmicosina 200 ppm Amoxicilina 300 ppm	SID lisina 1,13 % EN 2500 kcal/kg Lys/EN 0,492 Tilmicosina 200 ppm Amoxicilina 300 ppm
Pienso arranque (del día 40 al 59 de vida)	SID Lisina 1,24 % EN 2450 kcal/kg Lys/EN 0,55 Neomicina 250 ppm Doxiciclina 250 ppm Amoxicilina 300 ppm	SID Lisina 1,08 % EN 2370 kcal/kg Lys/EN 0,55 Neomicina 250 ppm Doxiciclina 250 ppm Amoxicilina 300 ppm	SID Lisina 1,08 % EN 2370 kcal/kg g Lys/EN 0,55 Doxiciclina 250 ppm Amoxicilina 300 ppm

De cada corral se envió una muestra de heces de un macho y de una hembra, realizando en el laboratorio una mezcla de ambas muestras previamente a realizar la extracción. Los muestreos se llevaron a cabo los mismos días que en el estudio comparación 2, es decir, el día siguiente al destete (tiempo 1, 23 días de edad), a los 8 días del destete (tiempo 2, 30 días de edad) y el día anterior a la salida de los animales hacia el cebadero (tiempo 3, 59 días de edad).

Estudio 2 (dieta 2)

Se realizó en las mismas instalaciones y con el mismo diseño que el estudio anterior (estudio dieta 1). Los animales se dividieron en un grupo testigo, con la alimentación y medicación empleada en la explotación en ese momento, y dos grupos experimentales en los cuales se redujeron los antibióticos empleados en las premezclas y se añadió un suplemento de ácidos grasos de cadena media diferente (Tabla 3.5). Los muestreos se realizaron de forma similar al estudio anterior, adelantando el tercer muestreo (tiempo 3) a los 56 días de edad de los animales.

La composición de los suplementos fue la siguiente:

AGCM 1: ácido fórmico, 315 ppm; formiato de amonio, 105 ppm; formiato de sodio, 67 ppm; ácido propiónico, 10 ppm; monoglicéridos de ácidos grasos de cadena media (C-4, C-6, C-8, C-10 y C-12), 105 ppm.

AGCM 2: ácido fórmico, 73.8 ppm; formiato sódico, 13 ppm; ácido propiónico, 159 ppm; monoglicérido de C-4, 20 ppm; monoglicérido de C-8, 100 ppm; monoglicérido de C-10, 100 ppm; monoglicérido de C-12, 100 ppm.

Tabla 3.5.- Diferencias en la composición del pienso administrado a los tres grupos de animales durante la fase de transición del estudio dieta 2.

	Composición del pienso		
	Grupo testigo	Grupo experimental 1	Grupo experimental 2
Pienso prearranque (del día 22 al 40 de vida)	Colistina 120 ppm Tilmicosina 200 ppm Amoxicilina 300 ppm	AGCM 1 (1 %) Tilmicosina 200 ppm Amoxicilina 300 ppm	AGCM 2 (1 %) Tilmicosina 200 ppm Amoxicilina 300 ppm
Pienso arranque (del día 40 al 56 de vida)	Neomicina 250 ppm Doxiciclina 250 ppm Amoxicilina 300 ppm	AGCM 1 (1 %) Doxiciclina 250 ppm Amoxicilina 300 ppm	AGCM 2 (1 %) Doxiciclina 250 ppm Amoxicilina 300 ppm

Estudio 3 (dieta 3)

Se realizó en las mismas instalaciones y con el mismo diseño que el estudio anterior (estudio dieta 2). Los animales se dividieron en un grupo testigo, con la alimentación y medicación empleada en la explotación en ese momento (se incluyó el suplemento de AGCM 2 del ensayo anterior), y dos grupos experimentales en los cuales se empleó avena como fuente de fibra. En uno de estos grupos se redujeron los antibióticos empleados en las premezclas (Tabla 3.6). Los muestreos se realizaron de forma similar al estudio anterior, retrasando el tercer muestreo (tiempo 3) a los 58 días de edad de los animales.

Tabla 3.6.- Diferencias en la composición del pienso administrado a los tres grupos de animales durante la fase de transición del estudio dieta 3.

	Composición del pienso		
	Grupo testigo	Grupo experimental 1	Grupo experimental 2
Pienso prearranque (del día 22 al 40 de vida)	AGCM 2 (1 %) Colistina 120 ppm Tilmicosina 200 ppm Amoxicilina 300 ppm	AGCM 2 (1 %) Avena 15 % Colistina 120 ppm Tilmicosina 200 ppm Amoxicilina 300 ppm	AGCM 2 (1 %) Avena 15 % Tilmicosina 200 ppm Amoxicilina 300 ppm
Pienso arranque (del día 40 al 58 de vida)	AGCM 2 (1 %) Neomicina 250 ppm Doxiciclina 250 ppm Amoxicilina 300 ppm	AGCM 2 (1 %) Avena 20 % Neomicina 250 ppm Doxiciclina 250 ppm Amoxicilina 300 ppm	AGCM 2 (1 %) Avena 20 % Doxiciclina 250 ppm Amoxicilina 300 ppm

Estudio 4 (dieta 4)

Se realizó la transición de los lechones en las mismas instalaciones y con el mismo diseño que el estudio anterior (estudio dieta 3) pero además se continuó con el estudio en un cebadero asociado en la misma provincia. Todos los animales recibieron un pienso con la formulación *gut health*, es decir, un pienso con un contenido en lisina total de 1,20 % con un ratio lisina total/EN de 0,50 y con un 15 % de avena. Los animales se dividieron en tres grupos experimentales: un grupo experimental recibió un suplemento de extractos de aliáceas y orégano (producto A) y ácidos grasos destilados de coco (producto B), otro grupo recibió un suplemento de aceites esenciales (producto C) y trigo extrusionado con MG-AGCM (producto D) y el tercer grupo de animales recibió un suplemento con

extractos de aliáceas y orégano y producto D (Tabla 3.7). Los muestreos se realizaron de forma similar al estudio anterior, retrasando el tercer muestreo (tiempo 3) a los 61 días de edad de los animales y añadiendo dos muestreos más en el cebadero, uno a los 79 días y otro a los 89 días de edad, en los cuales se eliminó uno de los corrales por cada grupo experimental por una cuestión de espacio.

Tabla 3.7.- Diferencias en la composición del pienso administrado a los tres grupos de animales durante la fase de transición y cebo del estudio dieta 4.

	Composición del pienso		
	Grupo experimental 1	Grupo experimental 2	Grupo experimental 3
Pienso prearranque (del día 22 al 40 de vida)	Formulación <i>gut health</i> 3 kg/t de producto A + 3 kg/t de producto B	Formulación <i>gut health</i> 4 kg/t producto D + 500 g/t producto C	Formulación <i>gut health</i> 4 kg/t producto D + 3 kg/t de producto A
Pienso arranque (del día 40 al 61 de vida)	Formulación <i>gut health</i> 3 kg/t de producto A + 1 kg/t producto B	Formulación <i>gut health</i> 4 kg/t producto D + 500 g/t producto C	Formulación <i>gut health</i> 4 kg/t producto D + 3 kg/t de producto A
Pienso cebo (del día 61 al 89 de vida)	Formulación <i>gut health</i> 3 kg/t de producto A + 1 kg/t producto B	Formulación <i>gut health</i> 4 kg/t producto D + 500 g/t producto C	Formulación <i>gut health</i> 4 kg/t producto D + 3 kg/t de producto A

Producto A: pienso de prearranque 0,5 % de extractos, pienso de arranque 0,7 % de extractos, pienso de cebo 1 % de extractos.

Estudio 5 (dieta 5)

Se realizó en una granja experimental ubicada en Segovia. Los lechones destetados a los 28 días procedían de una única granja de 300 madres y fueron agrupados en corrales de 10 animales cada uno, 5 machos y 5 hembras. Se realizaron dos ensayos en los cuales se repitió el diseño experimental consecutivamente, es decir, se realizó un primer ensayo con cuatro corrales de animales por cada tratamiento experimental y, con un desfase, se repitió el ensayo en otros cuatro corrales por cada grupo. Los animales se dividieron en un grupo testigo negativo con la alimentación empleada en la explotación en ese momento pero sin antibióticos, un grupo testigo positivo en cual se empleó la prescripción de antibióticos de la explotación y un grupo experimental con un pienso sin antibióticos pero suplementado con un producto a base de extractos de plantas (Tabla 3.8). Los muestreos se realizaron el día del destete (tiempo 1, 28 días de edad), a los 14 días del destete (tiempo 2, 42 días de edad) y a los 42 días del destete (tiempo 3, 76 días de edad).

Tabla 3.8.- Diferencias en la composición del pienso administrado a los tres grupos de animales durante la fase de transición del estudio dieta 5.

	Composición del pienso		
	Grupo testigo negativo	Grupo testigo positivo	Grupo experimental 1
Pienso prearranque y arranque	Dieta basal	Dieta basal Colistina 120 ppm Óxido de zinc 3000 ppm	Dieta basal Extractos vegetales

3.2.- Cuantificación de la microbiota mediante PCRc

3.2.1.- Extracción del ADN

Las muestras fueron procesadas el mismo día que fueron recibidas en el laboratorio (estudios de disbiosis) o tras un periodo de una semana de congelación a -20 °C (en el resto de los estudios). Se optó por este periodo de congelación para poder homogeneizar los tratamientos que reciben las muestras previamente a la extracción, debido a su procedencia nacional y a la duración de algún experimento (evitar festivos).

La extracción del ADN microbiano presente en las heces se ha realizado mediante el kit comercial GeneMATRIX® STOOL DNA Purification (EURx) siguiendo las instrucciones del fabricante con algunas modificaciones (v. 1.2 Septiembre, 2008). En el caso de los estudios de disbiosis la extracción se realizó a partir de 0,2 g de heces mezcladas manualmente mientras que en el resto de estudios se utilizaron 500 µl de un homogeneizado de las heces 1:10 en PBS, obtenido a partir de 2 g de heces mezcladas en un Stomacher 400 (Seward) a máxima velocidad durante 5 minutos. Además, se incrementó el tiempo de incubación inicial a 70 °C hasta 10 minutos para favorecer la extracción del ADN de las bacterias Gram-positivas.

Finalmente, el ADN obtenido fue resuspendido en 200 µl de tampón de elución (TrisHCl 10 mM, pH 8,5) y se comprobó que la extracción había sido correcta mediante la medida de la absorbancia a 260 nm para determinar la cantidad de ADN extraído así como de la relación entre la absorbancia a 230 y 280 nm para determinar la calidad del mismo. Estas medidas de absorbancia se realizaron en un espectrofotómetro Nanodrop ND-1000 (Thermo Scientific). El ADN obtenido fue almacenado a -20 °C hasta la realización de las diferentes PCRc.

Inicialmente se realizó una comparación entre el kit anterior con el QIAamp® DNA Stool Mini (Qiagen), siguiendo estrictamente en ambos casos las instrucciones del fabricante, optando por el kit que proporcionó unos mejores resultados en términos de extracción de ADN y en términos económicos. La comparación de los resultados relativos a la cantidad y calidad del ADN se realizó mediante un análisis no paramétrico con el paquete estadístico SPSS Statistics versión 24 (IBM).

3.2.2.- Curvas de cuantificación de las poblaciones bacterianas

Para la cuantificación de los distintos grupos bacterianos presentes en las heces de los animales de los diferentes estudios se emplearon cepas tipo de colección (Tabla 3.9).

Tras la descongelación de la cepa bacteriana en un medio de cultivo sólido se procedió al cultivo de 1-2 colonias en 120 ml de caldo a 90 rpm durante el tiempo de crecimiento óptimo de la bacteria (Tabla 3.9). Una vez alcanzada la fase estacionaria, las bacterias se concentraron mediante centrifugación (3.000 g durante 10 min) y se realizó el recuento mediante cámara de Neubauer (Brand). Posteriormente, se ajustó esta concentración a la reflejada en la Tabla 3.9 y se realizó un nuevo recuento. Esta

suspensión se conservó y se procesó para la extracción del ADN en las mismas condiciones que las empleadas con las heces a fin de disponer de una curva que permitiera la cuantificación de las diferentes poblaciones bacterianas.

Tabla 3.9.- Especies bacterianas empleadas como patrón para la cuantificación de bacterias presentes en las heces.

Especie	Cepa	Medio de cultivo	Condiciones de cultivo	Concentración final (bacterias/ml)
<i>Escherichia coli</i>	ATCC 11775	TSA-TSB (Oxoid)	24 h anaerobiosis	1 x 10 ¹¹
<i>Lactobacillus plantarum</i>	CECT 748	Agar y caldo MRS (Merck)	24 h anaerobiosis	1 x 10 ¹⁰
<i>Bifidobacterium bifidum</i>	CECT 870	Agar y caldo MRS (Merck) + 0,05 % cisteína (Sigma)	48 h anaerobiosis	1 x 10 ¹⁰
<i>Bacteroides coprosuis</i>	DSM 18011	FAA-FAB (Lab M)	48 h anaerobiosis	1 x 10 ¹⁰
<i>Clostridium perfringens</i>	CECT 376	FAA-FAB (Lab M)	24 h anaerobiosis	1 x 10 ¹⁰
<i>Clostridium leptum</i>	DSM 753	FAA-FAB (Lab M)	48 h anaerobiosis	1 x 10 ⁹
<i>Blautia coccooides</i>	DSM 935	FAA-FAB (Lab M)	48 h anaerobiosis	1 x 10 ⁹

3.2.3.- Amplificación del ADN mediante PCRc

3.2.3.1.- Diseño de cebadores

Se realizó una búsqueda en la literatura publicada para encontrar cebadores empleados para la cuantificación bacteriana de la microbiota intestinal basados en la amplificación del gen que codifica para el ARN ribosomal 16S. Esta secuencia del ADN bacteriano está formada por regiones conservadas, semi-conservadas e hipervariables (V1-V9) que permiten la clasificación taxonómica. Las regiones conservadas permiten un diseño de cebadores universal o de taxones amplios como puede ser la determinación de bacterias totales o la secuenciación masiva basada en este gen. En cambio, las regiones hipervariables permiten distinguir entre taxones a nivel de familia o género (Clarridge 2004).

Tras una comprobación inicial de los cebadores seleccionados se comprobó que varios de ellos no eran muy específicos del grupo bacteriano que se quería detectar o no poseían una buena eficiencia en la amplificación. Por este motivo se optó por realizar una búsqueda bibliografía con mayor profundidad y comprobando las parejas de cebadores *in silico*, antes de solicitar su síntesis (Tabla 3.10). Además, en el caso de los clúster de clostridios, se recurrió al diseño de nuevos cebadores para emplearlos en el estudio (Tabla 3.10). Se comprobaron todas las parejas de cebadores asegurando que produjeran un fragmento de amplificación de un tamaño inferior a 400 pb.

Para el diseño *de novo* y el estudio *in silico* de los cebadores empleados se utilizaron los programas ClustalX2 (Larkin *et al.*, 2007), Mega6 (Tamura *et al.*, 2013),

Clone Manager Professional (versión 9.2) y BLAST (Altschul *et al.*, 1990), además de la base de datos GenBank (Benson *et al.*, 2005). Aquellos cebadores que demostraron, a priori, una buena especificidad con el taxón a amplificar fueron solicitados a Eurofins® y mediante PCRc se comprobó su sensibilidad, especificidad y eficiencia.

Finalmente, se seleccionó una pareja de cebadores, con o sin sonda asociada, para la cuantificación de cada una de las distintas poblaciones bacterianas analizadas en este estudio (Tabla 3.11).

Tabla 3.10a.- Relación de cebadores y sondas evaluadas para la amplificación específica del ARN ribosómico 16S de las bacterias totales y de las diferentes familias bacterianas estudiadas.

Diana	Cebador	Secuencia (5' → 3')	Referencia
Bacterias totales			
directo	BACT1369F	CGG TGA ATA CGT TCC CGG	Suzuki <i>et al.</i> (2000)
reverso	PROK1492R	TAC GGC TAC CTT GTT ACG ACT T	Suzuki <i>et al.</i> (2000)
sonda	TM1389F	CTT GTA CAC ACC GCC CGT C	Suzuki <i>et al.</i> (2000)
Bacteroides-prevotella			
directo	Bac303F	GAA GGT CCC CCA CAT TG	Bartosch <i>et al.</i> (2004)
	AllBac296F	GAG AGG AAG GTC CCC CAC	Layton <i>et al.</i> (2006)
reverso	Bac708R	CAA TCG GAG TTC TTC GTG	Bernhard y Field (2000)
	AllBac412R	CGC TAC TTG GCT GGT TCA G	Layton <i>et al.</i> (2006)
sonda	AllBac375Probe	CCA TTG ACC AAT ATT CCT CAC TGC TGC CT	Layton <i>et al.</i> (2006)
Lactobacilos			
directo	Lac-F	AGC AGT AGG GAA TCT TCC A	Walter <i>et al.</i> (2001)
	Lac-F	CGA TGA GTG CTA GGT GTT GGA	Fu <i>et al.</i> (2006)
reverso	Lac-R	CAC CGC TAC ACA TGG AG	Heilig <i>et al.</i> (2002)
	Lac-R	CAA GAT GTC AAG ACC TGG TAA G	Fu <i>et al.</i> (2006)
sonda	Lacprobe	CGG CTA ACT ACG TGC CAG CAG C	Skånseng <i>et al.</i> (2013)
Enterobacterias			
directo	Eco1457F	CAT TGA CGT TAC CCG CAG AAG AAG C	Bartosch <i>et al.</i> (2004)
	Ent-F	ATG GCT GTC GTC AGC TCG T	Castillo <i>et al.</i> (2006)
reverso	Eco1652R	CTC TAC GAG ACT CAA GCT TGC	Bartosch <i>et al.</i> (2004)
	Ent-R	CTA CTT CTT TTG CAA CCC ACT C	Han <i>et al.</i> (2011)
Bifidobacterias			
directo	Bif164-PC	GGT GGT AAT GCC GGA TG	Kok <i>et al.</i> (1996)
	lm26	GAT TCT GGC TCA GGA TGA ACG C	Kaufmann <i>et al.</i> (1997)
	g-Bifid-F	CTC CTG GAA ACG GGT GG	Matsuki <i>et al.</i> (2002)
	Bifido5'	GAT TCT GGC TCA GGA TGA ACG	Gueimonde <i>et al.</i> (2004)
	F-bifido	CGC GTC YGG TGT GAA AG	Delroisse <i>et al.</i> (2008)
	prF21bifido	CCT TAC CTG GGC TTG ACA TGT	Nauta <i>et al.</i> (2008)
	SB-F	CGC GTC CGG TGT GAA AG	Xiang <i>et al.</i> (2011)
	SB-P1	AGG GCT CGT AGG CGG TTC GTC	Xiang <i>et al.</i> (2011)
	Bif-F	TTC GGG TTG TAA ACC GCT TTT	Gómez-Doñate <i>et al.</i> (2012)
reverso	Bif662-PCR	CCA CCG TTA CAC CGG GAA	Kok <i>et al.</i> (1996)
	lm3	CGG GTG CTI CCC ACT TTC ATG	Kaufmann <i>et al.</i> (1997)
	g-Bifid-R	GGT GTT CTT CCC GAT ATC TAC A	Matsuki <i>et al.</i> (2002)
	Bifido3'	CTG ATA GGA CGC GAC CCC AT	Gueimonde <i>et al.</i> (2004)
	Lm3-new	CTR CCC ACT TTC ATG ACT	Mølbak <i>et al.</i> (2007)
	prR21bifido	GAC GTA AGG GGC ATG ATG ATC	Nauta <i>et al.</i> (2008)
	R-bifido	CCC CAC ATC CAG CAT CCA	Delroisse <i>et al.</i> (2008)
	SB-R	CTT CCC GAT ATC TAC ACA TTC CA	Xiang <i>et al.</i> (2011)
	SB-P2	CCCCACATCCAGCATCCA	Xiang <i>et al.</i> (2011)
	Bif-R	TAC GTA TTA CCG CGG CTG CT	Gómez-Doñate <i>et al.</i> (2012)

Continúa...

Tabla 3.10b (continuación).- Relación de cebadores y sondas evaluadas para la amplificación específica del ARN ribosómico 16S de las bacterias totales y de las diferentes familias bacterianas estudiadas.

Diana	Cebador	Secuencia (5' → 3')	Referencia
Bifidobacterias			
sonda	Probe A	TCG CCC CGT GTT GC	Nauta <i>et al.</i> (2008)
	MGB-bifido	AAC AGG ATT AGA TAC CC	Delroisse <i>et al.</i> (2008)
	SB-P	ATT CCA CCG TTA CAC CGG GAA	Xiang <i>et al.</i> (2011)
	PGprobe	CGC AAG TGA GTG TAC CTT	Gómez-Doñate <i>et al.</i> (2012)
Clostridios clúster I			
directo	Van-I_F	ACC TRG RCT TGA CAT CYC YTG	Modificado de Van Dyke y McCarthy (2002)
	CI-F1	TAC CHR AGG AGG AAG CCA C	Song <i>et al.</i> (2004)
	Clos-cI-F	ATG CAA GTC GAG CGA KG	Rinttilä <i>et al.</i> (2004)
	S-Cbot-0691-S-23	GTG AAA TGC GTA GAG ATT AGG AA	Le Bourhis <i>et al.</i> (2005)
	Clos-I-IV_F	ACA GGT GGT GCA TGG TTG TC	Diseño propio
	Clos-I_F2	AAT CAT CAT GCC CCT TAT GT	Diseño propio
reverso	CI-R2	GTT CTT CCT AAT CTC TAC GCA T	Song <i>et al.</i> (2004)
	Clos-cI-R	TAT GCG GTA TTA ATC TYC CTT T	Rinttilä <i>et al.</i> (2004)
	S-Clit-1338-A-22	GAT YYG CGA TTA CTA GYA ACT C	Le Bourhis <i>et al.</i> (2005)
	ClostI_r	TTC TTC CTA ATC TCT ACG CA	Hung <i>et al.</i> (2008)
	Clos-I_R	GAG TGC TCA ACT WAA TGG TAG CA	Diseño propio
	Clos-I_R2	TTC ACC GCG ACA TKC TGA TT	Diseño propio
sonda	Clos-I-IV_Sr	ACA TCT CAC GAC ACG AG	Diseño propio
Clostridios clúster IV			
directo	S-Clos-0561-a-17	TTA CTG GGT GTA AAG GG	Van Dyke y McCarthy (2002)
	F	CCC TTC AGT GCC GCA GT	Rinttilä <i>et al.</i> (2004)
	sg-Clept-F	GCA CAA GCA GTG GAG T	Matsuki <i>et al.</i> (2004)
	F_Clept 09	CCT TCC GTG CCG SAG TTA	Furet <i>et al.</i> (2009)
	Clep866mF	TTA ACA CAA TAA GTW ATC CAC CTG G	Ramirez-Farias <i>et al.</i> (2009)
	Rflbr730F	GGC GGC YTR CTG GGC TTT	Ramirez-Farias <i>et al.</i> (2009)
	Fprau 07	CCA TGA ATT GCC TTC AAA ACT GTT	Sokol <i>et al.</i> (2009)
	Fami_IV_F	ACA ATA AGT AAT CCA CCT GG	Hermann-Bank <i>et al.</i> (2013)
	C_IV_F	AGT ACG GCC GCA AGG TTG AAA	Boets <i>et al.</i> (2015)
	Clos-I-IV_F	ACA GGT GGT GCA TGG TTG TC	Diseño propio
reverso	S-Clept-1129-A-17	TAG AGT GCT CTT GCG TA	Van Dyke y McCarthy (2002)
	R	GTCGCAGGATGTCAAGAC	Rinttilä <i>et al.</i> (2004)
	sg-Clept-R	CTT CCT CCG TTT TGT CAA	Matsuki <i>et al.</i> (2004)
	R_Clept 08	GAA TTA AAC CAC ATA CTC CAC TGC TT	Furet <i>et al.</i> (2009)
	Clep1240mR	ACC TTC CTC CGT TTT GTC AAC	Ramirez-Farias <i>et al.</i> (2009)
	Fprau 02	GAG CCT CAG CGT CAG TTG GT	Sokol <i>et al.</i> (2009)
	C_IV_R	CTG CCA TTG TAG TAC GTG TG	Boets <i>et al.</i> (2015)
	Clos-IV_R	CAC CTT CCT CCG TTT TGT CAA C	Modificado de Matsuki <i>et al.</i> (2004)
	Clos-IV_R2	[T]AGA GTG CTC TTG CGT AG	Modificado de Van Dyke y McCarthy (2002)
sonda	P_Clep 01	CAC AAT AAG TAA TCC ACC	Furet <i>et al.</i> (2009)
	Clos-I-V_Sr	ACA TCT CAC GAC ACG AG	Diseño propio
Clostridios clúster XIV			
directo	Erec-0482-S-19	CGG TAC YTG ACT AAG AAG C	Franks <i>et al.</i> (1998)
	g-Ccoc-F	AAA TGA CGG TAC CTG ACT AA	Matsuki <i>et al.</i> (2002)
	Coccoides-Eubacterium_F	CGG TAC CTG ACT AAG AAG C	Rinttilä <i>et al.</i> (2004)
	CXIV-F1	GAW GAA GTA TYT CGG TAT GT	Song <i>et al.</i> (2004)
	F_Ccoc 07	GAC GCC GCG TGA AGG A	Furet <i>et al.</i> (2009)
	RrecmF	GCG GTR CGG CAA GTC TGA	Ramirez-Farias <i>et al.</i> (2009)
	Lachno2_F	TTC GCA AGA ATG AAA CTC AAA G	Newton <i>et al.</i> (2011)
	C_XIV_F	TGA CCG GCC ACA TTG GGA CTG	Boets <i>et al.</i> (2015)
	Clos-XIV_F	GCA ACC CCT ATT CTT AGT AGC CAK C	Diseño propio

[] se elimina la base y en **negrita** se añade una base a la secuencia del cebador. Continúa...

Tabla 3.10c (continuación).- Relación de cebadores y sondas evaluadas para la amplificación específica del ARN ribosómico 16S de las bacterias totales y de las diferentes familias bacterianas estudiadas.

Diana	Cebador	Secuencia (5' → 3')	Referencia
Clostridios clúster XIV reverso	g-Ccoc-R	CTT TGA GTT TCA TTC TTG CGA A	Matsuki <i>et al.</i> (2002)
	S-Ccoc-1112-A-19	TGG CTA CTR DRV AYA RGG G	Van Dyke y McCarthy (2002)
	Coccoides-Eubacterium_R	AGT TTY ATT CTT GCG AAC G	Rinttilä <i>et al.</i> (2004)
	CXIV-R2	CTA CGC WCC CTT TAC AC	Song <i>et al.</i> (2004)
	R_Ccoc 14	AGC CCC AGC CTT TCA CAT C	Furet <i>et al.</i> (2009)
	Rrec630mR	CCT CCG ACA CTC TAG TMC GAC	Ramirez-Farias <i>et al.</i> (2009)
	Lachno2_R	AAG GAA AGA TCC GGT TAA GGA TC	Newton <i>et al.</i> (2011)
	C_XIV_R	TCA TCC CCA CCT TCC TCC AG	Boets <i>et al.</i> (2015)
	Clos-XIV_R	TTT ACG CCA TTG TAG CAC GTG T	Diseño propio
	sonda	P_Erec482	CGG TAC CTG ACT AAG AAG
Lachno2_P		ACC AAG TCT TGA CAT CCG	Newton <i>et al.</i> (2011)
probeXIVab		GTG CCA GCA GCC GCG GTA ATA CG	Ji <i>et al.</i> (2012)
Clos-XIV_Sf		ACG TCA AAT CAT CAT GC	Diseño propio

Tabla 3.11.- Relación de cebadores y sondas finalmente seleccionados para la amplificación de diferentes grupos bacterianos estudiados.

Diana	Cebador	Secuencia (5' → 3')	Fragmento amplificado (pb)	Punto superior de la curva (bacterias/ml)
Bacterias totales	BACT1369F	CGG TGA ATA CGT TCC CGG	142	1 x 10 ¹¹
	PROK1492R	TAC GGC TAC CTT GTT ACG ACT T		
	TM1389F	(NED) CTT GTA CAC ACC GCC CGT C (MGB)		
Bacteroides	AllBac296F	GAG AGG AAG GTC CCC CAC	106	1 x 10 ¹⁰
	AllBac412R	CGC TAC TTG GCT GGT TCA G		
	AllBac375Probe	(FAM) CCA TTG ACC AAT ATT CCT CAC TGC TGC CT (MGB)		
Lactobacilos	Lac-F	AGC AGT AGG GAA TCT TCC A	337-341	1 x 10 ¹⁰
	Lac-R	CAC CGC TAC ACA TGG AG		
	Lacprobe	(FAM) CGG CTA ACT ACG TGC CAG CAG C (MGB)		
Enterobacterias	Ent-F	ATG GCT GTC GTC AGC TCG T	385	1 x 10 ¹⁰
	Ent-R	CTA CTT CTT TTG CAA CCC ACT C		
Bifidobacterias	F-bifido	CGC GTC YGG TGT GAA AG	127	1 x 10 ⁹
	g-Bifid-R	GGT GTT CTT CCC GAT ATC TAC A		
Clostridios clúster I	CI-F1	TAC CHR AGG AGG AAG CCA C	230	1 x 10 ⁹
	ClostI_r	TTC TTC CTA ATC TCT ACG CA		
Clostridios clúster IV	Clos-I-IV_F	ACA GGT GGT GCA TGG TTG TC	101	1 x 10 ⁹
	Clos-IV_R2	AGA GTG CTC TTG CGT AG		
Clostridios clúster XIV	g-Ccoc-F	AAA TGA CGG TAC CTG ACT AA	102	1 x 10 ⁹
	CXIV-R2	CTA CGC WCC CTT TAC AC		

3.2.3.2.- Amplificación del ADN

La cuantificación de la microbiota en las heces se realizó mediante la aplicación de una técnica de PCR cuantitativa o PCRc. Los grupos bacterianos estudiados fueron: bacterias totales, lactobacilos, enterobacterias, bacteroides, bifidobacterias y clostridios clúster I (incluye *C. perfringens*), IV (incluye la familia Ruminococcaceae) y XIV (incluye la familia Lachnospiraceae).

Se emplearon dos tipos de fluoróforos, Sybr Green (se une inespecíficamente a la doble cadena de ADN amplificada) en el caso de las enterobacterias, bifidobacterias y los clúster de clostridios, y sondas Taq-Man-MGB (más específica al emitir solo fluorescencia cuando se une al fragmento diana amplificado) para la determinación de bacterias totales, lactobacilos y bacteroides.

Cada reacción de PCRc fue realizada en un volumen final de 20 µl con los siguientes reactivos: 8 µl de Maxima Probe qPCR Master Mix 2X (Thermo Scientific) o de SG qPCR Master Mix 2X (Eur_x) según se utilizase sonda o Sybr Green respectivamente, 0,3 µl de cada cebador (10 mM), 0,12 µl de Rox diluido 1:10 (Thermo Scientific), 0,15 µl de la sonda Taq-Man-MGB, 9,28 o 9,13 µl de agua libre de ADNasa según se utilizase sonda o Sybr Green respectivamente, y 2 µl de cada muestra, punto de la curva o control negativo. Las muestras empleadas para la determinación de bacterias totales y los clúster IV y XIV de clostridios fueron diluidas previamente 1:10 en agua libre de ADNasa para que la fluorescencia emitida se encontrase dentro de los puntos de la curva utilizados.

Cada muestra fue analizada por duplicado en diferente placa de PCRc (Brand 781375), cuyo diseño también incluía una curva de cuantificación formada por 7 diluciones decimales del ADN extraído de la cepa tipo específica, cuyo punto superior se muestra en la Tabla XXXX, así como un control negativo, todo ello por duplicado. Una vez rellenadas las placas se sellaron con film transparente especial para PCRc (Brand 781391). Aquellas muestras con una desviación entre las dos réplicas superior a un 5 % en base logarítmica fueron analizadas de nuevo.

Las PCRc se realizaron en un equipo 7500 Real-time PCR System (Applied Biosystems) equipado con el programa 7500 System SDS software versión 1.4.0.21. Las condiciones de amplificación del ADN fueron 95 °C durante 10 min, 40 ciclos de 95 °C 15 s y 60 °C 1 min, y, en el caso de las cuantificaciones con Sybr Green se añadió al finalizar una curva de disociación para determinar la especificidad de la amplificación.

3.2.4.- Análisis estadístico

Para cada grupo bacteriano se obtuvo el valor absoluto de la cuantificación, el logaritmo de esta cantidad y su proporción con respecto a las bacterias totales cuantificadas para cada muestra así como las desviaciones obtenidas entre las dos réplicas realizadas.

Se obtuvo un índice, que hemos denominado Índice de Salud Intestinal (ISI), que es una relación entre tres grupos de bacterias presentes en la microbiota digestiva de los cerdos basado en el descrito por Muralidhara y colaboradores (1977). Los lactobacilos y bifidobacterias serían considerados bacterias beneficiosas para el cerdo mientras que el grupo de las enterobacterias están más asociadas a procesos de disbiosis en los animales, es decir, potencialmente patógenas.

$$\text{ISI} = \frac{\% \text{ lactobacilos} + \% \text{ bifidobacterias}}{\% \text{ enterobacterias}}$$

El análisis estadístico se realizó con el paquete estadístico SPSS Statistics versión 24 (IBM). En los estudios de disbiosis, en los cuales no se habían aplicado tratamientos, se realizó una comparación de los valores de recuentos expresados exponencialmente o de las proporciones de cada grupo bacteriano con respecto a las bacterias totales mediante un análisis no paramétrico para k muestras independientes por Kruskal-Wallis con un intervalo de confianza del 95 %. En cambio, en los estudios en los cuales se introdujo un tratamiento para modificar la microbiota se realizó una comparación de los valores de recuentos expresados como logaritmos o de las proporciones de cada grupo bacteriano con respecto a las bacterias totales mediante un ANCOVA, empleando como covariable los valores obtenidos a tiempo 1 para la variable evaluada. En ambos análisis, las diferencias se consideraron significativas para $p < 0,05$.

3.3.- Secuenciación masiva mediante amplificación del gen que codifica para el ARNr 16S

Como se ha mencionado anteriormente, la secuenciación masiva del gen que codifica para el ARNr 16S es la técnica de referencia o *gold standard* para el estudio de la filogenia de la microbiota presente en el tracto gastrointestinal. Por este motivo, se ha realizado una comparación entre los resultados obtenidos mediante las amplificaciones por PCRc y las obtenidas por la secuencia masiva de este gen.

3.3.1.- Preparación de las muestras

Debido al coste del análisis de las muestras mediante esta técnica de secuenciación masiva se optó por seleccionar dos experimentos para realizar esta comparación, tal como se ha descrito en el apartado 3.1.1. Además, el número de muestras se redujo de 8 a 5 por cada punto de muestreo y tratamiento. La selección de estas muestras no se realizó de forma aleatoria, sino que se tuvo en cuenta la cantidad de ADN necesaria para realizar esta técnica (5 ng/μl) y, por ello, se descartaron aquellas muestras que tenían una concentración inferior a este límite en alguno de los muestreos.

Además, al ser necesaria una cuantificación más precisa del ADN presente en las extracciones realizadas, se realizó la determinación de dicha cantidad mediante la lectura

de fluorescencia emitida por la muestra al añadirle una enzima y sustrato (Qubit dsDNA HS Assay Kit) mediante un Qubit® 3.0 Fluorometer (Thermo Scientific).

3.3.2.- Preparación de la biblioteca 16S

Las muestras fueron procesadas en el laboratorio del Dr. Paul Cotter en el Teagasc de Fermoy (Irlanda), siguiendo las indicaciones Illumina (2013) con algunas modificaciones. Se realizó la secuenciación de las regiones hipervariables V3 y V4 del gen que codifica para el ARNr 16S. La amplificación de estas dos regiones origina un fragmento amplificado de un tamaño aproximado de 460 pb mediante el uso de cebadores con adaptador. El cebador directo consta del adaptador (*cursiva*) y una parte de la región V3 (5'-*TCGTCGGCAGCGTCAGATGTGTATAAGAGACAG*CCTACGGGNGGCWGCAG-3') mientras que cebador reverso consta de adaptador (*cursiva*) y una parte de la región V4 (5'-*GTCTCGTGGGCTCGGAGATGTGTATAAGAGACAG*GACTACHVGGGTATCTAATCC-3').

El primer paso es la amplificación del fragmento V3-V4, ajustando para ello el ADN molde empleado a 25 ng en vez de a 5 µl como consta en el protocolo y ajustando el volumen final de la reacción a 50 µl con agua. Además, se incrementó el número de ciclos de la PCR subsiguiente a 30, en lugar de 25. Una vez realizada esta amplificación se verificó el tamaño del fragmento al cargar 5 µl de la reacción en un gel de agarosa al 1,5 % y tras 30 min a 100 V se observó un fragmento de aproximadamente 550 pb (fragmento amplificado más adaptadores).

El siguiente paso es la limpieza de este fragmento amplificado mediante el empleo de 36 µl de AMPure XP Beads (Beckman Coulter) por cada muestra. Tras la precipitación magnética, se eliminaron las impurezas y se lavó el ADN-perlas con 180 µl de etanol al 80 % dos veces. A continuación, se eliminó el etanol y los restos se dejaron evaporar durante 5 min. Se retiró el campo magnético y se añadieron 52,5 µl de Tris 10 mM (pH 8,5), incubando durante 5 min para que se produzca la liberación del ADN de las perlas. Por último, se vuelve a precipitar magnéticamente y se recogen 50 µl de sobrenadante para su uso posterior.

A continuación, se realizó una nueva PCR para añadir los índices del kit Nextera XT Index Kit, siguiendo el protocolo descrito por el fabricante (Illumina). A cada muestra se le añadió una combinación distinta de cebador-índice directo y reverso, de forma que una vez realizada la secuenciación masiva se pudieran asignar las lecturas obtenidas a cada muestra.

Se realizó una segunda limpieza con 56 µl de AMPure XP Beads y se obtuvieron 25 µl de ADN resuspendido en Tris 10 mM (pH 8,5). Tras esta limpieza se realizó otra comprobación en gel de agarosa, esperando un tamaño de los fragmentos amplificados de aproximadamente 630 pb.

El siguiente paso fue una nueva cuantificación del ADN para poder realizar una normalización del mismo. Esta nueva cuantificación se realizó empleando los mismos reactivos descritos en la preparación de las muestras para la secuenciación masiva, aunque

se empleó un Qubit® 2.0 Fluorometer. La concentración obtenida, expresada en ng/μl, se dividió entre el tamaño promedio del fragmento multiplicado por 660 g/mol y, todo ello, se multiplicó por 10⁶ para obtener la concentración expresada en nM.

Todas las muestras fueron normalizadas a 20 nM y, de cada una, se cogieron 5 μl para realizar una mezcla o pool por cada experimento. Se tomaron 4 μl de esta mezcla para realizar una PCRc con 4 μl de agua y 12 μl de una mezcla formada por Kapa Sybr Fast Master Mix (2X) y Library Quantification Primer Premix (10X) (Kapa Biosystems) en proporción 5:1. La curva de cuantificación se realizó con 6 puntos, con diluciones decimales de concentración conocida. La amplificación se realizó en un LightCycler 480 II (Roche Diagnostics) con el siguiente programa: desnaturalización a 95 °C durante 5 min y amplificación durante 35 ciclos a 95 °C 30 s y 60 °C 45 s.

A continuación, se comprobó el tamaño de los fragmentos amplificados de la mezcla mediante el empleo de un chip en un Agilent 2100 Bioanalyzer (Agilent Technologies), realizando la lectura por duplicado. Este paso permite conocer con mayor exactitud el tamaño medio de los fragmentos amplificados y la posible degradación de los mismos. Con la combinación de la PCRc y la comprobación del tamaño se obtiene una concentración de ADN de la mezcla de las muestras más exacta.

3.3.3.- Secuenciación

Se realizó una secuenciación de extremos apareados (*paired-end*) de 250 pb en un equipo MiSeq (Illumina). La salida de los resultados se realizó en formato Fastq y el número de ciclos fue de 502 (2 x 251, este ciclo adicional es necesario para corregir el efecto de la hebra retrasada y hebra adelantada, *phasing - prephasing*).

Previamente a la secuenciación la mezcla de muestras se ajustó a una concentración de 4 nM y se desnaturalizó con una solución de NaOH 0,2 N en proporción 1:1. Tras una incubación de 5 min a temperatura ambiente se diluyó 1:100 en el tampón de hibridación y, a continuación, se realizó otra dilución 1:5 para tener una concentración final de 4 pM. Finalmente, se mezclaron 480 μl del ADN y 120 μl del control PhiX a la misma concentración y estos 600 μl son los que se cargaron para realizar la lectura de la secuenciación.

3.3.4.- Procesamiento de las secuencias

De cada muestra analizada mediante el equipo MiSeq se obtuvo un archivo en formato *FASTQ* donde consta la secuencia de bases de cada fragmento amplificado de la región V3-V4 así como la calidad de dicha secuencia.

En primer lugar se realizó una evaluación de la calidad de las secuencias con el programa *FastQC* (v. 0.11.5) (Andrews 2016), observando la calidad de la secuencia por base, el contenido de cada nucleótido por secuencia (incluido el contenido GC y de nucleótidos sin base asignada), la longitud de las secuencias o el contenido de adaptadores entre otros parámetros.

A continuación se realizó el procesamiento de las secuencias propiamente dicho así como el análisis de los resultados mediante el protocolo basado en el software *Qiime* v. 1.9 (Caporaso *et al.*, 2010) empleado en el laboratorio del Teagasc.

En primer lugar se realizó la limpieza por calidad y longitud de las secuencias amplificadas mediante el programa *Prinseq-lite* (v. 0.20.4) (Schmieder y Edwards, 2011) con los siguientes parámetros: longitud mínima de 50 bases, la ausencia de bases sin asignar y una calidad mínima media de 20 en el extremo 3' para una ventana de 20 nucleótidos.

A continuación se unieron la secuencia directa y reversa con un solapamiento mínimo de 30 bases y un porcentaje máximo de diferencias del 25 % con el programa *FLASH* (v. 1.2.7) (Magoč y Salzberg, 2011). Todas estas secuencias unidas se concatenaron en un único archivo en el cual se cambiaron las cabeceras para que fueran reconocidas por el siguiente programa.

Se empleó el paquete *USEARCH* v. 7 (Edgar 2010) para calcular la abundancia de secuencia idénticas (continuando en el análisis como si fuera solo una), la eliminación de las secuencias únicas y de las secuencias quimera (base de datos basada en la del Broad Institute) y la agrupación de los OTU con un 97 % de identidad.

El siguiente paso fue el alineamiento de los OTU (Caporaso *et al.*, 2010), el filtrado del mismo y la creación del árbol de filogenia para poder realizar la asignación de la taxonomía mediante el uso de la versión 123 de la base de datos SILVA (Quast *et al.*, 2013).

3.3.5.- Análisis de los resultados

Tras el procesamiento de las secuencias se realizó el análisis de diversidad alfa (dentro de la misma muestra), mediante la determinación de los índices Chao1, Shannon, Simpson y el número de especies observadas en cada muestra, y la diversidad beta (entre las diferentes muestras), mediante un análisis de coordenadas principales (PCoA) a partir del índice de Bray-Curtis y de las distancias filogenéticas ponderadas o no calculadas por *Unifrac* (Lozupone y Knight, 2005), representando las muestras tridimensionalmente mediante el software *EMPeror* (Vázquez-Baeza *et al.*, 2013) incluido en *Qiime*.

Finalmente, se analizaron las diferencias existentes a nivel de género, familia y filo para las muestras de animales sometidos a diferentes tratamientos y en los tres muestreos realizados. Para ello, se realizó un análisis no paramétrico mediante Kruskal-Wallis al que se le aplicaron dos correcciones para comparaciones múltiples, la corrección de FDR de Benjamini-Hochberg y la de Bonferroni (la más estricta de las dos). La representación de la identificación de las secuencias se realizó con los paquetes *phyloseq* (McMurdie y Holmes, 2013) y *ggplot2* (Wickham, 2009) para R (v. 3.5.1 para Ubuntu).

3.4.- Determinación de lactoferrina en las heces

3.4.1.- Obtención y purificación de lactoferrina porcina

La lactoferrina es una glicoproteína asociada a procesos inflamatorios, como se ha mencionado con anterioridad, presente en la leche y en el calostro de las cerdas. Para su obtención se ordeñaron manualmente 5 cerdas tras la administración de 5 UI de oxitocina. Todas las muestras de calostro obtenidas se conservaron en refrigeración hasta su procesado. Inicialmente se desnataron a 2.500 g durante 30 min a 4 °C y, tras la eliminación de la grasa, se congelaron a -20 °C hasta su posterior envío al Departamento de Producción Animal y Ciencia de los Alimentos de la Universidad de Zaragoza, donde se realizó la purificación de la proteína y la obtención del suero policlonal por parte del grupo de investigación dirigido por la Dra. Lourdes Sánchez.

La lactoferrina fue purificada a partir de calostro desnatado mediante el protocolo descrito por Conesa y colaboradores (2008). Las muestras se diluyeron 1:1 con tampón NaH_2PO_4 0,04 M (pH 7,4) suplementado con NaCl 0,8 M y Tween 20 0,04 % y se incubaron con SP-Sepharose durante toda la noche a 4 °C. A continuación, se lavó con tampón NaH_2PO_4 0,02 M (pH 7,4) suplementado con NaCl 0,4 M y Tween 20 0,02 %. Después se eluyó con un tampón NaH_2PO_4 0,02 M (pH 7,4) suplementado con NaCl 1 M y, finalmente, se dializó frente a PBS.

La pureza de la lactoferrina porcina obtenida fue comprobada mediante SDS-PAGE con un 10 % de poliacrilamida, tiñéndose las proteínas con tinción PAS y azul de Coomassie y observándose una banda principal a un tamaño aproximado de 78 kDa y una pureza superior al 90 %. A continuación, se esterilizó mediante un filtro de baja unión a proteínas de 0,22 μm y se cuantificó mediante el método de BCA.

3.4.2.- Obtención de los anticuerpos

Se preparó un suero policlonal en conejo siguiendo el procedimiento descrito por Sánchez y colaboradores (1992) con algunas modificaciones. Se preparó un inoculo constituido por 0,5 ml de la solución de lactoferrina porcina a una concentración de 2 mg/ml y el mismo volumen del adyuvante completo de Freund (Sigma), administrando 1 ml intradérmicamente, en pequeñas cantidades y en diferentes puntos de la espalda del conejo. Al mes, se volvió a realizar la inoculación del mismo volumen, pero empleando en este caso el adyuvante incompleto de Freund. A los 10 días de la segunda inoculación se realizó la primera extracción de sangre para comprobar el éxito de la inmunización mediante un ELISA indirecto. Tras la obtención de una reacción positiva, se llevó a cabo una nueva extracción de sangre de la vena auricular y se continuó con el protocolo de inmunización, reinoculando el antígeno cada 15 días y realizando extracciones de sangre seriadas para obtener el suero policlonal.

Por otro lado, se produjeron anticuerpos monoclonales frente a la lactoferrina porcina mediante la inmunización de ratones BALB/c y fusión con células Sp2/0 (mieloma), en la empresa Abyntek Biopharma (Derio, Vizcaya).

Tras la obtención, se seleccionaron 5 sobrenadantes que fueron valorados mediante un ELISA indirecto, tapizando con 100 ng/pocillo de lactoferrina porcina y usando un anticuerpo producido en cabra anti-IgG de ratón marcado con peroxidasa (KPL). En base a los resultados obtenidos por ELISA y por SDS-PAGE, se seleccionó uno de los hibridomas, purificándose el anticuerpo monoclonal producido mediante HPLC y conjugándolo con peroxidasa de rábano picante. Abyntek Biopharma suministró este anticuerpo conjugado a una concentración de 0,588 mg/ml.

3.4.3.- ELISA sándwich

Se probaron varios diseños de ELISA con diferentes combinaciones de tapizado y revelado con los anticuerpos procedentes del suero policlonal de conejo y los anticuerpos monoclonales incluyendo el anticuerpo monoclonal marcado con peroxidasa.

El diseño final consistió en el tapizado de microplacas de poliestireno (Costar) con el suero policlonal de conejo a una concentración 1:1000 en tampón carbonato 0,1 M (pH 9,6) durante toda la noche a 4 °C (100 µl/pocillo). Posteriormente, se realizaron tres lavados con PBST y se pos-tapizaron las placas con PBS suplementado con 1 % de albúmina sérica bovina (Sigma), incubándose a 37 °C durante una hora. A continuación, se lavaron tres veces con PBST y se añadió 100 µl/pocillo de las muestras, bien lactoferrina purificada o bien las muestras de heces preparadas como se describe en el siguiente apartado. Después de una incubación de 1 hora a 37 °C se realizó un nuevo proceso de lavado, idéntico al del paso anterior, y se añadieron 100 µl/pocillo del anticuerpo monoclonal marcado con peroxidasa. Tras una nueva incubación en las mismas condiciones, se realizaron 6 nuevos lavados con PBST y se añadieron 100 µl/pocillo del sustrato (TMB Microwell Peroxidase Substrate System, KPL). Finalmente se paró la reacción con ácido sulfúrico 0,5 M (Sigma) y se leyeron las microplacas a 450 nm usando un espectrofotómetro (Titertek Multiskan Plus MK II).

3.4.4.- Cuantificación de la lactoferrina en heces

Las muestras de heces fueron diluidas 1:10 (2 g de heces en 18 ml de PBS) y homogeneizadas en un Stomacher 400 (Seward) a máxima velocidad durante 5 minutos. A continuación, se centrifugaron a 10.000 g durante 10 min y se conservó el sobrenadante a -20 °C hasta su posterior uso.

En cada microplaca de ELISA se añadieron como muestras problema una dilución 1:10 de la dilución de heces conservadas en congelación (concentración final 1:100) así como una curva de lactoferrina porcina purificada realizada mediante diluciones decimales con concentraciones desde 1 µg/ml a 1 ng/ml y un control negativo sin lactoferrina.

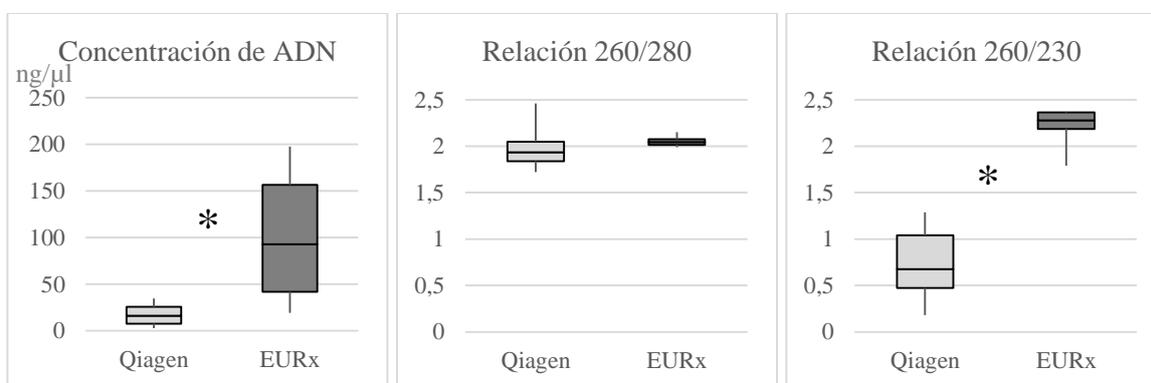
La especificidad del ELISA desarrollado se determinó mediante la valoración de la reacción producida cuando se sustituyó la lactoferrina porcina por otra de procedencia bovina (Tatua Nutritionals Company). Se comprobó que la absorbancia obtenida tras la incubación con 10 mg/g de lactoferrina bovina era equivalente a la de una concentración de lactoferrina porcina de entre 0,1 y 1 µg/g, lo que indica que el ELISA desarrollado es 10.000 veces más sensible a la lactoferrina porcina que aquella de procedencia bovina.

4.- Resultados

4.1.- Puesta a punto de las técnicas de PCRc

4.1.1.- Extracción del ADN

La comparación entre dos kit comerciales para la extracción de ADN se llevó a cabo a partir de las muestras de heces considerando tanto la cantidad y calidad del ADN extraído como el coste económico de la extracción con cada uno de ellos (Figuras 4.1, 4.2 y 4.3).



Figuras 4.1-3.- Concentración de ADN extraído mediante los dos kit comerciales valorados y calidad del mismo determinada mediante la relación de la absorbancia a 230, 260 y 280 nm. Los asteriscos indican diferencias estadísticamente significativas (* $p < 0,05$).

La comparación estadística de las diferencias mediante la prueba de Mann-Whitney-Wilcoxon determinó que la cantidad de ADN extraído por el kit GeneMATRIX® STOOL DNA Purification (EURx) fue significativamente superior ($p = 0,015$) a la obtenida mediante el kit QIAamp® DNA Stool Mini (Qiagen), siendo la cantidad extraída por este último kit prácticamente una quinta parte de la extraída con el kit de EURx.

En cuanto a la calidad de la extracción, no se observaron diferencias en la relación entre la absorbancia a 260 y 280 nm entre los dos kits de extracción evaluados ($p = 0,180$) aunque sí se observaron en la relación entre la absorbancia a 260 y 230 nm ($p = 0,002$). La cantidad de sales presentes en las muestras extraídas mediante el kit de Qiagen fue proporcionalmente superior con respecto a la cantidad de ADN, lo que podría interferir con la enzima polimerasa empleada para las PCRc posteriores.

En lo que respecta al coste, existen diferencias importantes; EURx tiene un precio por reacción 2,5 veces inferior al de Qiagen. Además, el procedimiento y el tiempo necesario para realizar la extracción son bastante similares entre los dos kit evaluados.

Teniendo en cuenta estos resultados, se decidió seleccionar el test EURx para la extracción del ADN de las muestras de heces.

4.1.2.- Curvas de cuantificación de las poblaciones bacterianas

Las suspensiones empleadas para la obtención de las curvas de cuantificación de las diferentes poblaciones bacterianas fueron inicialmente caracterizadas mediante recuento en cámara de Neubauer previa y posteriormente al ajuste de la concentración reflejada en la Tabla 3.11.

4.1.3.- Amplificación del ADN

La cuantificación de la microbiota en las heces se realizó mediante la aplicación de una PCRc para los grupos bacterianos: bacterias totales, lactobacilos, enterobacterias, bacteroides, bifidobacterias y clostridios clúster I, IV y XIV (incluye los subclúster XIVa y XIV b).

En primer lugar se realizó una validación de los cebadores seleccionados (Tabla 3.11) para comprobar que la amplificación fuera específica de los grupos estudiados, valorando todas las PCRc desarrolladas con las cepas bacterianas descritas en la Tabla 4.1.

Tabla 4.1.- Validación de los cebadores basados en el ARNr 16S para el análisis por PCRc de la microbiota digestiva.

Cepa bacteriana	BT	Bact	Lact	Ent	Bif	cI	cIV	cXIV
<i>B. coprosuis</i> DSM 18011	+	+	-	-	-	-	-	-
<i>Bacteroides gallinarum</i> DSM 18171	+	+	-	-	-	-	-	-
<i>Prevotella bryantii</i> DSM 11371	+	+	-	-	-	-	-	-
<i>L. plantarum</i> CECT 748	+	-	+	-	-	-	-	-
<i>Lactobacillus delbrueckii</i> CECT 4005	+	-	+	-	-	-	-	-
<i>Lactobacillus reuteri</i> CEI 69	+	-	+	-	-	-	-	-
<i>E. coli</i> ATCC 11775	+	-	-	+	-	-	-	-
<i>E. coli</i> CECT 434	+	-	-	+	-	-	-	-
<i>Salmonella enterica</i> Typhimurium CECT 443	+	-	-	+	-	-	-	-
<i>B. bifidum</i> CECT 870	+	-	-	-	+	-	-	-
<i>B. gallicum</i> CECT 5778	+	-	-	-	+	-	-	-
<i>C. perfringens</i> CECT 376	+	-	-	-	-	+	-	-
<i>C. perfringens</i> CECT 820	+	-	-	-	-	+	-	-
<i>Clostridium sporogenes</i> ACCT 19404	+	-	-	-	-	+	-	-
<i>C. leptum</i> DSM 753	+	-	-	-	-	-	+	-
<i>Faecalibacterium prausnitzii</i> DSM 17677	+	-	-	-	-	-	+	-
<i>B. coccoides</i> DSM 935	+	-	-	-	-	-	-	+
<i>Eubacterium rectale</i> DSM 17629	+	-	-	-	-	-	-	+
<i>Clostridium herbivorans</i> DSM 14428	+	-	-	-	-	-	-	+
<i>Clostridium lactatifermentans</i> DSM 14214	+	-	-	-	-	-	-	+
<i>Clostridium colinum</i> DSM 6011	+	-	-	-	-	-	-	+
<i>Clostridioides difficile</i> CECT 531	+	-	-	-	-	-	-	-
<i>C. difficile</i> CEI Cd1	+	-	-	-	-	-	-	-

CEI: Colección de Enfermedades Infecciosas de la Universidad de León. +: reacción específica con menos de 1 Ct de desviación ; -: ausencia de reacción, inferior al límite de detección o reacción inespecífica.

A continuación se comprobó la eficiencia de cada una de las reacciones: bacterias totales $95,49 \pm 4,68$; bacteroides $95,04 \pm 5,17$; lactobacilos $87,45 \pm 7,03$; enterobacterias $85,47 \pm 4,25$; bifidobacterias $92,59 \pm 8,76$; clostridios clúster I $81,34 \pm 4,06$; clostridios clúster IV $90,23 \pm 2,50$; y clostridios clúster XIV $94,58 \pm 4,23$.

El límite de detección fue: bacterias totales $4,65E+05 \pm 6,12E+05$; bacteroides $1,12E+05 \pm 2,52E+05$; lactobacilos $1,08E+03 \pm 2,21E+03$; enterobacterias $1,79E+04 \pm 4,90E+04$; bifidobacterias $1,35E+04 \pm 1,46E+04$; clostridios clúster I $7,41E+03 \pm 1,66E+04$; clostridios clúster IV $4,55E+03 \pm 6,27E+03$; y clostridios clúster XIV $6,77E+04 \pm 5,09E+04$.

4.2.- Comparación entre la secuenciación masiva y las PCRc para la caracterización de la microbiota digestiva

Para conocer la relación entre los resultados obtenidos con las PCRc desarrolladas para estudiar la microbiota intestinal de los cerdos y los de la secuenciación masiva, técnica de referencia, se analizaron dos de los estudios en los cuales se modificó la dieta de los lechones, uno de ellos durante la lactación y otro durante la transición.

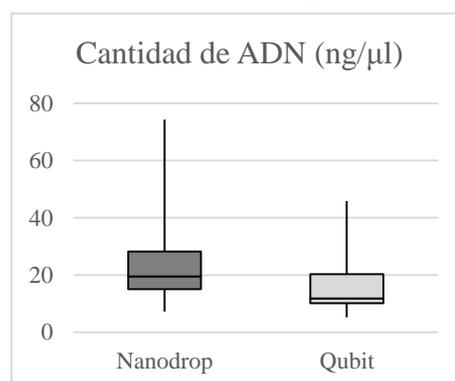
4.2.1.- Determinación de la microbiota durante la lactación

En el primero de los estudios realizados durante la lactación de los lechones se incorporó un lactorreemplazante sin reconstituir del día 3 al 12 de vida de los lechones del grupo experimental (estudio de comparación 1). De cada camada se envió un pool de heces en tres muestreos.

4.2.1.1.- Extracción del ADN

Se comprobó la cantidad y calidad de la extracción mediante la medida de la absorbancia a 260, 230 y 280 nm. La relación entre el ADN y las proteínas (260/280) fue de $2,01 \pm 0,24$ mientras que la relación de la absorbancia medida a 260 y 230 fue ligeramente peor, de $1,71 \pm 0,57$. Además, las muestras analizadas mediante secuenciación masiva fueron valoradas mediante una reacción enzimática que fue leída con el Qubit® (Figura 4.4).

Figura 4.4.- Comparación de la cantidad de ADN en las muestras evaluadas mediante Nanodrop y Qubit en el estudio de comparación 2.



4.2.1.2.- Cuantificación de la microbiota mediante PCRc

Se realizó un estudio longitudinal con los recuentos obtenidos de las poblaciones bacterianas analizadas a lo largo del estudio, tomando las muestras de ambos grupos experimentales, testigo y tratamiento, para analizar la evolución de la microbiota a lo largo de los tres muestreos realizados en el experimento (tras la toma del calostro, a mitad de lactación y 7 días posdestete). Los resultados más destacados se describen a continuación.

Como se puede apreciar en la Figura 4.5, las bacterias totales se incrementaron significativamente entre el primer y segundo muestreo ($p = 0,008$), permaneciendo más o menos estables hasta el último muestreo. No se observaron diferencias significativas en las poblaciones de bacteroides-*Prevotella* ni de bifidobacterias a lo largo del estudio. Las poblaciones de lactobacilos y enterobacterias fueron inferiores en el último muestreo con respecto al primer ($p < 0,001$ para ambas poblaciones) y segundo muestreo ($p = 0,003$ y $p < 0,001$, respectivamente). Por último, se observaron cambios en las poblaciones de clostridios; el clúster I disminuyó entre el primer y segundo muestreo ($p < 0,001$), incrementándose en el tercer muestreo ($p = 0,005$), mientras que el clúster IV y XIV tuvieron un comportamiento inverso, incrementándose durante los dos primeros muestreos ($p = 0,002$ y $p = 0,019$, respectivamente) y disminuyendo a continuación ($p = 0,039$ para el clúster XIV).

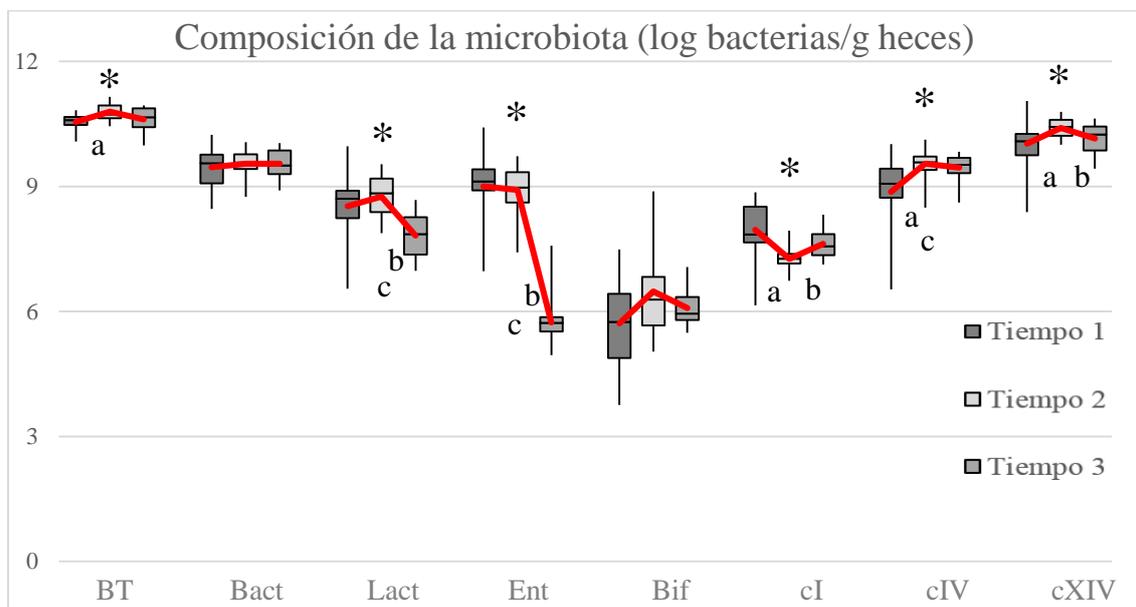


Figura 4.5.- Composición de la microbiota digestiva determinada mediante PCRc a lo largo de los muestreos realizados: tras la toma del calostro (tiempo 1), a mitad de lactación (tiempo 2) y 7 días posdestete (tiempo 3) en el estudio de comparación 1. Los asteriscos y letras indican diferencias estadísticamente significativas (* $p < 0,05$: comparación tiempo 1-2-3; a: comparación tiempo 1-2; b: comparación tiempo 2-3; c: comparación tiempo 1-3).

En cuanto a la proporción de las poblaciones bacterianas analizadas se observaron diferencias significativas en el porcentaje de lactobacilos, enterobacterias y los tres clúster de clostridios (Figura 4.6). El porcentaje de lactobacilos se redujo progresivamente a lo largo del estudio, siendo esta diferencia significativa entre los tiempos 2 y 3 ($p < 0,001$)

y entre los tiempos 1 y 3 ($p < 0,001$). La proporción de enterobacterias también se redujo a lo largo del estudio: $p = 0,026$ entre los dos primeros muestreos y $p < 0,001$ entre los dos últimos. En el caso de los clostridios del clúster I, su proporción disminuyó entre los dos primeros muestreos ($p < 0,001$) y se incrementó entre el segundo y tercer muestreo ($p < 0,001$). La proporción de clostridios del clúster IV y XIV se incrementó entre el primer y segundo muestreo ($p < 0,001$). También se comprobó que, aunque el porcentaje de bacteroides no presentó diferencias en el análisis global, existió un incremento significativo de este grupo entre el segundo y tercer muestreo ($p = 0,032$).

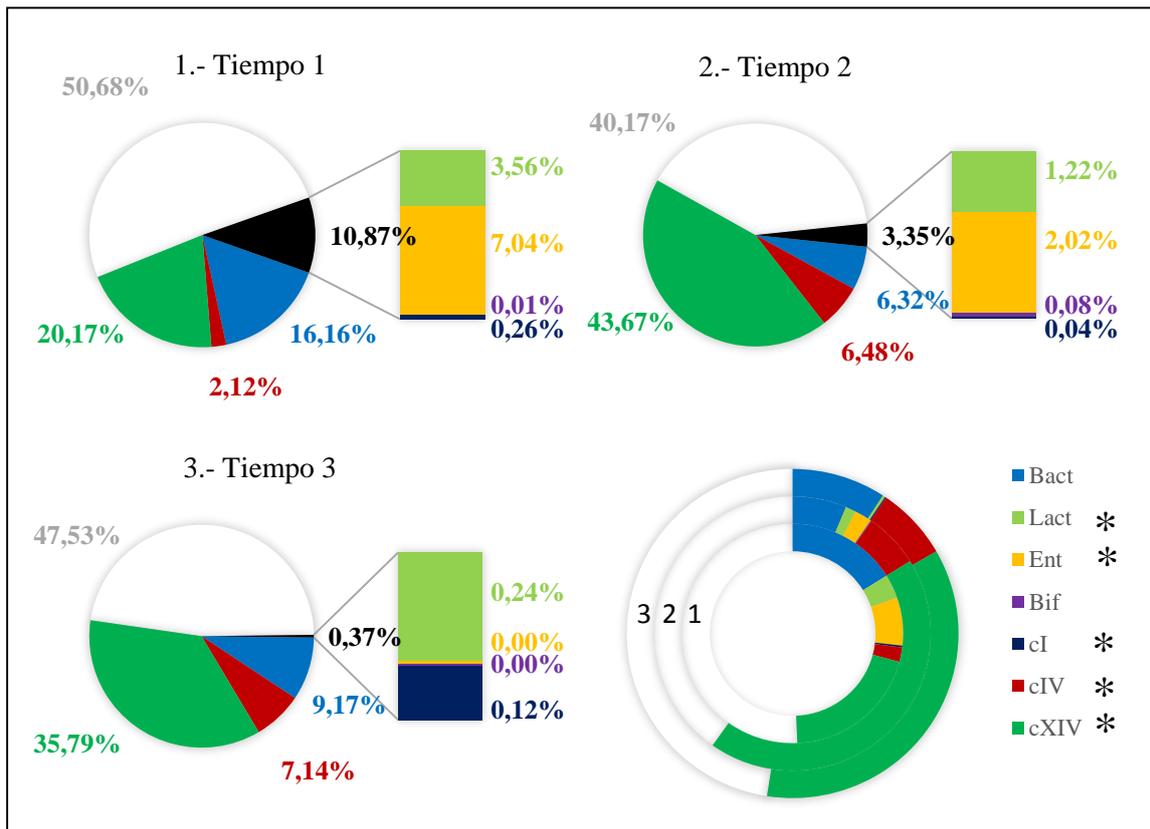


Figura 4.6.- Porcentajes medios relativos de las poblaciones bacterianas analizadas mediante PCRc en los lechones del estudio de comparación 1 y a lo largo del periodo de seguimiento (* diferencias significativas $p < 0,05$): tiempo 1 (tras la toma del calostro), tiempo 2 (a mitad de lactación) y tiempo 3 (a los 7 días posdestete).

Por último, el Índice de Salud Intestinal calculado fue superior en el tercer muestreo con respecto a los datos obtenidos en el primer y segundo muestreo ($p < 0,001$ y $p < 0,001$, respectivamente) (Figura 4.7).

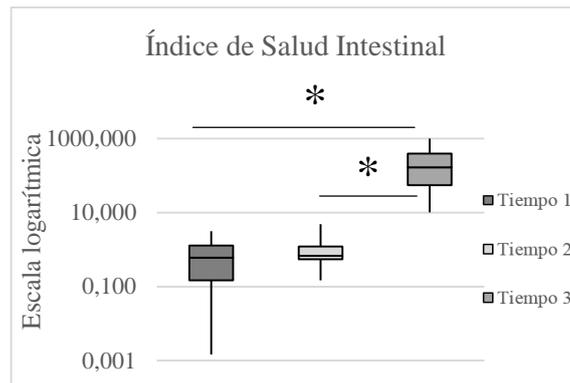


Figura 4.7.- Índice de Salud Intestinal (escala logarítmica) a lo largo del estudio: tras la toma del calostro (tiempo 1), a mitad de lactación (tiempo 2) y 7 días posdestete (tiempo 3) (* diferencias significativas $p < 0,05$).

En la comparación de los resultados obtenidos para los dos grupos experimentales a la mitad de la lactación (tiempo 2) teniendo en cuenta los resultados obtenidos tras la toma del calostro (tiempo 1), no se observaron diferencias significativas entre los grupos testigo y experimental empleando ANCOVA (Figuras 4.8 y 4.9).

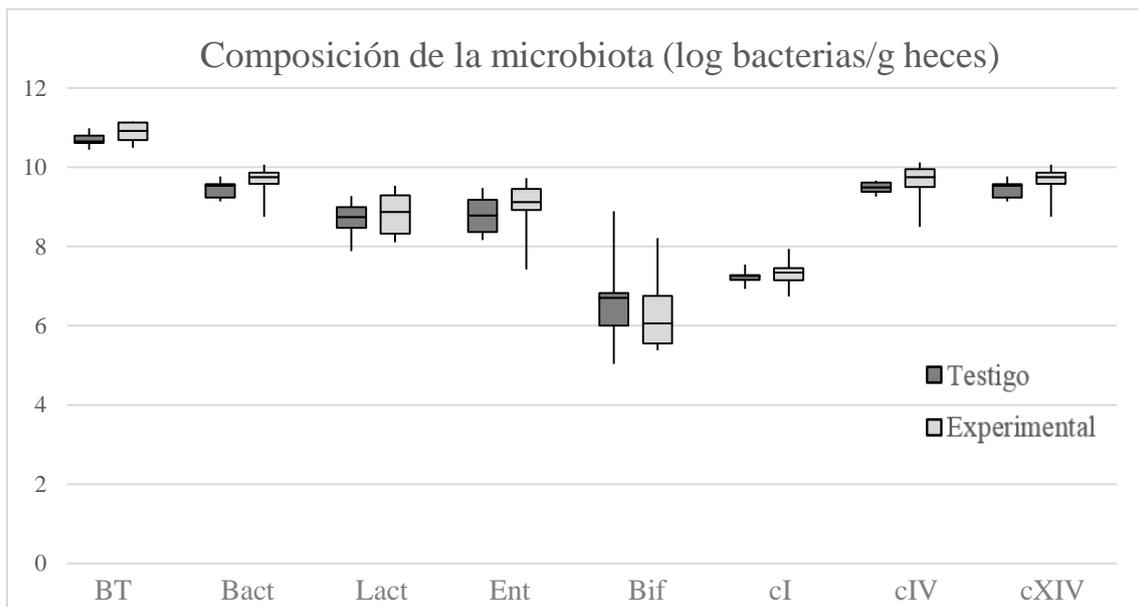


Figura 4.8.- Comparación de la composición de la microbiota digestiva a la mitad de la lactación (tiempo 2) en los lechones del grupo testigo y del grupo experimental durante el estudio de comparación 1.

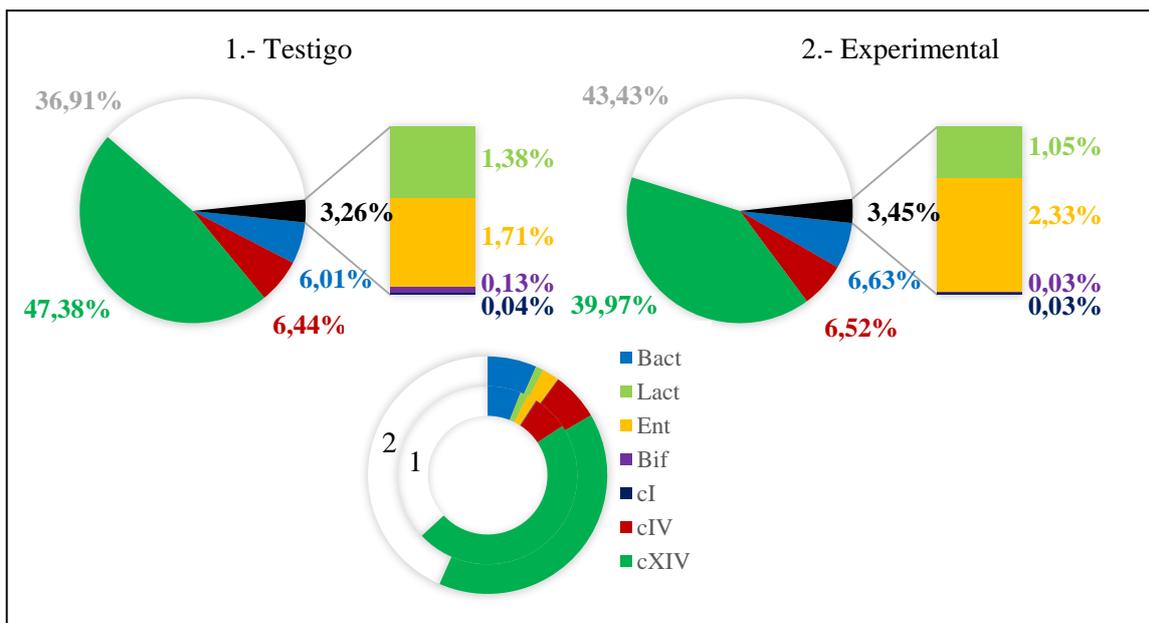


Figura 4.9.- Porcentajes medios relativos de las poblaciones bacterianas analizadas de los lechones del grupo testigo (1) y del grupo experimental (2) durante el muestreo realizado a mitad de lactación (tiempo 2) durante el estudio de comparación 1.

Por último, el Índice de Salud Intestinal calculado en el segundo muestreo para los dos grupos de animales no mostró diferencias significativas ($p = 0,696$) (Figura 4.10).

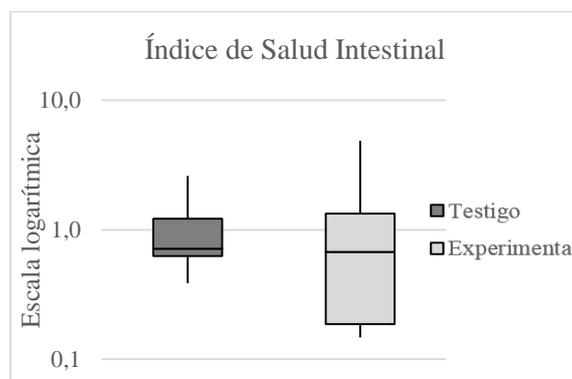


Figura 4.10.- Índice de Salud Intestinal (escala logarítmica) obtenido para los dos grupos de animales, testigo y experimental, a mitad de lactación (tiempo 2) durante el estudio de comparación 1.

En la comparación de los resultados obtenidos para los dos grupos experimentales a los 7 días posdestete (tiempo 3), teniendo en cuenta los resultados obtenidos tras la toma del calostro (tiempo 1) mediante un ANCOVA, no se observaron diferencias significativas entre los grupo testigo y experimental (Figuras 4.11 y 4.12).

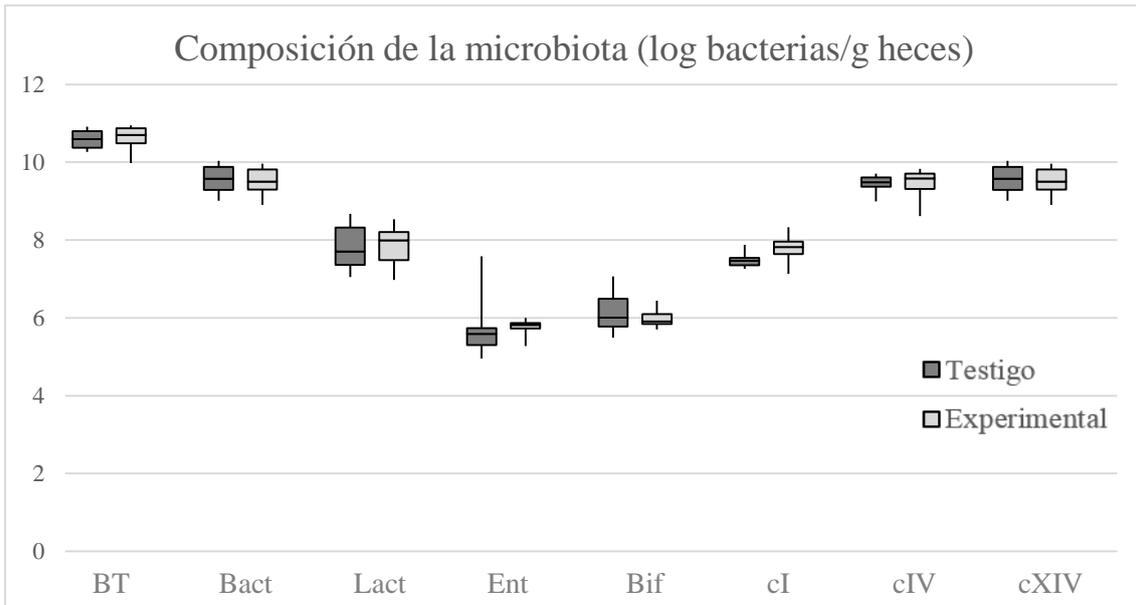


Figura 4.11.- Comparación de la composición de la microbiota digestiva al día 7 tras el destete (tiempo 3) en los lechones del grupo testigo y del grupo experimental durante el estudio de comparación 1.

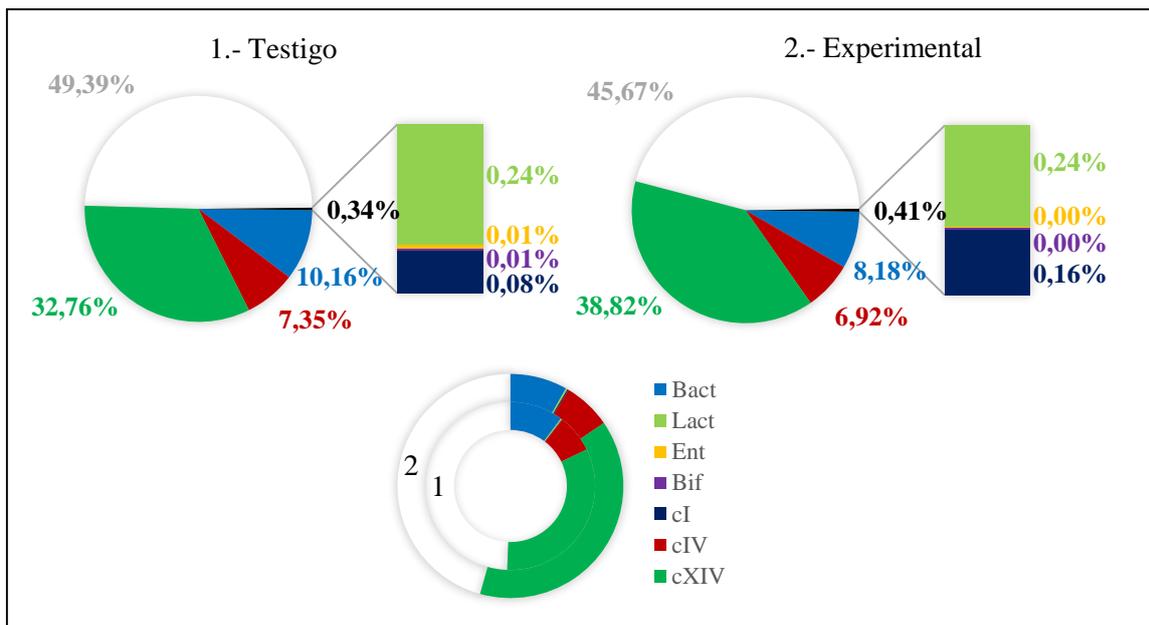


Figura 4.12.- Porcentajes medios relativos de las poblaciones bacterianas analizadas de los lechones del grupo testigo (1) y del grupo experimental (2) durante el muestreo realizado a los 7 días pos-destete (tiempo 3) durante el estudio de comparación 1.

Por último, el Índice de Salud Intestinal calculado en el tercer muestreo para los dos grupos de animales tampoco mostró diferencias significativas entre los dos grupos de tratamiento ($p = 0,9236$) (Figura 4.13).

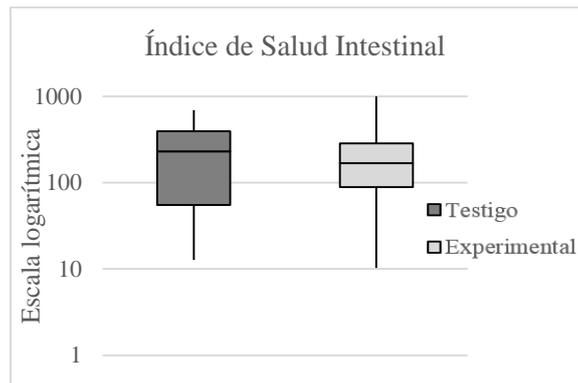


Figura 4.13.- Índice de Salud Intestinal (escala logarítmica) obtenido para los dos grupos de animales, testigo y experimental, en el muestreo realizado a los 7 días pos-destete (tiempo 3) durante el estudio de comparación 1.

4.2.1.3.- Secuenciación masiva mediante amplificación del gen que codifica para el ARNr 16S

En primer lugar se analizó la diversidad alfa de cada muestra a lo largo del estudio a través de 4 índices (Figura 4.14). Todos los índices se incrementaron significativamente a lo largo del estudio ($p < 0,001$), tanto en la comparación entre el muestreo realizado tras la toma del calostro (tiempo 1) y la mitad de la lactación (tiempo 2), como entre el segundo muestreo y el final (7 días pos-destete).

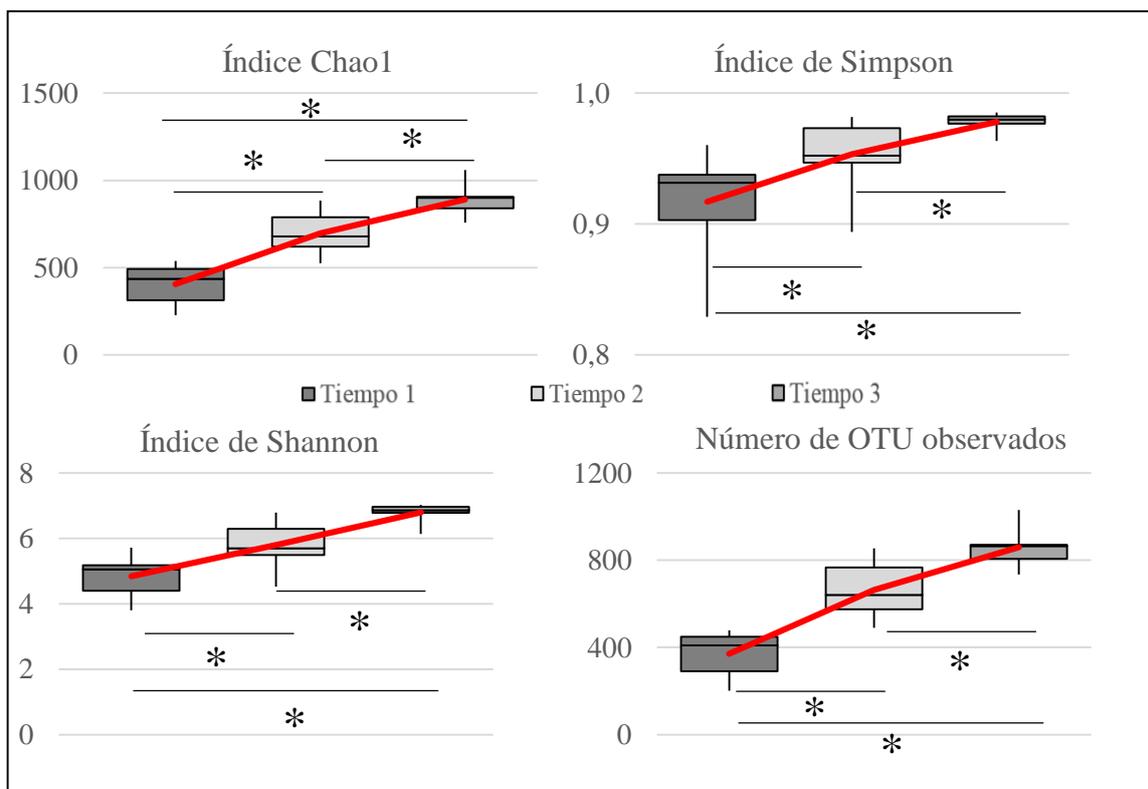


Figura 4.14.- Variaciones en la diversidad alfa en la microbiota digestiva determinada por secuenciación masiva en los tres muestreos realizados a lo largo del estudio de comparación 1 medida a través de 4 índices: Chao1, Simpson, Shannon y el número de OTU observados. Los asteriscos indican diferencias significativas ($* p < 0,05$).

Cuando la comparación de estos índices de diversidad alfa se realizó entre los dos tratamientos que recibieron los animales en cada muestreo realizado apenas se encontraron diferencias (Figura 4.15). Solo se observaron diferencias entre los dos grupos experimentales del estudio, testigo y tratamiento, en el primer muestreo realizado para el índice de Simpson ($p = 0,008$) y el índice de Shannon ($p = 0,032$), que fueron superiores en los animales que recibieron el lactoreemplazante con respecto a aquellos que no recibieron. También presentaron un mayor índice de Shannon los animales del grupo experimental con respecto al grupo testigo en el último muestreo, aunque no se alcanzó la significación estadística ($p = 0,151$).

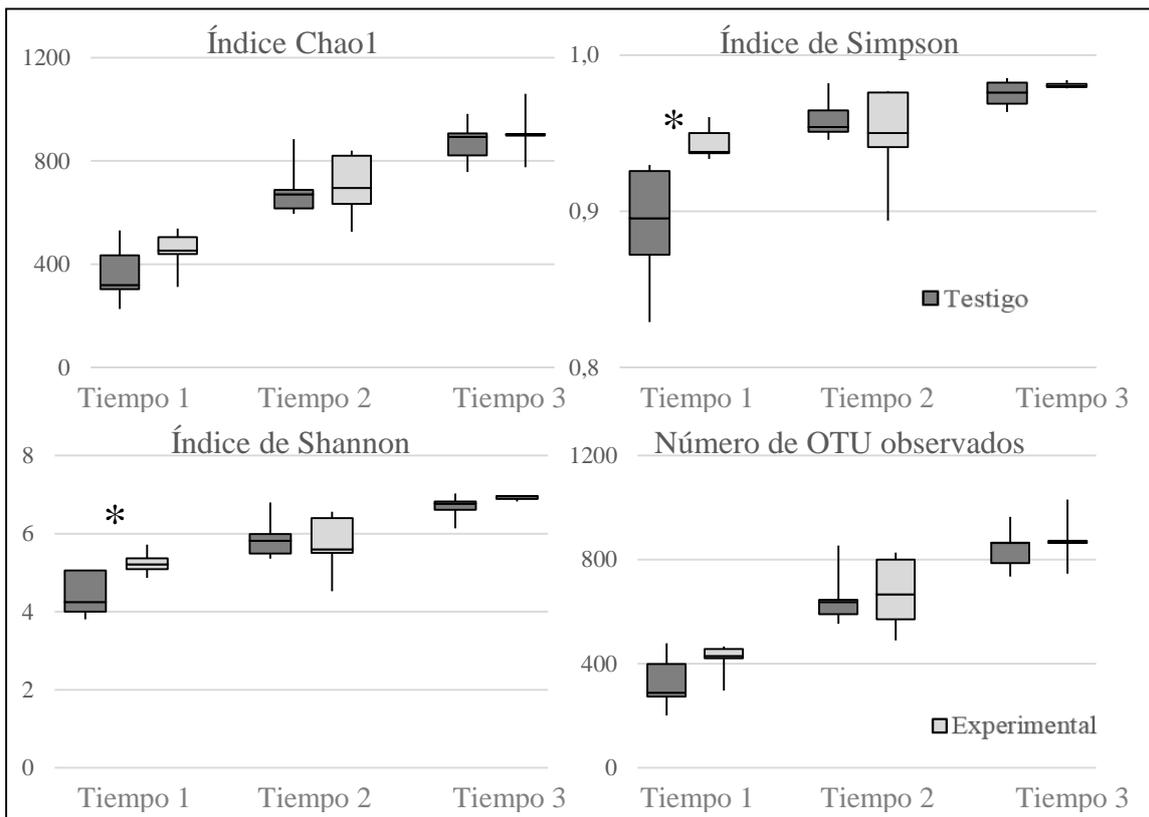


Figura 4.15.- Variaciones en la diversidad alfa de la microbiota digestiva determinada por secuenciación masiva en los dos grupos experimentales y a lo largo del estudio de comparación 1 medida a través de 4 índices: Chao1, Simpson, Shannon y el número de OTU observados. Los asteriscos indican diferencias significativas (* $p < 0,05$).

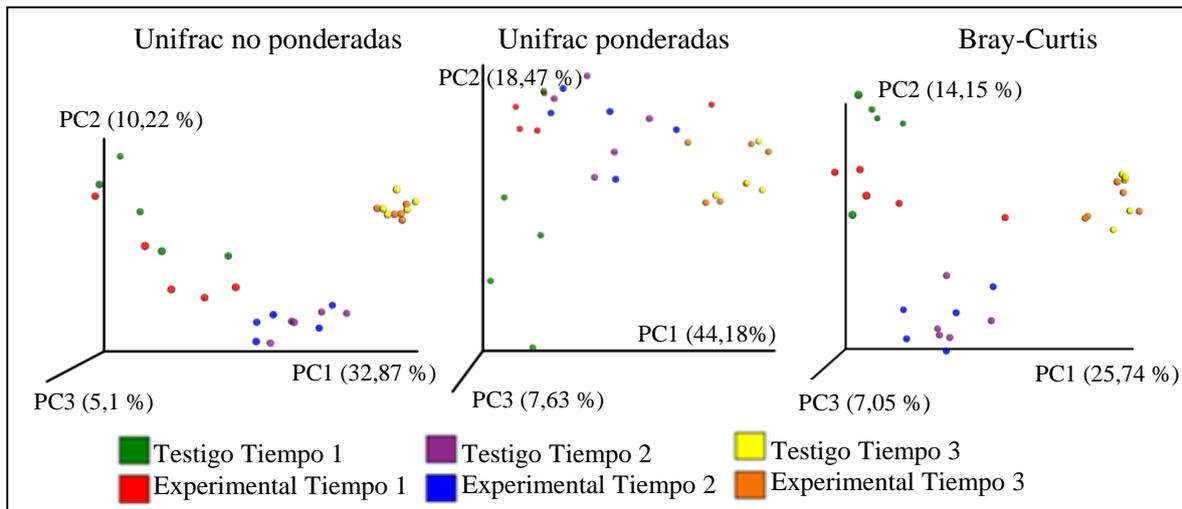


Figura 4.16.- Variaciones en la diversidad beta de la microbiota digestiva determinada por secuenciación masiva en los dos grupos experimentales y a lo largo del estudio de comparación 1 calculadas mediante el índice de Bray-Curtis y las distancias filogenéticas calculadas por *Unifrac* (ponderadas y no ponderadas).

En cuanto al análisis de la diversidad beta se observó que las muestras se agrupan entre ellas, en base al muestreo al que pertenecen según el índice de Bray-Curtis o las distancias no ponderadas por *Unifrac*. En cambio, con las distancias ponderadas, las muestras tomadas tras la toma del calostro (tiempo 1) y a mitad de lactación (tiempo 2) se entremezclan entre ellas. Por otro lado, teniendo en cuenta las muestras separadas por grupo experimental, éstas no se separan claramente unas de otras, independientemente de método empleado para calcular la diversidad beta (Figura 4.16).

La distribución de los filos detectados en las muestras del estudio de comparación 1 (lactación) se muestra en la Figura 4.17. De forma mayoritaria, las secuencias analizadas pertenecieron al filo Firmicutes (52 %) y al Bacteroidetes (32 %). En menor proporción nos encontramos con los filos Proteobacteria (8 %), Fusobacteria (4 %), Spirochaetae (1 %), Actinobacteria (1 %) o Synergistetes (1 %).

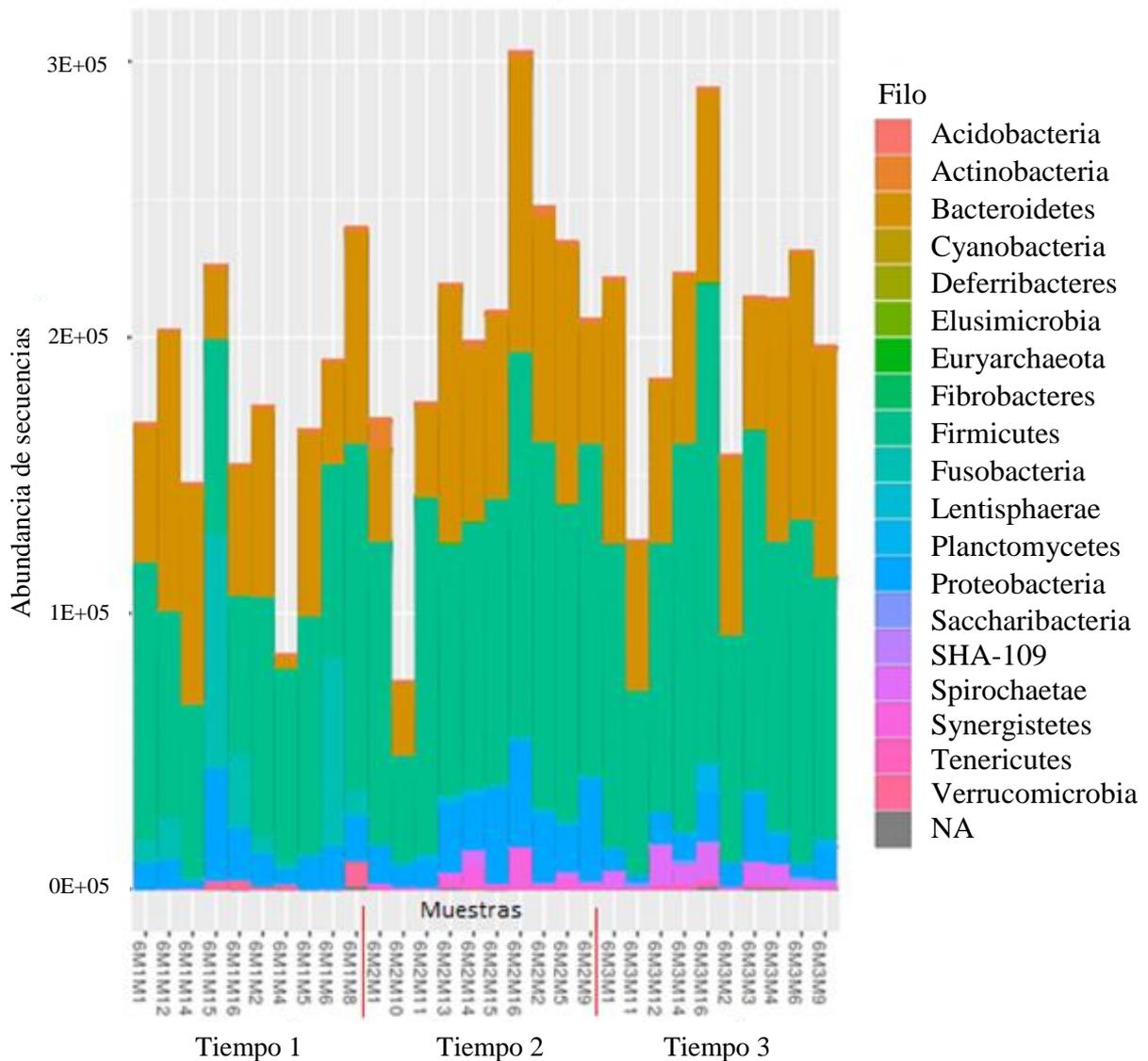


Figura 4.17.- Distribución de los filos identificados en base al número de secuencias asignadas a cada taxón para el total de las muestras procesadas mediante secuenciación masiva en el estudio de comparación 1.

En el análisis estadístico no paramétrico realizado a nivel de filo se observaron diferencias significativas a lo largo de los muestreos realizados mientras que en las comparaciones realizadas entre los dos grupos de animales, testigo y experimental, apenas hubo diferencias.

Los filos Firmicutes, Bacteroidetes y Acidobacteria no presentaron diferencias entre los tres muestreos realizados mientras que el filo Fusobacteria disminuyó (11,41, 0,20 y 0,01 % por tiempo 1, 2 y 3, respectivamente) y los filos Spirochaetae (0,05, 0,65 y 2,82) y Synergistetes (0,01, 1,06 y 0,05) se incrementaron claramente entre el primer y segundo muestreo ($p < 0,001$ con la corrección de Bonferroni) (Figura 4.18).

Por otro lado, la comparación a tiempo 1, 2 y 3 no demostró diferencias con las correcciones de Bonferroni o FDR entre los dos grupos de tratamiento. Tan solo en el muestreo realizado tras el encalostramiento, existieron diferencias en el filo

Proteobacteria ($p = 0,026$), cuya abundancia fue superior en los animales del grupo testigo.

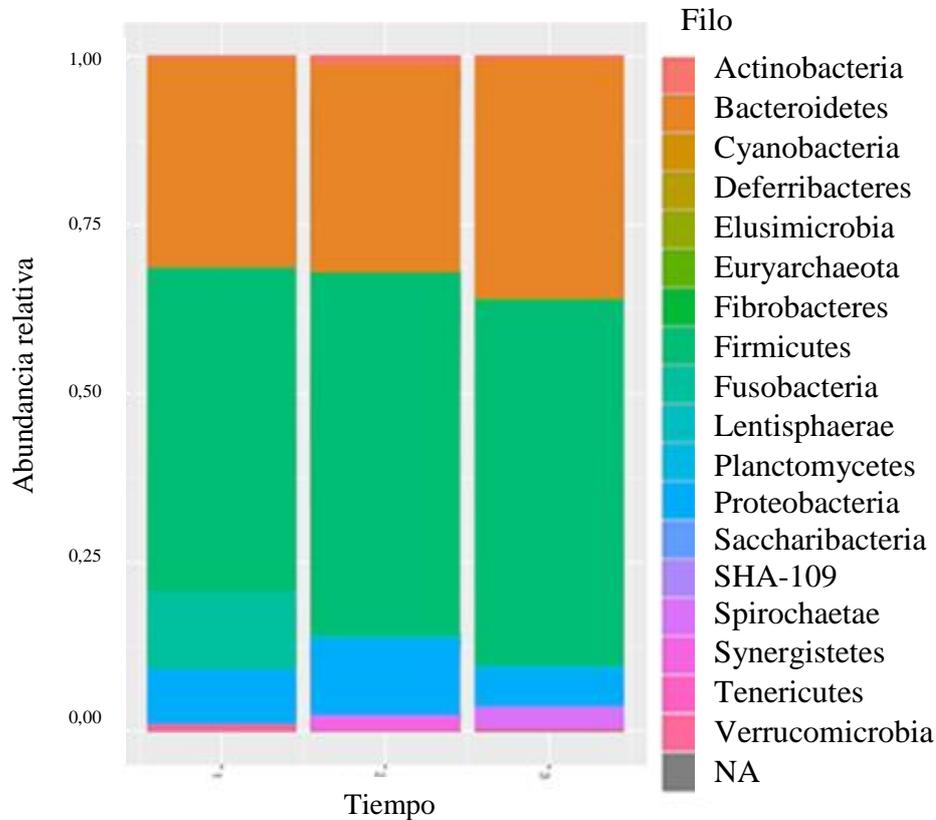


Figura 4.18.- Distribución de la abundancia relativa media de los filos identificados en la microbiota digestiva determinada mediante secuenciación masiva en los tres muestreos realizaos (tras el encalostramiento o tiempo 1, a mitad de lactación o tiempo 2 y a los 8 días del destete o tiempo 3) en el estudio de comparación 1.

A nivel de familia, los 10 primeros taxones están descritos en la Figura 4.19. De estas 10 familias solo una de ellas (Porphyromonadaceae) no presentó diferencias significativas por Kruskal-Wallis a lo largo del estudio ($p = 0,084$), cinco (Enterobacteriaceae $p = 0,007$, Fusobacteriaceae $p < 0,001$, Prevotellaceae $p = 0,030$, Rikenellaceae $p = 0,032$ y Ruminococcaceae $p = 0,008$) presentaron diferencias por Bonferroni, dos (Bacteroidaceae y Lactobacillaceae, $p = 0,003$ en ambos casos) presentaron diferencias por la corrección FDR y solo dos familias (Lachnospiraceae $p = 0,038$ y la familia S24-7 de los Bacteroidales $p = 0,034$) presentaron diferencias sin hacer las correcciones para comparaciones múltiples.

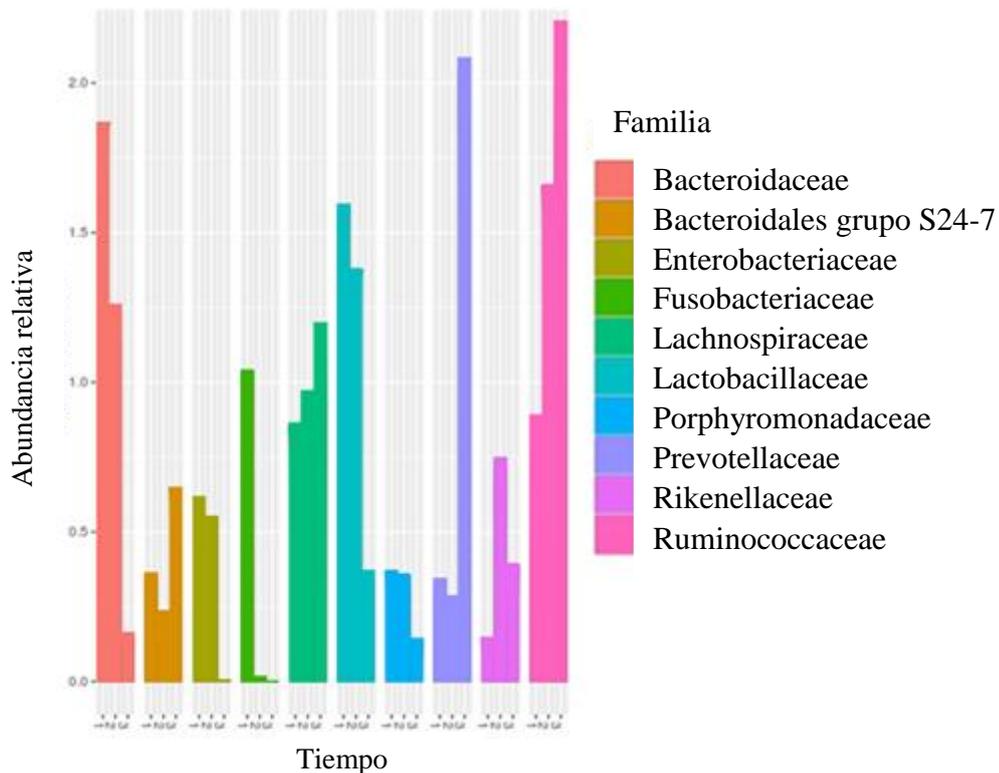


Figura 4.19.- Distribución de la abundancia relativa media de las 10 familias de la microbiota digestiva determinada mediante secuenciación masiva identificadas más frecuentemente en los tres muestreos realizados (tras el encalostramiento o tiempo 1, a mitad de lactación o tiempo 2 y a los 8 días del destete o tiempo 3) en el estudio de comparación 1.

En el análisis estadístico global realizado a nivel de familia se observaron diferencias a lo largo del estudio en un total de 31 familias mediante la corrección de Bonferroni, 67 mediante la corrección FDR y 73 sin aplicar ninguna de estas correcciones. En cambio, en la comparación de las familias entre los dos grupos de animales, testigo y experimental, en cada uno de los muestreos realizados no se observaron diferencias significativas aplicando las correcciones para comparaciones múltiples.

A tiempo 1 (Figura 4.20), las 10 familias más abundantes fueron: Bacteroidaceae (18,7 %), Lactobacillaceae (15,9 %), Fusobacteriaceae (10,4 %), Ruminococcaceae (8,9 %), Lachnospiraceae (8,6 %), Enterobacteriaceae (6,2 %), Streptococcaceae (5,3 %), Clostridiaceae *sensu stricto* (4,4 %), Porphyromonadaceae (3,7 %) y la familia S24-7 de los Bacteroidales (3,6 %). Los animales del grupo testigo presentaron mayor abundancia relativa de Peptostreptococcaceae ($p = 0,016$), Enterobacteriaceae ($p = 0,028$) y Veillonellaceae ($p = 0,047$) con respecto al grupo experimental, 2,16 % frente a 0,70 %, 8,86 % frente a 3,48 % y 1,29 % frente a 0,44 %, respectivamente. En cambio, la familia Oxalobacteraceae presentó un 0,0034 % de abundancia relativa en lechones del grupo experimental frente al 0,0005 % en lechones testigo ($p = 0,034$).

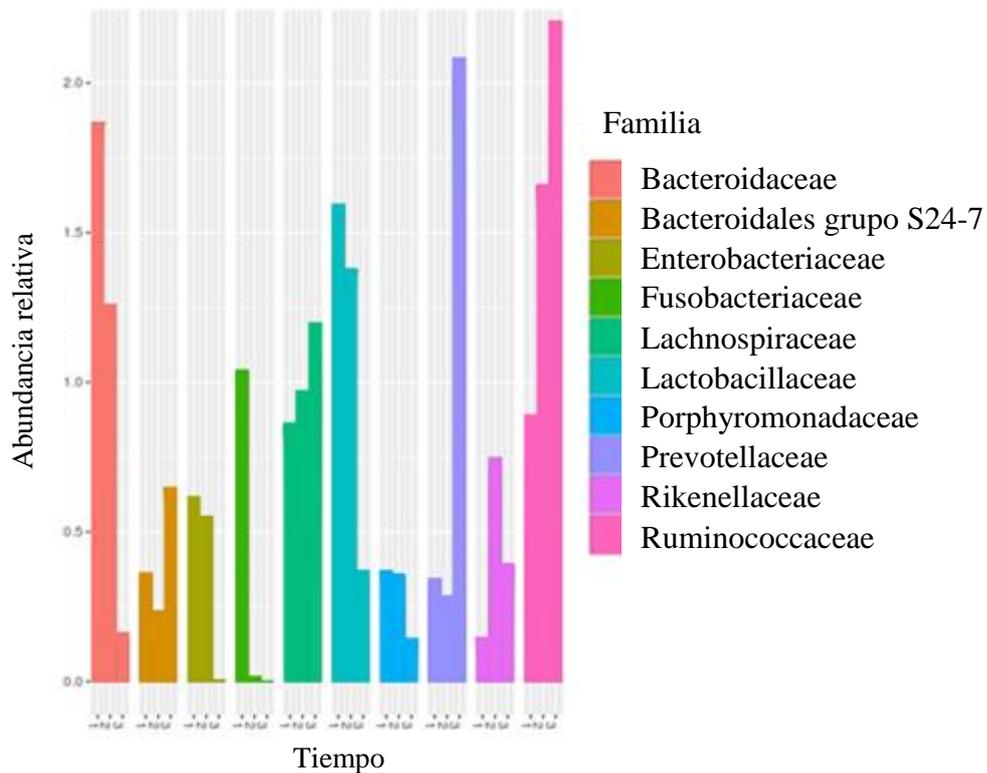


Figura 4.20.- Distribución de la abundancia relativa media de las 10 familias de la microbiota digestiva determinada mediante secuenciación masiva identificadas con mayor frecuencia en el primer muestreo (tras el encalostramiento o tiempo 1) en los animales de los dos grupos experimentales del estudio de comparación 1.

A tiempo 2 (Figura 4.21), las 10 familias más abundantes fueron: Ruminococcaceae (16,6 %), Lactobacillaceae (13,8 %), Bacteroidaceae (12,6 %), Lachnospiraceae (9,7 %), Rikenellaceae (7,5 %), Enterobacteriaceae (5,5 %), Porphyromonadaceae (3,6 %), Acidaminococcaceae (3,5 %), Christensenellaceae (3,2 %) y Prevotellaceae (2,9 %). Los animales del grupo testigo presentaron menor abundancia relativa de Desulfovibrionaceae ($p = 0,028$) y Planctomycetaceae ($p = 0,047$) con respecto al grupo experimental, 0,73 % frente a 1,52 % y 0,22 % frente a 0,58 %, respectivamente.

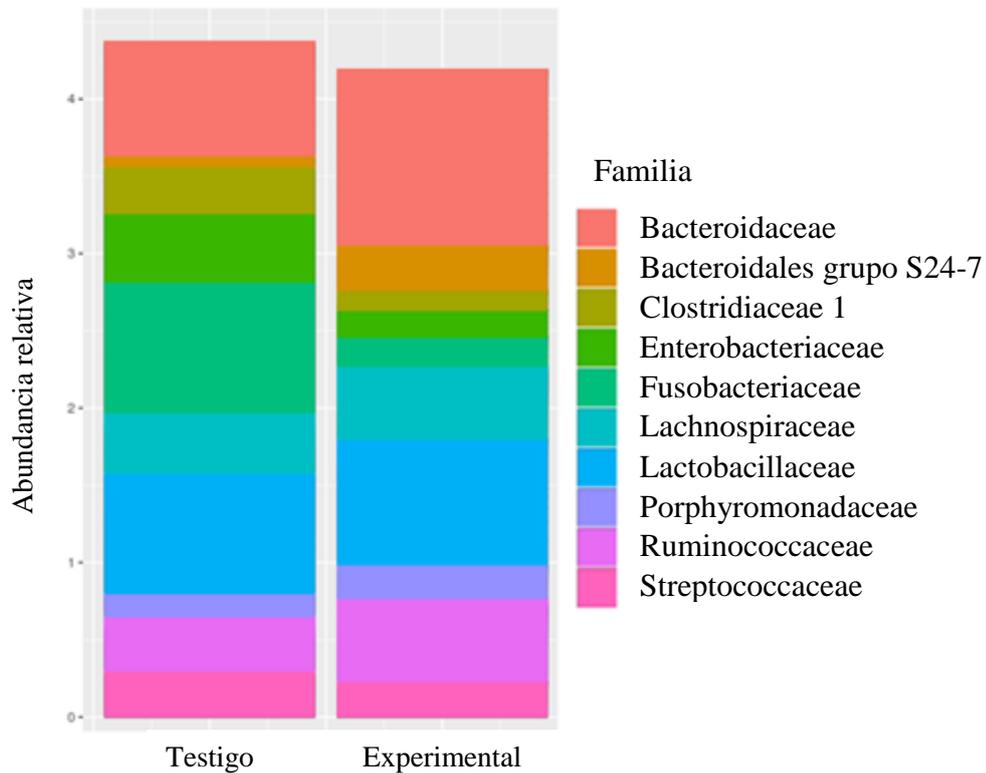


Figura 4.21.- Distribución de la abundancia relativa media de las 10 familias de la microbiota digestiva determinada mediante secuenciación masiva identificadas con mayor frecuencia en el segundo muestreo (a mitad de lactación o tiempo 2) en los animales de los dos grupos experimentales del estudio de comparación 1.

Finalmente, a tiempo 3 (Figura 4.22), las 10 familias más abundantes fueron: Ruminococcaceae (22,0 %), Prevotellaceae (20,8 %), Lachnospiraceae (12,0 %), familia S24-7 de los Bacteroidales (6,5 %), Rikenellaceae (3,9 %), Lactobacillaceae (3,7 %), Christensenellaceae (3,3 %), Acidaminococcaceae (3,5 %), Spirochaetaceae (2,8 %) y Erysipelotrichaceae (2,7 %). Los animales del grupo testigo presentaron menor abundancia relativa de Clostridiaceae *sensu stricto* ($p = 0,016$), Defluviitaleaceae ($p = 0,045$) y Peptostreptococcaceae ($p = 0,047$), así como de otras 3 familias no clasificadas, con respecto al grupo experimental, 0,72 % frente a 2,24 %, 0,003 % frente a 0,047 % y 0,22 % frente a 0,91 %, respectivamente. Por el lado contrario, presentaron una mayor abundancia de Bacillaceae ($p = 0,028$) y Alcaligenaceae ($p = 0,047$), así como de otra familia no clasificada, que los animales que recibieron el lactoreemplazante.

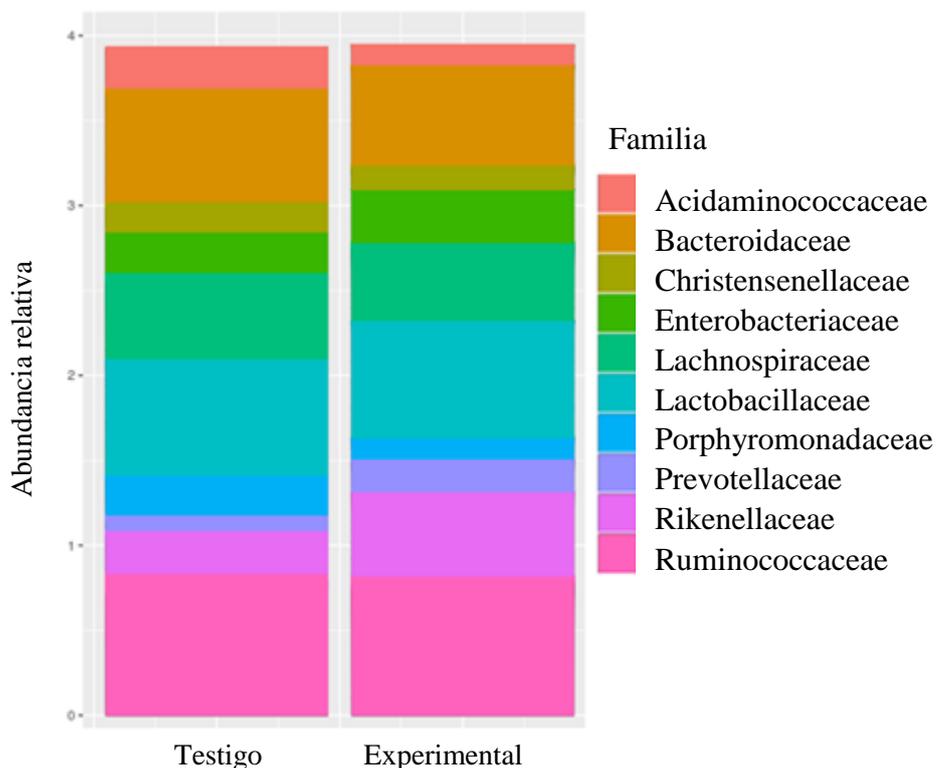


Figura 4.22.- Distribución de la abundancia relativa media de las 10 familias de la microbiota digestiva determinada mediante secuenciación masiva identificadas con mayor frecuencia en el tercer muestreo (a los 7 días del destete o tiempo 3) en los animales de los dos grupos experimentales del estudio de comparación 1.

A nivel de género, los 5 primeros taxones fueron: *Lactobacillus* (11,1 %), *Bacteroides* (11,0 %), un género no cultivado de la familia S24-7 de los Bacteroidales (4,1 %), un género de la familia Ruminococcaceae (UCG-002) (3,9 %) y *Escherichia-Shigella* (3,9 %). En el análisis estadístico global realizado a nivel de género se observaron diferencias, a lo largo del estudio, en 72 géneros mediante la corrección de Bonferroni, 189 mediante la corrección FDR y 210 sin aplicar estas correcciones para un nivel de significación de $p < 0,05$. En cambio, en la comparación entre los dos grupos de animales, testigo y experimental, en cada uno de los muestreos realizados no se observaron diferencias significativas aplicando las correcciones para comparaciones múltiples.

A tiempo 1 los 5 géneros más abundantes fueron: *Bacteroides* (18,7 %), *Lactobacillus* (15,9 %), *Fusobacterium* (10,4 %), *Escherichia-Shigella* (6,2 %) y *Streptococcus* (5,3 %). Los animales del grupo testigo presentaron menor abundancia relativa con respecto al grupo experimental de *Acetivomaculum*, un género de la familia Ruminococcaceae (UCG-002), *Oxalobacter*, *Butyricimonas* y el género clasificado como *Ruminococcus 2* (Tabla 4.2). En cambio, los géneros *Peptostreptococcus*, *Escherichia-Shigella* y *Eggerthella* fueron más abundantes en lechones del grupo testigo (Tabla 4.2).

Tabla 4.2.- Diferencias a nivel de género en la composición de la microbiota digestiva determinada mediante secuenciación masiva en el primer muestreo (tras el encalostramiento de los lechones o tiempo 1) en los animales de los dos grupos experimentales del estudio de comparación 1.

Género	p	FDR	Bonferroni	Abundancia relativa (%)	
				Testigo	Experimental
<i>Acetivomaculum</i>	0,0186	0,874	1,00	0	0,001
<i>Methanobrevibacter</i>	0,0264	0,874	1,00	0,001	0,014
<i>Peptostreptococcus</i>	0,0283	0,874	1,00	0,315	0,012
Ruminococcaceae UCG-002	0,0283	0,874	1,00	0,383	3,150
<i>Escherichia-Shigella</i>	0,0283	0,874	1,00	8,862	3,481
<i>Oxalobacter</i>	0,0343	0,874	1,00	0,000	0,003
<i>Eggerthella</i>	0,0472	0,874	1,00	0,025	0,006
<i>Butyricimonas</i>	0,0472	0,874	1,00	0,469	2,800
<i>Ruminococcus</i> 2	0,0472	0,874	1,00	0,173	0,565

A tiempo 2 los 5 géneros más abundantes fueron: *Lactobacillus* (13,8 %), *Bacteroides* (12,6 %), el grupo RC9 *gut* de la familia Rikenellaceae (6,3 %), *Lachnoclostridium* (5,7 %) y *Escherichia-Shigella* (5,5 %). Los animales del grupo testigo presentaron menor abundancia relativa de los siguientes géneros con respecto al grupo experimental: *Porphyromonas*, un género de la familia Planococcaceae no clasificado, *Anaerotruncus*, el género de la familia Ruminococcaceae (UCG-013) y el grupo p-1088-a5 *gut* de la familia Planctomycetaceae (Tabla 4.3). En cambio, el género *Catenibacterium* mostró una menor abundancia relativa en lechones del grupo experimental frente al grupo testigo (Tabla 4.3).

Tabla 4.3.- Diferencias a nivel de género en la composición de la microbiota digestiva determinada mediante secuenciación masiva en el segundo muestreo (a la mitad de la lactación o tiempo 2) en los animales de los dos grupos experimentales del estudio de comparación 1.

Género	p	FDR	Bonferroni	Abundancia relativa (%)	
				Testigo	Experimental
<i>Porphyromonas</i>	0,0183	0,941	1,00	0,0003	0,009
Planococcaceae no clasificado	0,0185	0,941	1,00	0,001	0,015
<i>Catenibacterium</i>	0,0226	0,941	1,00	0,205	0,006
<i>Anaerotruncus</i>	0,0307	0,941	1,00	1,140	2,199
Ruminococcaceae UCG-013	0,0316	0,941	1,00	0,031	0,057
Grupo p-1088-a5 <i>gut</i> Planctomycetaceae	0,0318	0,941	1,00	0,223	0,584

A tiempo 3 los 5 géneros más abundantes fueron: un género no cultivado de la familia S24-7 de los Bacteroidales (6,5 %), un género de la familia Ruminococcaceae (UCG-002) (5,2 %), el género clasificado como *Prevotella* 9 (4,6 %), el grupo RC9 *gut* de la familia Rikenellaceae (3,7 %) y *Lactobacillus* (3,7 %). Los animales del grupo testigo presentaron menor abundancia relativa con respecto al grupo experimental del grupo NK4A136 de la familia Lachnospiraceae, *Clostridium sensu stricto*, un género no clasificado de la familia Peptostreptococcaceae, *Oscillibacter*, el género clasificado como *Ruminococcus* 1, *Turicibacter*, *Eisenbergiella*, *Tyzzera*, un género de la familia Defluviitaleaceae y *Haemophilus* (Tabla 4.4). En cambio, los géneros *Bacillus*, *Marvinbryantia* y el género de la familia Ruminococcaceae (UCG-003) presentaron una

abundancia relativa superior en lechones del grupo testigo frente al grupo experimental (Tabla 4.4).

Tabla 4.4.- Diferencias a nivel de género en la composición de la microbiota digestiva determinada mediante secuenciación masiva en el tercer muestreo (a los 7 días del destete o tiempo 3) en los animales de los dos grupos experimentales del estudio de comparación 1.

Género	p	FDR	Bonferroni	Abundancia relativa (%)	
				Testigo	Experimental 1
Grupo NK4A136 Lachnospiraceae	0,0090	0,822	1,00	1,988	3,235
<i>Clostridium sensu stricto</i>	0,0163	0,822	1,00	0,425	1,909
Peptostreptococcaceae no clasificado	0,0163	0,822	1,00	0,166	0,891
<i>Bacillus</i>	0,0283	0,822	1,00	0,003	0,001
<i>Oscillibacter</i>	0,0283	0,822	1,00	0,322	0,977
<i>Ruminococcus</i> 1	0,0283	0,822	1,00	0,507	0,971
<i>Turicibacter</i>	0,0283	0,822	1,00	0,002	0,081
<i>Eisenbergiella</i>	0,0343	0,822	1,00	0,0001	0,012
<i>Tyzzerella</i>	0,0406	0,822	1,00	0,0002	0,002
Defluviitaleaceae UCG-011	0,0445	0,822	1,00	0,003	0,047
<i>Marvinbryantia</i>	0,0472	0,822	1,00	0,075	0,039
Ruminococcaceae UCG-003	0,0472	0,822	1,00	0,298	0,122
<i>Haemophilus</i>	0,0472	0,822	1,00	0,002	0,017

4.2.1.4.- Comparación entre la secuenciación masiva y las PCRC

Se realizó una comparación entre los resultados obtenidos mediante las amplificaciones por PCRC y las obtenidas por la secuenciación masiva del gen ARNr 16S, técnica de referencia para los estudios de microbiota.

Para analizar la relación entre ambos resultados (Tabla 4.5), en primer lugar, se obtuvieron las abundancias relativas de varios taxones que se incluyeron en cada población bacteriana analizada mediante PCRC. Para la proporción de bacteroides-*Prevotella* se emplearon las abundancias de las familias Bacteroidaceae y Prevotellaceae, para los lactobacilos se incluyó el género *Lactobacillus*, para las enterobacterias se usaron las abundancias de la familia Enterobacteriaceae, para las bifidobacterias se incluyó el género *Bifidobacterium*, para los clostridios del clúster I se empleó la familia Clostridiaceae *sensu stricto*, para los clostridios del clúster IV se utilizó la familia Ruminococcaceae y para los clostridios del clúster XIV se emplearon las abundancias de la familia Lachnospiraceae.

La población de bacteroides evaluada mediante secuenciación masiva fue dos veces superior a la obtenida mediante PCRC, aunque se observaron diferencias entre los muestreos realizados. En cuanto a los lactobacilos, esta diferencia se elevó por encima de las diez veces, alcanzando su máximo valor (20 veces mayor) en el segundo muestreo. La proporción de enterobacterias determinada mediante secuenciación masiva fue superior, en más de 7 veces, a la obtenida mediante PCRC. La población de bifidobacterias presentó una escasa variabilidad en los tres muestreos, aunque hay que tener en cuenta que los valores obtenidos solo pertenecen a una parte de las muestras ya que aproximadamente la mitad no se asignaron secuencias al género *Bifidobacterium* mediante secuenciación

masiva. Por último, en la comparación de las poblaciones de clostridios por ambas técnicas se observó que el clúster I y IV estaban subrepresentados mediante PCRc, alrededor de 20 y 5 veces, respectivamente, mientras que el clúster XIV estaba sobrerrepresentado 3 veces en comparación con los resultados de la secuenciación masiva.

Tabla 4.5.- Proporciones de las poblaciones bacterianas analizadas mediante PCRc y las abundancias relativas obtenidas mediante secuenciación masiva, así como la relación (división) entre ambas a lo largo del estudio de comparación 1.

	Tiempo 1		Tiempo 2		Tiempo 3		Global	
	Media	Desviación	Media	Desviación	Media	Desviación	Media	Desviación
Bact PCRc	22,956	20,252	5,991	2,394	9,714	3,910	12,887	13,735
Bact NGS	22,107	12,012	15,430	6,073	22,438	6,931	19,992	9,051
Bact NGS/PCRc	1,518	1,043	3,092	1,895	2,433	0,462	2,347	1,396
Lact PCRc	5,327	9,269	0,970	0,648	0,279	0,216	2,192	5,655
Lact NGS	15,916	11,146	13,762	5,180	3,686	2,904	11,122	8,882
Lact NGS/PCRc	6,083	3,075	22,485	19,401	13,147	1,912	13,905	12,944
Ent PCRc	8,383	11,215	1,994	1,763	0,006	0,016	3,461	7,295
Ent NGS	6,172	4,326	5,488	3,521	0,023	0,055	3,894	4,182
Ent NGS/PCRc	1,221	0,776	11,080	18,287	9,325	8,619	7,209	12,087
Bif PCRc	0,003	0,004	0,124	0,301	0,005	0,005	0,044	0,177
Bif NGS	0,002	0,003	0,036	0,090	0,001	0,001	0,013	0,053
Bif NGS/PCRc	1,254	3,152	1,357	3,763	0,128	0,192	0,913	2,795
cI PCRc	0,288	0,257	0,038	0,029	0,118	0,096	0,148	0,187
cI NGS	4,359	3,841	0,643	0,517	1,480	1,158	2,160	2,775
cI NGS/PCRc	17,577	7,049	34,262	55,384	12,625	3,981	21,488	32,572
cIV PCRc	1,946	1,154	7,064	3,207	7,461	1,671	5,490	3,316
cIV NGS	8,898	5,582	16,579	4,601	22,034	2,588	15,837	6,954
cIV NGS/PCRc	8,561	13,217	3,977	5,303	3,033	0,465	5,190	8,309
cXIV NGS	20,717	7,880	47,296	14,836	40,155	8,923	36,056	15,581
cXIV PCRc	8,610	2,730	9,682	3,201	11,956	2,350	10,083	3,037
cXIV NGS/PCRc	0,458	0,214	0,222	0,095	0,303	0,058	0,328	0,167

Cabe destacar que fue en las muestras a tiempo 1 donde mayores diferencias se observaron en la relación de las proporciones obtenidas mediante secuenciación masiva y PCRc, debido a la dispersión de los resultados obtenidos mediante esta última técnica (con desviaciones superiores a la media de los valores).

Se comprobó también la correlación entre los resultados de ambas técnicas mediante el coeficiente de Pearson (Tabla 4.6). Además, se realizó un análisis por tiempos al encontrarse algunas correlaciones moderadas (0,5), observándose que los coeficientes

más bajos correspondían al primer muestreo, principalmente en los grupos de bacteroides y de clostridios del clúster XIV, así como los lactobacilos en el segundo muestreo.

Tabla 4.6.- Coeficientes de correlación de Pearson para las proporciones de las poblaciones bacterianas analizadas mediante PCRc y las abundancias relativas obtenidas mediante secuenciación masiva en el estudio de comparación 1.

	Global		Tiempo 1		Tiempo 2		Tiempo 3	
	Coeficiente	p	Coeficiente	p	Coeficiente	p	Coeficiente	p
Bact	0,489	0,006	0,446	0,197	0,769	0,009	0,914	< 0,001
Lact	0,618	< 0,001	0,672	0,033	0,464	0,176	0,988	< 0,001
Ent	0,723	< 0,001	0,828	0,003	0,980	< 0,001	0,998	< 0,001
Bif	0,999	< 0,001	0,816	0,004	0,999	< 0,001	0,895	< 0,001
cI	0,878	< 0,001	0,813	0,004	0,747	0,013	0,924	< 0,001
cIV	0,885	< 0,001	0,931	< 0,001	0,848	0,002	0,749	0,013
cXIV	0,530	0,003	0,157	0,666	0,641	0,046	0,653	0,041

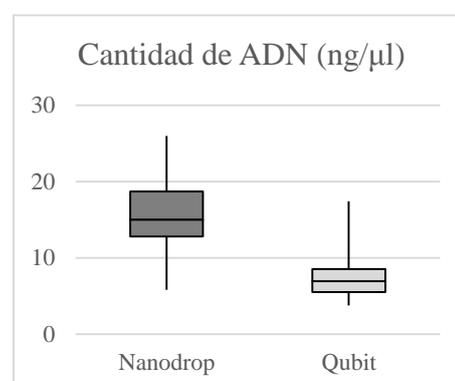
4.2.2.- Determinación de la microbiota durante la transición

El segundo de los estudios realizados para la comparación entre las técnicas empleadas para determinar la composición de la microbiota intestinal se realizó durante la transición de tres grupos de lechones sometidos a cambios en su alimentación, reduciendo la cantidad de lisina y antibióticos e introduciendo avena en la composición del pienso (estudio de comparación 2).

4.2.2.1.- Extracción del ADN

Se comprobó la cantidad y calidad de la extracción mediante la medida de la absorbancia mediante espectrofotómetro (Nanodrop). La relación entre el ADN y las proteínas (260/280) fue de $2,00 \pm 0,18$ mientras que la relación de la absorbancia medida a 260 y 230 fue ligeramente peor, de $1,83 \pm 0,32$. Además, las muestras analizadas mediante secuenciación masiva fueron evaluadas mediante una reacción enzimática con el Qubit® (Figura 4.23).

Figura 4.23.- Comparación de la cantidad de ADN en las muestras evaluadas mediante Nanodrop y Qubit en el estudio de comparación 2.



4.2.2.2.- Cuantificación de la microbiota mediante PCRc

Al igual que en el estudio de comparación 1, se llevó a cabo un estudio longitudinal analizando los recuentos obtenidos de las diferentes poblaciones bacterianas a lo largo del estudio. La evolución de la microbiota a lo largo de los tres muestreos se determinó con las muestras de los tres grupos experimentales, testigo, tratamiento 1 y tratamiento 2 (al día siguiente del destete, a los 8 días del destete y al finalizar la transición). Los principales resultados obtenidos se describen a continuación.

Como se puede apreciar en la Figura 4.24 las bacterias totales disminuyeron significativamente entre el primer y segundo muestreo ($p = 0,005$) y se incrementaron entre el segundo y tercer muestreo ($p = 0,004$). Los bacteroides-*Prevotella* se incrementaron de forma significativa entre los 8 días pos-destete y el final del experimento ($p = 0,005$). Las poblaciones de lactobacilos y enterobacterias fueron inferiores en el segundo muestreo con respecto al primero ($p = 0,007$ y $p < 0,001$, respectivamente) y, en el caso de las enterobacterias, éstas se incrementaron ligeramente en el tercer muestreo ($p < 0,001$). Por último, se observaron cambios en las poblaciones de bifidobacterias y de clostridios del clúster I y IV, disminuyendo entre el primer y segundo muestreo ($p = 0,030$, $p = 0,122$ y $p = 0,001$, respectivamente) e incrementándose en el tercer muestreo ($p = 0,002$, $p < 0,001$ y $p = 0,083$, respectivamente). En el caso de los clostridios del clúster XIV las diferencias no fueron significativas aunque estuvieron próximas, $p = 0,201$ y $p = 0,083$, para la comparación entre el tiempo 1 y 2 y entre el tiempo 2 y 3, respectivamente.

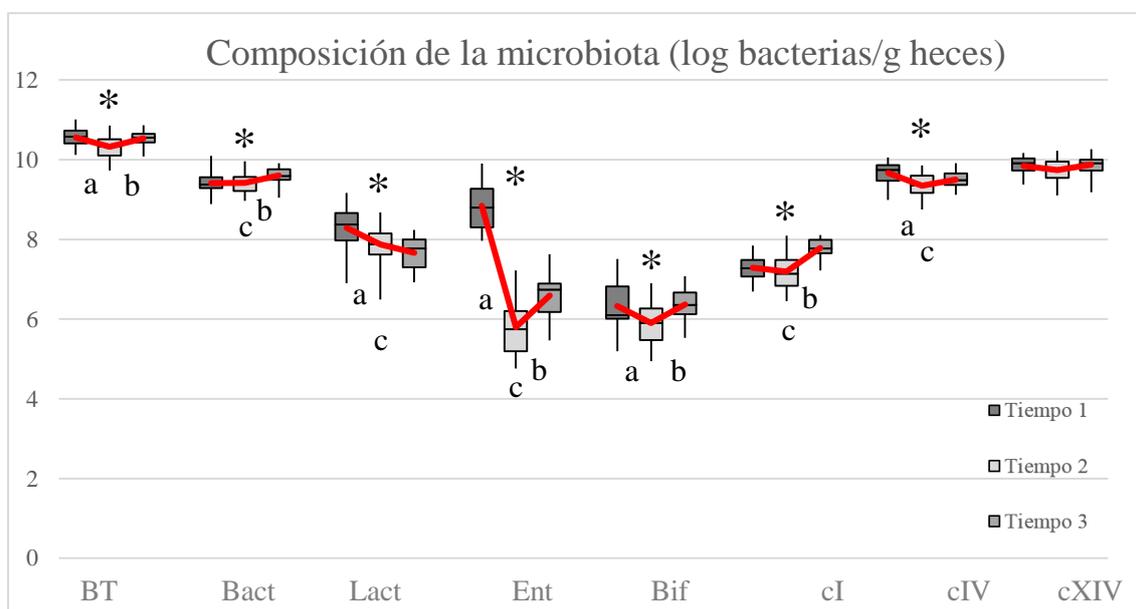


Figura 4.24.- Composición de la microbiota digestiva determinada por PCRc a lo largo de los muestreos realizados: al día siguiente del destete (tiempo 1), a los 8 días del destete (tiempo 2) y al finalizar la transición (tiempo 3) en el estudio de comparación 2. Los asteriscos y letras indican diferencias estadísticamente significativas (* $p < 0,05$: comparación tiempo 1-2-3; a: comparación tiempo 1-2; b: comparación tiempo 2-3; c: comparación tiempo 1-3).

En cuanto a la proporción de las poblaciones bacterianas analizadas se observaron diferencias significativas en el porcentaje de bacteroides, lactobacilos, enterobacterias y los tres clúster de clostridios (Figura 4.25) durante el seguimiento. En la comparación realizada entre el primer y segundo muestreo se observó que se incrementó el porcentaje de bacteroides y clostridios del clúster XIV ($p < 0,001$ y $p = 0,001$, respectivamente) y disminuyó la proporción de lactobacilos y enterobacterias ($p = 0,076$ y $p < 0,001$, respectivamente). Al analizar las diferencias entre el muestreo realizado a los 8 días del destete y tras la finalización de la transición, la proporción de lactobacilos, enterobacterias, bifidobacterias y clostridios del clúster XIV disminuyó ($p < 0,001$, $p = 0,008$, $p = 0,045$ y $p = 0,019$, respectivamente), mientras que se incrementaron los clostridios del clúster I ($p = 0,001$).

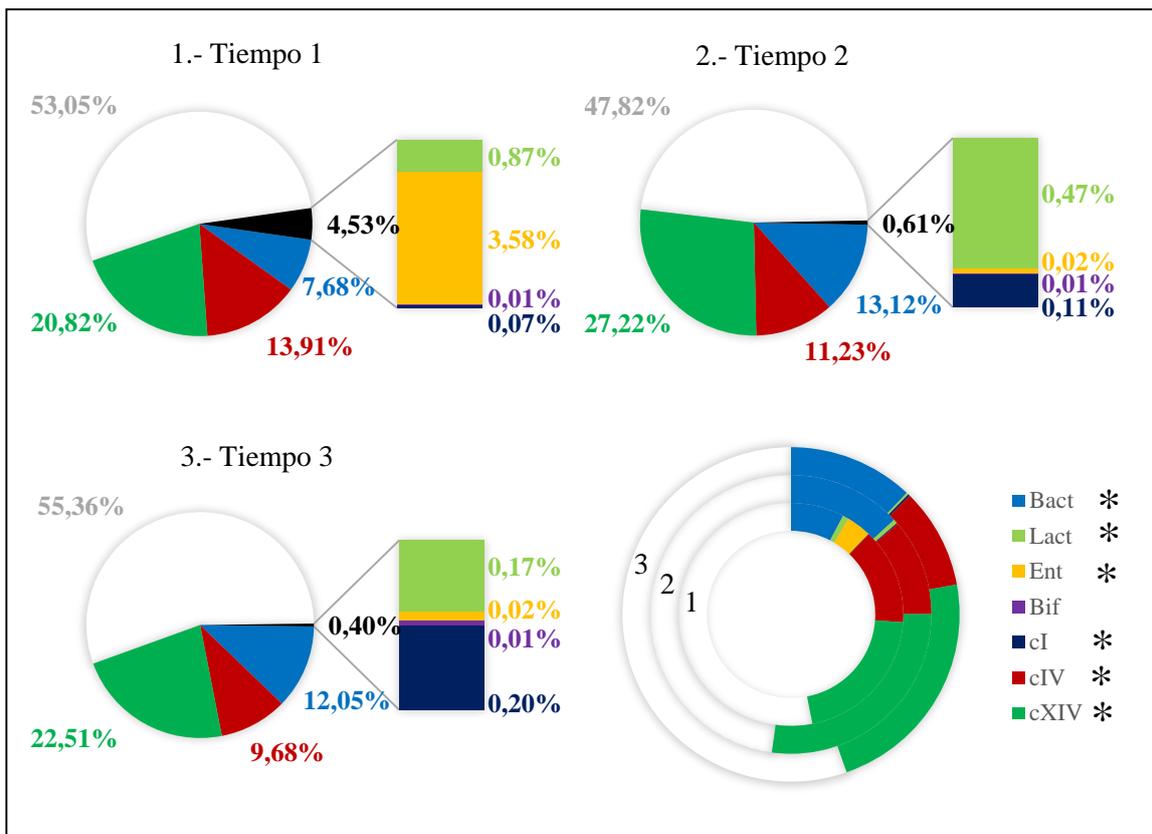


Figura 4.25.- Porcentajes medios relativos de las poblaciones bacterianas analizadas mediante PCRc en los lechones del estudio de comparación 2 y a lo largo del periodo de seguimiento (* diferencias significativas $p < 0,05$): tiempo 1 (día siguiente al destete), tiempo 2 (a los 8 días del destete) y tiempo 3 (a la salida hacia el cebadero).

Por último, el Índice de Salud Intestinal se incrementó significativamente entre el primer y segundo muestreo ($p < 0,001$), disminuyendo en el último muestreo ($p < 0,001$) (Figura 4.26).

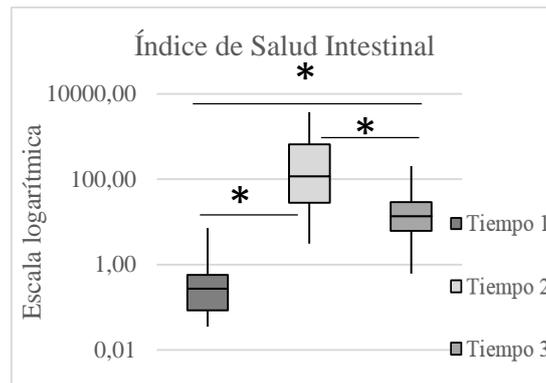


Figura 4.26.- Índice de Salud Intestinal (escala logarítmica) durante el periodo de seguimiento del estudio comparación 2: día siguiente al destete (tiempo 1), 8 días del destete (tiempo 2) y al finalizar la transición (tiempo 3) (* diferencias significativas $p < 0,05$).

La comparación de los resultados obtenidos para los tres grupos experimentales a los 8 días del destete de los lechones (tiempo 2) teniendo en cuenta los resultados obtenidos el día siguiente al destete (tiempo 1) mostró diferencias significativas entre los grupos del estudio (Figuras 4.27 y 4.28).

No existieron diferencias significativas en los recuentos, en valor absoluto o logarítmico, de bacterias totales, bacteroides, lactobacilos y clostridios de los tres clúster analizados. Los recuentos de enterobacterias fueron superiores en los animales que recibieron el tratamiento 2 con respecto a los lechones del grupo testigo, estando esta diferencia próxima a la significación estadística ($p = 0,096$) y con respecto a los lechones del grupo de tratamiento 1 ($p = 0,030$).

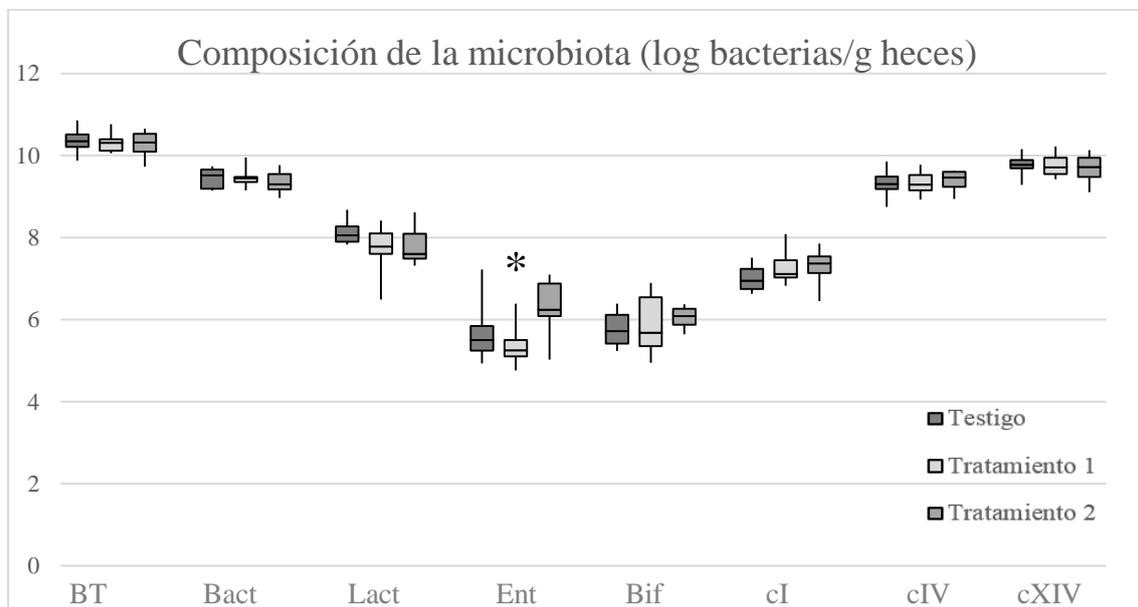


Figura 4.27.- Comparación de la composición de la microbiota digestiva determinada por PCRc a los 8 días del destete (tiempo 2) de los lechones del grupo testigo, grupo experimental 1 y grupo experimental 2 durante el estudio de comparación 2 (* diferencias significativas $p < 0,05$).

En cuanto a la proporción de las poblaciones bacterianas no se apreciaron diferencias significativas aunque se puede destacar que el porcentaje de lactobacilos fue superior en los animales del grupo testigo ($p = 0,073$) con respecto a los lechones de los

grupos de tratamiento 1 y 2, y que los animales del grupo de tratamiento 2 presentaron un porcentaje superior de clostridios del clúster IV con respecto a los otros dos grupos de animales del estudio ($p = 0,174$).

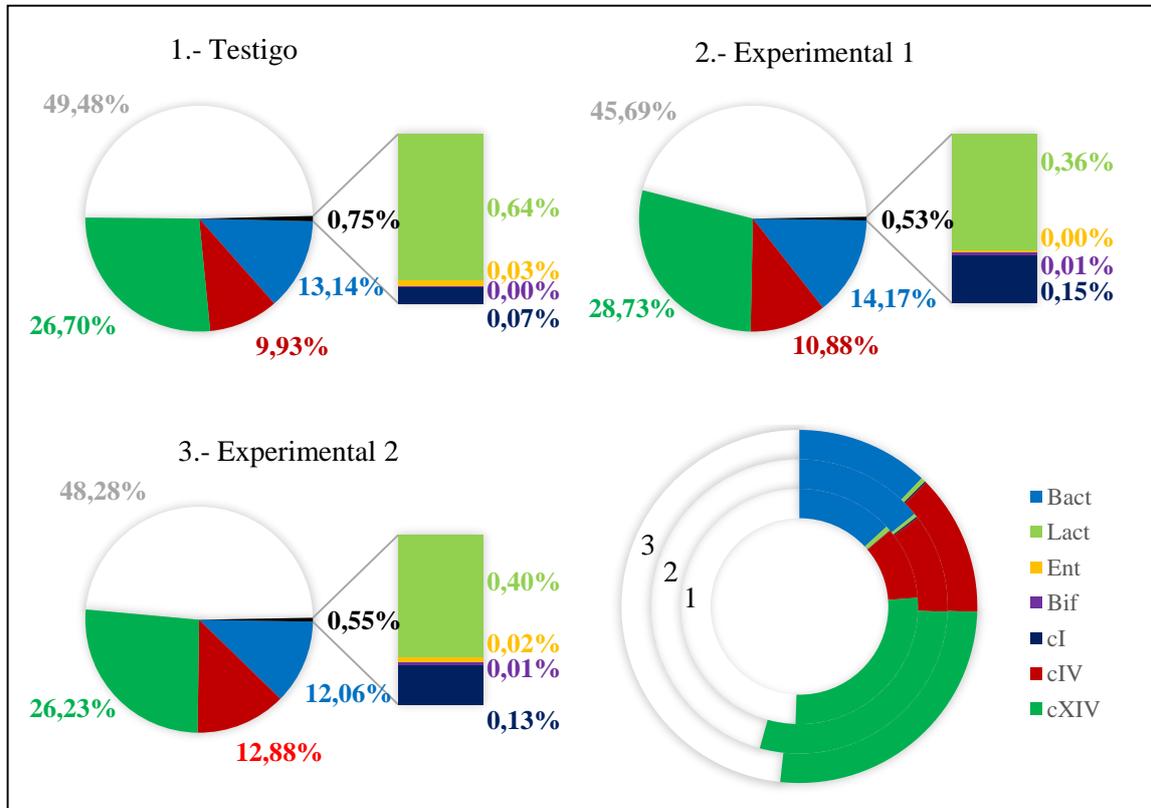


Figura 4.28.- Porcentajes medios relativos de las poblaciones bacterianas de la microbiota digestiva determinados mediante PCRc en los lechones del grupo testigo (1), del grupo experimental 1 (2) y del grupo experimental 2 (3) durante el muestreo realizado a los 8 días del destete (tiempo 2) en el estudio de comparación 2.

Por último, no existieron diferencias en el Índice de Salud Intestinal para los tres grupos de animales ($p = 0,123$), presentando los lechones del grupo testigo el valor más elevado (Figura 4.29).



Figura 4.29.- Índice de Salud Intestinal (escala logarítmica) para los tres grupos de animales, testigo, experimental 1 y experimental 2, a los 8 días del destete (tiempo 2) en el estudio de comparación 2.

En la comparación de los resultados obtenidos para los tres grupos experimentales el día anterior a la salida de los animales hacia el cebadero (tiempo 3), teniendo en cuenta los resultados obtenidos el día siguiente al destete (tiempo 1), se observaron las siguientes diferencias significativas entre los grupos del estudio (Figuras 4.30 y 4.31).

No se apreciaron diferencias significativas entre las poblaciones bacterianas analizadas, tanto en valor absoluto como en proporción, con respecto a las bacterias totales. Se podría mencionar el menor recuento y proporción de clostridios del clúster I en los animales del grupo de tratamiento 1 con respecto a los otros dos grupos del estudio ($p = 0,300$ y $p = 0,277$, respectivamente, para el valor del recuento o proporción).

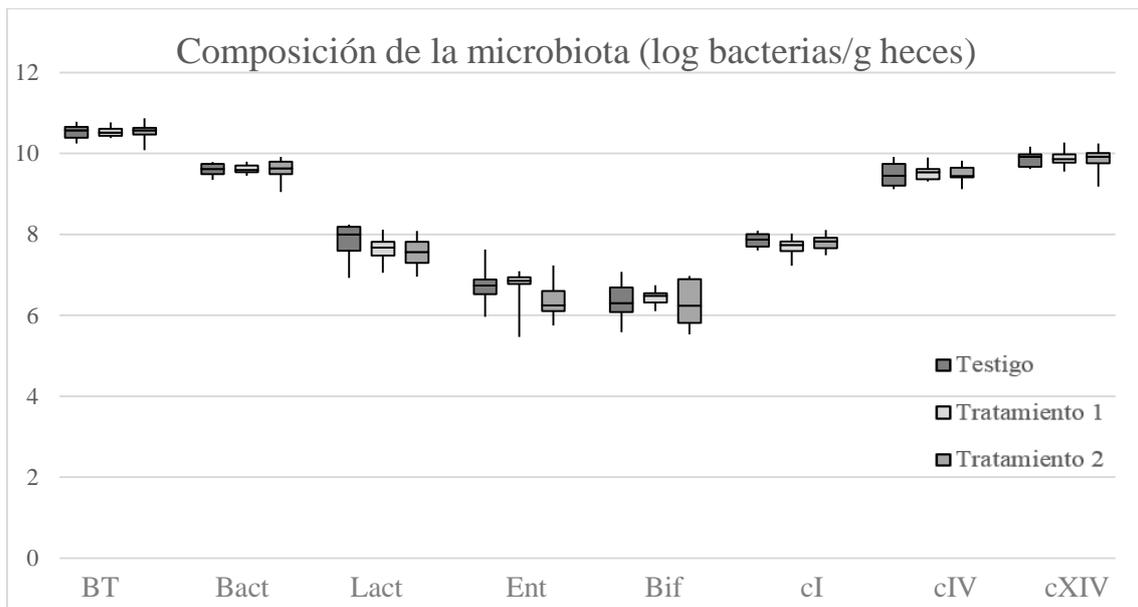


Figura 4.30.- Comparación de la composición de la microbiota digestiva determinada mediante PCRc a la finalización de la transición (tiempo 3) en los lechones del grupo testigo, grupo experimental 1 y grupo experimental 2 durante el estudio de comparación 2.

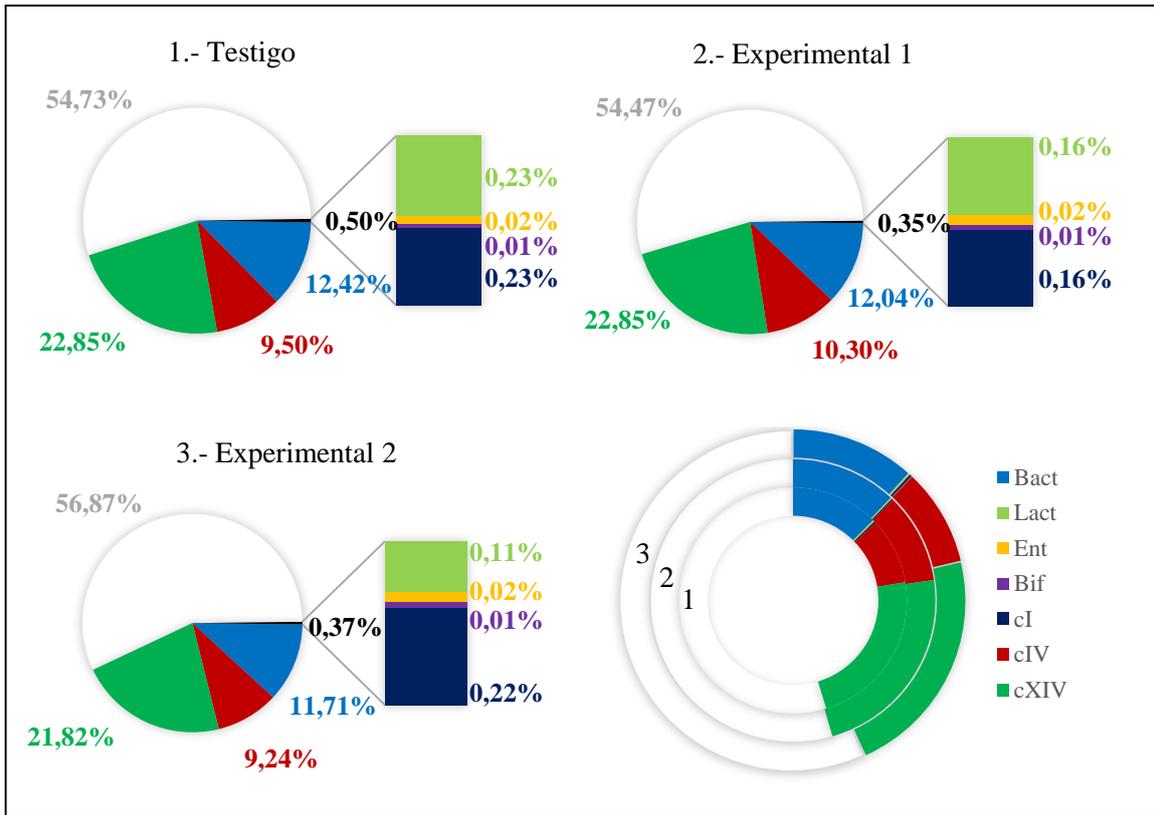


Figura 4.31.- Porcentajes medios relativos de las poblaciones bacterianas de la microbiota digestiva determinados mediante qPCR en los lechones del grupo testigo (1), del grupo experimental 1 (2) y del grupo experimental 2 (3) durante el muestreo realizado al finalizar la transición (tiempo 3) en el estudio de comparación 2.

Por último, el valor del Índice de Salud Intestinal no presentó diferencias significativas entre los lechones de los diferentes grupos experimentales ($p = 0,971$), probablemente a consecuencia de la gran dispersión de los valores determinados (Figura 4.32).

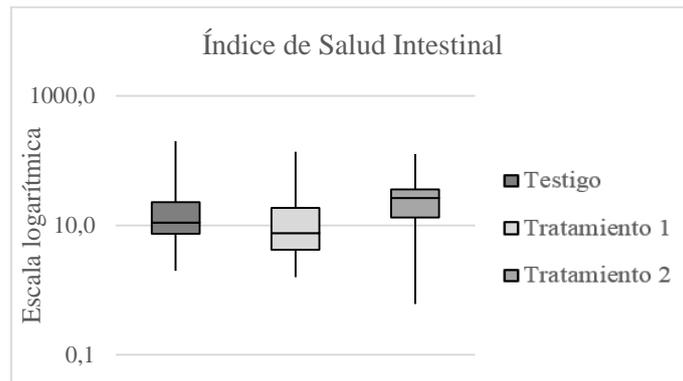


Figura 4.32.- Índice de Salud Intestinal (escala logarítmica) para los tres grupos de animales, testigo, experimental 1 y experimental 2, al finalizar la transición de los lechones (tiempo 3) del estudio de comparación 2.

4.2.2.3.- Secuenciación masiva mediante amplificación del gen que codifica para el ARN 16S ribosomal

Al igual que en el estudio de comparación 1, en primer lugar se analizó la diversidad alfa de cada muestra a lo largo del estudio a través de 4 índices (Figura 4.33). Se comprobó que todos estos índices se incrementaron significativamente a lo largo del estudio ($p < 0,002$), aunque en la comparación entre el muestreo realizado tras el destete (tiempo 1) y a los 8 días del mismo (tiempo 2) se apreciaron diferencias para los valores obtenidos de diversidad alfa con todos los índices salvo con el índice de Simpson ($p = 0,081$). Entre el segundo y tercer muestreo (día anterior a la salida hacia el cebadero) solo se demostraron diferencias significativas con los índices Simpson y Shannon ($p = 0,015$ y $p = 0,003$, respectivamente).

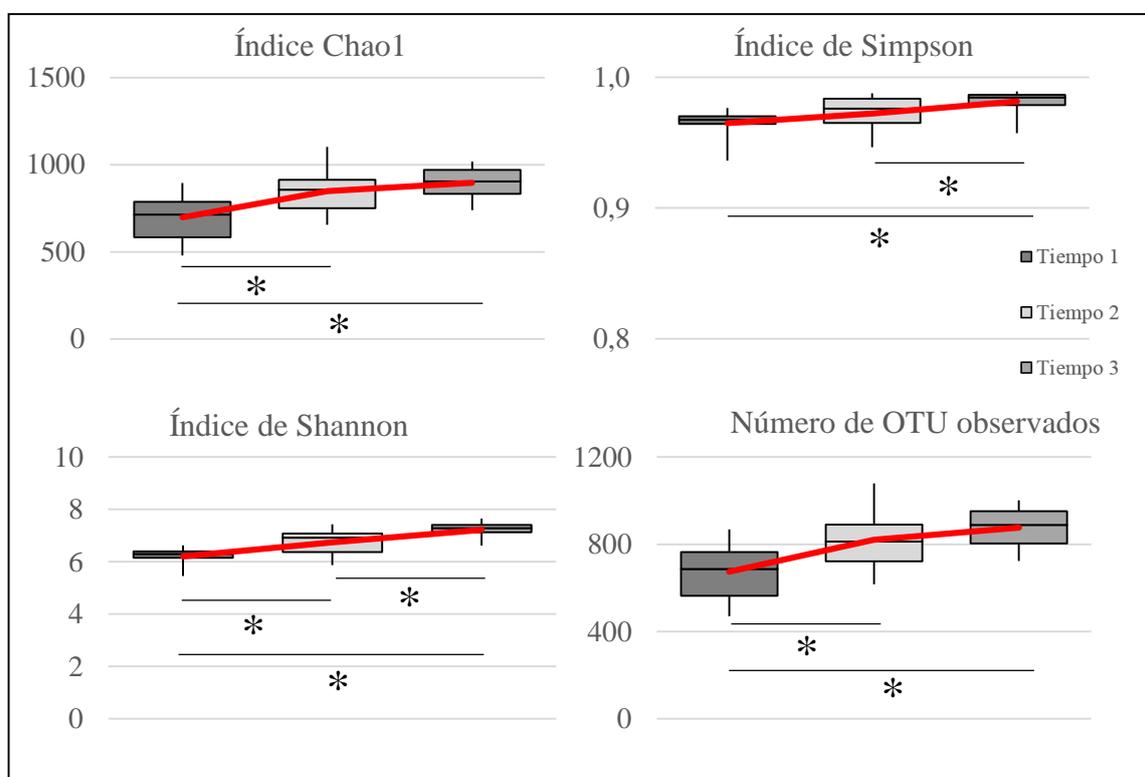


Figura 4.33.- Variaciones en la diversidad alfa en la microbiota digestiva determinada por secuenciación masiva en los tres muestreos realizados a lo largo del estudio de comparación 2 medida a través de 4 índices: Chao1, Simpson, Shannon y el número de OTU observados. Los asteriscos indican diferencias significativas (* $p < 0,05$).

Cuando se realizó la comparación de estos índices de diversidad alfa entre los tres tratamientos que recibieron los animales en cada muestreo no se encontraron diferencias significativas (Figura 4.34). Se puede señalar que a los 8 días del destete (tiempo 2), el índice de Simpson fue superior en los animales que recibieron el tratamiento 2 con respecto a los otros dos grupos de animales y que el día anterior a la salida de los lechones hacia el matadero (tiempo 3) el índice de Shannon fue inferior en este mismo grupo de

animales (tratamiento 2) con respecto a los otros dos grupos, aunque no se alcanzó la significación estadística ($p = 0,112$ y $p = 0,114$, respectivamente).

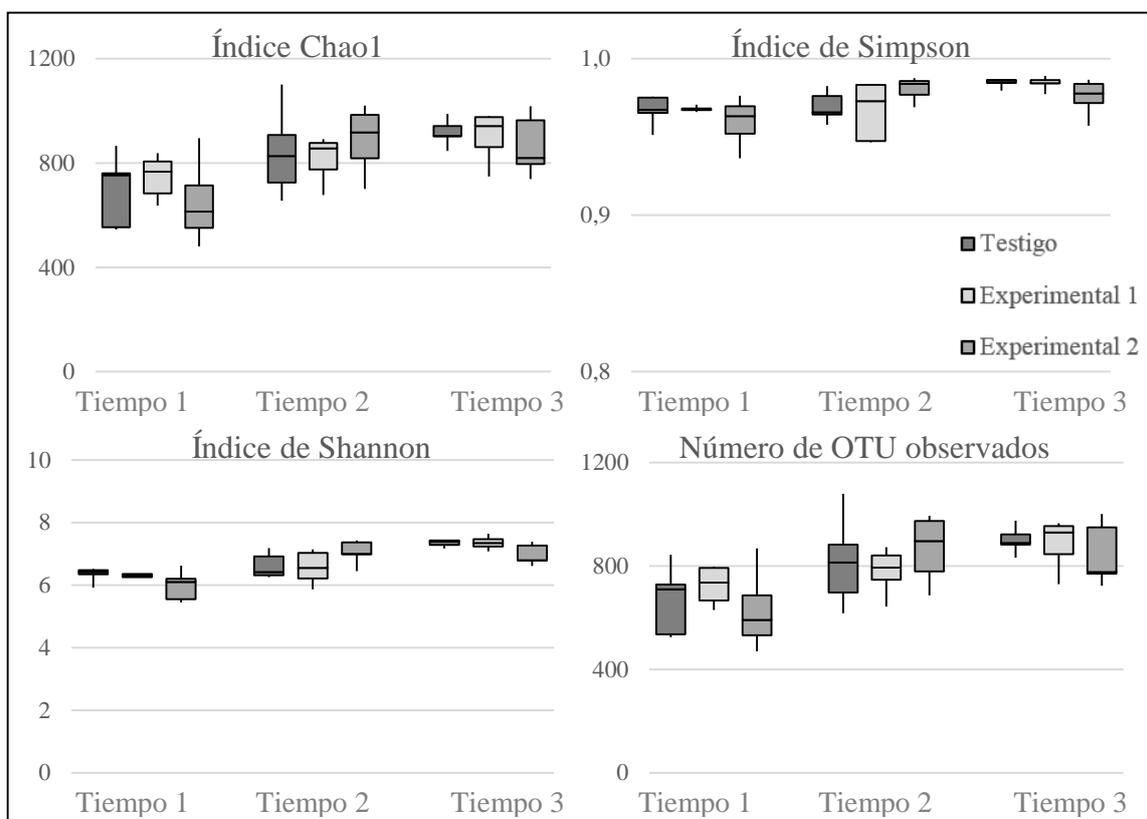


Figura 4.34.- Variaciones en la diversidad alfa de la microbiota digestiva determinada por secuenciación masiva en los tres grupos experimentales y a lo largo del estudio de comparación 2 medida a través de 4 índices: Chao1, Simpson, Shannon y el número de OTU observados. Los asteriscos indican diferencias significativas (* $p < 0,05$).

En cuanto al análisis de la diversidad beta se ha observado que las muestras se agrupan entre ellas en base al muestreo al que pertenecen según el índice de Bray-Curtis o las distancias no ponderadas por *Unifrac*. En cambio, con las distancias ponderadas las muestras tomadas tras la toma del calostro (tiempo 1) y a mitad de lactación (tiempo 2) se entremezclan entre ellas. Por otro lado, teniendo en cuenta las muestras separadas por grupo experimental, éstas no se separan claramente unas de otras, independientemente del método empleado para la estimación de esta diversidad beta (Figura 4.35).

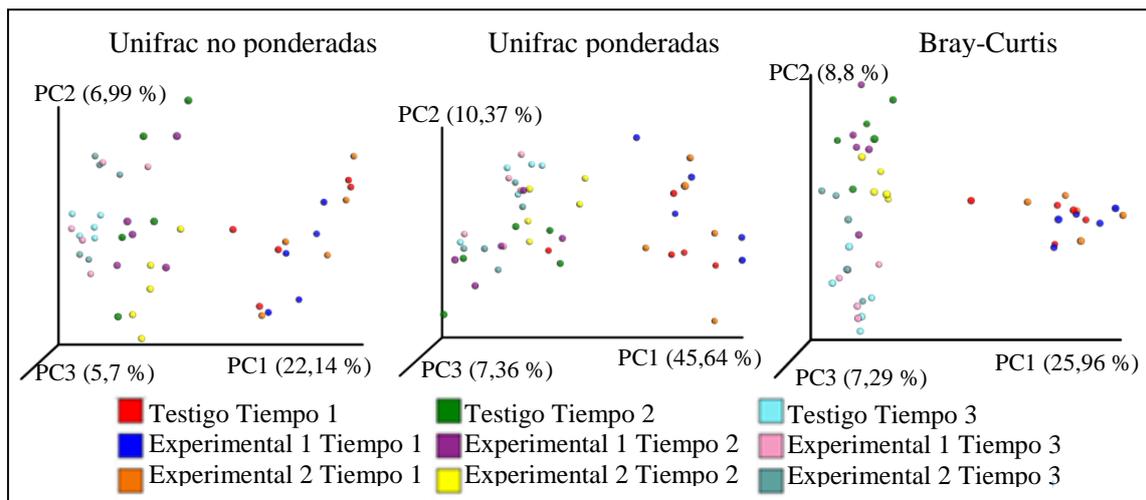


Figura 4.35.- Variaciones en la diversidad beta en la microbiota digestiva determinada por secuenciación masiva a lo largo del estudio de comparación 2 calculadas mediante el índice de Bray-Curtis y las distancias filogenéticas calculadas por *Unifrac* (ponderadas y no ponderadas).

La distribución de los filos detectados en las muestras del estudio de comparación 2 (transición) se muestra en la Figura 4.36. Las secuencias mayoritarias pertenecieron a los filos Firmicutes (53 %) y Bacteroidetes (37 %). En menor proporción encontramos los filos Proteobacteria (5 %), Spirochaetae (3 %) y, en proporciones inferiores al 1 %, al resto de filos detectados.

En el análisis estadístico no paramétrico realizado a nivel de filo se demostró la existencia de diferencias significativas a lo largo del tiempo del estudio. Por el contrario, apenas existieron diferencias cuando se compararon los tres grupos de animales, testigo, experimental 1 y experimental 2 (Figura 4.37). Los filos Chlamydiae, Verrucomicrobia, Lentisphaerae, Tenericutes, Elusimicrobia y Saccharibacteria no presentaron diferencias entre los tres muestreos realizados. Sin embargo, los filos Synergistetes ($p < 0,001$ Bo), Fusobacteria ($p < 0,001$ Bo), Euryarchaeota ($p < 0,001$ Bo) y Firmicutes ($p = 0,002$ Bo) se redujeron, los filos Bacteroidetes ($p < 0,001$ Bo), Cyanobacteria ($p < 0,001$ Bo), Fibrobacteres ($p = 0,014$ FDR) y Spirochaetae ($p = 0,016$ FDR) se incrementaron y el resto presentó evoluciones en sus poblaciones dispares en la línea temporal del estudio.

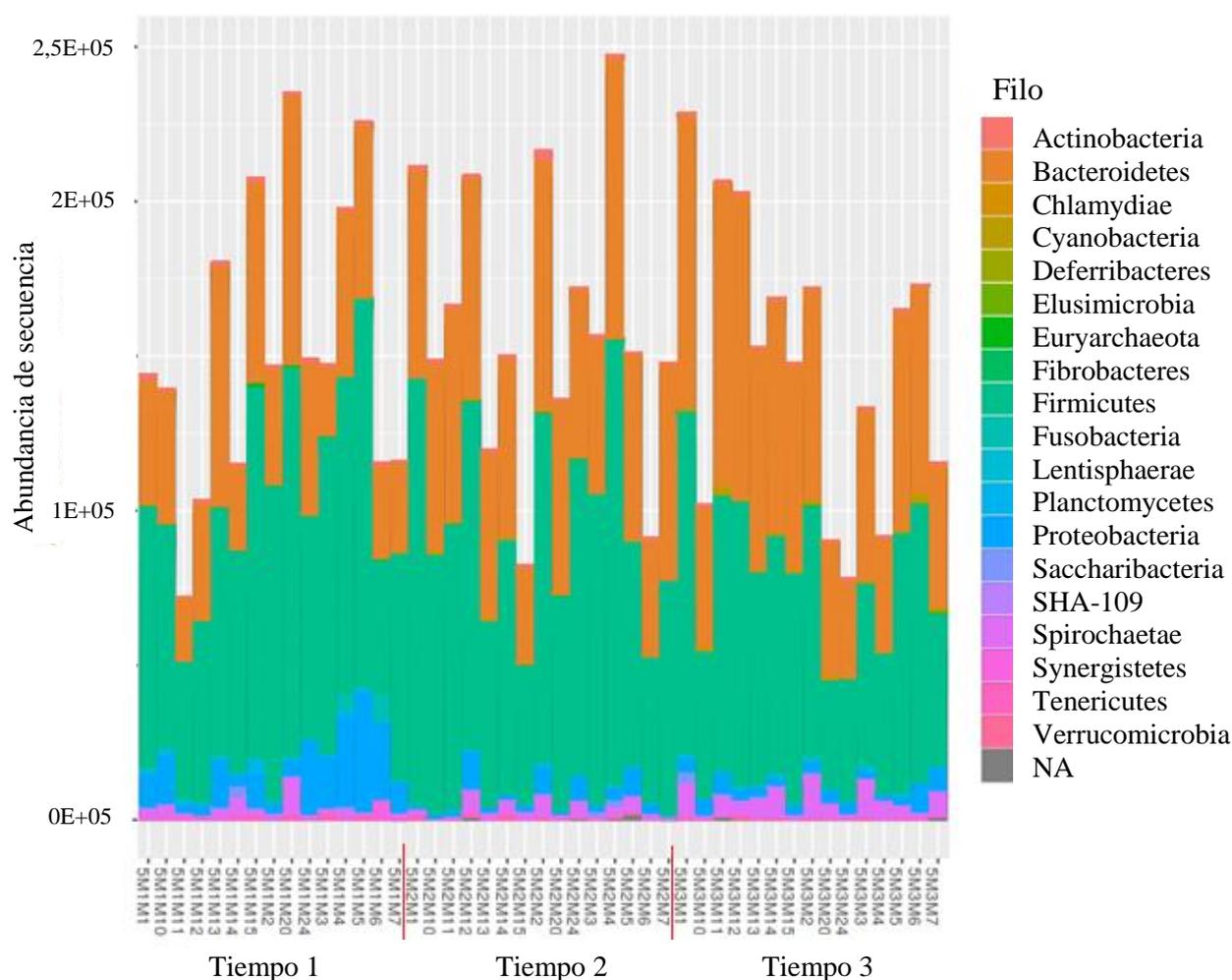


Figura 4.36.- Distribución de los filos identificados en base al número de secuencias asignadas a cada taxón para el total de las muestras procesadas mediante secuenciación masiva en el estudio de comparación 2.

En el primer muestreo solo se observaron diferencias en los filos Tenericutes ($p = 0,046$) y Spirochaetae ($p = 0,049$) sin realizar las correcciones para comparaciones múltiples, presentando los animales del grupo experimental 2 mayores poblaciones que los otros dos grupos de animales. En el segundo muestreo, solo el filo Elusimicrobia mostró diferencias con la corrección de Bonferroni ($p = 0,049$), presentando los animales que recibieron el tratamiento 2 mayor proporción de esta población. Además, otros cuatro filos presentaron diferencias al no aplicar ninguna de las correcciones: Fibrobacteres ($p = 0,015$), Verrucomicrobia ($p = 0,017$), Proteobacteria ($p = 0,039$) y Spirochaetae ($p = 0,044$), cuyas poblaciones también fueron superiores en los animales del grupo de tratamiento 2. En el último muestreo solo se observaron diferencias significativas sin corregir para el filo Chlamydiae ($p = 0,032$), cuya población también fue superior en los animales del grupo experimental 2.

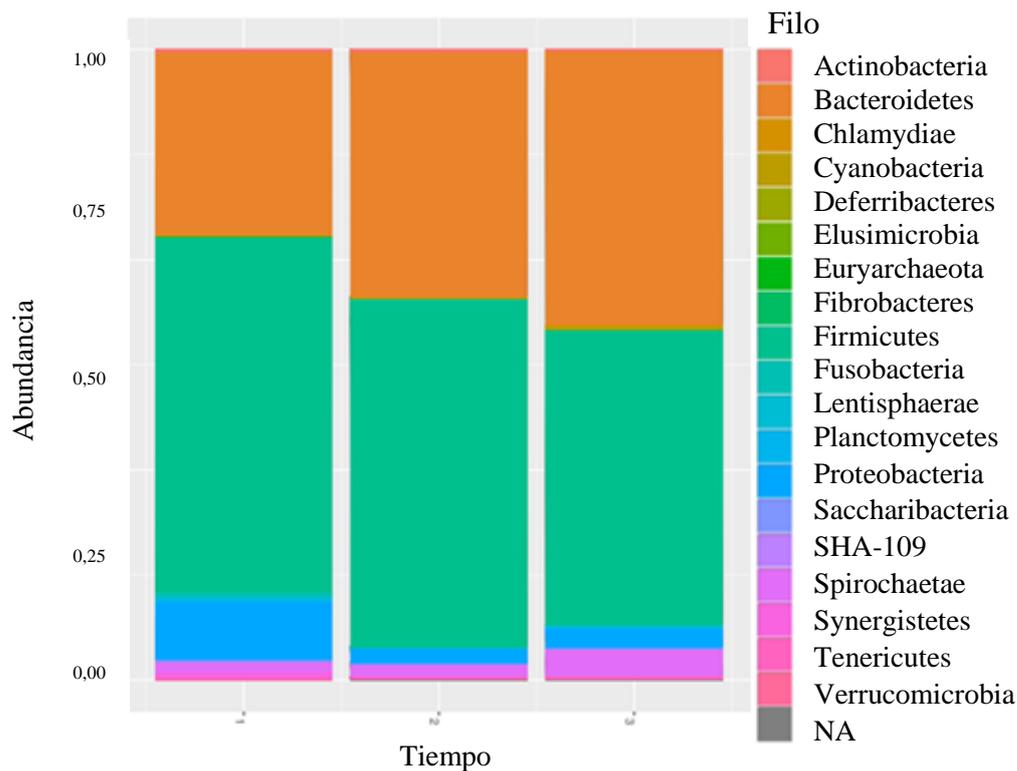


Figura 4.37.- Distribución de la abundancia relativa media de los filios identificados en la microbiota digestiva determinada mediante secuenciación masiva en los tres muestreos realizados (tras el destete o tiempo 1, a los 8 días del destete o tiempo 2 y el día anterior a la salida hacia cebadero o tiempo 3) en el estudio de comparación 2.

A nivel de familia, los 10 primeros taxones están descritos en la Figura 4.38. De estas 10 familias solo dos de ellas (Acidaminococcaceae y Ruminococcaceae) no presentaron diferencias significativas por Kruskal-Wallis a lo largo del estudio ($p = 0,300$ y $p = 0,110$), cuatro (Bacteroidaceae, Erysipelotrichaceae, Prevotellaceae y Veillonellaceae, $p < 0,001$ para los cuatro) presentaron diferencias por Bonferroni, tres (familia S24-7 de los Bacteroidales $p = 0,002$, Lachnospiraceae $p = 0,012$ y Lactobacillaceae $p = 0,002$) presentaron diferencias por la corrección FDR y solo una de las familias (Rikenellaceae $p = 0,047$) mostró diferencias sin hacer las correcciones para comparaciones múltiples.

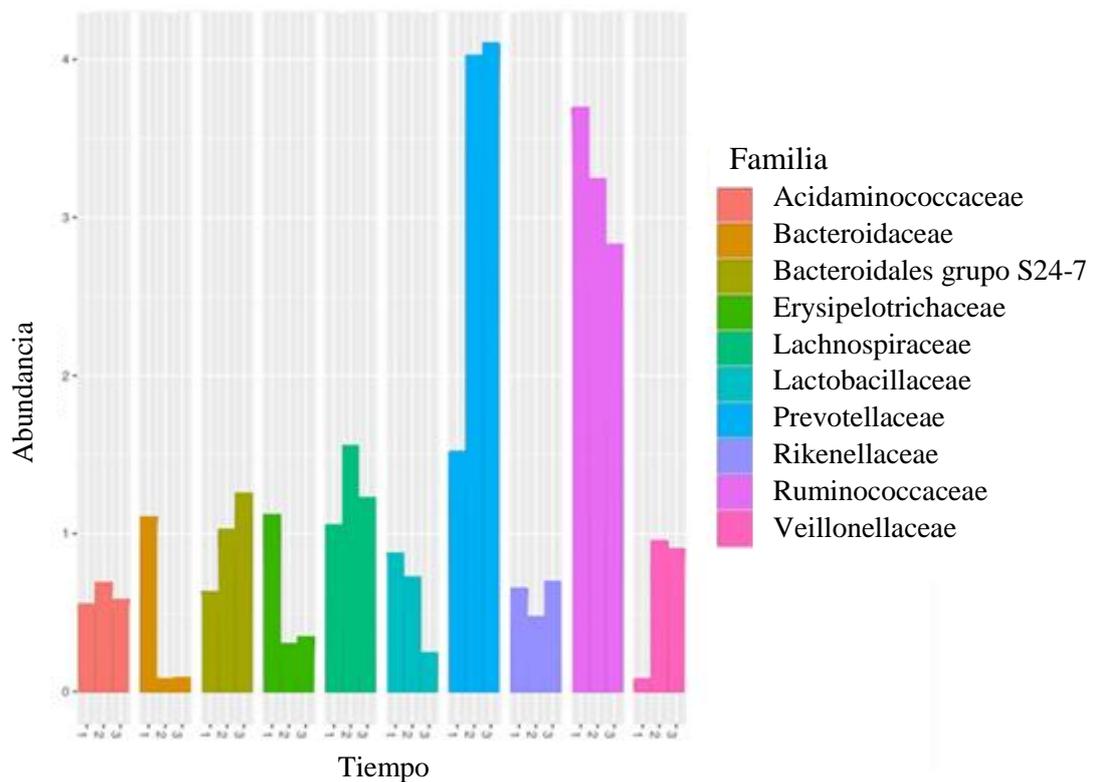


Figura 4.38.- Distribución de la abundancia relativa media de las 10 familias identificadas con mayor frecuencia en la microbiota digestiva determinada por secuenciación masiva en los tres muestreos realizaos (tras el destete o tiempo 1, a los 8 días del destete o tiempo 2 y el día anterior a la salida hacia cebadero o tiempo 3) en el estudio de comparación 2.

En el análisis estadístico global realizado a nivel de familia se observaron diferencias a lo largo del estudio para un total de 25 familias mediante la corrección de Bonferroni, 50 mediante la corrección FDR y 56 sin aplicar alguna de estas correcciones. En cambio, en la comparación de las familias entre los tres grupos de animales, testigo, experimental 1 y experimental 2, en cada uno de los muestreos realizados no se observaron diferencias significativas cuando se aplicaron las correcciones para comparaciones múltiples.

A tiempo 1 (Figura 4.39), las 10 familias más abundantes fueron: Ruminococcaceae (24,6 %), Prevotellaceae (10,1 %), Erysipelotrichaceae Fusobacteriaceae (7,4 %), Bacteroidaceae (7,4 %), Lachnospiraceae (7,0 %), Enterobacteriaceae (6,8 %), Lactobacillaceae (5,8 %), Rikenellaceae (4,3 %), la familia S24-7 de los Bacteroidales (4,2 %) y Acidaminococcaceae (3,7 %). Los animales del grupo experimental 1 presentaron mayor abundancia relativa de Helicobacteraceae ($p = 0,018$), Campylobacteraceae ($p = 0,023$) y Spirochaetaceae ($p = 0,049$) con respecto a los otros dos grupos de animales, testigo y experimental 2 (0,10 % frente a 0,06 % y 0,006 %, 0,67 % frente a 0,21 % y 0,11 % y 2,70 % frente a 1,84 % y 0,44 %, respectivamente).

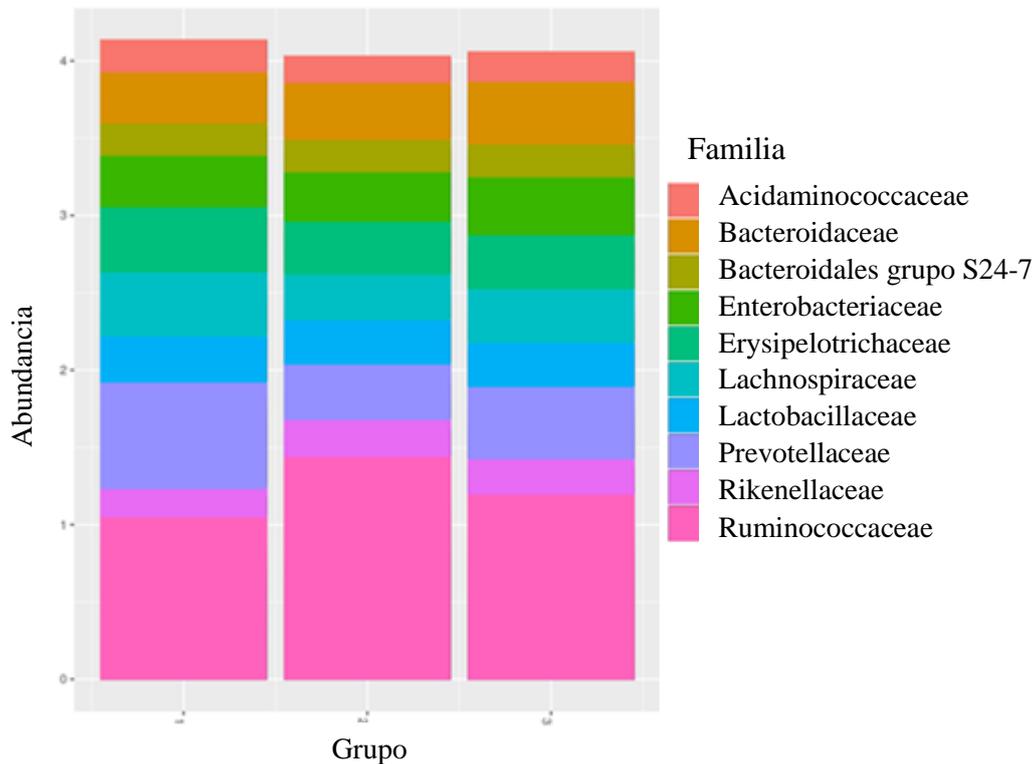


Figura 4.39.- Distribución de la abundancia relativa media de las 10 familias de la microbiota digestiva determinadas mediante secuenciación masiva identificadas con mayor frecuencia en el primer muestreo (tras el destete o tiempo 1) en los animales de los tres grupos experimentales del estudio de comparación 2.

A tiempo 2 (Figura 4.40), las 10 familias más abundantes fueron: Prevotellaceae (26,8 %), Ruminococcaceae (21,6 %), Lachnospiraceae (10,4 %), familia S24-7 de los Bacteroidales (6,8 %), Veillonellaceae (6,3 %), Lactobacillaceae (4,8 %), Acidaminococcaceae (4,6 %), Rikenellaceae (3,1 %), Erysipelotrichaceae (2,0 %) y Spirochaetaceae (1,9 %). Los animales del grupo experimental 2 presentaron la mayor abundancia relativa (0,11 %) de Elusimicrobiaceae ($p = 0,002$), un 0,64 % de Desulfovibrionaceae ($p = 0,004$), un 0,07 % de Fibrobacteraceae ($p = 0,015$), un 4,21 % de Rikenellaceae ($p = 0,022$), un 0,012 % de Oligosphaeraceae ($p = 0,029$), un 2,99 % de Spirochaetaceae ($p = 0,044$) y un 0,08 % de una familia no clasificada del orden Bacteroidales ($p = 0,045$), con respecto al grupo testigo (0 %, 0,15 %, 0,022 %, 3,35 %, 0,004 %, 0,90 %, 0,002 %, respectivamente) y experimental 1 (0,0003 %, 0,048 %, 0 %, 1,84 %, 0,002 %, 1,67 %, 0,0001 %, respectivamente).

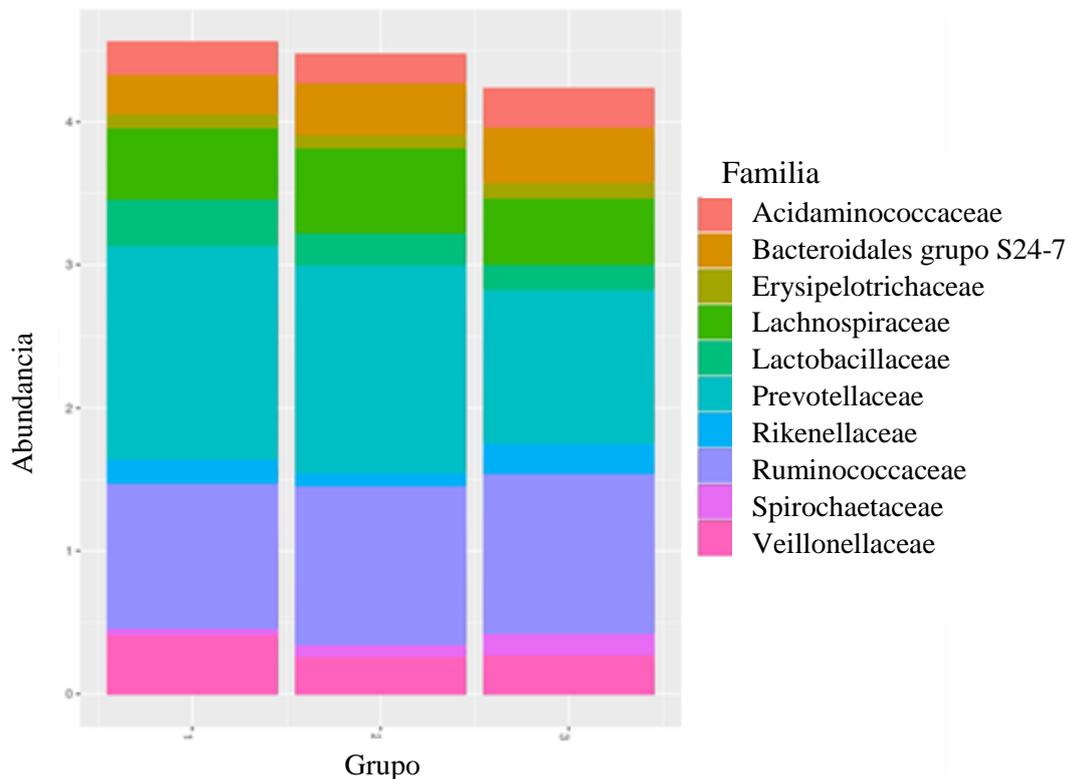


Figura 4.40.- Distribución de la abundancia relativa media de las 10 familias de la microbiota digestiva determinadas mediante secuenciación masiva identificadas con mayor frecuencia en el segundo muestreo (a los 8 días del destete o tiempo 2) en los animales de los tres grupos experimentales del estudio de comparación 2.

A tiempo 3 (Figura 4.41), las 10 familias más abundantes fueron: Prevotellaceae (27,3 %), Ruminococcaceae (18,8 %), la familia S24-7 de los Bacteroidales (8,3 %), Lachnospiraceae (8,2 %), Veillonellaceae (6,0 %), Rikenellaceae (4,6 %), Spirochaetaceae (4,3 %), Acidaminococcaceae (3,9 %), Erysipelotrichaceae (2,3 %) y Succinivibrionaceae (2,0 %). Los animales del grupo testigo presentaron mayor abundancia relativa de Micrococcaceae, con un 0,001 % ($p = 0,032$), y de una familia del orden Rickettsiales ($p = 0,032$) (0,002 %) con respecto a los otros dos grupos en los que no se detectaron estas familias (0 %). Los animales del grupo de tratamiento 1 presentaron una mayor abundancia relativa de Bacteroidaceae ($p = 0,025$) (0,37 %), un grupo BB60 de los Clostridiales ($p = 0,032$) (0,067 %) y Alcaligenaceae ($p = 0,044$) (0,08 %) con respecto a los animales del grupo testigo (0,15 %, 0,006 %, 0 %, respectivamente) y del grupo experimental 2 (0,23 %, 0,040 %, 0 %, respectivamente). Por último, los animales del grupo de tratamiento 2 presentaron una mayor abundancia relativa de Desulfovibrionaceae ($p = 0,014$) (0,92 %), Helicobacteraceae ($p = 0,018$) (0,58 %) y Chlamydiaceae ($p = 0,032$) (0,18 %) con respecto a los animales del grupo testigo (0,73 %, 0,41 %, 0,07 %, respectivamente) y del grupo experimental 1 (0,069 %, 0,25 %, 0,045 %, respectivamente).

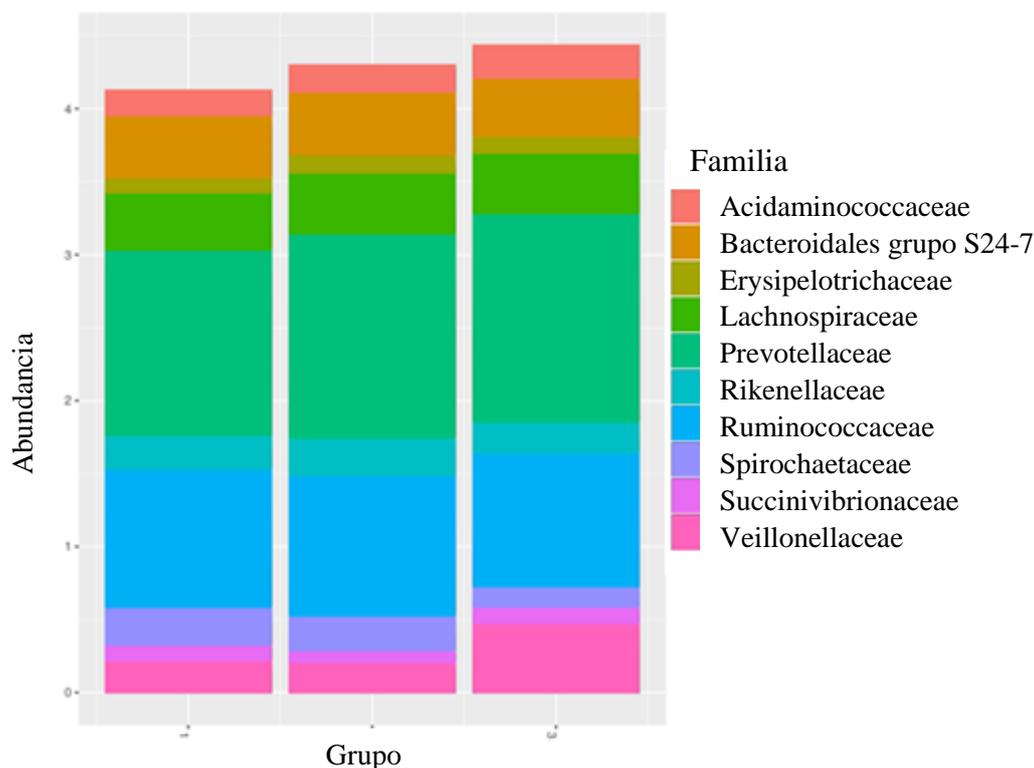


Figura 4.41.- Distribución de la abundancia relativa media de las 10 familias de la microbiota digestiva determinadas mediante secuenciación masiva identificadas con mayor frecuencia en el tercer muestreo (a la salida de los animales hacia el cebadero o tiempo 3) en los animales de los tres grupos experimentales del estudio de comparación 2.

A nivel de género, los 5 primeros taxones fueron: el género clasificado como *Prevotella* 9 (8,4 %), un género no cultivado de la familia S24-7 de los Bacteroidales (6,5 %), *Lactobacillus* (4,1 %), *Phascolarctobacterium* (4,0 %) y un género de la familia Ruminococcaceae (UCG-002) (3,7 %). En el análisis estadístico global realizado a nivel de género se observaron diferencias a lo largo del estudio para un total de 85 géneros mediante la corrección de Bonferroni, 164 mediante la corrección FDR y 183 sin aplicar alguna de estas correcciones. En cambio, en la comparación entre los tres grupos de animales, testigo y experimentales 1 y 2, en cada uno de los muestreos realizados no se observaron diferencias significativas aplicando las correcciones para comparaciones múltiples.

A tiempo 1 los 5 géneros más abundantes fueron: *Bacteroides* (7,4 %), *Escherichia-Shigella* (6,8 %), un género de la familia Ruminococcaceae (UCG-002) (6,0 %), *Lactobacillus* (5,8 %) y un género no cultivado de la familia Erysipelotrichaceae (5,5 %). Los animales del grupo testigo presentaron mayor abundancia relativa del género clasificado como *Prevotella* 9 ($p = 0,018$) con respecto a los otros dos grupos (Tabla 4.7). Los animales del grupo experimental 1 presentaron mayor abundancia relativa de los géneros *Helicobacter*, *Campylobacter*, un género no cultivado de la familia Desulfovibrionaceae, *Acidaminococcus*, *Peptoclostridium* y el género clasificado como *Treponema* 2 con respecto al grupo testigo y experimental 2 (Tabla 4.7).

Tabla 4.7.- Diferencias a nivel de género en la composición de la microbiota digestiva determinada mediante secuenciación masiva en el primer muestreo (tras el destete o tiempo 1) en los animales de los tres grupos experimentales del estudio de comparación 2.

Género	p	FDR	Bonferroni	Abundancia relativa (%)		
				Testigo	Experimental 1	Experimental 2
<i>Helicobacter</i>	0,0183	0,993	1,00	0,063	0,096	0,006
<i>Prevotella 9</i>	0,0185	0,993	1,00	3,280	1,013	0,868
<i>Campylobacter</i>	0,0226	0,993	1,00	0,210	0,666	0,112
Desulfovibrionaceae no cultivado	0,0307	0,993	1,00	0,006	0,034	0,013
<i>Acidaminococcus</i>	0,0316	0,993	1,00	0,001	0,005	0
<i>Peptoclostridium</i>	0,0318	0,993	1,00	0	0,001	0
<i>Treponema 2</i>	0,0498	0,993	1,00	1,668	2,465	0,342

A tiempo 2 los 5 géneros más abundantes fueron: el género clasificado como *Prevotella 9* (13,0 %), un género no cultivado de la familia S24-7 de los Bacteroidales (6,8 %), *Lactobacillus* (4,8 %), *Phascolarctobacterium* (4,6 %) y el género clasificado como *Prevotella 1* (3,6 %). Los animales del grupo testigo presentaron mayor abundancia relativa de *Alistipes*, el grupo FCS020 de la familia Lachnospiraceae y *Fusicatenibacter* con respecto a los animales de los dos grupos experimentales (Tabla 4.8). Los animales que recibieron el tratamiento 1 presentaron mayor abundancia relativa de *Erysipelatoclostridium*, *Faecalibacterium* y un género no cultivado de la familia Erysipelotrichaceae con respecto a los grupos testigo y experimental 2 (Tabla 4.8). Por último, los animales que recibieron el tratamiento 2 presentaron mayor abundancia relativa de los géneros clasificados como *Selenomonas 3*, *Elusimicrobium*, *Desulfovibrio*, género no cultivado de la familia Desulfovibrionaceae, *Bilophila*, *Fibrobacter*, grupo RC9 *gut* de la familia Rikenellaceae, género no cultivado de la familia Oligosphaeraceae, *Pyramidobacter* y grupo AC2044 de la familia Lachnospiraceae, con respecto a los grupos testigo y experimental 1 (Tabla 4.8).

Tabla 4.8.- Diferencias a nivel de género en la composición de la microbiota digestiva determinada mediante secuenciación masiva en el segundo muestreo (a los 8 días tras el destete o tiempo 2) en los animales de los tres grupos experimentales del estudio de comparación 2.

Género	p	FDR	Bonferroni	Abundancia relativa (%)		
				Testigo	Experimental 1	Experimental 2
<i>Selenomonas 3</i>	0,0013	0,371	0,41	0	0	0,004
<i>Elusimicrobium</i>	0,0024	0,371	0,74	0	0,0003	0,107
<i>Desulfovibrio</i>	0,0045	0,467	1,00	0,144	0,048	0,628
Desulfovibrionaceae no cultivado	0,0071	0,559	1,00	0	0	0,007
<i>Bilophila</i>	0,0145	0,676	1,00	0,003	0	0,006
<i>Alistipes</i>	0,0147	0,676	1,00	0,020	0,068	0,006
<i>Fibrobacter</i>	0,0151	0,676	1,00	0,022	0	0,072
Grupo RC9 <i>gut</i> Rikenellaceae	0,0178	0,686	1,00	3,180	1,651	3,562
<i>Erysipelatoclostridium</i>	0,0199	0,686	1,00	0,001	0,008	0,000
Oligosphaeraceae no cultivado	0,0285	0,720	1,00	0,004	0,002	0,012
<i>Faecalibacterium</i>	0,0299	0,720	1,00	1,415	2,111	1,086
Erysipelotrichaceae no cultivado	0,0318	0,720	1,00	0	0,003	0
Grupo FCS020 Lachnospiraceae	0,0380	0,720	1,00	0,096	0,057	0,043
<i>Pyramidobacter</i>	0,0446	0,720	1,00	0,001	0,006	0,029
Grupo AC2044 Lachnospiraceae	0,0484	0,720	1,00	0,012	0,001	0,104
<i>Fusicatenibacter</i>	0,0493	0,720	1,00	0,324	0,144	0,158

A tiempo 3 los 5 géneros más abundantes fueron: el género clasificado como *Prevotella* 9 (10,5 %), un género no cultivado de la familia S24-7 de los Bacteroidales (8,3 %), el grupo NK3B31 de la familia Prevotellaceae (6,9 %), el grupo RC9 *gut* de la familia Rikenellaceae (4,5 %) y *Phascolarctobacterium* (3,8 %). Los animales del grupo testigo presentaron mayor abundancia relativa de *Selenomonas* 1, *Parabacteroides*, un género no clasificado de la familia Lachnospiraceae, *Acetitomaculum* y un género de la familia Ruminococcaceae (UCG-005) con respecto a los animales de los dos grupos experimentales (Tabla 4.9). Los animales que recibieron el tratamiento 1 presentaron mayor abundancia relativa de *Bacteroides*, un género de la familia Ruminococcaceae (UCG-014), *Parasutterella*, *Cloacibacillus* y un género no cultivado de la familia Peptococcaceae con respecto al grupo testigo y experimental 2 (Tabla 4.9). Por último, los animales que recibieron el tratamiento 2 presentaron mayor abundancia relativa de los géneros clasificados como *Mogibacterium*, *Desulfovibrio*, *Helicobacter*, *Blautia*, *Chlamydophila*, un género no cultivado de la familia Desulfovibrionaceae, *Bilophila*, *Fibrobacter*, *Ruminobacter* y Lachnospiraceae UCG-004, con respecto al grupo testigo y experimental 1 (Tabla 4.9).

Tabla 4.9.- Diferencias a nivel de género en la composición de la microbiota digestiva determinada mediante secuenciación masiva en el tercer muestreo (a la salida de los animales hacia el cebadero o tiempo 3) en los animales de los tres grupos experimentales del estudio de comparación 2.

Género	p	FDR	Bonferroni	Abundancia relativa (%)		
				Testigo	Experimental 1	Experimental 2
<i>Selenomonas</i> 1	0,0055	0,622	1,00	0,106	0,014	0
<i>Parabacteroides</i>	0,0104	0,622	1,00	1,203	0,712	0,299
Lachnospiraceae no clasificado	0,0113	0,622	1,00	0,769	0,645	0,247
<i>Mogibacterium</i>	0,0158	0,622	1,00	0,001	0	0,004
<i>Desulfovibrio</i>	0,0162	0,622	1,00	0,146	0,229	0,371
<i>Helicobacter</i>	0,0178	0,622	1,00	0,006	0,040	0,068
<i>Blautia</i>	0,0240	0,622	1,00	0,425	0,608	1,020
<i>Bacteroides</i>	0,0255	0,622	1,00	0,730	0,925	0,069
Ruminococcaceae UCG-014	0,0271	0,622	1,00	1,432	2,508	2,413
<i>Parasutterella</i>	0,0316	0,622	1,00	0,018	0,115	0,000
<i>Cloacibacillus</i>	0,0318	0,622	1,00	0,0004	0,007	0,001
<i>Chlamydophila</i>	0,0318	0,622	1,00	0	0	0,081
<i>Ruminobacter</i>	0,0318	0,622	1,00	0	0	0,012
Peptococcaceae no cultivado	0,0347	0,635	1,00	0,062	0,079	0,048
Lachnospiraceae UCG-004	0,0365	0,635	1,00	0,040	0,088	0,127
<i>Acetitomaculum</i>	0,0493	0,734	1,00	0,112	0,029	0,039
Ruminococcaceae UCG-005	0,0493	0,734	1,00	2,251	1,495	1,451

4.2.2.4.- Comparación entre la secuenciación masiva y las PCRc

Se realizó una comparación entre los resultados obtenidos mediante las amplificaciones por PCRc y las obtenidas por la secuenciación masiva del gen ARNr 16S, tal y como se ha descrito en el apartado 4.2.1.4 (Tabla 4.10).

Tabla 4.10.- Proporciones de las poblaciones bacterianas analizadas mediante PCRc y las abundancias relativas obtenidas mediante secuenciación masiva, así como la relación entre ambas a lo largo del estudio de comparación 2.

	Tiempo 1		Tiempo 2		Tiempo 3		Global	
	Media	Desviación	Media	Desviación	Media	Desviación	Media	Desviación
Bact PCRc	7,923	2,905	11,781	3,578	11,771	2,591	10,492	3,503
Bact NGS	17,443	5,230	27,370	7,214	27,895	5,897	27,215	8,300
Bact NGS/PCRc	2,281	0,497	2,387	0,372	2,383	0,208	2,235	0,615
Lact PCRc	0,584	0,401	0,449	0,288	0,164	0,095	0,148	0,084
Lact NGS	5,820	3,972	4,829	2,880	1,634	0,880	1,523	0,804
Lact NGS/PCRc	10,145	2,373	11,036	2,655	10,216	1,755	9,910	2,861
Ent PCRc	4,013	3,836	0,005	0,011	0,017	0,022	0,015	0,012
Ent NGS	6,848	5,930	0,013	0,013	0,137	0,405	0,176	0,421
Ent NGS/PCRc	2,010	0,586	13,413	22,383	6,689	15,469	7,915	16,107
Bif PCRc	0,011	0,017	0,007	0,009	0,011	0,009	0,010	0,008
Bif NGS	0,001	0,003	0,000	0,000	0,001	0,001	0,001	0,001
Bif NGS/PCRc	0,034	0,073	0,014	0,049	0,053	0,154	0,072	0,159
cI PCRc	0,080	0,069	0,095	0,097	0,172	0,074	0,165	0,072
cI NGS	0,751	0,681	0,970	1,060	1,686	0,858	1,639	0,831
cI NGS/PCRc	8,649	3,598	10,024	8,701	9,589	1,320	9,024	2,568
cIV PCRc	13,526	5,343	11,656	3,510	9,963	2,612	8,827	2,598
cIV NGS	24,625	9,335	21,610	4,642	18,833	2,687	17,395	4,993
cIV NGS/PCRc	1,881	0,581	1,953	0,493	1,959	0,362	1,918	0,544
cXIV NGS	22,547	9,514	26,351	7,946	23,502	4,314	22,141	6,521
cXIV PCRc	7,023	2,527	10,370	2,564	8,154	1,613	7,998	2,354
cXIV NGS/PCRc	0,327	0,078	0,406	0,083	0,351	0,055	0,341	0,091

Al contrario de lo observado en el estudio de comparación 1, este segundo estudio demostró menores diferencias entre las proporciones obtenidas mediante secuenciación masiva y por PCRc, con la excepción de las mediciones relativas a enterobacterias. Así, en este estudio, la abundancia de bacteroides y clostridios del clúster IV evaluada mediante secuenciación masiva fue aproximadamente dos veces superior a la obtenida mediante PCRc y la proporción de lactobacilos, enterobacterias y clostridios del clúster I fue alrededor de 9 veces superior, mientras que el porcentaje de bifidobacterias y clostridios del clúster XIV estuvo subrepresentado, entre 15 y 3 veces, respectivamente,

en comparación con los resultados obtenidos mediante PCRc. Cabe destacar que en este estudio no se detectaron secuencias del género *Bifidobacterium* en dos tercios de las muestras analizadas.

Se comprobó también la correlación entre los resultados de ambas técnicas mediante el coeficiente de Pearson (Tabla 4.11).

Tabla 4.11.- Coeficientes de correlación de Pearson para las proporciones de las poblaciones bacterianas analizadas mediante PCRc y las abundancias relativas obtenidas mediante secuenciación masiva en el estudio de comparación 2.

	Global	
	Coeficiente	p
Bact	0,885	< 0,001
Lact	0,952	< 0,001
Ent	0,987	< 0,001
Bif	0,761	< 0,001
cI	0,940	< 0,001
cIV	0,694	< 0,001
cXIV	0,728	< 0,001

4.3.- Caracterización de la microbiota digestiva en animales con disbiosis o diferente estatus sanitario

4.3.1.- Estudio de disbiosis 1

El primer estudio de la microbiota asociada a un cuadro compatible con una disbiosis (disbiosis 1), realizado en cuatro granjas de lechones en la etapa de transición con la misma alimentación y genética, demostró diferencias significativas en la composición de la microbiota intestinal (Figura 4.42 y 4.43).

Los animales con un cuadro clínico asociado a una disbiosis presentaron un número de bacterias en las heces semejante a los animales que no presentaron este cuadro clínico. Tampoco se observaron diferencias significativas en las poblaciones bacterianas de bacteroides-*Prevotella*, lactobacilos y clostridios del clúster IV. Sin embargo, las poblaciones de enterobacterias y bifidobacterias presentes en las heces de los lechones fueron superiores en los animales con un cuadro asociado a disbiosis con respecto a aquellos animales que no lo presentaron ($p = 0,008$ y $p = 0,025$, respectivamente). Por el contrario, las poblaciones de clostridios del clúster I y XIV fueron significativamente inferiores ($p = 0,040$ y $p = 0,035$, respectivamente).

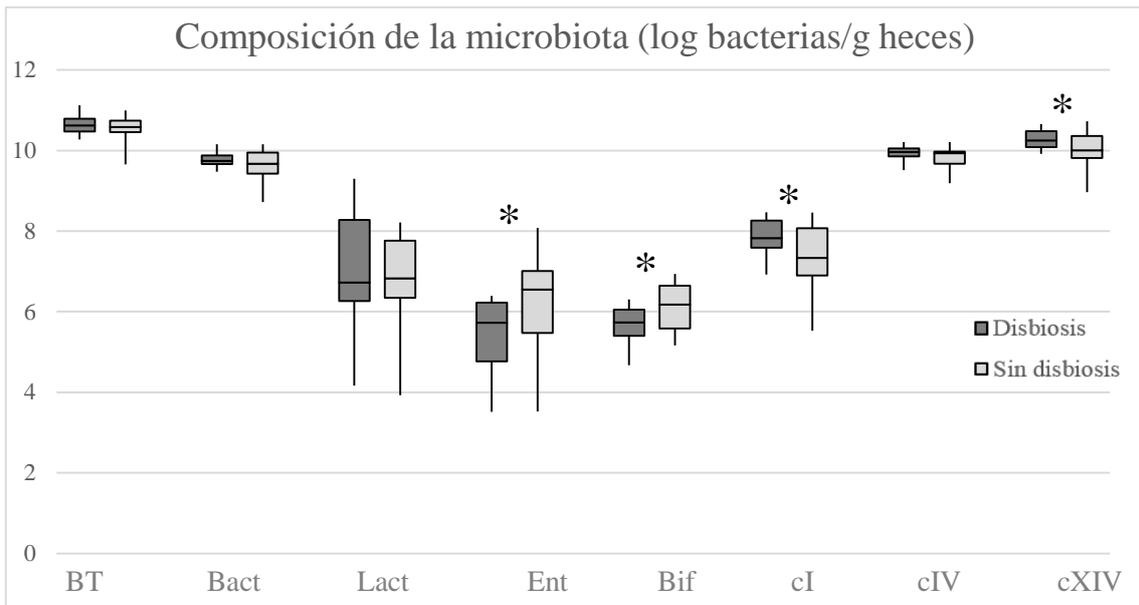


Figura 4.42.- Composición de la microbiota digestiva de los lechones del primer estudio de disbiosis (* diferencias significativas $p < 0,05$).

En cuanto las proporciones de estos mismos grupos de bacterias, también se observaron diferencias entre los dos grupos de animales. Así, el porcentaje de enterobacterias o bifidobacterias fueron superiores en los animales con un cuadro clínico asociado a disbiosis ($p = 0,005$ y $p = 0,012$, respectivamente). En cambio, las diferencias en las proporciones de las poblaciones de clostridios del clúster I y XIV no alcanzaron la significación estadística, al contrario de lo que ocurrió en los valores absolutos de estas bacterias, aunque estuvieron próximas ($p = 0,073$ y $p = 0,095$, respectivamente).

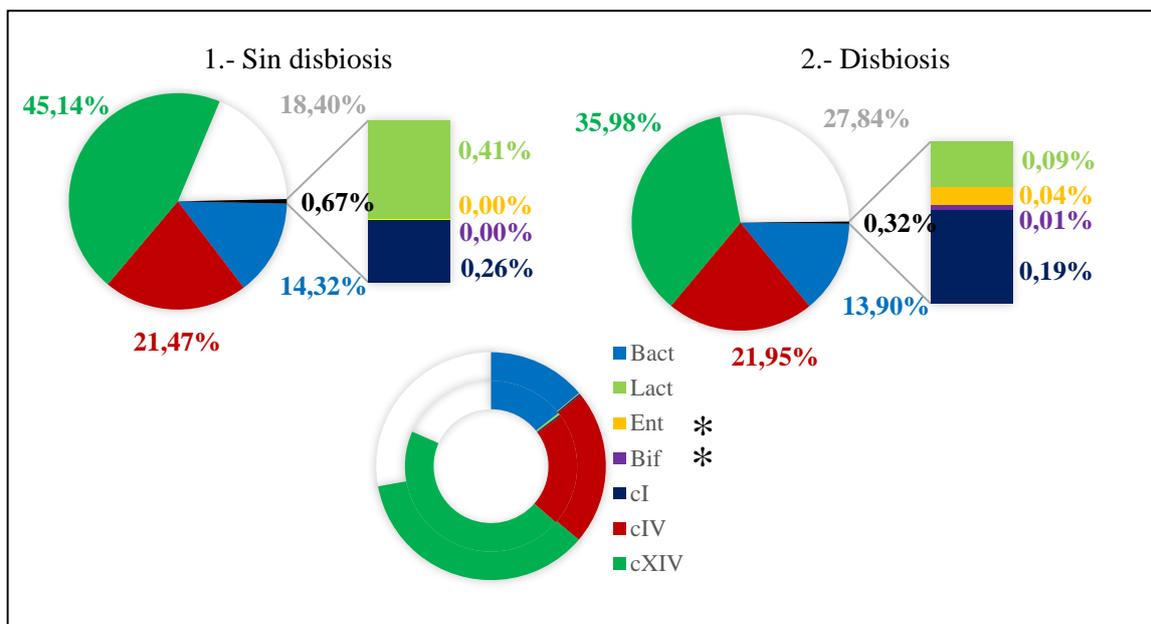
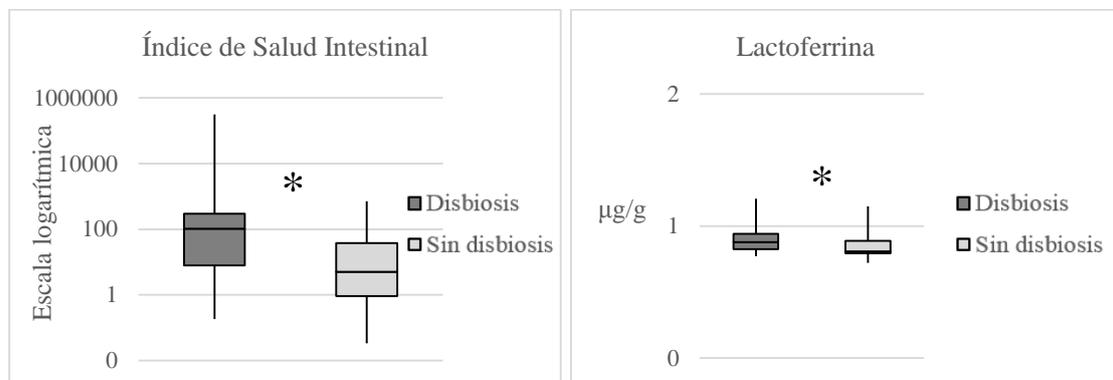


Figura 4.43.- Porcentajes medios relativos de las poblaciones bacterianas analizadas de los lechones con o sin disbiosis del primer estudio de disbiosis (* diferencias significativas $p < 0,05$).

Por último, el Índice de Salud Intestinal presentó diferencias significativas entre ambos grupos ($p = 0,035$), siendo más elevado en los animales aparentemente sanos, mientras que la concentración de lactoferrina presente en las heces fue significativamente inferior en los animales que presentaron disbiosis ($p = 0,037$) (Figuras 4.44 y 4.45).



Figuras 4.44-4.45.- Índice de Salud Intestinal (escala logarítmica) y concentración de la lactoferrina en las heces de los lechones con o sin disbiosis del estudio disbiosis 1. Los asteriscos indican diferencias estadísticamente significativas (* $p < 0,05$).

4.3.2.- Estudio de disbiosis 2

El segundo estudio de caracterización de la microbiota asociada a un cuadro compatible con una disbiosis (disbiosis 2) se realizó en una granja de lechones durante el año 2015, no detectándose diferencias significativas en la composición de la microbiota intestinal entre animales con cuadro clínico o no asociado a disbiosis (Figura 4.46 y 4.47).

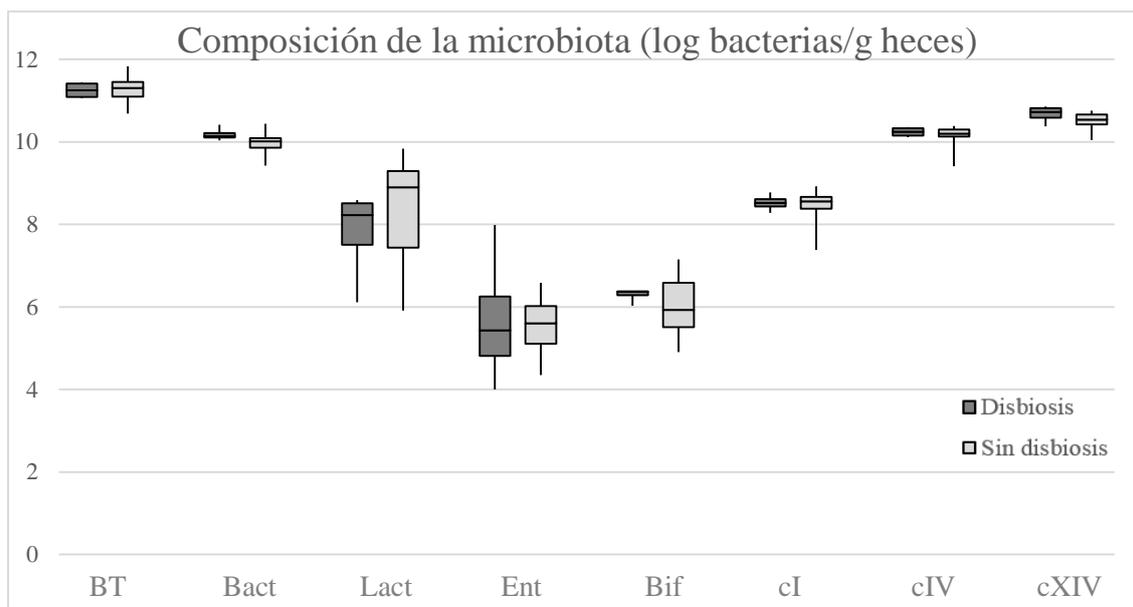


Figura 4.46.- Composición de la microbiota digestiva de los lechones del estudio de disbiosis 2.

Los animales con un cuadro clínico asociado a una disbiosis presentaron un número de bacterias en las heces semejante a los animales que no presentaron este cuadro clínico. Tampoco se observaron diferencias significativas para ninguna de las poblaciones bacterianas analizadas en este estudio. Solo cabe mencionar una ligera diferencia en la concentración de bacteroides-*Prevotella*, que fue superior en los animales sin un cuadro clínico asociado a disbiosis ($p = 0,118$).

En cuanto las proporciones de estos grupos de bacterias analizados tampoco se observaron diferencias significativas entre los dos grupos de animales.

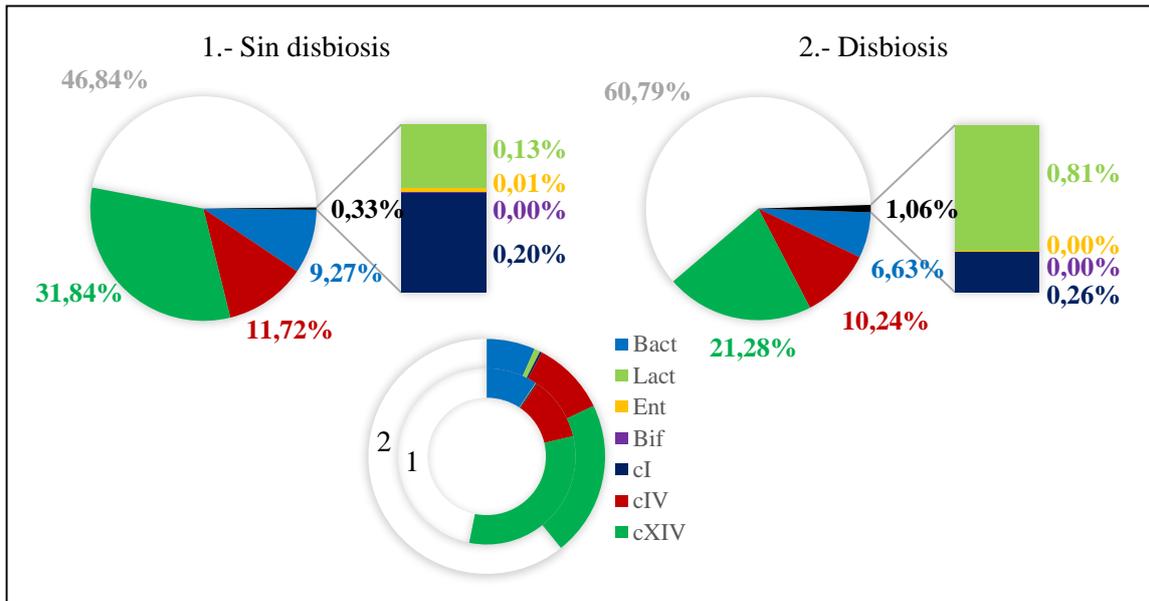
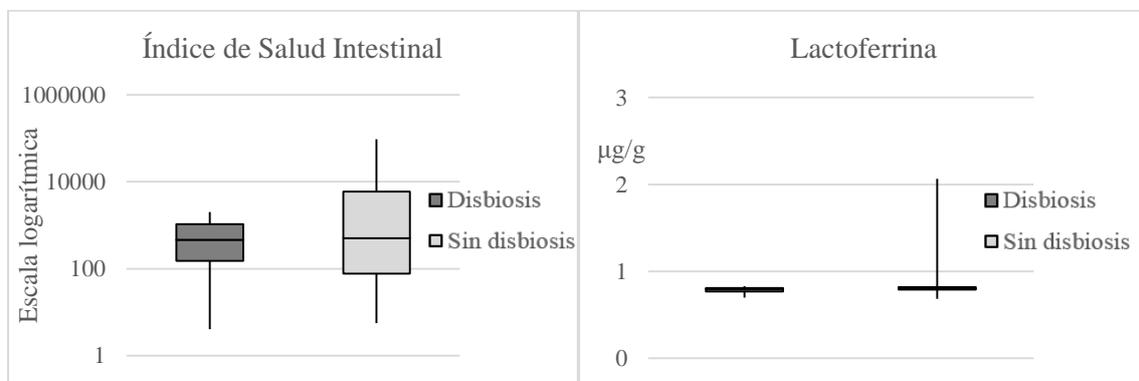


Figura 4.47.- Porcentajes medios relativos de las poblaciones bacterianas analizadas de los lechones del estudio de disbiosis 2.

De forma similar, no existieron diferencias significativas en los valores del Índice de Salud Intestinal ni en la concentración de lactoferrina en las heces de los lechones de ambos grupos (Figuras 4.48 y 4.49).



Figuras 4.48-4.49.- Índice de Salud Intestinal (escala logarítmica) y concentración de la lactoferrina en las heces de los lechones del estudio disbiosis 2.

Se llevó a cabo un segundo análisis de estos mismos resultados comparando, por un lado, aquellos animales sin ningún tipo de cuadro clínico y aquellos que solo presentaban un incremento de la temperatura corporal, y por otro, los lechones con un cuadro clínico evidente. El análisis realizado permitió observar las siguientes diferencias en la composición de la microbiota (Figura 4.50 y 4.51).

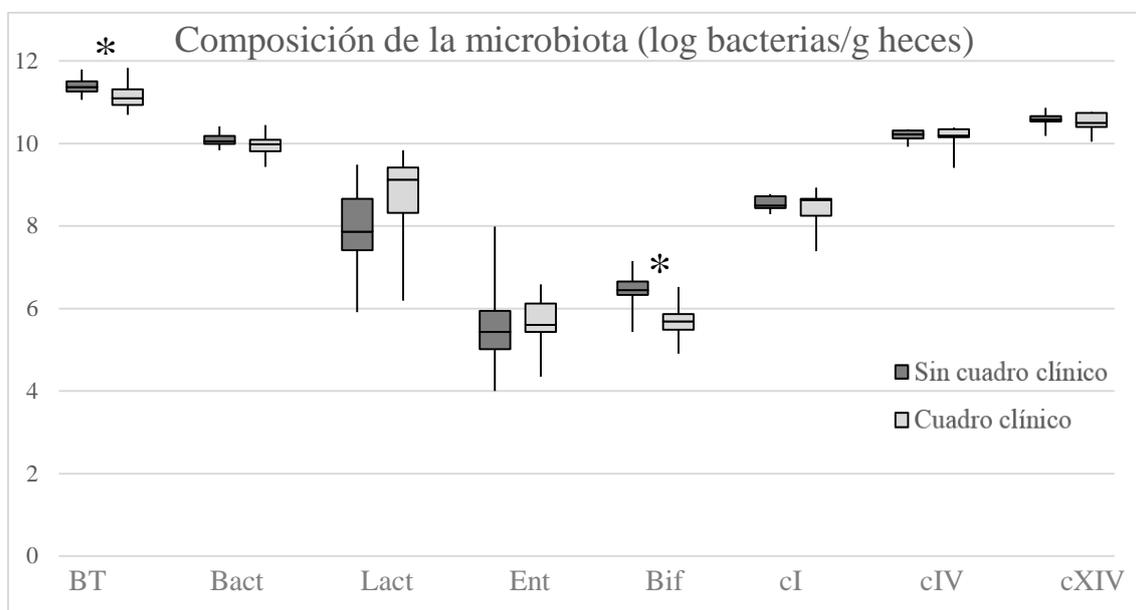


Figura 4.50.- Composición de la microbiota digestiva de los lechones del estudio de disbiosis 2 agrupando los animales en base a los signos clínicos (* diferencia significativa $p < 0,05$).

Ambos grupos de animales, lechones sin cuadro clínico ni temperatura elevada y lechones con cuadro clínico, presentaron diferencias en la cantidad de bacterias totales cuantificadas en las heces ($p = 0,050$), siendo inferior la concentración en los animales con un cuadro clínico. Estos animales también presentaron una población inferior de bifidobacterias ($p = 0,002$). El resto de poblaciones bacterianas fueron similares entre los dos grupos de animales, aunque se podría destacar la mayor población de lactobacilos cuantificada en los animales con un cuadro clínico asociado a disbiosis ($p = 0,080$).

En cuanto a las proporciones de estos grupos de bacterias, se observaron diferencias significativas entre los dos grupos de animales en el porcentaje de lactobacilos y de bifidobacterias ($p = 0,043$ y $p = 0,036$, respectivamente). Los animales con cuadro clínico presentaron mayor proporción de lactobacilos y menor proporción de bifidobacterias.

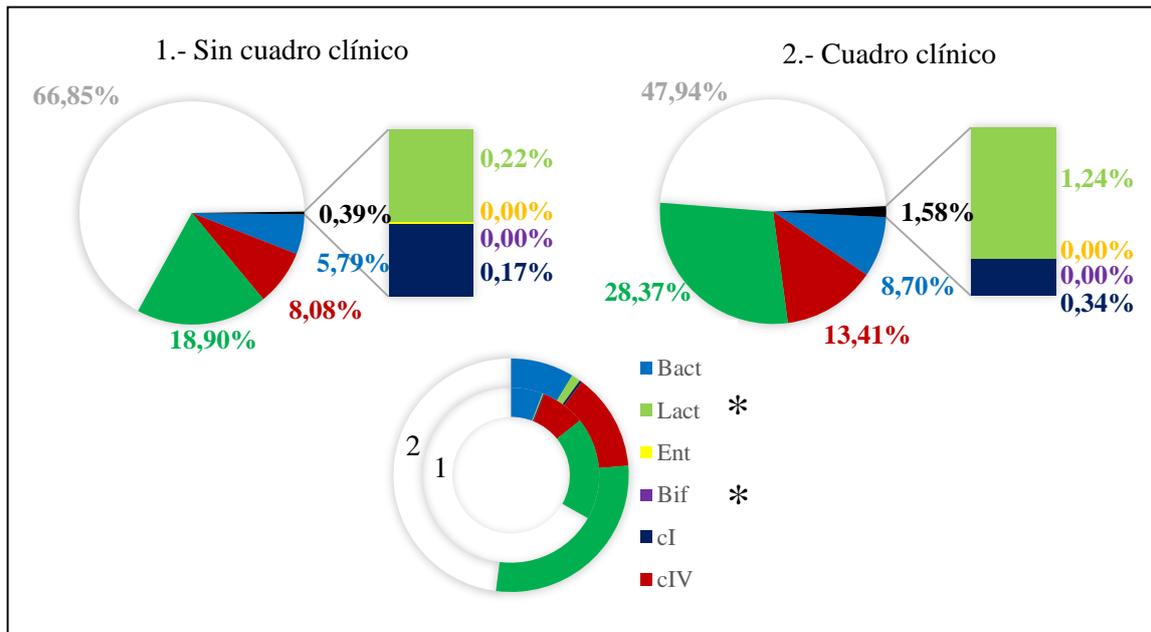
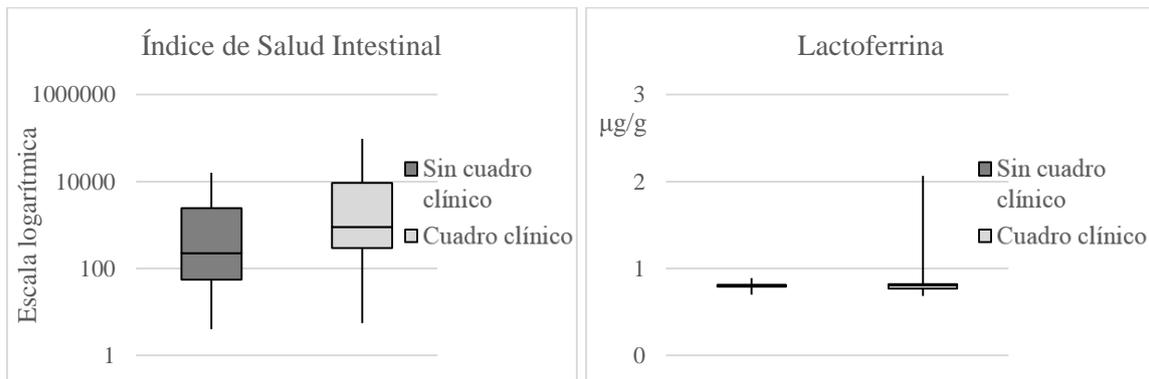


Figura 4.51.- Porcentajes medios relativos de las poblaciones bacterianas analizadas de los lechones del estudio de disbiosis 2, agrupando los animales en base a los signos clínicos (* diferencias significativas $p < 0,05$).

El Índice de Salud Intestinal fue similar para ambos grupos al igual que en la concentración de lactoferrina en las heces de los lechones (Figuras 4.52 y 4.53).



Figuras 4.52-4.53.- Índice de Salud Intestinal (escala logarítmica) y concentración de la lactoferrina en las heces de los lechones del estudio disbiosis 2, agrupando los animales en base a los signos clínicos.

4.3.3.- Estudio de disbiosis 3

El tercer estudio de caracterización de la microbiota asociada a un cuadro compatible con una disbiosis (disbiosis 3) se llevó a cabo en una granja de lechones durante el año 2016 y demostró escasas diferencias significativas en la composición de la microbiota intestinal (Figura 4.54 y 4.55). Como en el caso anterior, se comprobó que los animales sin un cuadro clínico o que solo presentaban un incremento de su temperatura corporal presentaban una composición de la microbiota muy similar, por lo que se agruparon en la comparación estadística.

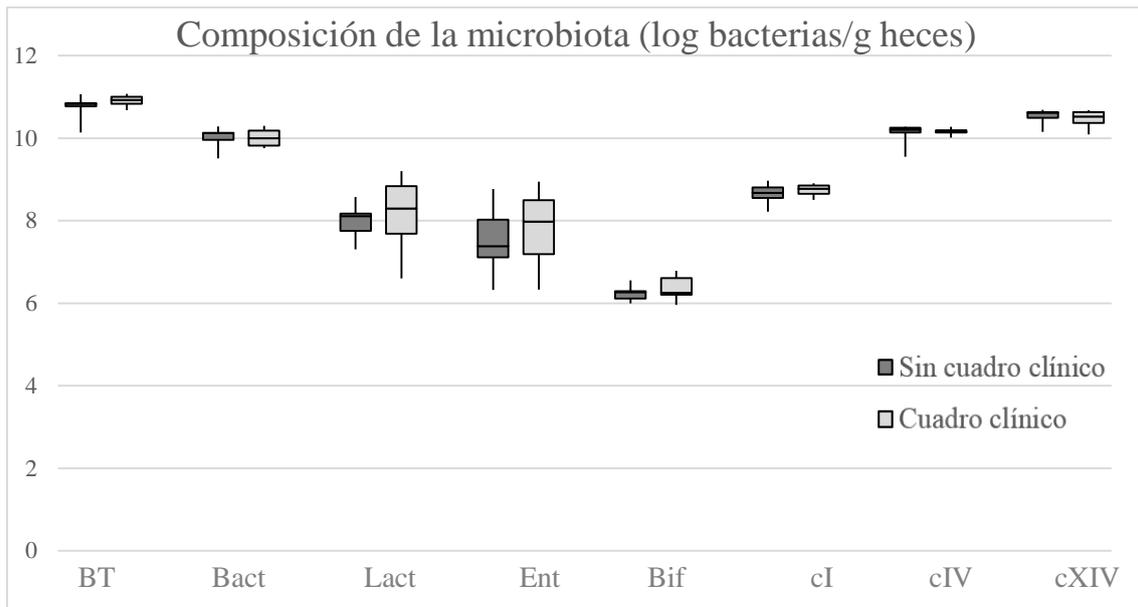


Figura 4.54.- Composición de la microbiota digestiva de los lechones del estudio de disbiosis 3, agrupando los animales en base a los signos clínicos.

Los animales con un cuadro clínico asociado a una disbiosis presentaron unas poblaciones bacterianas, determinadas mediante PCRc, similares a las de los animales sin un cuadro clínico o solo con un incremento en su temperatura corporal.

En cuanto las proporciones de estos grupos de bacterias, sí que se observaron diferencias significativas. La proporción de bacterioires-*Prevotella* y de clostridios del clúster XIV fue superior en los animales sin un cuadro clínico asociado a disbiosis comparado con los animales con cuadro clínico ($p = 0,014$ para ambas poblaciones). El porcentaje de clostridios del clúster IV también fue ligeramente superior en los animales sin cuadro clínico, con diferencias que estuvieron muy próximas a la significación estadística ($p = 0,056$).

Por último, el Índice de Salud Intestinal calculado para los ambos grupos de animales no presentó diferencias significativas al igual que la concentración de lactoferrina en las heces de los lechones (Figuras 4.56 y 4.57).

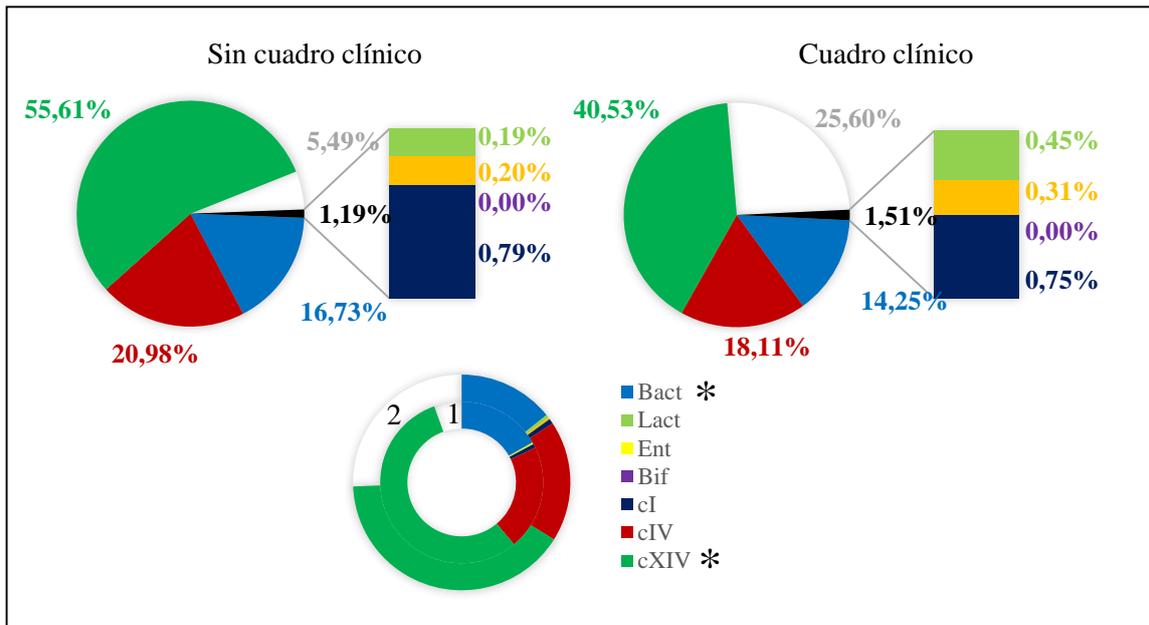
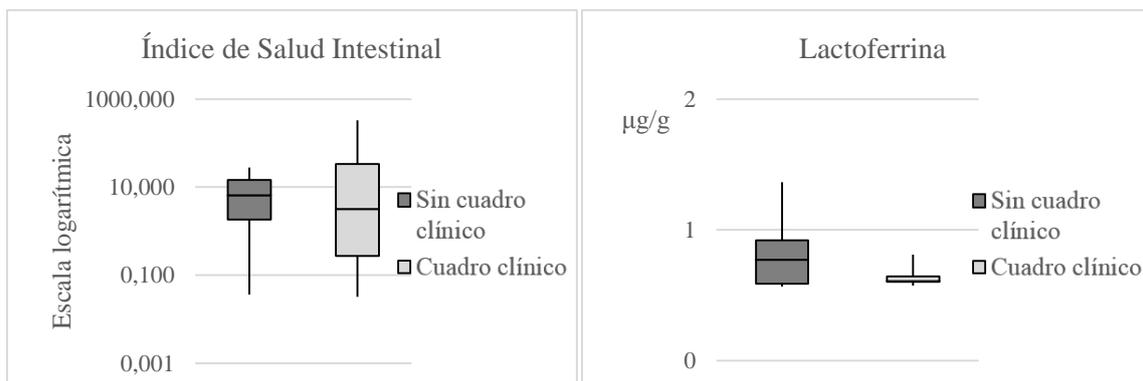


Figura 4.55.- Porcentajes medios relativos de las poblaciones bacterianas analizadas de los lechones del estudio de disbiosis 3 (* diferencias significativas $p < 0,05$), agrupando los animales en base a los signos clínicos.



Figuras 4.58-4.59.- Índice de Salud Intestinal (escala logarítmica) y concentración de la lactoferrina en las heces de los lechones del estudio disbiosis 3, agrupando los animales en base a los signos clínicos.

4.3.4.- Estudio de disbiosis 4

El último estudio de la microbiota asociada a un cuadro de diarreas compatible con una disbiosis (disbiosis 4) fue realizado durante la transición de un lote de lechones. Tal y como se muestra en las Figura 4.60 y 4.61, en este estudio se detectaron diferencias significativas en la composición de la microbiota intestinal.

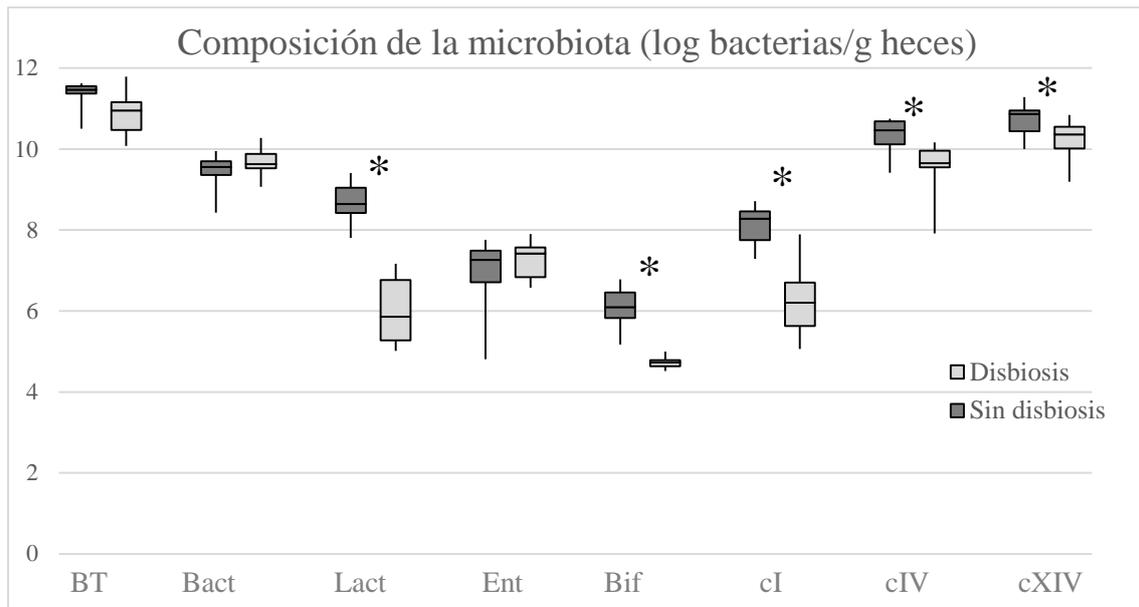


Figura 4.60.- Composición de la microbiota digestiva de los lechones del estudio de disbiosis 4 (* diferencias significativas $p < 0,05$)

Los animales con diarrea presentaron un número de bacterias totales cuantificadas en las heces inferior a los animales a los animales que no presentaron este cuadro clínico, estando esta diferencia en el límite de la significación ($p = 0,050$). No se observaron diferencias significativas en las determinaciones de las poblaciones bacterianas, en valor absoluto o logarítmico, de bacteroides y enterobacterias. En cambio, en las heces de los animales que presentaban diarrea se contabilizaron poblaciones inferiores de lactobacilos, bifidobacterias y clostridios del clúster I, IV y XIV con respecto a los animales sin cuadro clínico ($p < 0,001$, $p < 0,001$, $p < 0,001$, $p < 0,001$ y $p = 0,017$, respectivamente).

En cuanto a las proporciones de estos grupos bacterianos, se observaron diferencias significativas entre los dos grupos de animales. El porcentaje de bacteroides ($p = 0,030$), lactobacilos ($p < 0,001$), bifidobacterias ($p = 0,001$) y clostridios del clúster I ($p < 0,001$) y IV ($p = 0,017$) fue superior en los animales que no presentaron un cuadro clínico de diarrea con respecto a los animales con este signo clínico. La diferencia en la proporción de enterobacterias estuvo próxima a la significación estadística, siendo superior en los animales que presentaron diarrea ($p = 0,123$).

Los animales con diarrea presentaron un número de bacterias totales cuantificadas en las heces inferior a los animales a los animales que no presentaron este cuadro clínico, estando esta diferencia en el límite de la significación ($p = 0,050$). No se observaron diferencias significativas en las determinaciones de las poblaciones bacterianas, en valor absoluto o logarítmico, de bacteroides y enterobacterias. En cambio, en las heces de los animales que presentaban diarrea se contabilizaron poblaciones inferiores de lactobacilos, bifidobacterias y clostridios del clúster I, IV y XIV con respecto a los animales sin cuadro clínico ($p < 0,001$, $p < 0,001$, $p < 0,001$, $p < 0,001$ y $p = 0,017$, respectivamente).

En cuanto las proporciones de estos grupos de bacterias analizados, se observaron diferencias significativas entre los grupos de animales. El porcentaje de lactobacilos

($p < 0,001$), bifidobacterias ($p = 0,001$) y clostridios del clúster I ($p < 0,001$) y IV ($p = 0,017$) fue superior en los animales que no presentaron un cuadro clínico de diarreas con respecto a los animales que sí lo presentaron mientras que la proporción de bacteroides ($p = 0,030$) fue superior en los animales con disbiosis. La diferencia en la proporción de enterobacterias no llegó a la significación estadística aunque estuvo próxima, siendo superior en los animales que presentaron diarrea ($p = 0,123$).

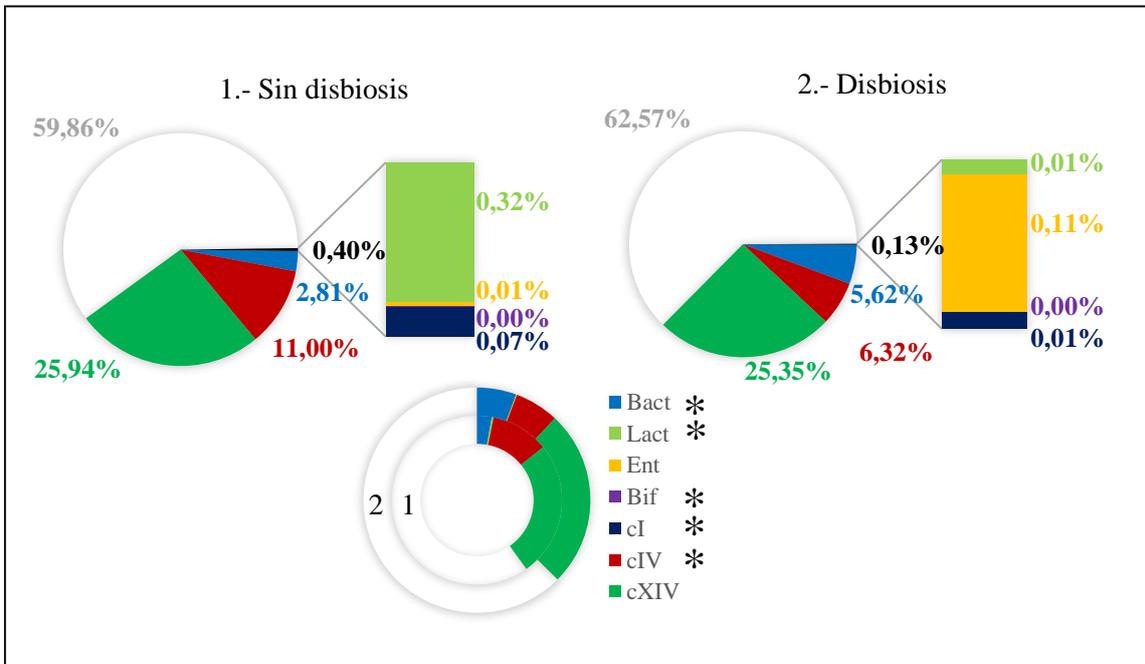
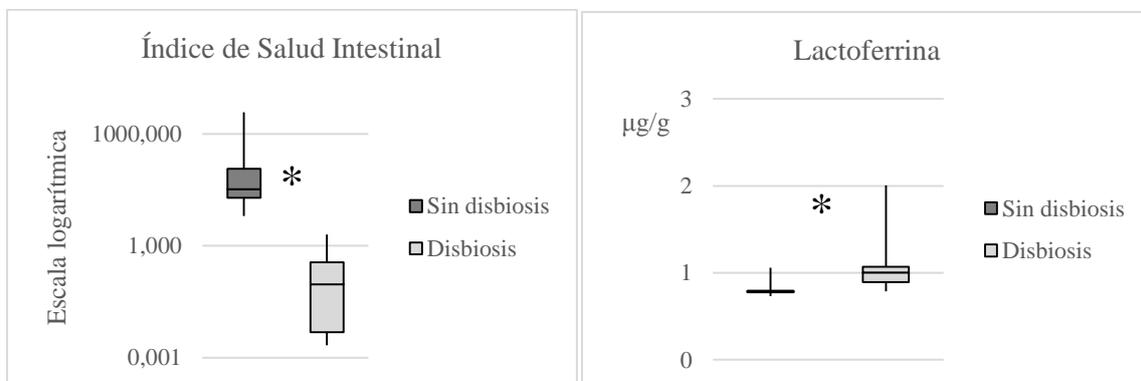


Figura 4.61.- Porcentajes medios relativos de las poblaciones bacterianas analizadas de los lechones del estudio de disbiosis 4 (* diferencias significativas $p < 0,05$).

Por último, el Índice de Salud Intestinal también mostró diferencias significativas ($p < 0,001$), al presentar los animales con diarrea un peor índice en comparación con los animales sanos. La concentración de lactoferrina en las heces de los lechones mostró un comportamiento inverso, siendo significativamente superior en los animales con diarrea ($p = 0,004$) (Figuras 4.62 y 4.63).



Figuras 4.62-4.63.- Índice de Salud Intestinal (escala logarítmica) y concentración de la lactoferrina en las heces de los lechones del estudio disbiosis 4 (* diferencias significativas $p < 0,05$).

4.3.5.- Estudio de estatus sanitario 1

En el estudio de estatus sanitario 1 se determinó la composición de la microbiota mediante PCRc en varias granjas con distinto estatus sanitario. Las granjas fueron clasificadas en base a este estatus sanitario como alto, medio y bajo y se realizó un estudio longitudinal con los recuentos obtenidos de las diferentes poblaciones bacterianas analizadas a lo largo del estudio, en los tres muestreos realizados en el experimento (al nacimiento, al destete y a la entrada al cebadero).

Como se puede apreciar en la Figura 4.64 las bacterias totales variaron a lo largo del estudio ($p = 0,014$), disminuyendo en un primer momento para incrementarse a la entrada a cebo de los animales. La población de bacteroides-*Prevotella* se incrementó a lo largo del estudio ($p = 0,006$), aunque al realizar la comparación por tiempos solo se apreció un incremento significativo entre los tiempos 2 y 3 ($p < 0,001$), existiendo gran variabilidad al nacimiento de los lechones. En cuanto a la población de lactobacilos también se observaron diferencias significativas ($p = 0,040$), disminuyendo entre los dos primeros muestreos e incrementándose en el último. El recuento de las bifidobacterias tuvo un comportamiento semejante al de lactobacilos, aunque no se alcanzó la significación estadística ($p = 0,076$). Los recuentos de enterobacterias presentes en las heces de los animales del estudio disminuyeron progresivamente a lo largo del estudio ($p < 0,001$). Por último, la cantidad de clostridios de los tres clúster analizados se incrementó de forma semejante entre el nacimiento y el destete de los animales, sin alcanzar la significación estadística. Entre el segundo y tercer muestreo, los clúster I y IV disminuyeron (significativamente en el caso del clúster I, $p = 0,030$) mientras que el clúster XIV se incrementó ($p = 0,026$).

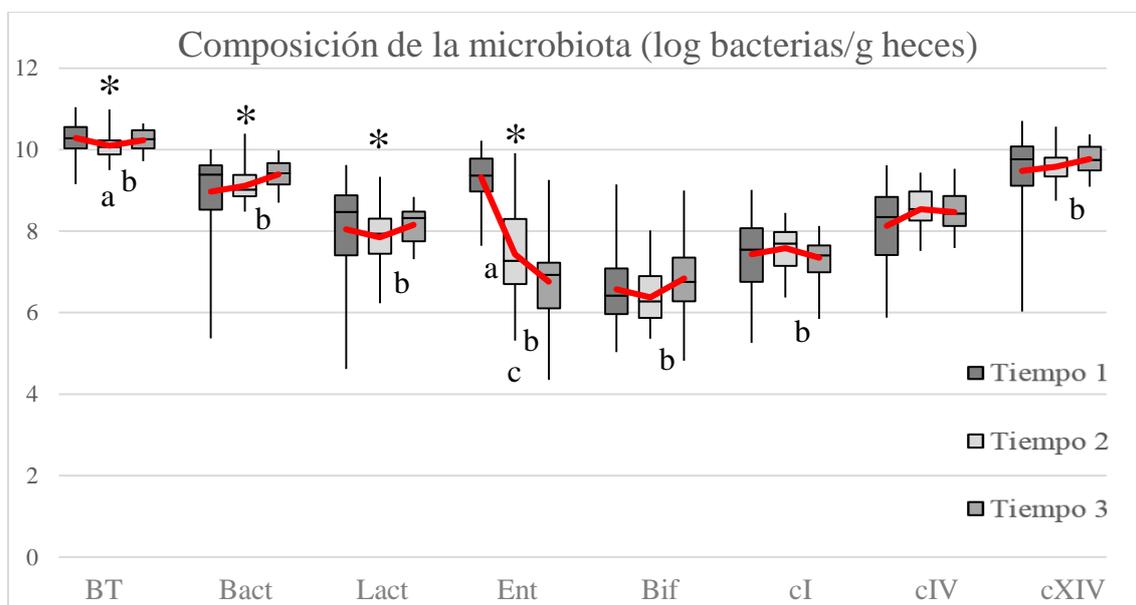


Figura 4.64.- Composición de la microbiota digestiva a lo largo de los muestreos realizados: al nacimiento (tiempo 1), al destete (tiempo 2) y a la entrada a cebo (tiempo 3) en el estudio estatus sanitario 1. Los asteriscos y letras indican diferencias estadísticamente significativas (* $p < 0,05$: comparación tiempo 1-2-3; a: comparación tiempo 1-2; b: comparación tiempo 2-3; c: comparación tiempo 1-3).

En cuanto a las proporciones de las poblaciones bacterianas analizadas se observaron diferencias significativas en los bacteroides ($p < 0,001$), enterobacterias ($p < 0,001$) y clostridios clúster I ($p = 0,020$), IV ($p = 0,015$) y XIV ($p = 0,042$). Entre el primer y segundo muestreo se incrementó el porcentaje de clostridios del clúster IV ($p = 0,006$) y XIV, aunque en este caso no se alcanzó la significación estadística ($p = 0,086$), y disminuyeron las enterobacterias ($p < 0,001$). Finalmente, entre el destete y la entrada a cebo de los animales se incrementó la proporción de bacteroides-*Prevotella* ($p = 0,001$) y bifidobacterias, con diferencias próximas a la significación estadística ($p = 0,059$), mientras que disminuyeron de forma significativa las enterobacterias ($p = 0,001$) y el clúster I de clostridios ($p = 0,002$) (Figura 4.65).

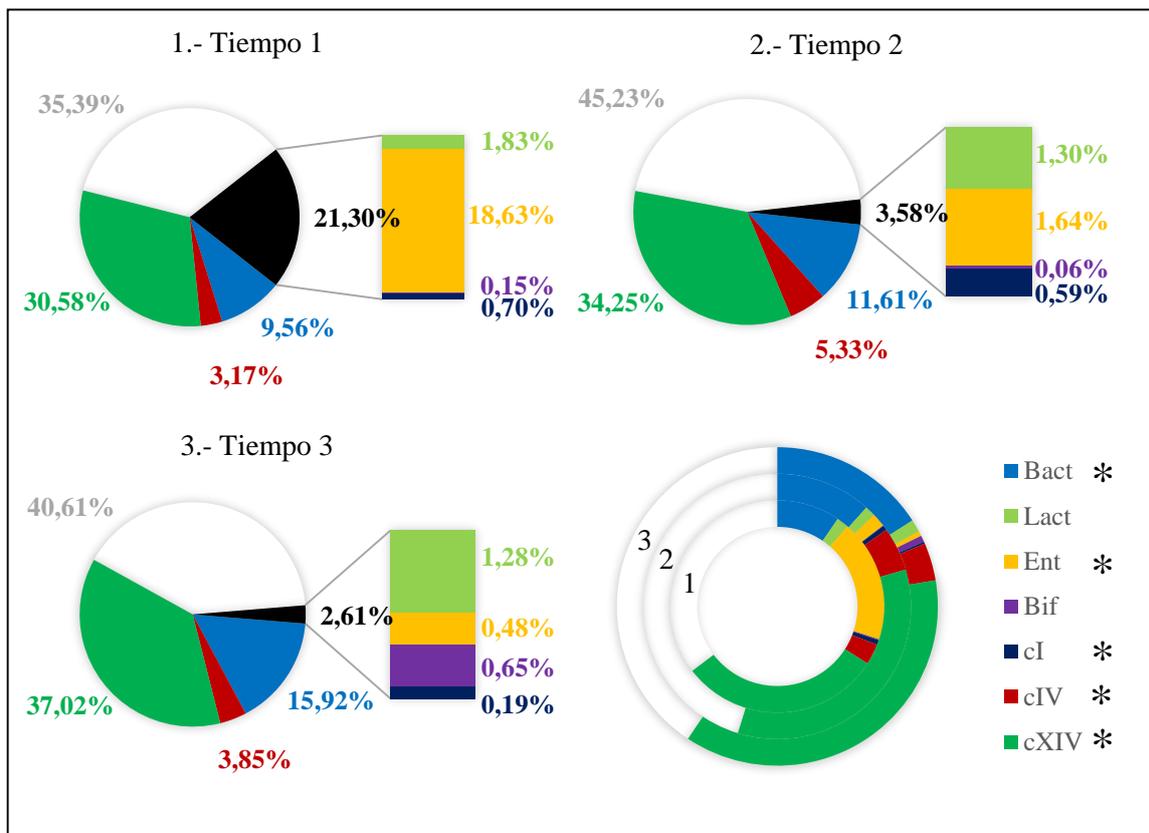
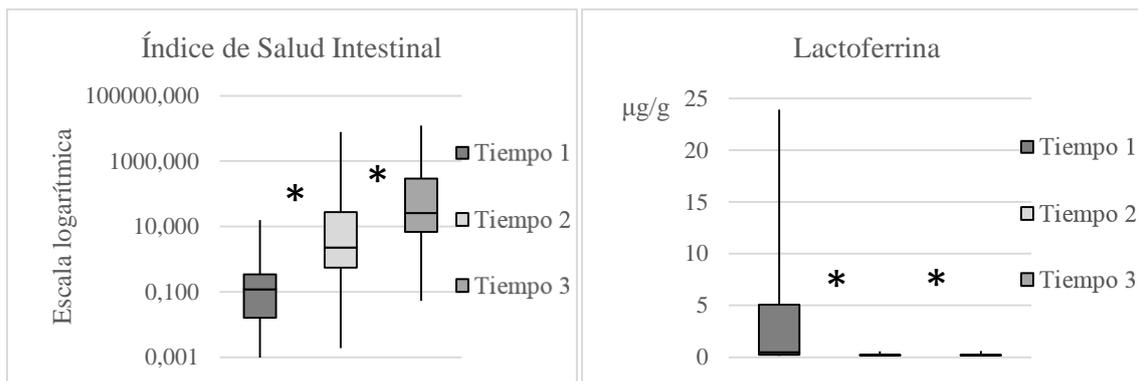


Figura 4.65.- Porcentajes medios relativos de las poblaciones bacterianas analizadas en las heces de los lechones a lo largo del estudio de estatus sanitario 1 (* diferencias significativas $p < 0,05$).

El Índice de Salud Intestinal mostró diferencias significativas entre los tres muestreos realizados, incrementándose progresivamente a lo largo del estudio ($p < 0,001$). En el caso de la cuantificación de la lactoferrina en las heces, se observó un claro descenso entre el primer y segundo muestreo ($p < 0,001$), que continuó entre los dos últimos muestreos ($p = 0,008$) (Figuras 4.66 y 4.67).



Figuras 4.66-4.67.- Índice de Salud Intestinal (escala logarítmica) y concentración de la lactoferrina en las heces de los lechones del estudio de estatus sanitario 1 (* diferencias significativas $p < 0,05$).

En el análisis realizado al nacimiento (tiempo 1) se pudieron observar las siguientes diferencias en las poblaciones bacterianas analizadas, como se puede apreciar en las Figuras 4.68 y 4.69.

No existieron diferencias significativas entre la microbiota de los animales de granjas con diferentes estatus sanitario siendo la única diferencia próxima a la significación la relativa a la concentración de lactobacilos ($p = 0,052$). Este valor fue más elevado entre los animales de granjas con un estatus alto en comparación con las de estatus bajo ($p = 0,084$).

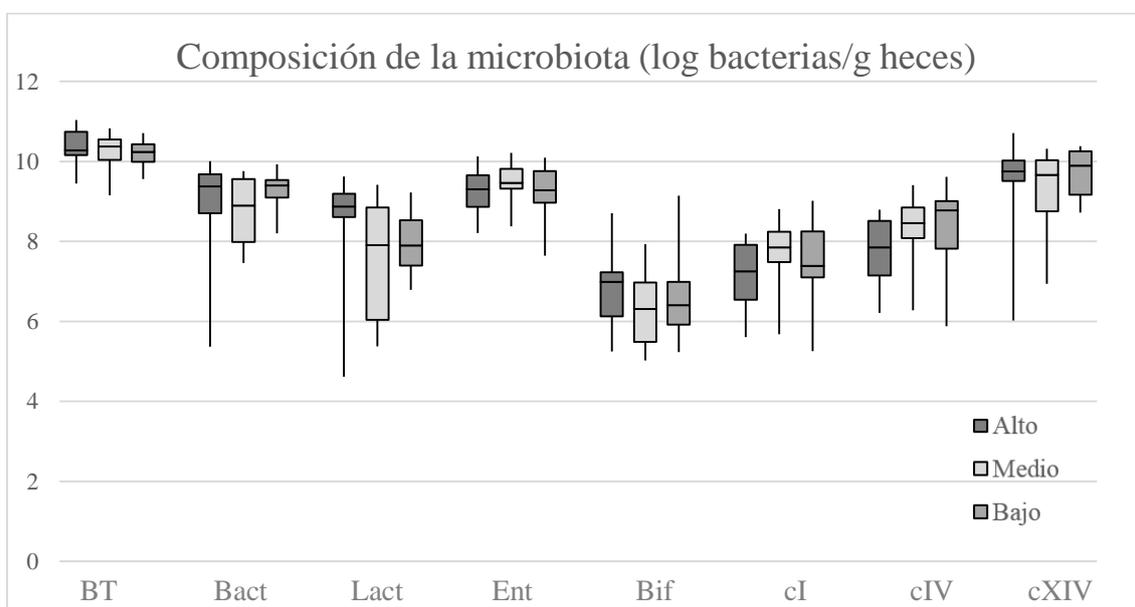


Figura 4.68.- Composición de la microbiota digestiva al nacimiento (tiempo 1) de los animales durante el estudio de estatus sanitario 1.

En cuanto a la proporción de las poblaciones bacterianas analizadas, se observaron diferencias significativas entre las granjas con diferente estatus sanitario. El porcentaje de bacteroides fue superior en los animales de granjas con un estatus bajo con respecto a aquellas con un estatus medio ($p = 0,023$). También se observaron diferencias en la proporción de lactobacilos ($p = 0,033$), principalmente entre las granjas con un estatus alto y medio ($p = 0,034$), siendo superior en las granjas de un estatus alto. El resto de poblaciones no presentaron diferencias significativas, aunque la proporción de clostridios del clúster XIV se acercó al límite de la significación ($p = 0,077$), siendo superior en las granjas con un estatus bajo con respecto a aquellas con un estatus medio ($p = 0,072$).

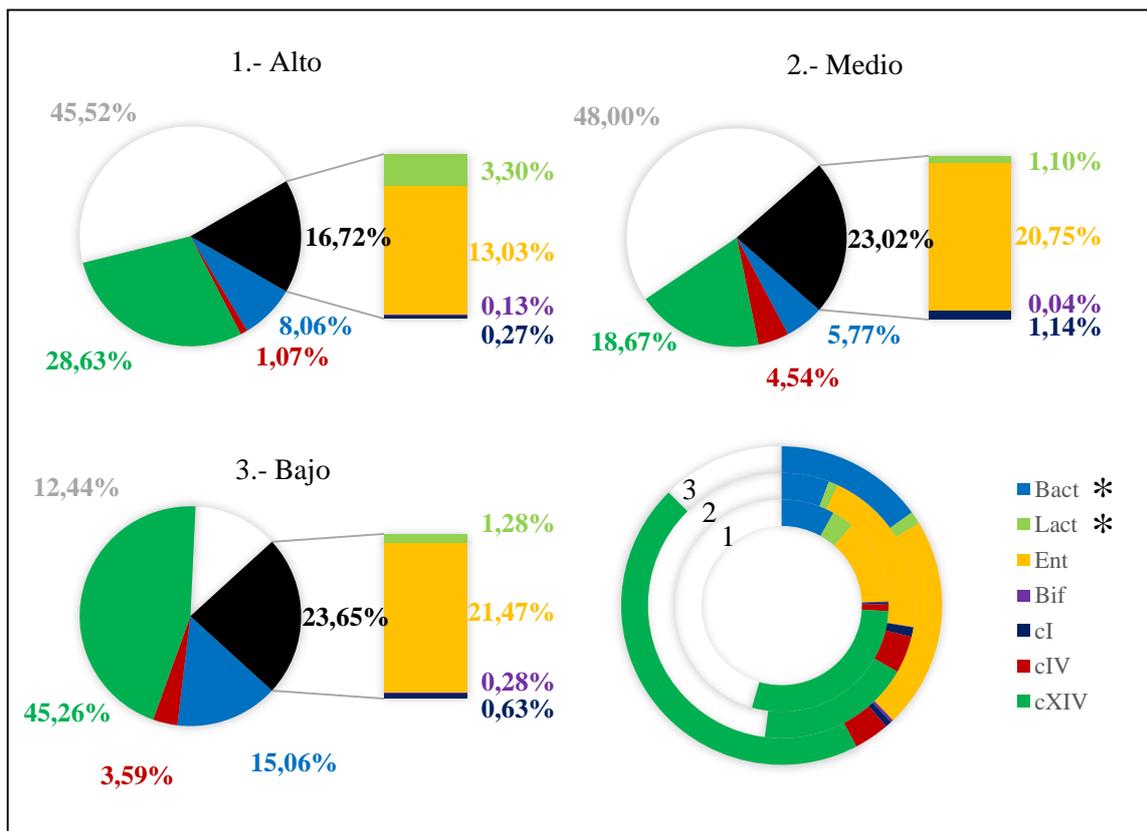
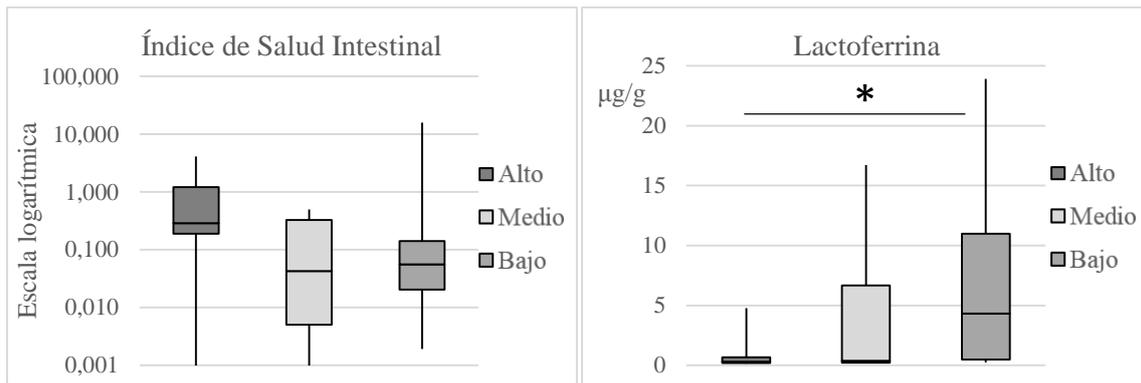


Figura 4.69.- Porcentajes medios relativos de las poblaciones bacterianas analizadas al nacimiento (tiempo 1) de los lechones en granjas con diferente estatus sanitario (* diferencias significativas $p < 0,05$).

El Índice de Salud Intestinal mostró diferencias significativas entre los tres estatus sanitarios ($p = 0,047$), siendo superior en los animales de granjas con un estatus sanitario alto con respecto a los lechones de granjas con un estatus medio ($p = 0,054$) (Figura 4.70). También la concentración de lactoferrina presente en las heces de los lechones presentó diferencias significativas ($p = 0,029$), siendo inferior en granjas con un estatus alto con respecto a las que tuvieron un estatus bajo ($p = 0,023$) (Figura 4.71).



Figuras 4.70-4.71.- Índice de Salud Intestinal (escala logarítmica) y concentración de la lactoferrina en las heces de los lechones en el primer muestreo (tiempo 1) en granjas con diferente estatus sanitario (* diferencias significativas $p < 0,05$).

En el análisis realizado al destete (tiempo 2) se pudieron observar las siguientes diferencias en las poblaciones bacterianas analizadas como se puede apreciar en las Figuras 4.72 y 4.73.

La población de lactobacilos fue inferior en los animales con un estatus sanitario medio con respecto aquellos con un estatus alto ($p = 0,011$) y bajo ($p = 0,002$). Las granjas con un estatus sanitario alto presentaron un mayor recuento de clostridios del clúster I con respecto a las que tenían un estatus bajo ($p = 0,005$) y éstas presentaron un recuento superior de clostridios del clúster IV con respecto a las granjas de estatus medio ($p = 0,031$). Además, cabe mencionar el mayor recuento de bacteroides en las granjas con estatus alto con respecto a las de medio ($p = 0,068$).

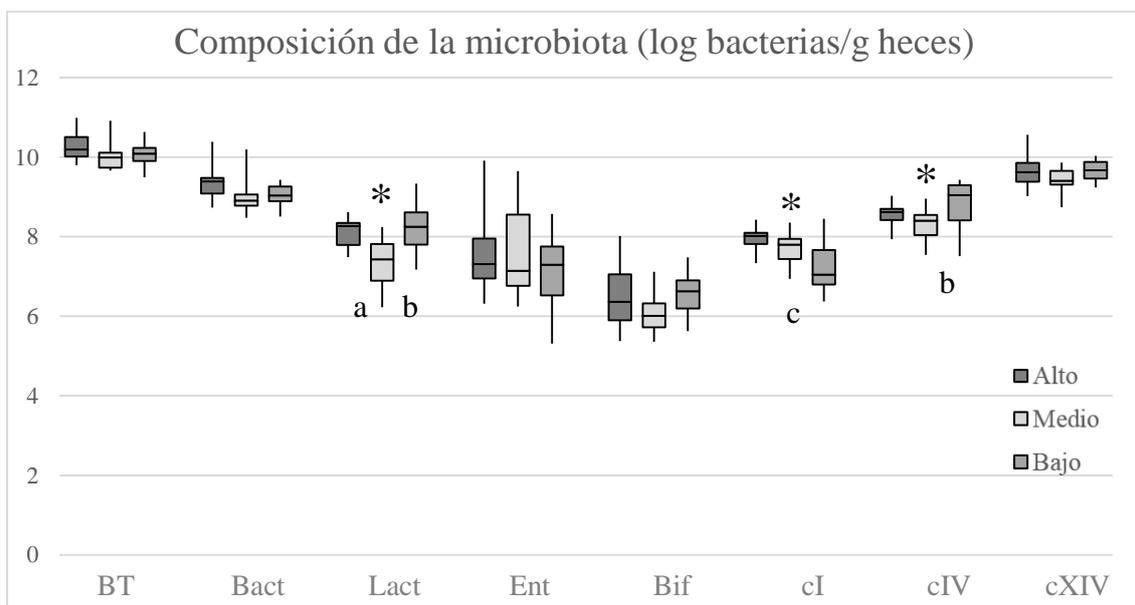


Figura 4.72.- Composición de la microbiota digestiva al destete (tiempo 2) de los animales durante el estudio de estatus sanitario 1. Los asteriscos y letras indican diferencias estadísticamente significativas (* $p < 0,05$: comparación estatus sanitario; a: comparación estatus alto-medio; b: comparación estatus medio-bajo; c: comparación estatus alto-bajo).

En cuanto a la proporción de las poblaciones bacterianas analizadas se observaron diferencias significativas en el porcentaje de lactobacilos, que fue superior en las granjas con un estatus bajo con respecto a aquellas con estatus medio ($p = 0,004$). La proporción de clostridios del clúster I fue superior en los animales con un estatus medio con respecto a los que tenían un estatus bajo ($p = 0,016$) y el porcentaje de clostridios del clúster IV fue superior en las granjas con estatus bajo con respecto a las de estatus alto ($p = 0,049$). También se puede destacar la proporción ligeramente superior de clostridios del clúster XIV en las granjas con estatus bajo con respecto a las de estatus alto, aunque esta diferencia no alcanzó la significación estadística ($p = 0,068$).

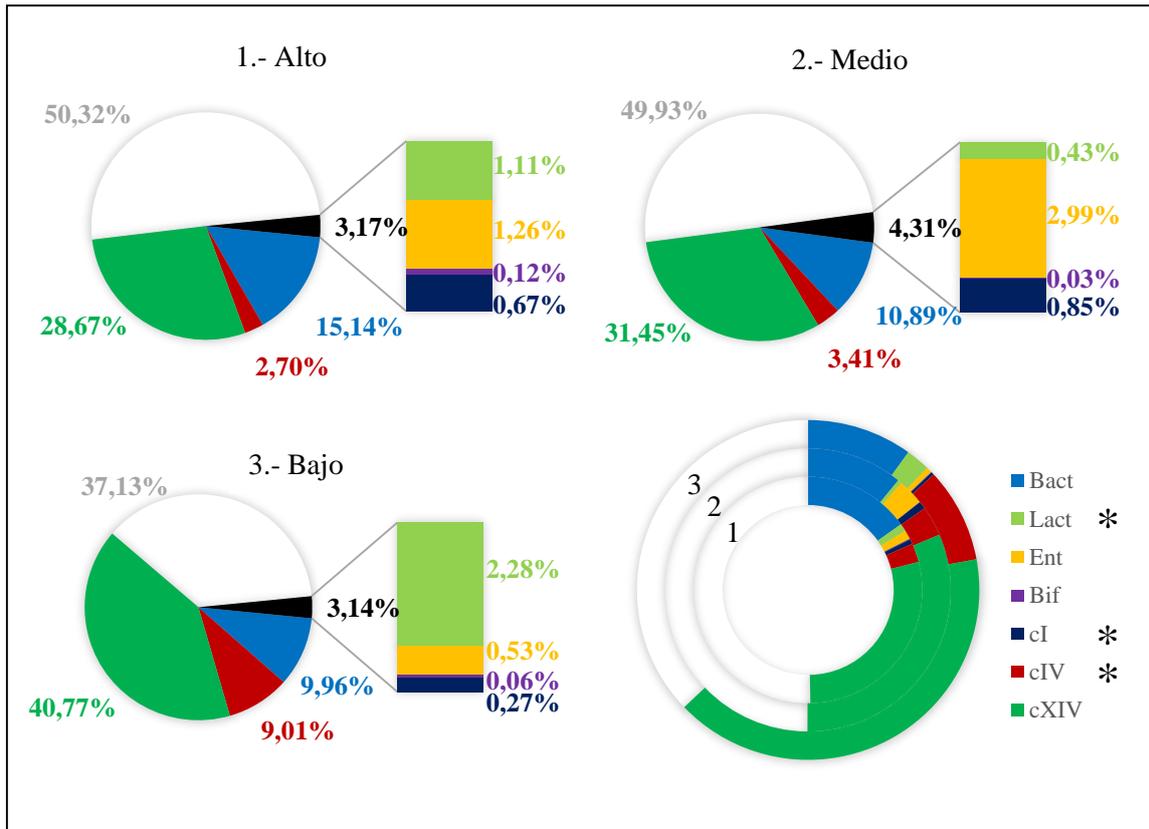
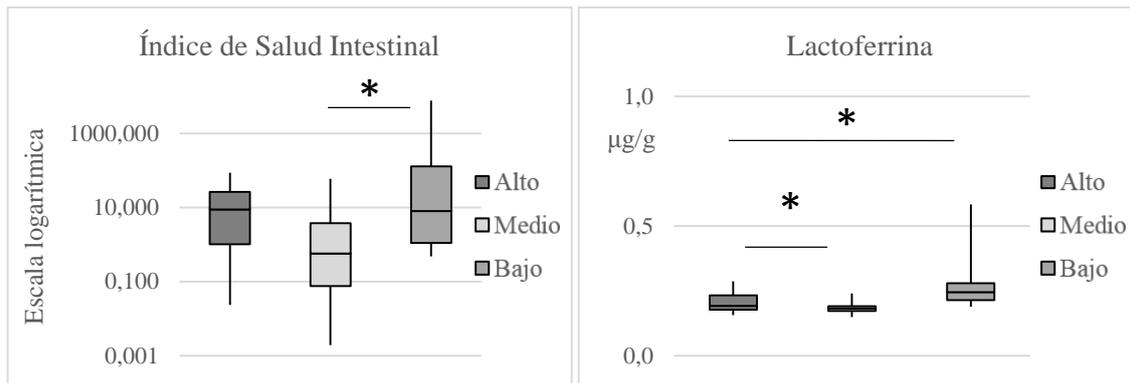


Figura 4.73.- Porcentajes medios relativos de las poblaciones bacterianas analizadas al destete (tiempo 2) en las heces de los lechones en granjas con diferente estatus sanitario (* diferencias significativas $p < 0,05$).

En el segundo muestreo, el Índice de Salud Intestinal fue diferente para los tres estatus sanitarios ($p = 0,046$), siendo superior en los animales de granjas con un estatus sanitario bajo con respecto a los lechones de granjas con un estatus medio ($p = 0,045$) (Figura 4.74). La concentración de lactoferrina en las heces de los lechones también presentó diferencias significativas ($p < 0,001$), siendo superior en granjas con un estatus bajo con respecto a las que tuvieron un estatus alto ($p = 0,053$) y medio ($p = 0,023$) (Figura 4.75).



Figuras 4.74-4.75.- Índice de Salud Intestinal (escala logarítmica) y concentración de la lactoferrina en las heces de los lechones en el segundo muestreo (tiempo 2) en granjas con diferente estatus sanitario (* diferencias significativas $p < 0,05$).

Las Figuras 4.76 y 4.77 muestran los resultados obtenidos en los animales muestreados a la entrada a cebo (tiempo 3). La población de enterobacterias fue inferior en los animales con un estatus sanitario bajo con respecto aquellos con un estatus alto ($p = 0,004$) y medio ($p = 0,018$). Las granjas con un estatus sanitario bajo también presentaron un menor recuento de clostridios del clúster I con respecto a las que tenían un estatus alto ($p = 0,003$) y un recuento superior de clostridios del clúster IV con respecto a las granjas de estatus medio ($p < 0,001$) y alto ($p = 0,001$). Además, estuvieron próximos a la significación estadística el mayor recuento de bacteroides en las granjas con estatus medio con respecto a las de estatus bajo ($p = 0,079$) o el menor número de bacterias totales en las granjas con un estatus bajo ($p = 0,061$).

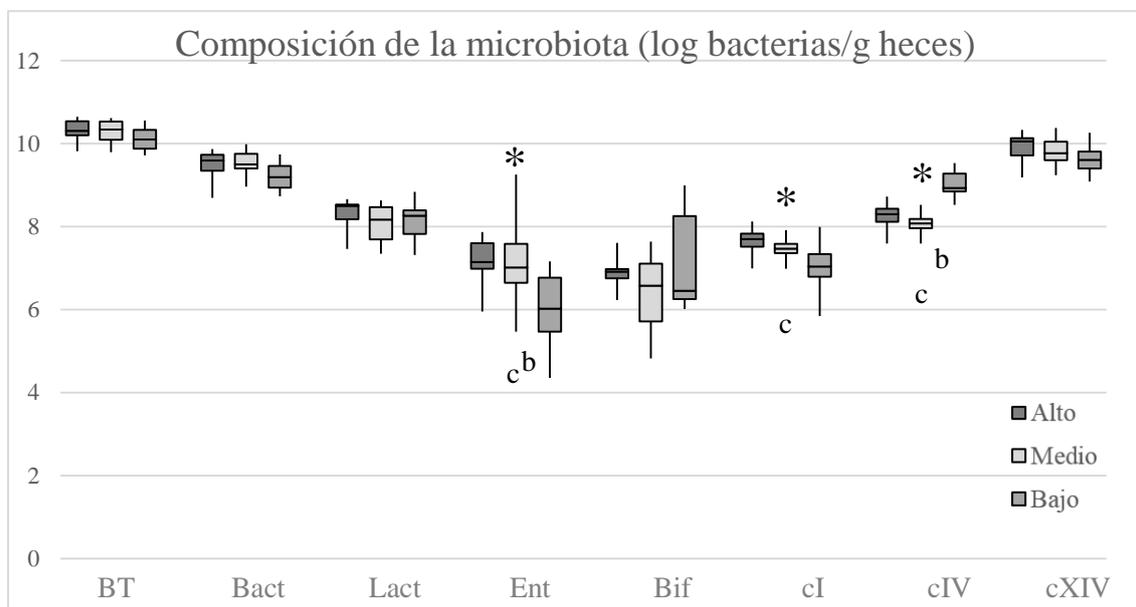


Figura 4.76.- Composición de la microbiota digestiva a la entrada a cebo (tiempo 3) de los animales durante el estudio de estatus sanitario 1. Los asteriscos y letras indican diferencias estadísticamente significativas (* $p < 0,05$: comparación estatus sanitario; b: comparación estatus medio-bajo; c: comparación estatus alto-bajo).

En cuanto a la proporción de las poblaciones bacterianas analizadas se observaron diferencias significativas entre las granjas con diferente estatus sanitario en los mismos grupos bacterianos que los observados para los recuentos en valor absoluto. Así, se observaron diferencias significativas en la proporción de enterobacterias y clostridios del clúster I y IV, aunque la significación se redujo.

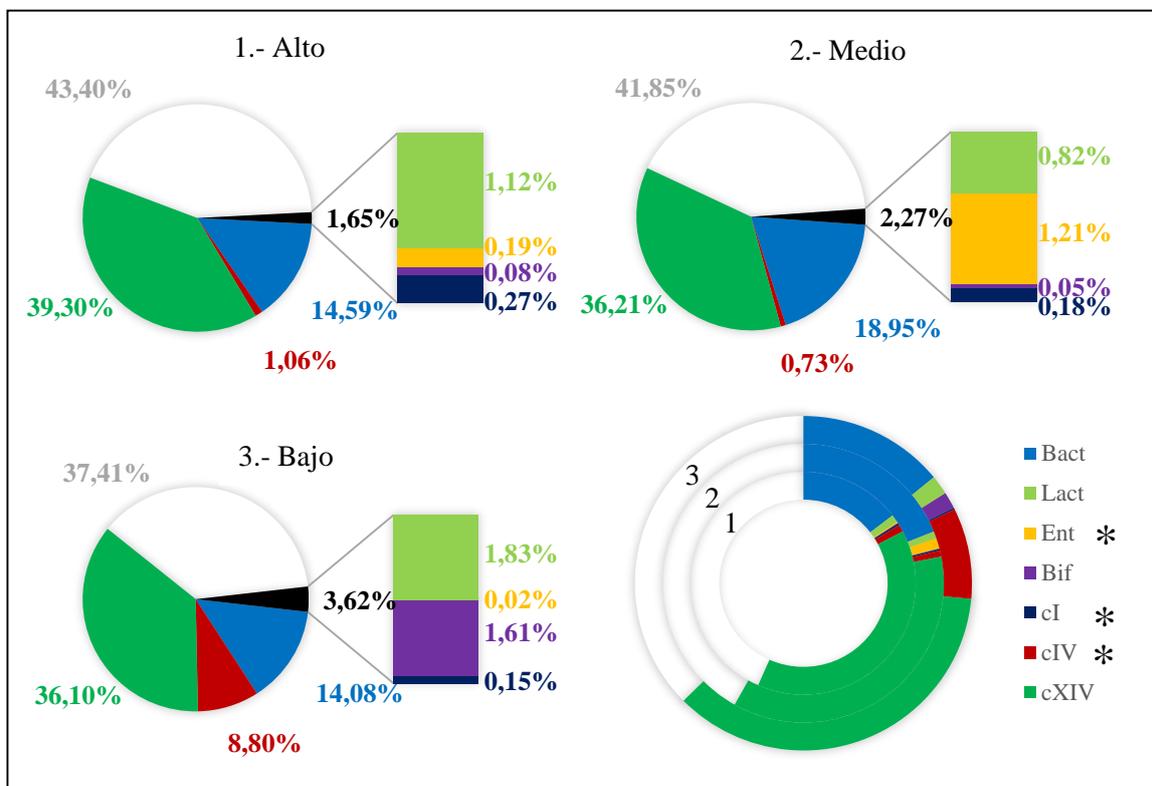
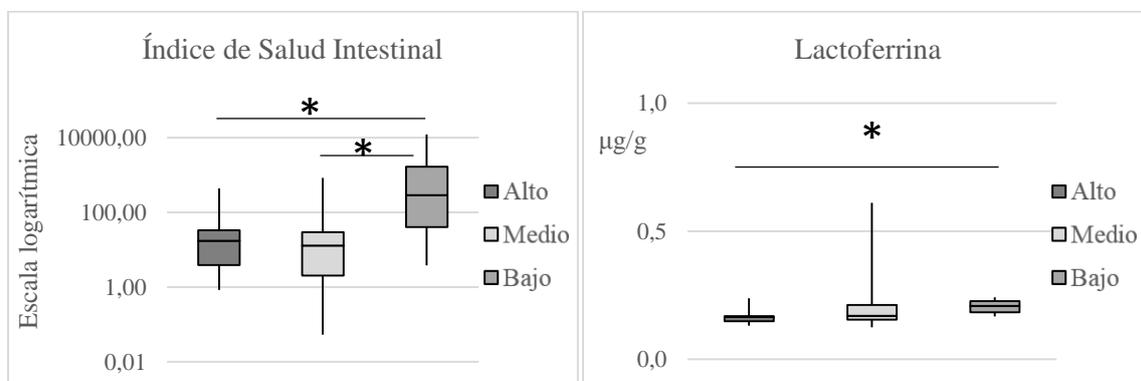


Figura 4.77.- Porcentajes medios relativos de las poblaciones bacterianas analizadas a la entrada de cebo (tiempo 3) de los cerdos en granjas con diferente estatus sanitario (* diferencias significativas $p < 0,05$).

Por último, el Índice de Salud Intestinal a la entrada a cebo fue superior en las granjas con un estatus bajo con respecto a las de estatus alto ($p = 0,043$) y medio ($p = 0,008$) (Figura 4.78) mientras que la concentración de lactoferrina en las heces fue superior en las granjas con un estatus bajo con respecto a las granjas de un estatus alto ($p = 0,003$) (Figura 4.79).



Figuras 4.80-4.81.- Índice de Salud Intestinal (escala logarítmica) y concentración de la lactoferrina en las heces de los lechones en el tercer muestreo (tiempo 3) en granjas con diferente estatus sanitario (* diferencias significativas $p < 0,05$).

4.4.- Caracterización de la microbiota digestiva en animales sometidos a diferentes modificaciones en la composición de la dieta

4.4.1.- Estudio de dieta 1

Se realizó el análisis a tiempo 2 (una semana pos-destete) y tiempo 3 (final de transición), teniendo en cuenta los resultados obtenidos a tiempo 1 (día siguiente al destete), comparando los resultados proporcionados por los animales del grupo testigo, con la alimentación y la medicación empleadas en las explotaciones de forma habitual, con los grupos experimentales 1 y 2 que recibieron dieta con menor concentración de lisina así como con menor uso de antibióticos (sin colistina y sin neomicina), en el caso del grupo experimental 2. Se ha omitido el análisis longitudinal ya que los resultados proporcionados fueron similares a los obtenidos en el estudio de comparación 2 por tratarse de animales de la misma.

Como se puede apreciar en las Figuras 4.82 y 4.83, el análisis realizado de los resultados obtenidos en el segundo muestreo (tiempo 2) no demostró la existencia de diferencias significativas en las poblaciones bacterianas analizadas. Se puede destacar el menor recuento y proporción de enterobacterias en los animales del grupo de tratamiento 1 con respecto al grupo testigo y al grupo tratamiento 2 ($p = 0,347$ y $p = 0,349$, respectivamente para el valor del recuento y la proporción) así como el mayor recuento de bifidobacterias y el menor porcentaje de clostridios del clúster I en el grupo de tratamiento 2 con respecto a los otros dos grupos de animales ($p = 0,367$ y $p = 0,197$, respectivamente).

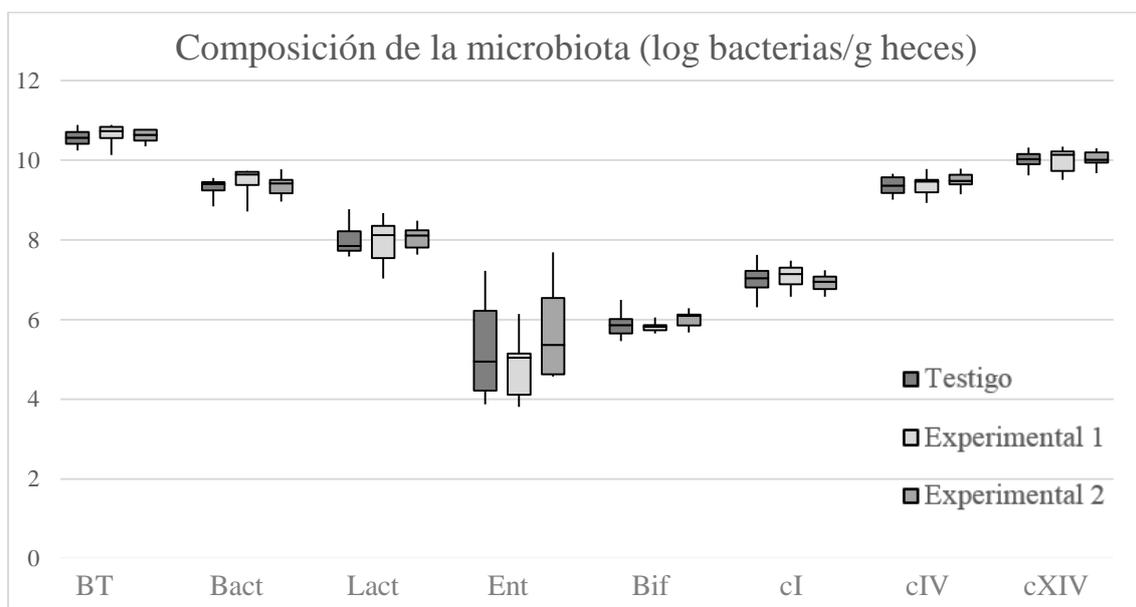


Figura 4.82.- Composición de la microbiota gastrointestinal determinada mediante PCRc a los 8 días del destete (tiempo 2) en los lechones de los tres grupos experimentales (testigo, experimental 1 con lisina reducida y experimental 2 con lisina reducida y sin colistina) durante el estudio de dieta 1.

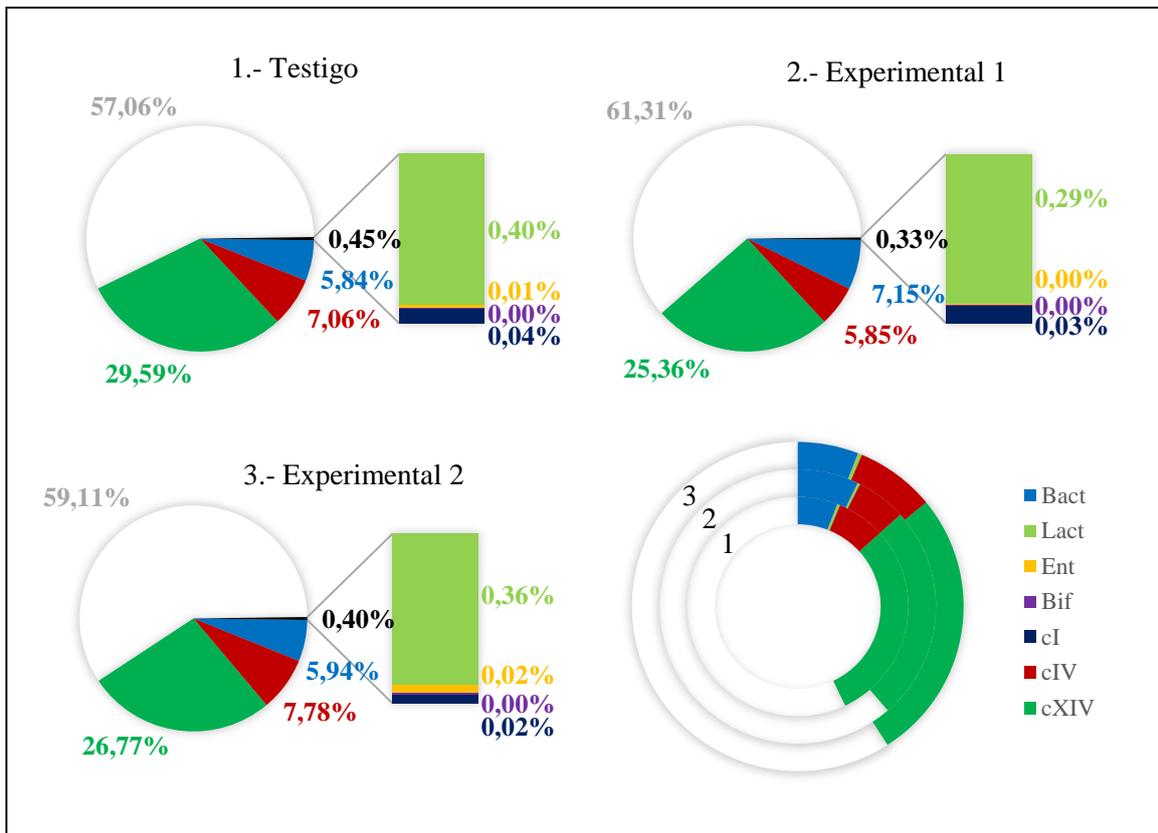


Figura 4.83.- Porcentajes medios relativos de las poblaciones bacterianas de la microbiota digestiva determinadas mediante PCRc en los lechones de los tres grupos experimentales (testigo, experimental 1 con lisina reducida y experimental 2 con lisina reducida y sin colistina) en el muestreo realizado a los 8 días del destete (tiempo 2) durante el estudio de dieta 1.

Por último, el Índice de Salud Intestinal calculado en el segundo muestreo para los tres grupos de animales no mostró diferencias significativas entre los lechones ($p = 0,610$), probablemente a consecuencia de la gran dispersión en sus valores (Figura 4.84).

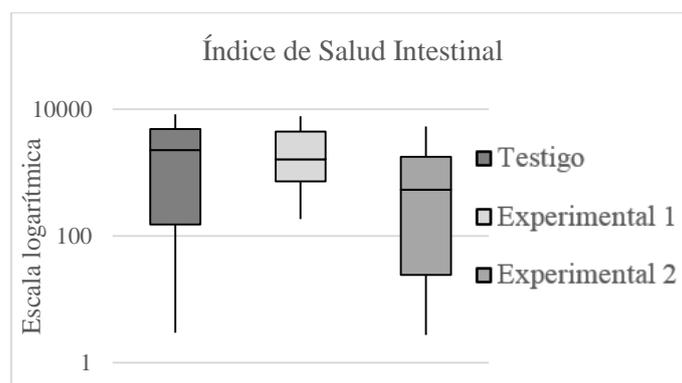


Figura 4.84.- Índice de Salud Intestinal (escala logarítmica) en los tres grupos experimentales (testigo, experimental 1 con lisina reducida y experimental 2 con lisina reducida y sin colistina) en el muestreo realizado a los 8 días del destete (tiempo 2) durante el estudio de dieta 1.

Los resultados obtenidos a la finalización de la etapa de transición (tiempo 3) se pueden apreciar en las Figuras 4.85 y 4.86.

Se observaron cambios significativos en la microbiota de los animales el día previo a la salida de los animales hacia el cebadero en función del grupo experimental. Los animales que recibieron el tratamiento 1 presentaron mayores recuentos de bacteroides con respecto a los otros grupos de animales ($p = 0,024$), principalmente con respecto a los que recibieron el tratamiento 2 ($p = 0,021$). En cambio, estos animales del grupo de tratamiento 1 presentaron un recuento inferior de bifidobacterias con respecto a los otros dos grupos de animales ($p = 0,011$), principalmente con respecto a los animales del grupo de tratamiento 2 ($p = 0,009$). Se podría destacar también el mayor recuento de clostridios del clúster IV y XIV en los animales que recibieron el tratamiento 1 con respecto a los otros dos grupos sin que estas diferencias alcanzasen significación estadística ($p = 0,208$ y $p = 0,175$, respectivamente).

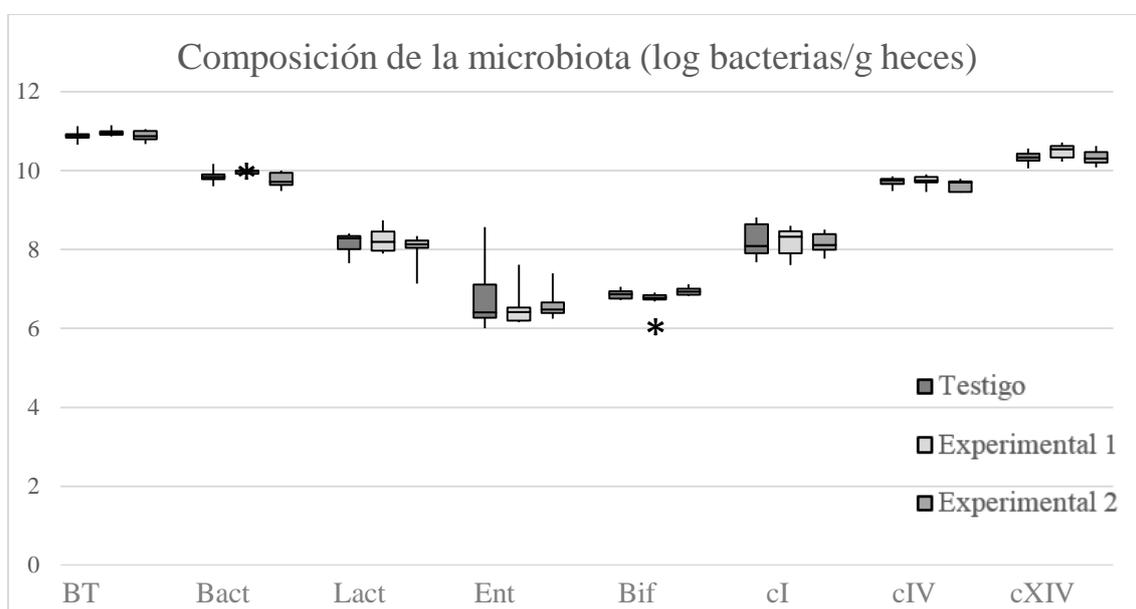


Figura 4.85.- Composición de la microbiota gastrointestinal determinada mediante PCR el día anterior a la salida hacia el cebadero (tiempo 3) en los animales de los tres grupos experimentales (testigo, experimental 1 con lisina reducida y experimental 2 con lisina reducida y sin neomicina) durante el estudio de dieta 1. Los asteriscos indican diferencias estadísticamente significativas (* $p < 0,05$).

En cuanto a la proporción de las poblaciones bacterianas analizadas se observaron diferencias significativas para la población de bacteroides-*Prevotella*, siendo los animales del grupo de tratamiento 2 los que presentaron un porcentaje inferior con respecto al grupo testigo ($p = 0,081$) o de tratamiento 1 ($p = 0,006$). La significación de las diferencias en la proporción de bifidobacterias se elevó ligeramente ($p = 0,064$), presentando los animales que recibieron el tratamiento 1 menor porcentaje con respecto a los que recibieron el tratamiento 2 ($p = 0,062$).

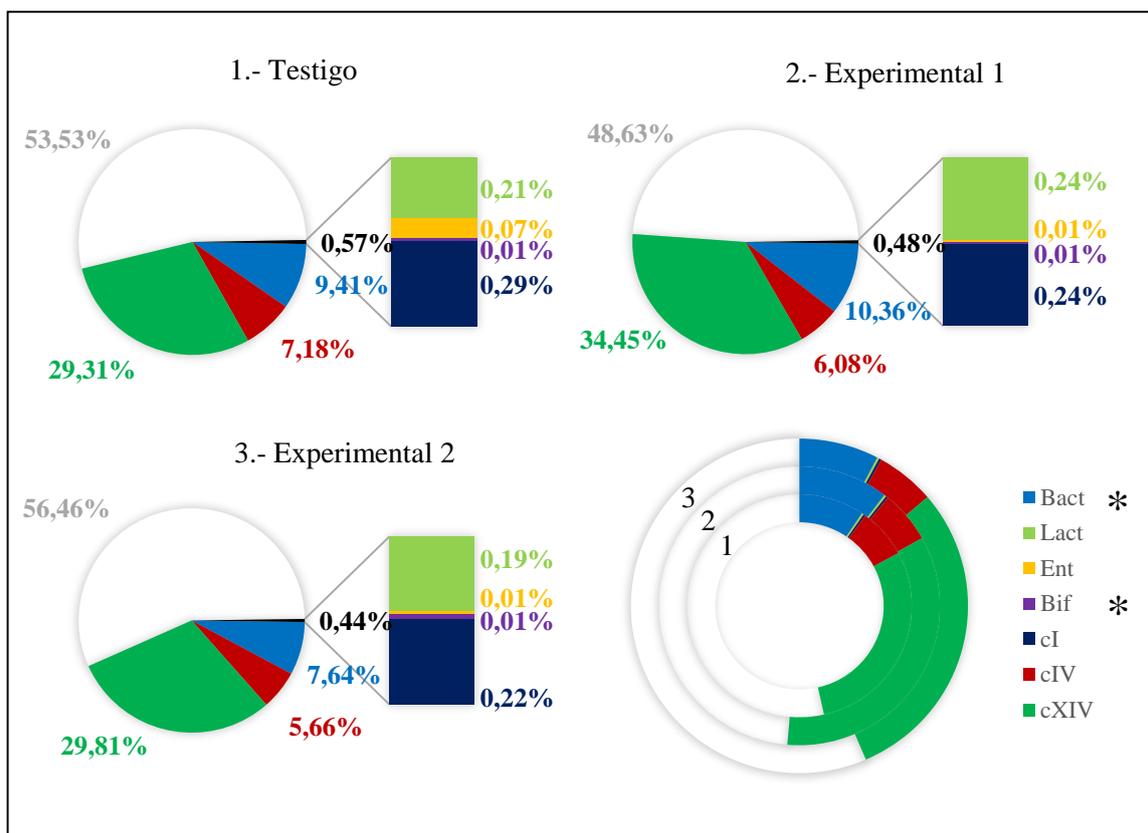


Figura 4.86.- Porcentajes medios relativos de las poblaciones bacterianas de la microbiota digestiva determinadas mediante PCRC en los lechones de los tres grupos experimentales, testigo (1), experimental 1 (2) y experimental 2 (3) en el muestreo realizado al finalizar la transición (tiempo 3) durante el estudio de dieta 1. Los asteriscos indican diferencias estadísticamente significativas (* $p < 0,05$).

Por último, el Índice de Salud Intestinal calculado en el tercer muestreo para los tres grupos de animales no mostró diferencias significativas entre los lechones ($p = 0,555$), existiendo, nuevamente, una gran dispersión en los valores de este índice (Figura 4.87).

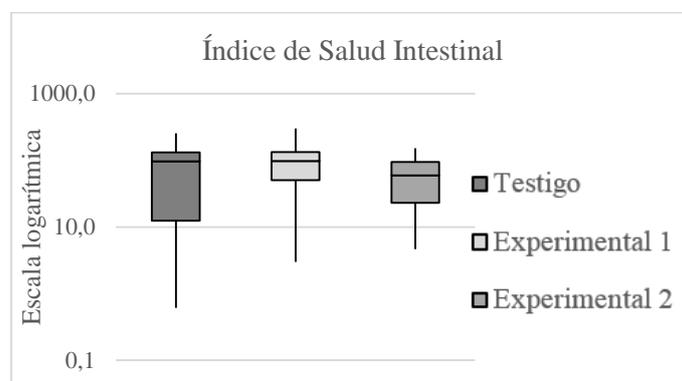


Figura 4.87.- Índice de Salud Intestinal (escala logarítmica) en los tres grupos experimentales (testigo, experimental 1 con lisina reducida y experimental 2 con lisina reducida y sin neomicina) en el muestreo realizado al finalizar la transición (tiempo 3) durante el estudio de dieta 1.

4.4.2.- Estudio de dieta 2

En el estudio dieta 2 se comparó la composición de la microbiota digestiva a tiempo 2 (una semana pos-destete) y a tiempo 3 (el día anterior a la salida hacia el cebadero) en los lechones del grupo testigo que recibió la dieta y medicación habitual en la explotación con los del grupo experimental 1 y 2 que recibieron dos suplementos de ácidos grasos (uno diferente en cada grupo experimental) y redujeron la administración de antibióticos empleados en las premezclas (sin colistina y sin neomicina). Para el análisis de los resultados obtenidos se tuvieron en cuenta los resultados obtenidos a tiempo 1 (día siguiente al destete) por cada uno de estos grupos de animales.

En el análisis realizado con los resultados obtenidos en el segundo muestreo (tiempo 2) apenas se pudieron observar diferencias en las poblaciones bacterianas analizadas, como se puede apreciar en las Figuras 4.88 y 4.89. El recuento de bacterias totales en las heces de los lechones a los 8 días del destete mostró diferencias que se aproximaron a la significación estadística ($p = 0,057$), ya que los animales que recibieron el tratamiento 1 presentaron un recuento mayor al de los otros dos grupos. La población de bacteroides fue inferior en los animales que recibieron el tratamiento 2 ($p = 0,013$), principalmente con respecto a los animales que recibieron el tratamiento 1 ($p = 0,011$). Cabe mencionar que las poblaciones de clostridios del clúster IV fueron superiores en los animales del grupo de tratamiento 1, particularmente con respecto a los animales testigo ($p = 0,063$), al igual que lo que ocurrió con el clúster XIV ($p = 0,105$).

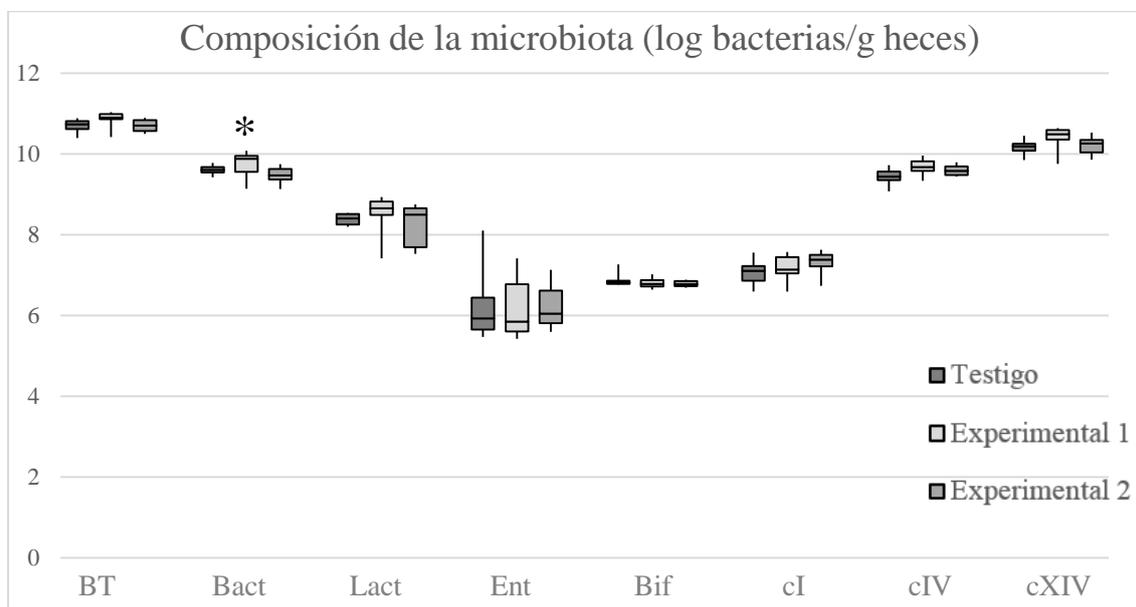


Figura 4.88.- Composición de la microbiota gastrointestinal determinada mediante PCRc a los 8 días del destete (tiempo 2) en los animales de los tres grupos experimentales (testigo, experimental 1 con suplemento de ácidos grasos 1 y reducción de antibióticos y experimental 2 con suplemento de ácidos grasos 2 y reducción de antibióticos) durante el estudio de dieta 2. Los asteriscos indican diferencias estadísticamente significativas (* $p < 0,05$).

En cuanto a las proporciones de las poblaciones bacterianas analizadas se observaron diferencias significativas en los valores obtenidos para bacteroides y clostridios del clúster I, cuyo porcentaje fue, respectivamente, inferior y superior en los animales que recibieron el tratamiento 2 con respecto a los otros dos grupos de animales del estudio ($p = 0,041$ y $p = 0,036$, respectivamente). También cabe citar el menor porcentaje de bifidobacterias en los animales que recibieron el tratamiento 1 ($p = 0,104$) así como la mayor proporción de clostridios del clúster IV de los animales que recibieron el tratamiento 2 ($p = 0,128$), diferencias que no alcanzaron la significación.

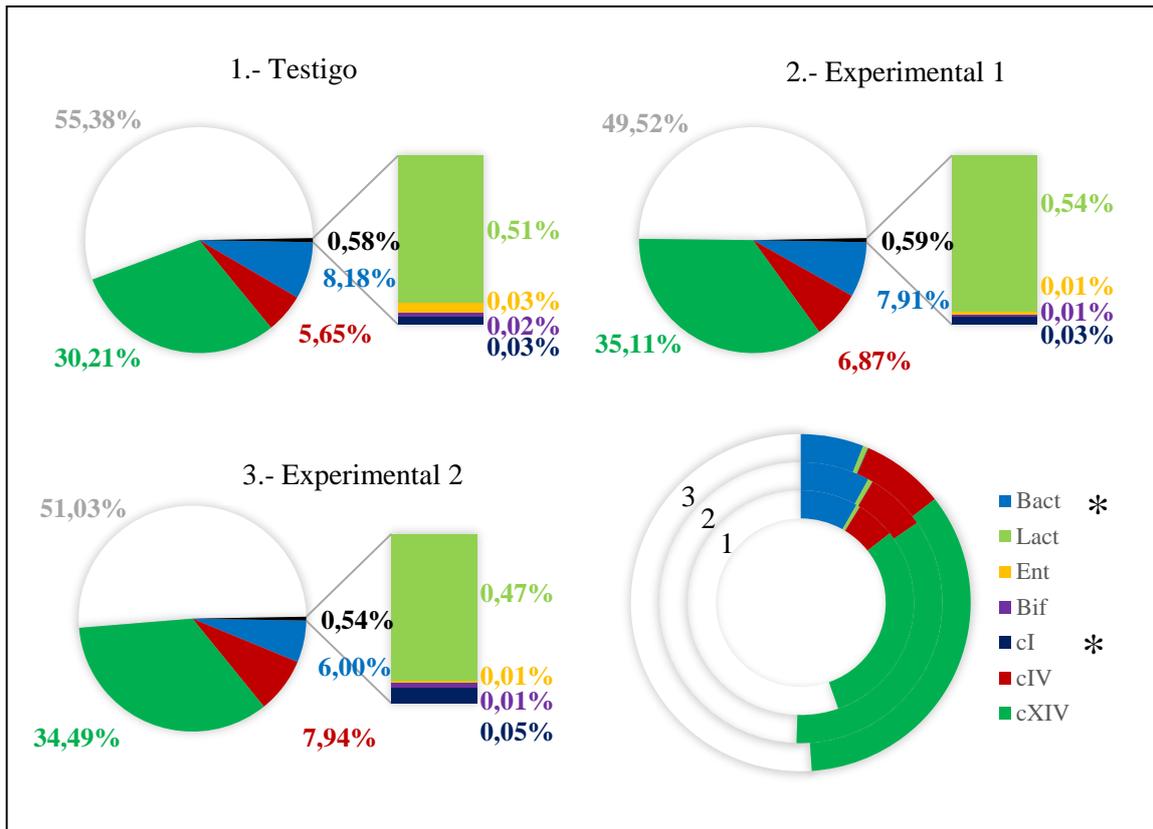


Figura 4.89.- Porcentajes medios relativos de las poblaciones bacterianas analizadas de los lechones de los tres grupos experimentales, testigo (1), experimental 1 (2) y experimental 2 (3) en el muestreo realizado a los 8 días del destete (tiempo 2) durante el estudio de dieta 2.

Por último, el Índice de Salud Intestinal calculado en el segundo muestreo para los tres grupos de animales no mostró diferencias significativas entre los lechones ($p = 0,225$) al presentar una gran dispersión en sus valores (Figura 4.90).

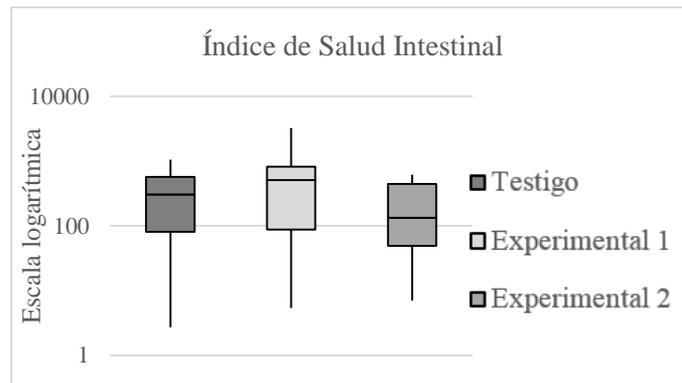


Figura 4.90.- Índice de Salud Intestinal (escala logarítmica) para los tres grupos experimentales (testigo, experimental 1 y experimental 2 con diferentes suplementos de ácidos grasos y reducción de antibióticos) en el muestreo realizado a los 8 días del destete de los lechones (tiempo 2) durante el estudio de dieta 2.

Las diferencias también fueron muy escasas en el análisis realizado a la finalización de la etapa de transición (tiempo 3) de los animales, como se puede apreciar en las Figuras 4.91 y 4.92. Existieron cambios significativos en el recuento de bacterias totales, bacteroides y clostridios del clúster IV y XIV que fueron superiores en los animales que recibieron el tratamiento 1 con respecto a los otros dos grupos de animales ($p = 0,044$, $p = 0,067$, $p = 0,050$ y $p = 0,007$, respectivamente).

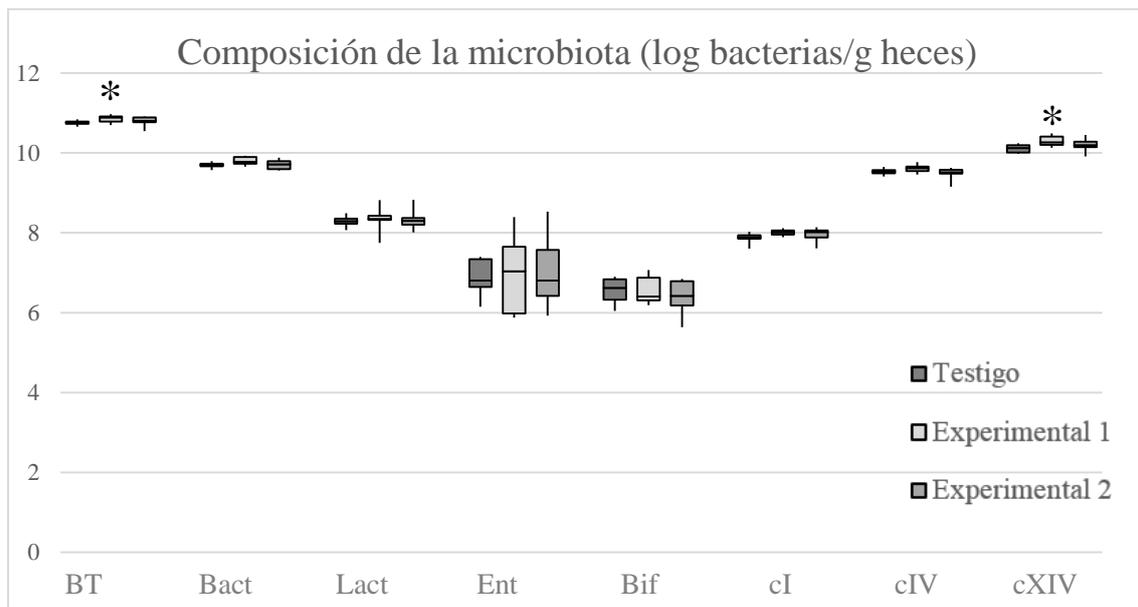


Figura 4.91.- Composición de la microbiota gastrointestinal determinada mediante PCRc el día anterior a la salida hacia el cebadero (tiempo 3) en los animales de los tres grupos experimentales (testigo, experimental 1 con suplemento de ácidos grasos 1 y reducción de antibióticos y experimental 2 con suplemento de ácidos grasos 2 y reducción de antibióticos) durante el estudio de dieta 2. Los asteriscos indican diferencias estadísticamente significativas (* $p < 0,05$).

En cuanto a la proporción de las poblaciones bacterianas analizadas solo se podrían destacar las diferencias observadas en el porcentaje de clostridios del clúster IV, cuyo valor fue inferior en los animales que recibieron el tratamiento 2 con respecto a los

otros dos grupos de animales, aunque no se alcanzaron diferencias significativas ($p = 0,144$).

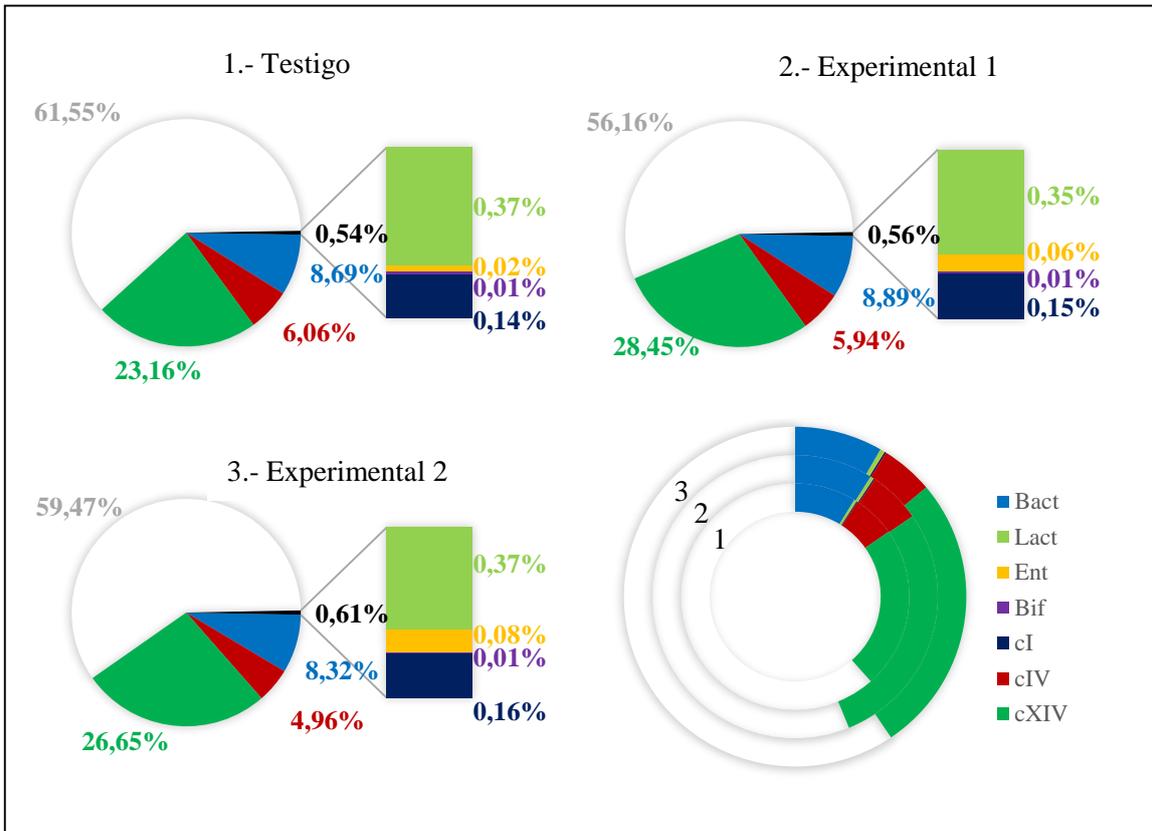


Figura 4.92.- Porcentajes medios relativos de las poblaciones bacterianas de la microbiota digestiva determinadas mediante PCRC en los lechones de los tres grupos experimentales, testigo (1), experimental 1 (2) y experimental 2 (3) en el muestreo realizado al finalizar la transición (tiempo 3) durante el estudio de dieta 2.

Por último, tampoco en el muestro 3 se demostraron diferencias significativas en el Índice de Salud Intestinal calculado para los tres grupos de animales ($p = 0,438$) (Figura 4.93).

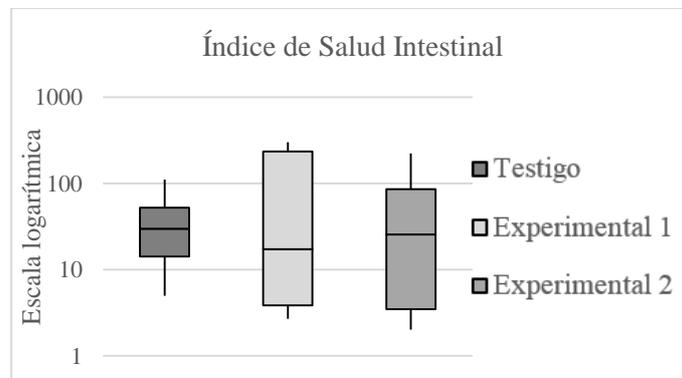


Figura 4.93.- Índice de Salud Intestinal (escala logarítmica) para los tres grupos experimentales (testigo, experimental 1 y experimental 2 con diferentes suplementos de ácidos grasos y reducción de antibióticos) en el muestreo realizado al finalizar la transición (tiempo 3) durante el estudio de dieta 2.

4.4.3.- Estudio de dieta 3

En el estudio 3 se compararon los resultados obtenidos a tiempo 2 (una semana pos-destete) y tiempo 3 (el día anterior a la salida hacia el cebadero), teniendo en cuenta los resultados obtenidos a tiempo 1 (día siguiente al destete). Los animales del grupo testigo recibieron la alimentación y medicación empleada en la explotación en ese momento (se incluyó el suplemento de AGCM 2 del ensayo anterior) mientras que los dos grupos experimentales introdujeron avena como fuente de fibra. Además, en el grupo experimental 2 se redujeron los antibióticos empleados en las premezclas (sin colistina ni neomicina).

A tiempo 2, apenas se pudieron observar diferencias en las poblaciones bacterianas analizadas, como se muestra en las Figuras 4.94 y 4.95. Solo se observaron diferencias significativas en el recuento de clostridios del clúster IV, cuantificando un menor número en los animales que recibieron el tratamiento 1, principalmente con respecto a los animales del grupo testigo ($p = 0,039$). Cabe mencionar, además, que las diferencias observadas en la población de enterobacterias estuvo muy próxima a la significación ($p = 0,052$) siendo menor el recuento de este grupo bacteriano en los animales que recibieron el tratamiento 2 con respecto al grupo testigo ($p = 0,084$). Además, los animales del grupo testigo presentaron mayores poblaciones de bifidobacterias y clostridios del clúster I con respecto a los otros dos grupos experimentales, aunque estas diferencias no estuvieron próximas a la significación estadística ($p = 0,246$ y $p = 0,239$, respectivamente).

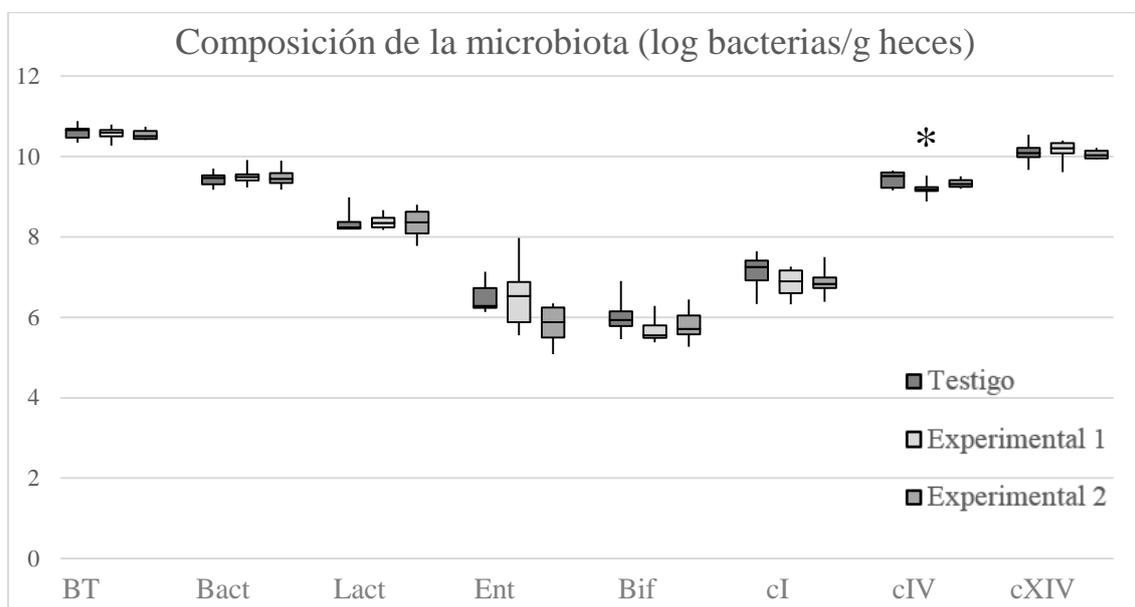


Figura 4.94.- Composición de la microbiota digestiva determinada mediante PCRc a los 8 días del destete (tiempo 2) en los lechones de los tres grupos experimentales (testigo, experimental 1 con suplemento de ácidos grasos y avena y experimental 2 con suplemento de ácidos grasos y avena y con reducción de antibióticos) durante el estudio de dieta 3. Los asteriscos indican diferencias estadísticamente significativas (* $p < 0,05$).

En cuanto a las proporciones de las poblaciones bacterianas analizadas solo se observaron diferencias significativas en las proporciones de clostridios del clúster IV ($p = 0,007$), cuyo porcentaje fue inferior en los animales que recibieron el tratamiento 1 con respecto a los otros dos grupos de animales del estudio, testigo ($p = 0,011$) y tratamiento 2 ($p = 0,031$). También cabe hacer referencia al superior porcentaje de bacteroides de los animales que recibieron el tratamiento 2 con respecto al grupo testigo, aunque no se alcanzó la significación estadística ($p = 0,265$).

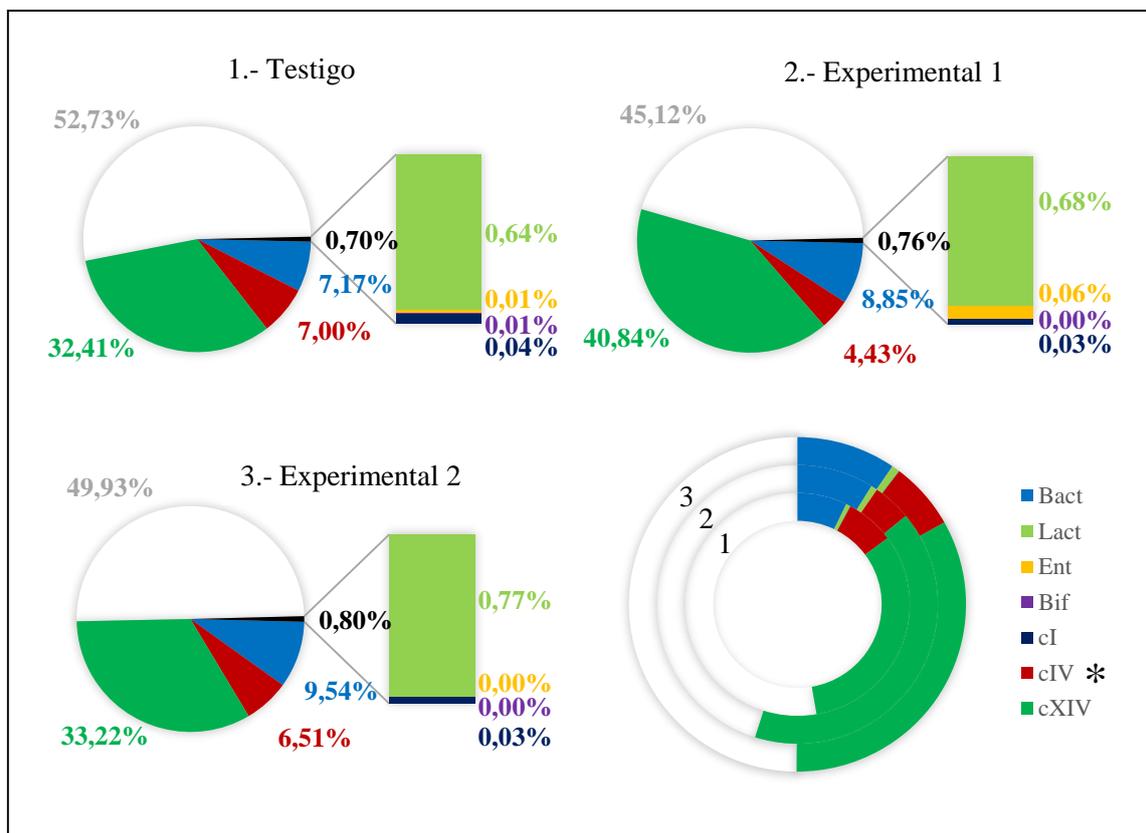


Figura 4.95.- Porcentajes medios relativos de las poblaciones bacterianas de la microbiota digestiva determinadas mediante PCRc en los lechones de los tres grupos experimentales, testigo (1), experimental 1 (2) y experimental 2 (3) en el muestreo realizado a los 8 días del destete (tiempo 2) durante el estudio de dieta 3. Los asteriscos indican diferencias estadísticamente significativas (* $p < 0,05$).

El Índice de Salud Intestinal presentó diferencias significativas en el segundo muestreo para los tres grupos de lechones del estudio de dieta 3 ($p = 0,022$), siendo responsable de estas diferencias el superior valor obtenido en los animales que recibieron el tratamiento 2 con respecto a los lechones del grupo testigo ($p = 0,021$) (Figura 4.96).

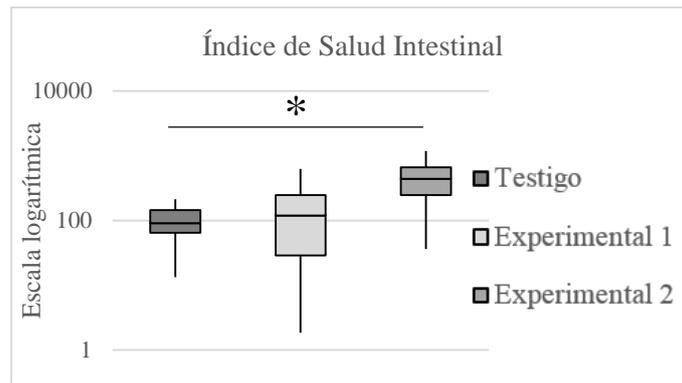


Figura 4.96.- Índice de Salud Intestinal (escala logarítmica) para los tres grupos experimentales (testigo, experimental 1 con suplemento de ácidos grasos y avena y experimental 2 con suplemento de ácidos grasos y avena y reducción de antibióticos) en el muestreo realizado a los 8 días del destete de los lechones (tiempo 2) durante el estudio de dieta 3. Los asteriscos indican diferencias estadísticamente significativas (* $p < 0,05$).

En el análisis realizado a la finalización de la etapa de transición (tiempo 3) no se observaron diferencias significativas en las poblaciones bacterianas analizadas, como se puede apreciar en las Figuras 4.97 y 4.98. Las diferencias observadas en el recuento de bifidobacterias el día previo a la salida de los animales hacia el cebadero estuvieron próximas a la significación ($p = 0,062$), siendo superior este valor en los animales que recibieron el tratamiento 2 con respecto al grupo testigo ($p = 0,080$).

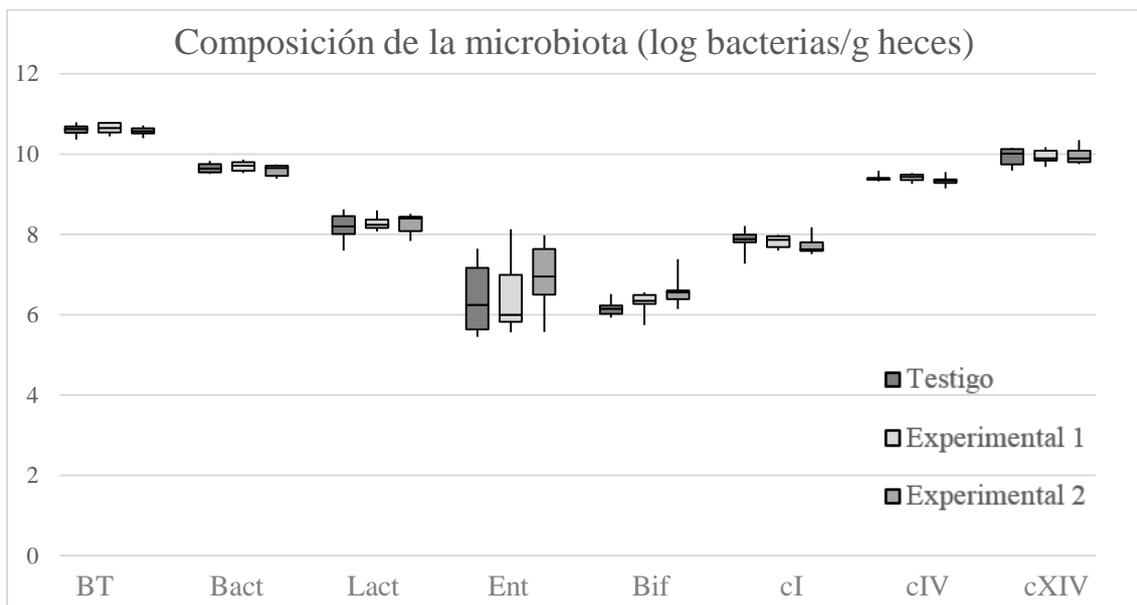


Figura 4.98.- Composición de la microbiota digestiva determinada mediante PCRc a la salida hacia el cebadero (tiempo 3) en los lechones de los tres grupos experimentales (testigo, experimental 1 con suplemento de ácidos grasos y avena y experimental 2 con suplemento de ácidos grasos y avena y con reducción de antibióticos) durante el estudio de dieta 3. Los asteriscos indican diferencias estadísticamente significativas (* $p < 0,05$).

En cuanto a la proporción de las poblaciones solo las diferencias observadas en el porcentaje de bifidobacterias se acercaron al nivel de significación ($p = 0,075$), siendo este valor superior en los animales del grupo experimental 2 con respecto a los otros dos

grupos de animales, testigo y experimental 1. Además, cabe mencionar que la proporción de clostridios del clúster XIV fue ligeramente superior en los animales del grupo de tratamiento 2 con respecto a los otros dos grupos de animales ($p = 0,335$).

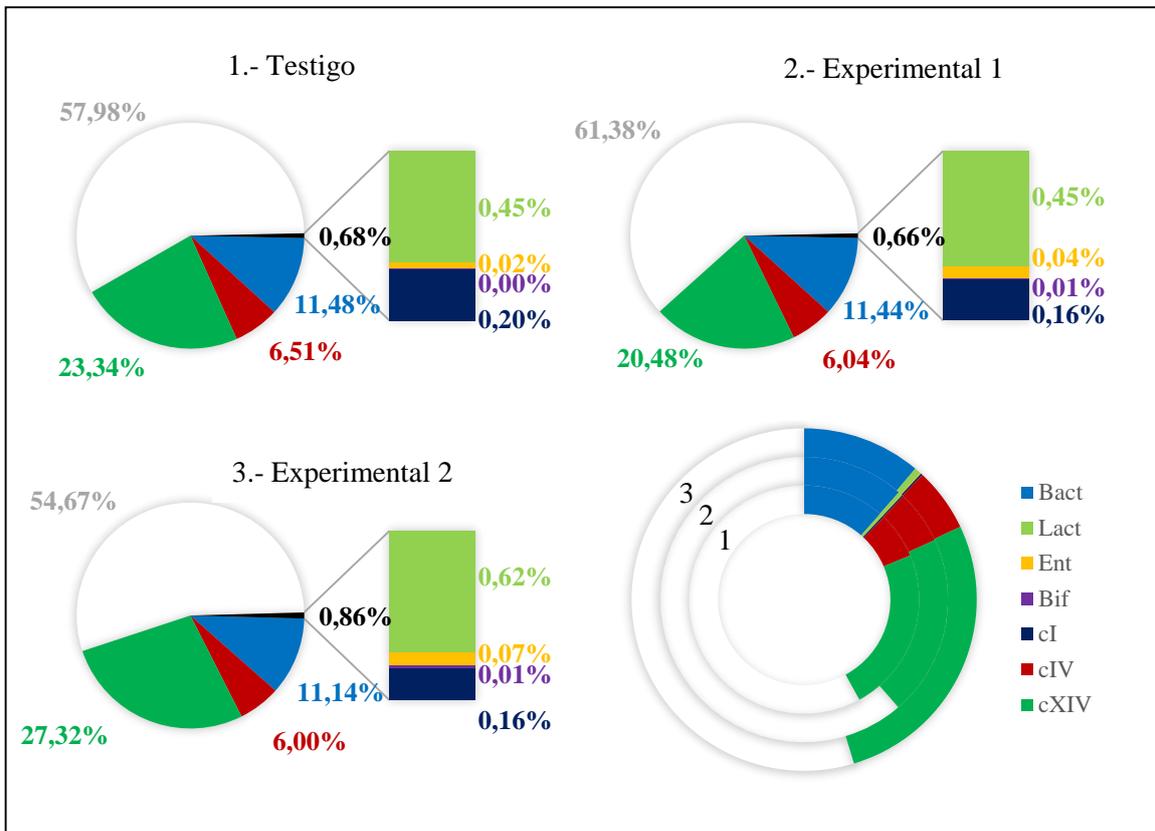


Figura 4.99.- Porcentajes medios relativos de las poblaciones bacterianas de la microbiota digestiva determinadas mediante PCRc en los lechones de los tres grupos experimentales, testigo (1), experimental 1 (2) y experimental 2 (3) en el muestreo realizado al finalizar la transición (tiempo 3) durante el estudio de dieta 3.

Finalmente, el Índice de Salud Intestinal en este tercer muestreo no mostró diferencias significativas entre los tres grupos de animales ($p = 0,880$) (Figura 4.100).

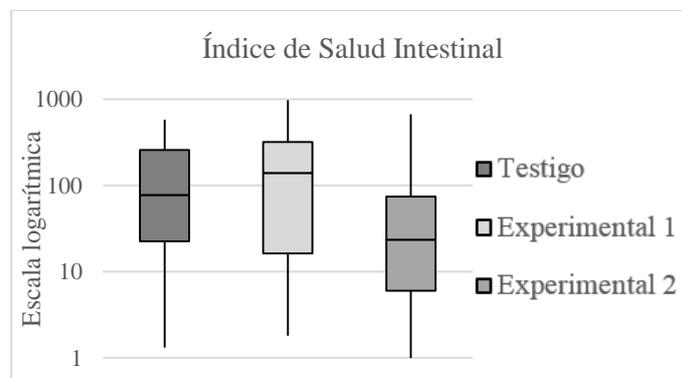


Figura 4.100.- Índice de Salud Intestinal (escala logarítmica) para los tres grupos experimentales (testigo, experimental 1 con suplemento de ácidos grasos y avena y experimental 2 con suplemento de ácidos grasos y avena y reducción de antibióticos) en el muestreo realizado al finalizar la transición de los lechones (tiempo 3) durante el estudio de dieta 3.

4.4.4.- Estudio de dieta 4

En primer lugar, al igual que en los estudios de comparación, se ha realizado un estudio longitudinal de evolución de la microbiota de los animales durante la transición y la primera fase del cebo de los cerdos. Para ello, se han empleado las muestras de los tres grupos experimentales, que recibieron diferentes suplementos en el pienso, a lo largo de cinco muestreos (al día siguiente del destete, a los 8 días del destete, al finalizar la transición, a la entrada a cebo y a la mitad de cebo). Los principales resultados obtenidos se describen a continuación.

Como se puede apreciar en la Figura 4.101 todas las poblaciones bacterianas presentaron diferencias estadísticas a lo largo del estudio salvo el clúster XIV de clostridios. Entre el muestreo realizado al día siguiente del destete y a los 8 días del destete se redujeron las poblaciones de enterobacterias, bifidobacterias y clostridios del clúster I y IV ($p < 0,001$, $p < 0,001$, $p = 0,025$ y $p = 0,030$, respectivamente), entre el segundo y tercer muestreo se redujo la población de enterobacterias ($p = 0,035$) y se incrementó la de clostridios del clúster I ($p < 0,001$), entre el muestreo realizado al finalizar la transición y a los 56 días del destete se incrementaron el número de enterobacterias y bifidobacterias ($p < 0,001$ en ambos casos) y, finalmente, entre el cuarto y el quinto muestreo se incrementaron el número de bacterias totales, bacteroides, lactobacilos y clostridios del clúster IV ($p = 0,019$, $p = 0,005$, $p = 0,001$ y $p < 0,001$, respectivamente) y se redujeron las poblaciones de enterobacterias y clostridios del clúster I ($p < 0,001$ en ambos casos).

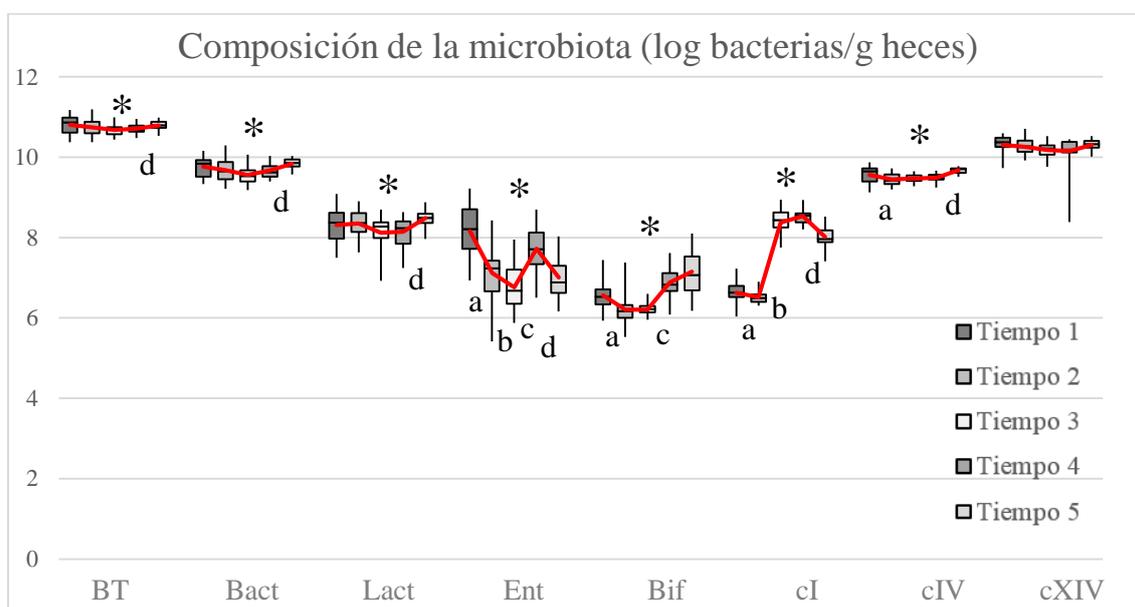


Figura 4.101.- Composición de la microbiota digestiva determinada por PCRc a lo largo de los muestreos realizados: al día siguiente del destete (tiempo 1), a los 8 días del destete (tiempo 2), al finalizar la transición (tiempo 3), a la entrada de cebo (tiempo 4) y a la mitad del cebo (tiempo 5) durante el estudio de dieta 4. Los asteriscos y letras indican diferencias estadísticamente significativas (* $p < 0,05$: comparación tiempo 1-2-3-4-5; a: comparación tiempo 1-2; b: comparación tiempo 2-3; c: comparación tiempo 3-4; d: comparación tiempo 4-5).

En cuanto a la proporción de las poblaciones bacterianas analizadas se observaron, de forma global, diferencias significativas en el porcentaje de bacteroides, enterobacterias, bifidobacterias y los clúster I y IV de clostridios (Figura 4.102). En la

comparación realizada entre el primer y segundo muestreo se observó que disminuyó el porcentaje de enterobacterias y bifidobacterias ($p < 0,001$ y $p = 0,013$, respectivamente). Entre el muestreo realizado a los 8 días del destete y tras la finalización de la transición la proporción de clostridios del clúster I y IV se incrementó significativamente ($p < 0,001$ y $p = 0,022$, respectivamente). Entre el tercer y cuarto muestreo se incrementaron las poblaciones de bacteroides, enterobacterias y bifidobacterias ($p = 0,006$, $p < 0,001$ y $p < 0,001$, respectivamente) y, finalmente, entre el cuarto y el último muestreo se incrementaron los bacteroides-*Prevotella* y clostridios del clúster IV ($p = 0,006$ y $p = 0,004$, respectivamente) y se redujeron los porcentajes de enterobacterias y clostridios del clúster I ($p = 0,001$ y $p < 0,001$, respectivamente).

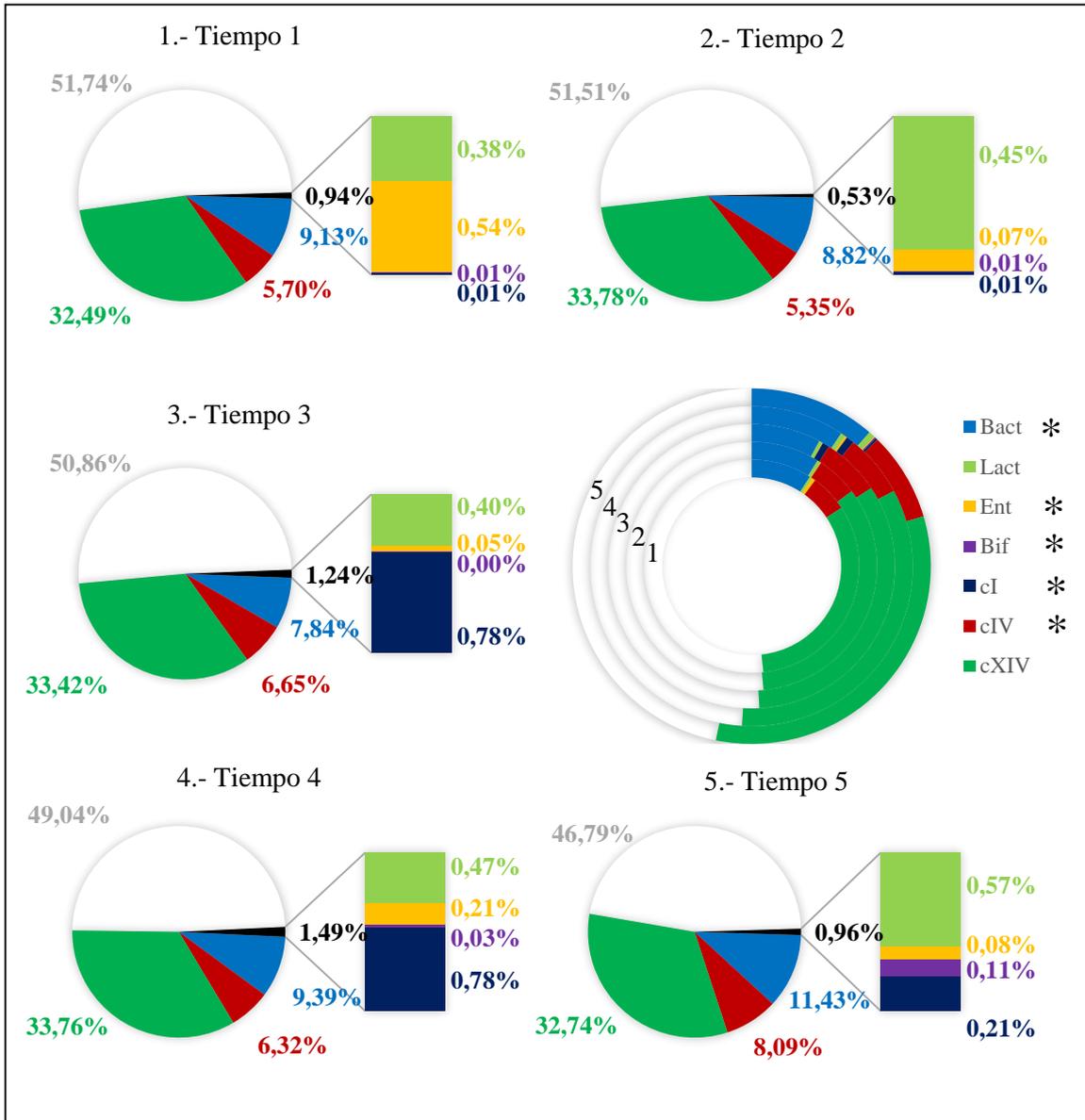


Figura 4.102.- Porcentajes medios relativos de las poblaciones bacterianas de la microbiota digestiva determinadas mediante PCRc a lo largo del estudio de dieta 4 (* diferencias significativas $p < 0,05$). Tiempo 1 (día siguiente al destete), tiempo 2 (a los 8 días del destete), tiempo 3 (a la salida hacia el cebadero), tiempo 4 (a los 56 días del destete) y tiempo 5 (a los 66 días del destete).

Por último, el Índice de Salud Intestinal incrementó significativamente entre el primer y segundo muestreo ($p < 0,001$) y entre el cuarto y quinto muestreo ($p < 0,001$), disminuyendo en el periodo entre la transición y el cebo ($p < 0,001$) (Figura 4.103). El incremento entre el segundo y tercer muestreo no llegó a ser significativo ($p = 0,099$).

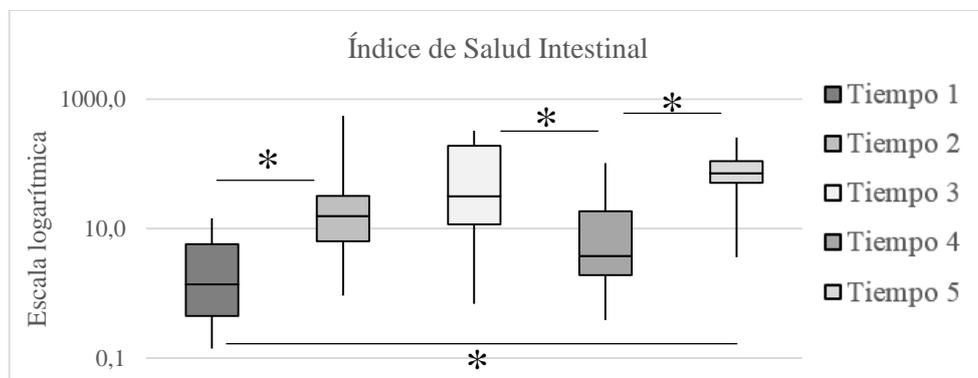


Figura 4.103.- Índice de Salud Intestinal (escala logarítmica) durante el periodo de seguimiento del estudio de dieta 4. Día siguiente del destete (tiempo 1), 8 días del destete (tiempo 2), al finalizar la transición (tiempo 3), a la entrada a cebo (tiempo 4) y a mitad de cebo (tiempo 5) (* diferencias significativas $p < 0,05$).

Cuando se compararon los resultados obtenidos para los tres grupos experimentales a los 8 días del destete (tiempo 2), teniendo en cuenta los resultados obtenidos el día siguiente al destete (tiempo 1), no se observaron diferencias significativas entre los grupos del estudio (Figuras 4.104 y 4.105). Se podría mencionar las diferencias en las poblaciones de enterobacterias ($p = 0,170$) y bifidobacterias ($p = 0,253$), aunque en ambos casos no se alcanzó la significación estadística, presentando los animales que recibieron el tratamiento 2 los menores recuentos.

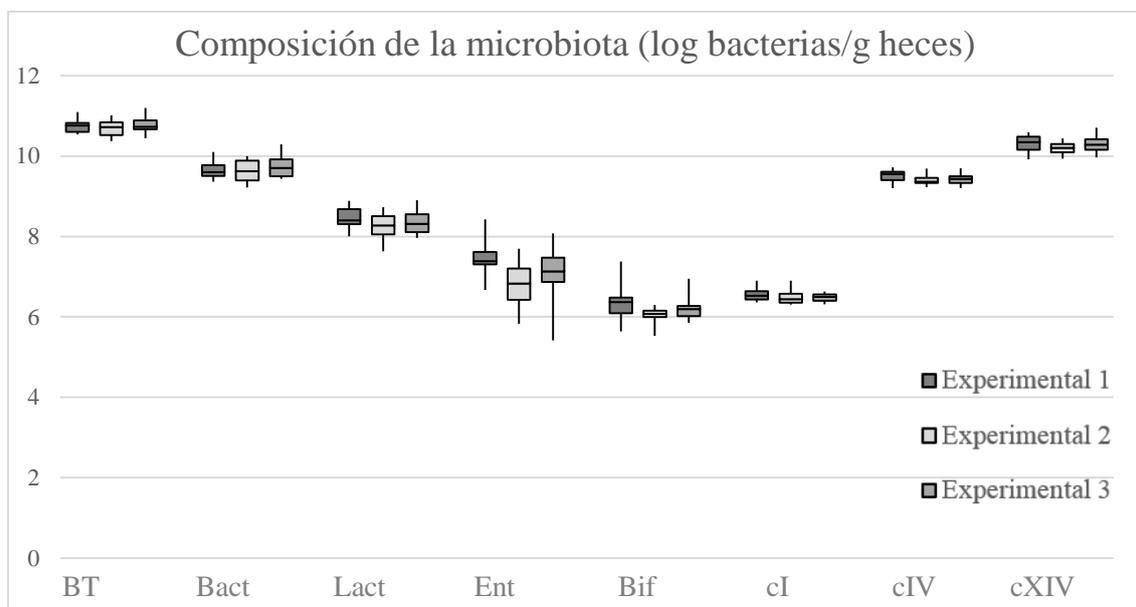


Figura 4.104.- Composición de la microbiota digestiva determinada mediante PCRc a los 8 días del destete (tiempo 2) en los lechones de los tres grupos experimentales (experimental 1, experimental 2 y experimental 3) durante el estudio de dieta 4. Los asteriscos indican diferencias estadísticamente significativas (* $p < 0,05$).

En cuanto a las proporciones de las poblaciones bacterianas analizadas tampoco se observaron diferencias significativas. El porcentaje de bacteroides ($p = 0,107$) fue superior en los animales que recibieron el tratamiento 2 y la proporción de lactobacilos ($p = 0,266$) fue ligeramente superior en los animales del grupo experimental 1.

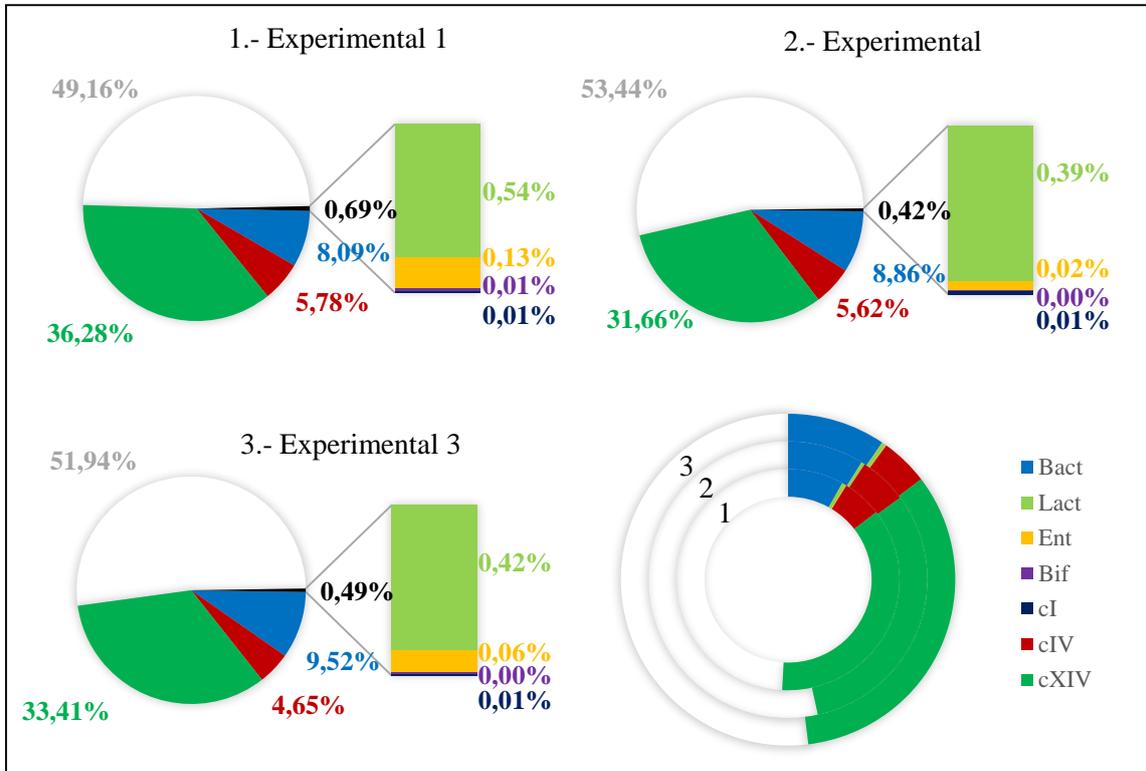


Figura 4.105.- Porcentajes medios relativos de las poblaciones bacterianas de la microbiota digestiva determinadas mediante PCRc en los lechones de los tres grupos experimentales, experimental 1, experimental 2 y experimental 3, en el muestreo realizado a los 8 días del destete (tiempo 2) durante el estudio de dieta 4.

El Índice de Salud Intestinal de los tres grupos experimentales del estudio no mostró diferencias significativas durante el segundo muestreo ($p = 0,678$) siendo su valor muy similar en los diferentes grupos (Figura 4.106).

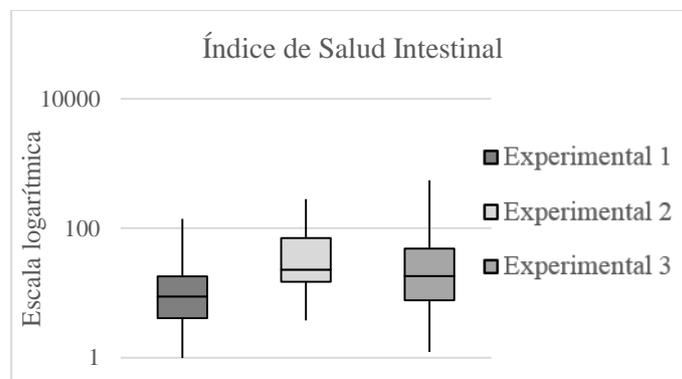


Figura 4.106.- Índice de Salud Intestinal (escala logarítmica) para los tres grupos de experimentales, experimental 1, experimental 2 y experimental 3, en el muestreo realizado a los 8 días del destete de los lechones (tiempo 2) durante el estudio dieta 4.

En el análisis realizado a la finalización de la etapa de transición (tiempo 3) de los lechones apenas se pudieron observar diferencias en las poblaciones bacterianas analizadas como se puede apreciar en las Figuras 4.107 y 4.108.

En los recuentos de bacterias presentes en las heces de los lechones solo los lactobacilos mostraron diferencias significativas ($p = 0,010$). Los animales del grupo experimental 2 presentaron menores recuentos que los otros dos grupos de animales, experimental 1 y experimental 3. También se encontraron diferencias cercanas a la significación estadística en las poblaciones de bacterias totales ($p = 0,099$), bacteroides ($p = 0,065$), enterobacterias ($p = 0,143$) y clostridios del clúster XIV ($p = 0,156$), que fueron superiores en los lechones que recibieron el tratamiento 1 con respecto a los otros dos grupos de animales.

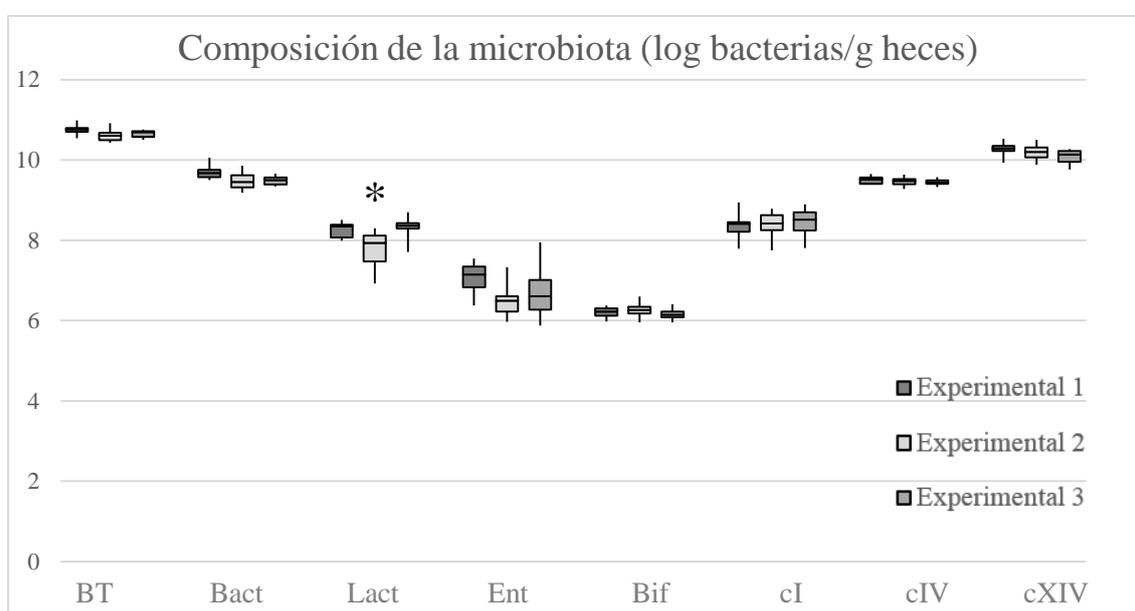


Figura 4.107.- Composición de la microbiota digestiva determinada mediante PCRc el día anterior a la salida hacia el cebadero (tiempo 3) en los animales de los tres grupos experimentales, experimental 1, experimental 2 y experimental 3, durante el estudio de dieta 4. Los asteriscos indican diferencias estadísticamente significativas (* $p < 0,05$).

En cuanto a la proporción de las poblaciones bacterianas analizadas se observaron diferencias en el porcentaje de lactobacilos ($p = 0,037$) y clostridios del clúster XIV ($p = 0,018$), siendo su valor inferior en los animales que recibieron el tratamiento 2 o el tratamiento 3, respectivamente, con respecto a los otros dos grupos de animales. Además, los animales que recibieron el tratamiento 1 presentaron un porcentaje ligeramente superior de bacteroides ($p = 0,127$), los animales del grupo experimental 2 presentaron proporciones más altas de bifidobacterias ($p = 0,216$) y clostridios del clúster IV ($p = 0,195$) mientras que los animales que recibieron el tratamiento 3 presentaron una proporción superior de enterobacterias ($p = 0,286$), no alcanzándose en ninguno de los casos la significación estadística.

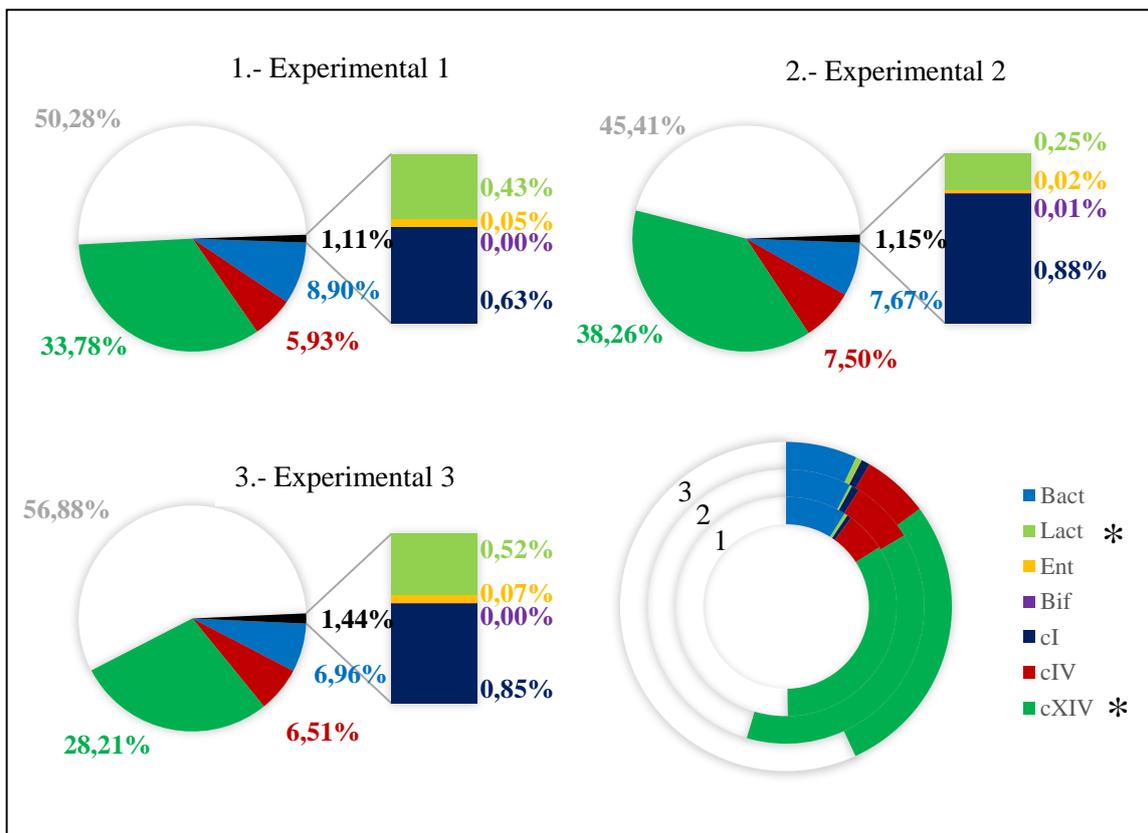


Figura 4.108.- Porcentajes medios relativos de las poblaciones bacterianas de la microbiota digestiva determinadas mediante PCRc en los animales de los tres grupos experimentales, experimental 1, experimental 2 y experimental 3 en el muestreo realizado al finalizar la transición (tiempo 3) durante el estudio de dieta 4. Los asteriscos indican diferencias estadísticamente significativas (* $p < 0,05$).

Por último, el Índice de Salud Intestinal en el tercer muestreo para los tres grupos de animales mostró diferencias significativas ($p = 0,020$), correspondiendo el valor más elevado a los animales que recibieron el tratamiento 3 (Figura 4.109).

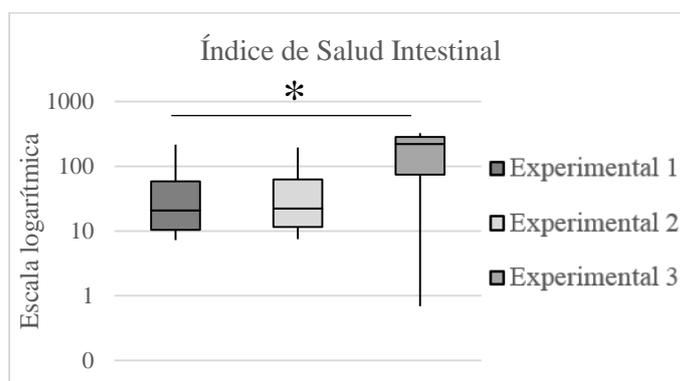


Figura 4.109.- Índice de Salud Intestinal (escala logarítmica) para los tres grupos experimentales, experimental 1, experimental 2 y experimental 3, en el muestreo realizado al finalizar la transición (tiempo 3) durante el estudio de dieta 4. Los asteriscos indican diferencias estadísticamente significativas (* $p < 0,05$).

Las diferencias detectadas en la comparación de los resultados obtenidos para los tres grupos experimentales a los 56 días del destete o inicio del periodo de cebo (tiempo 4) se muestran en las Figuras 4.110 y 4.111.

El recuento de lactobacilos presentes en las heces de los cerdos a la entrada a cebo presentó diferencias próximas a la significación estadística ($p = 0,087$), siendo los animales que recibieron el tratamiento 2 en los que se cuantificaron más lactobacilos en comparación con los otros dos grupos de animales, principalmente con respecto al grupo que recibió el tratamiento 3 ($p = 0,088$).

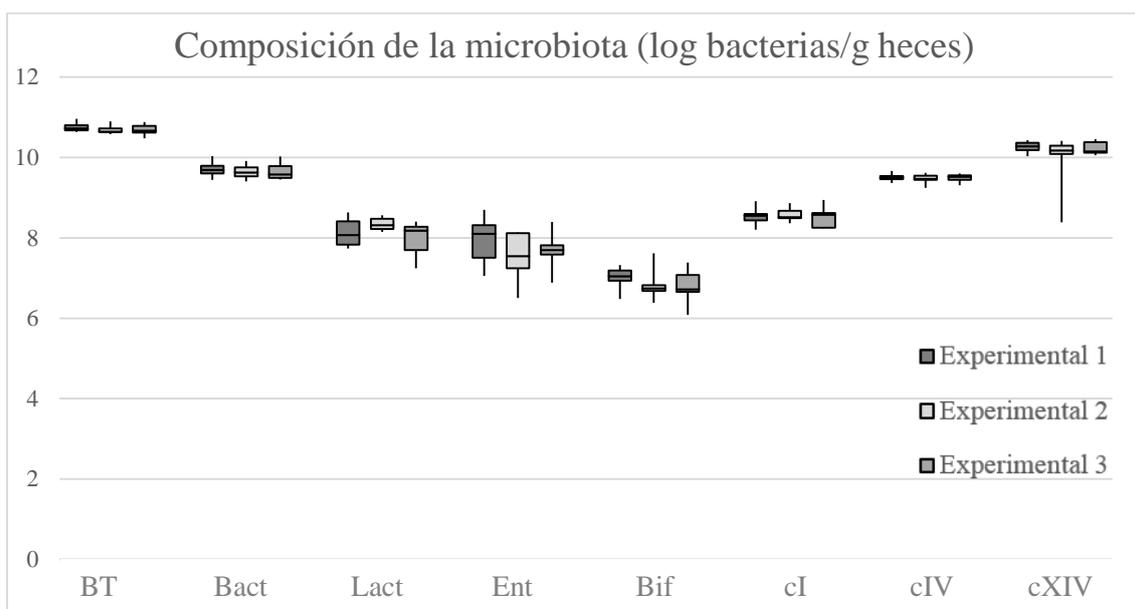


Figura 4.110.- Composición de la microbiota digestiva determinada mediante PCRc a la entrada a cebo (tiempo 4) en los cerdos de los tres grupos experimentales, experimental 1, experimental 2 y experimental 3, durante el estudio de dieta 4.

En cuanto a las proporciones de las poblaciones bacterianas analizadas tampoco se observaron diferencias significativas. Cabe mencionar solamente las diferencias en el clúster I de clostridios ($p = 0,270$), cuyo porcentaje fue inferior en los animales del grupo de tratamiento 1 con respecto a los otros dos grupos.

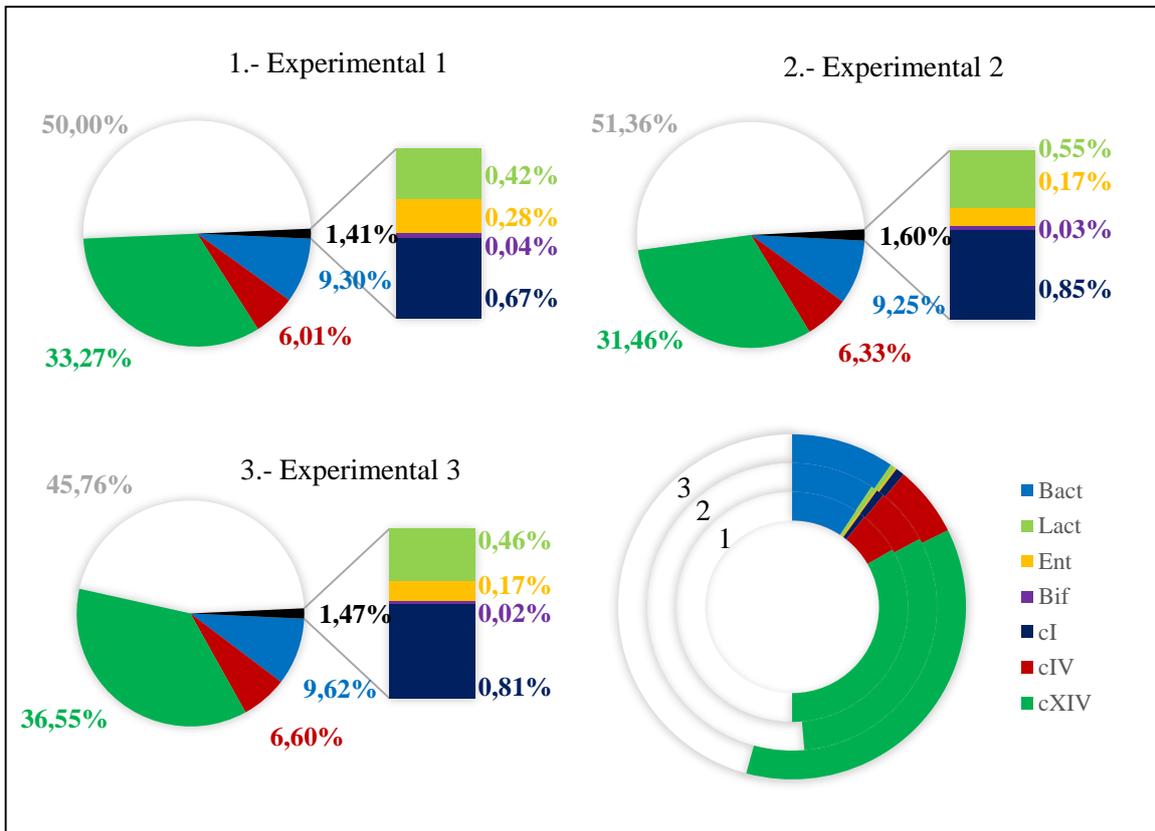


Figura 4.111.- Porcentajes medios relativos de las poblaciones bacterianas de la microbiota digestiva determinadas mediante PCRc en los animales de los tres grupos experimentales, experimental 1, experimental 2 y experimental 3, en el muestreo realizado a la entrada a cebo (56 días del destete o tiempo 4) durante el estudio de dieta 4.

El Índice de Salud Intestinal no mostró diferencias significativas entre los tres grupos experimentales del estudio de dieta 4 en este cuarto muestreo ($p = 0,352$) siendo destacable la gran dispersión en los valores estimados para este parámetro (Figura 4.112).

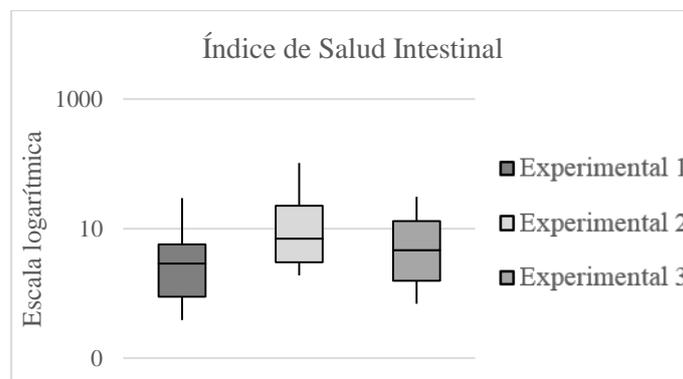


Figura 4.112.- Índice de Salud Intestinal (escala logarítmica) para los tres grupos experimentales, experimental 1, experimental 2 y experimental 3, en el muestreo realizado a la entrada a cebo (56 días del destete o tiempo 4) durante el estudio dieta 4.

En el último de los muestreos del estudio de dieta 4, realizado a la mitad del periodo de cebo (tiempo 5), a los 66 días del destete, no observaron diferencias significativas en las poblaciones bacterianas analizadas como se puede apreciar en las Figuras 4.113 y 4.114.

En lo que respecta a los valores de recuentos se puede destacar que las diferencias en los lactobacilos presentes en las heces ($p = 0,258$) fueron debidas a recuentos superiores en los animales del grupo de tratamiento 3. Por otra parte, los animales del grupo de tratamiento 1 presentaron mayores recuentos de enterobacterias, con diferencias próximas a la significación ($p = 0,067$), que los otros dos grupos mientras que los animales del grupo experimental 2 presentaron menores recuentos del clúster I ($p = 0,198$) y superiores del clúster IV ($p = 0,272$), con respecto a los otros dos grupos de animales.

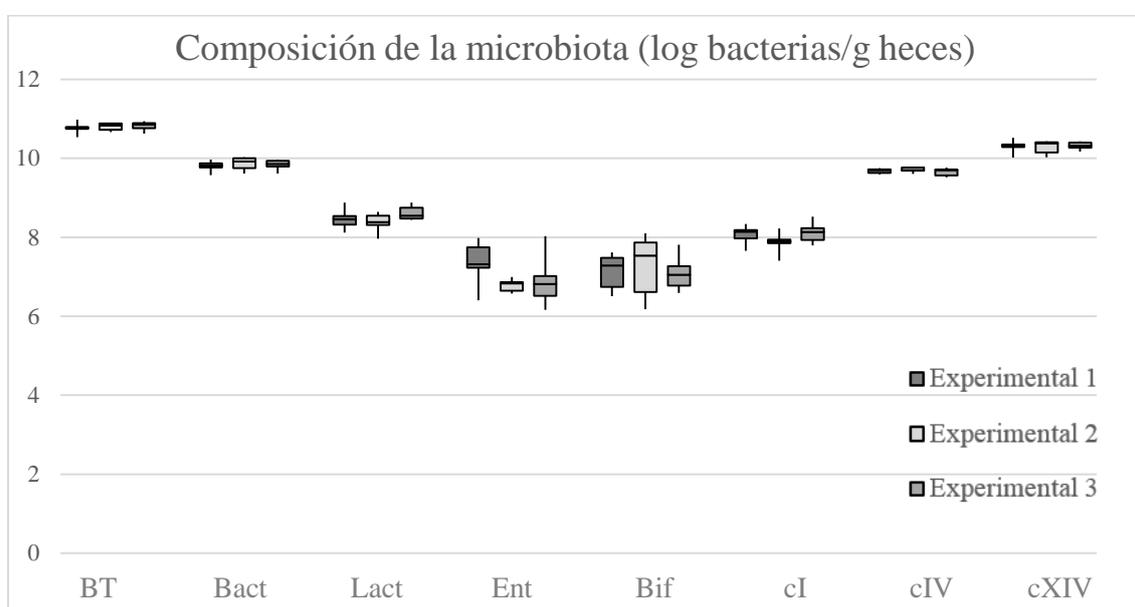


Figura 4.113.- Composición de la microbiota digestiva determinada mediante PCRc a mitad del periodo de cebo (tiempo 5) en los animales de los tres grupos experimentales, experimental 1, experimental 2 y experimental 3, durante el estudio de dieta 4.

En cuanto a la proporción de las poblaciones bacterianas analizadas tampoco se observaron diferencias significativas aunque se pueden destacar las diferencias observadas en el porcentaje de bacteroides ($p = 0,225$), cuyo valor fue superior en los animales que recibieron el tratamiento 3, en la proporción de enterobacterias ($p = 0,078$) y clostridios del clúster XIV ($p = 0,256$) que fueron superiores en los animales del grupo experimental 1, en el porcentaje de clostridios del clúster I ($p = 0,100$) que fue inferior en los animales del grupo experimental 2 y en la proporción del clúster IV ($p = 0,280$) que fue inferior en los animales que recibieron el tratamiento 3.

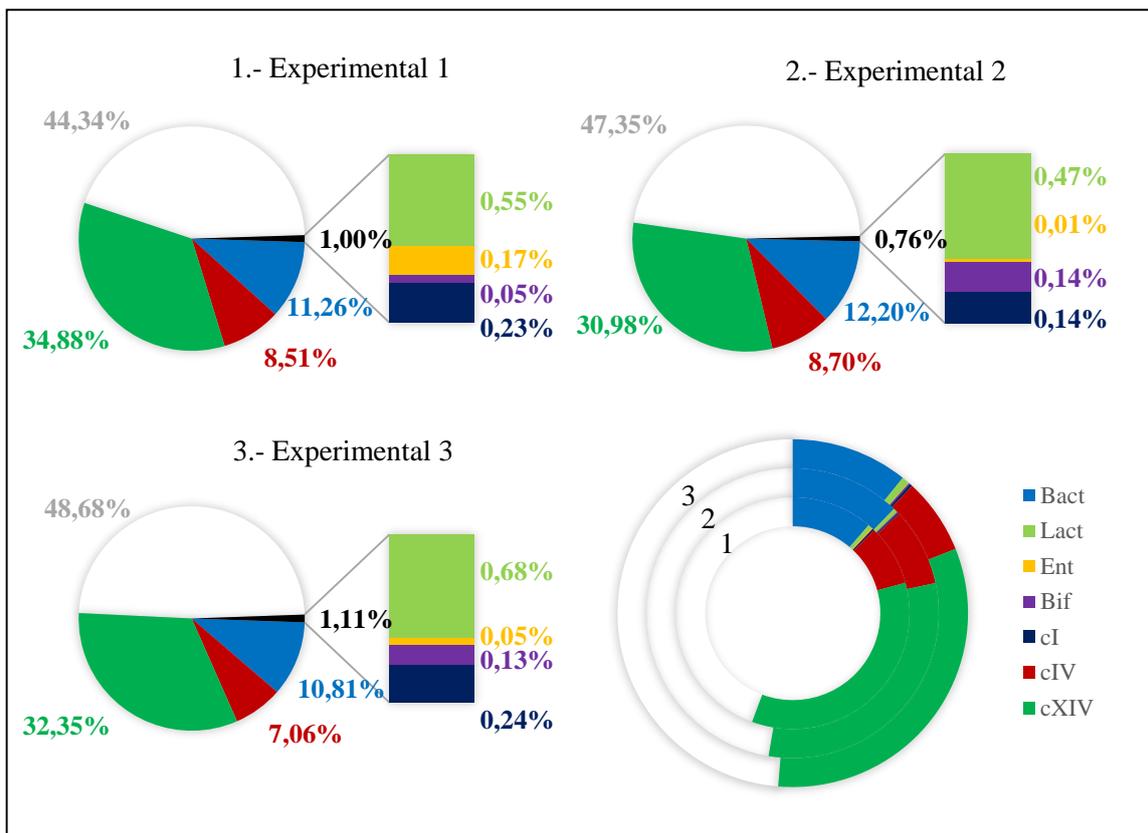


Figura 4.114.- Porcentajes medios relativos de las poblaciones bacterianas de la microbiota digestiva determinadas mediante PCRc en los animales de los tres grupos experimentales, experimental 1, experimental 2 y experimental 3, en el muestreo realizado a mitad del periodo de cebo (tiempo 5) durante el estudio de dieta 4.

Por último, en el último muestreo el Índice de Salud Intestinal para los tres grupos de animales mostró diferencias próximas a la significación estadística ($p = 0,070$), presentando los animales que recibieron el tratamiento 3 un valor superior (Figura 4.115).

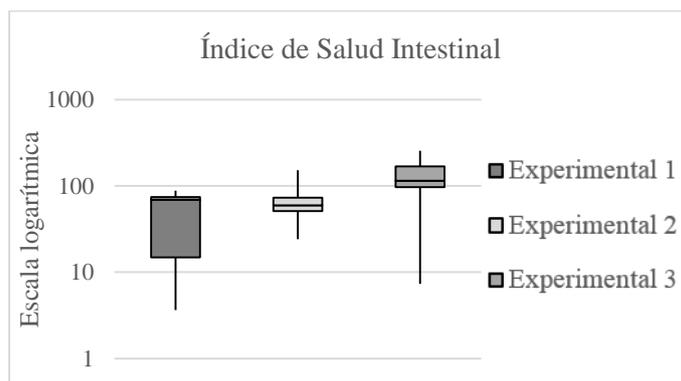


Figura 4.115.- Índice de Salud Intestinal (escala logarítmica) para los tres grupos de experimentales, experimental 1, experimental 2 y experimental 3, en el muestreo realizado a mitad del periodo del cebo (tiempo 5) durante el estudio dieta 4.

4.4.5.- Estudio de dieta 5

De forma similar al estudio de dieta 4, también en este caso se llevó a cabo un estudio longitudinal empleando los recuentos y proporciones obtenidos de las poblaciones bacterianas analizadas a lo largo del estudio que abarcó un periodo de 42 días, comenzando en el destete de los animales. La evolución de la microbiota a lo largo de los tres muestreos se determinó con las muestras de los tres grupos experimentales, testigo negativo con dieta habitual pero sin suplemento antibióticos, testigo positivo con dieta y prescripción antibiótica habitual en la explotación y tratamiento con dieta basal sin antibióticos y suplementada con extractos de plantas. Los muestreos se llevaron a cabo al día siguiente del destete, a los 14 días del destete y al finalizar la transición y los principales resultados obtenidos se describen a continuación.

Como se puede apreciar en la Figura 4.116 las bacterias totales se incrementaron significativamente entre el segundo y tercer muestreo ($p = 0,009$), al igual que los bacteroides-*Prevotella* ($p = 0,026$) y las bifidobacterias ($p = 0,006$). Las poblaciones de lactobacilos se incrementaron a lo largo del estudio, siendo las diferencias significativas entre el primer y último muestreo ($p = 0,022$). Las enterobacterias, en cambio, se redujeron entre el día del destete y los 14 días del éste ($p < 0,001$). En cuanto a los clúster de clostridios, el I y el IV no mostraron diferencias significativas a lo largo del estudio mientras que el clúster XIV se incrementó significativamente entre los dos primeros muestreos ($p = 0,007$).

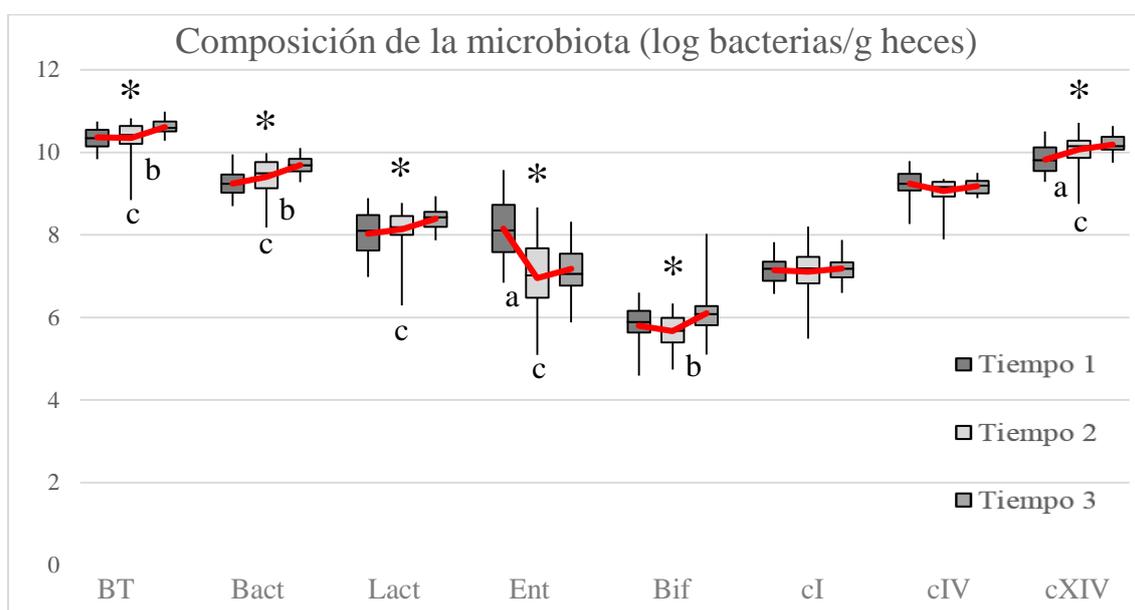


Figura 4.116.- Composición de la microbiota digestiva determinada por PCRc a lo largo de los muestreos realizados: al día del destete (tiempo 1), a los 14 días del destete (tiempo 2) y al finalizar la transición (tiempo 3) durante el estudio de dieta 5. Los asteriscos y letras indican diferencias estadísticamente significativas (* $p < 0,05$: comparación tiempo 1-2-3; a: comparación tiempo 1-2; b: comparación tiempo 2-3; c: comparación tiempo 1-3).

En cuanto a la proporción de las poblaciones bacterianas analizadas se observaron diferencias significativas en la proporción de bacteroides, enterobacterias y los clúster IV y XIV de clostridios (Figura 4.117) durante el seguimiento. En la comparación realizada entre el primer y segundo muestreo se observó un incremento en el porcentaje de bacteroides y clostridios del clúster XIV ($p = 0,004$ y $p = 0,001$, respectivamente) y una disminución de la proporción de enterobacterias y clostridios del clúster IV ($p < 0,001$ y $p = 0,012$, respectivamente). Al analizar las diferencias entre el muestreo realizado a los 14 días del destete y al final de la transición, se comprobó que la proporción de clostridios del clúster IV y XIV disminuyó ($p = 0,001$ en ambos casos), al igual que el clúster I, en este caso con diferencias próximas a la significación ($p = 0,055$).

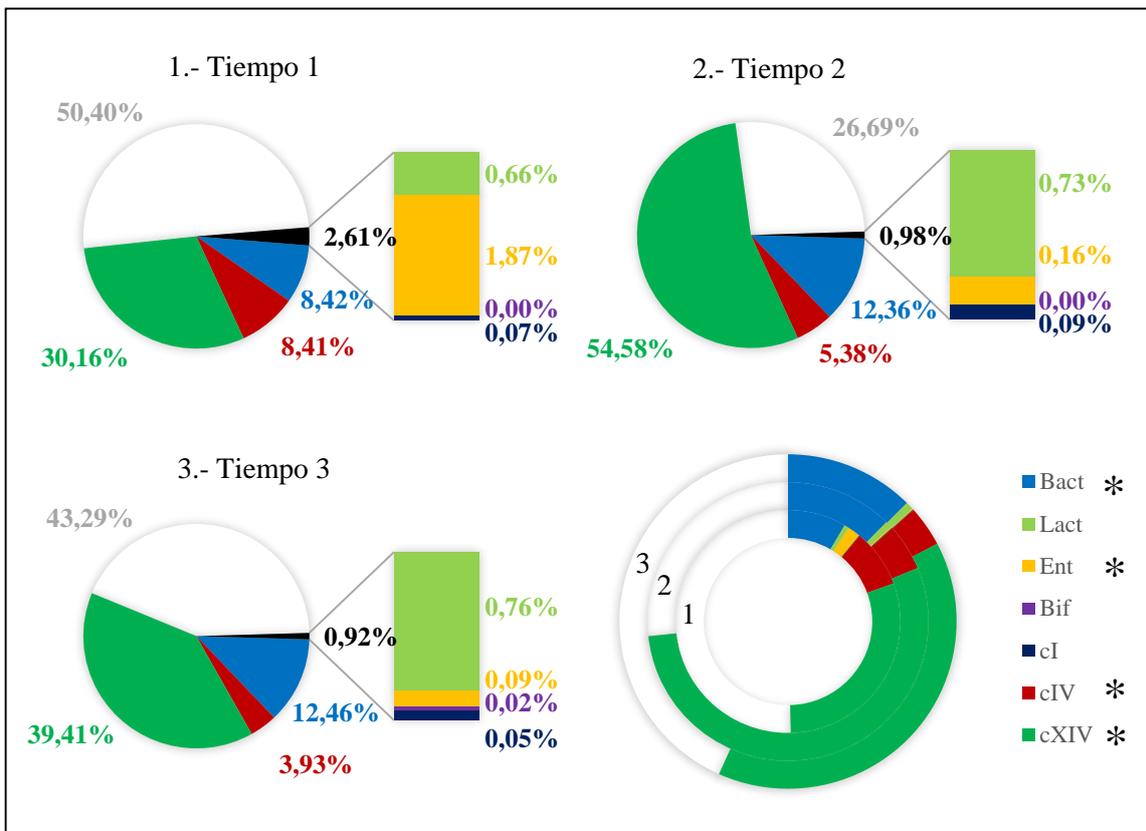


Figura 4.117.- Porcentajes medios relativos de las poblaciones bacterianas de la microbiota digestiva determinadas mediante PCRc a lo largo del estudio de dieta 5 (* diferencias significativas $p < 0,05$): tiempo 1 (día del destete), tiempo 2 (a los 14 días del destete) y tiempo 3 (a la salida hacia el cebadero).

El seguimiento longitudinal del Índice de Salud Intestinal determinó que este valor se incrementó significativamente entre el primer y segundo muestreo ($p < 0,001$), permaneciendo más o menos estable entre el segundo muestreo y el último ($p = 0,726$) (Figura 4.118).

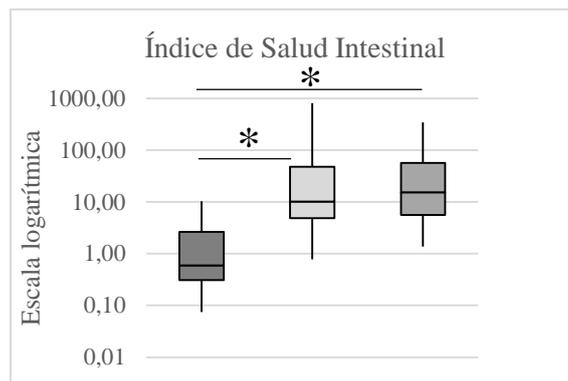


Figura 4.118.- Índice de Salud Intestinal (escala logarítmica) durante el periodo de seguimiento del estudio de dieta 5. Día del destete (tiempo 1), 14 días del destete (tiempo 2) y al finalizar la transición (tiempo 3) (* diferencias significativas $p < 0,05$).

En la comparación de los resultados obtenidos para los tres grupos experimentales a los 14 días del destete (tiempo 2) se tomaron en cuenta los resultados obtenidos el día del destete (tiempo 1), empleando un análisis ANCOVA (Figuras 4.119 y 4.120).

El recuento de bacterias totales en las heces de los lechones a los 14 días del destete fue inferior en los animales del grupo testigo negativo, aunque las diferencias estuvieron lejos de la significación estadística ($p = 0,112$). Se observaron diferencias significativas en las poblaciones de bacteroides ($p = 0,015$), cuyos mayores recuentos se obtuvieron en los animales del grupo testigo positivo, enterobacterias ($p = 0,026$), cuyos recuentos fueron inferiores en este mismo grupo testigo positivo y en los tres clúster de clostridios, cuyas cuantificaciones fueron inferiores en los animales del grupo testigo negativo con respecto a los otros dos grupos de animales para el clúster I ($p = 0,009$), IV ($p = 0,010$) y XIV ($p = 0,011$). También fue ligeramente mayor el recuento de lactobacilos en los animales del grupo experimental aunque las diferencias no fueron significativas ($p = 0,295$).

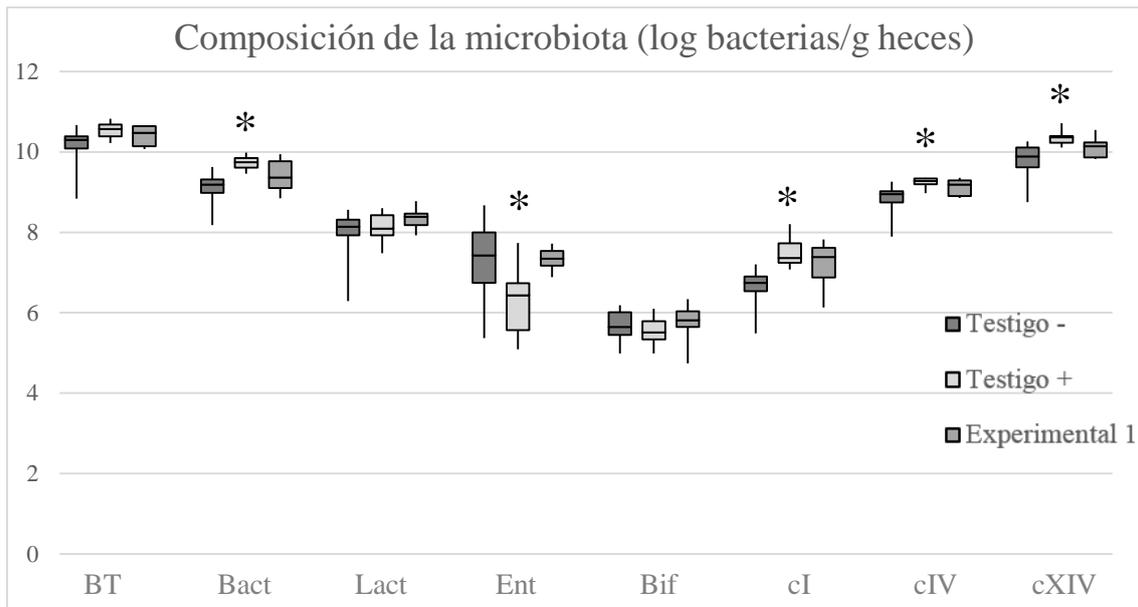


Figura 4.119.- Composición de la microbiota digestiva determinada mediante PCRc a los 14 días del destete (tiempo 2) en los lechones de los tres grupos experimentales, testigo negativo con dieta habitual sin antibióticos, testigo positivo con dieta habitual y antibióticos y experimental 1 con dieta habitual sin antibióticos suplementado con extractos de plantas, durante el estudio de dieta 5. Los asteriscos indican diferencias estadísticamente significativas (* $p < 0,05$).

En cuanto a las proporciones de las poblaciones bacterianas analizadas se observaron diferencias significativas exclusivamente en las poblaciones de bacteroides ($p = 0,044$), que fueron superiores en los animales del grupo testigo positivo. Otras proporciones mostraron diferencias cercanas a la significación. Así, las concentraciones de lactobacilos ($p = 0,065$), cuyo mayor porcentaje se observó en los animales del grupo experimental 1, enterobacterias ($p = 0,062$) y bifidobacterias ($p = 0,113$), cuyos porcentajes fueron inferiores en los animales del grupo testigo positivo, clostridios del clúster I ($p = 0,116$), cuya menor proporción fue observada en los animales del grupo testigo negativo, y clostridios del clúster XIV ($p = 0,067$), cuyo mayor porcentaje fue observado en los animales del grupo testigo positivo presentaron cierto grado de diferencia entre los grupos.

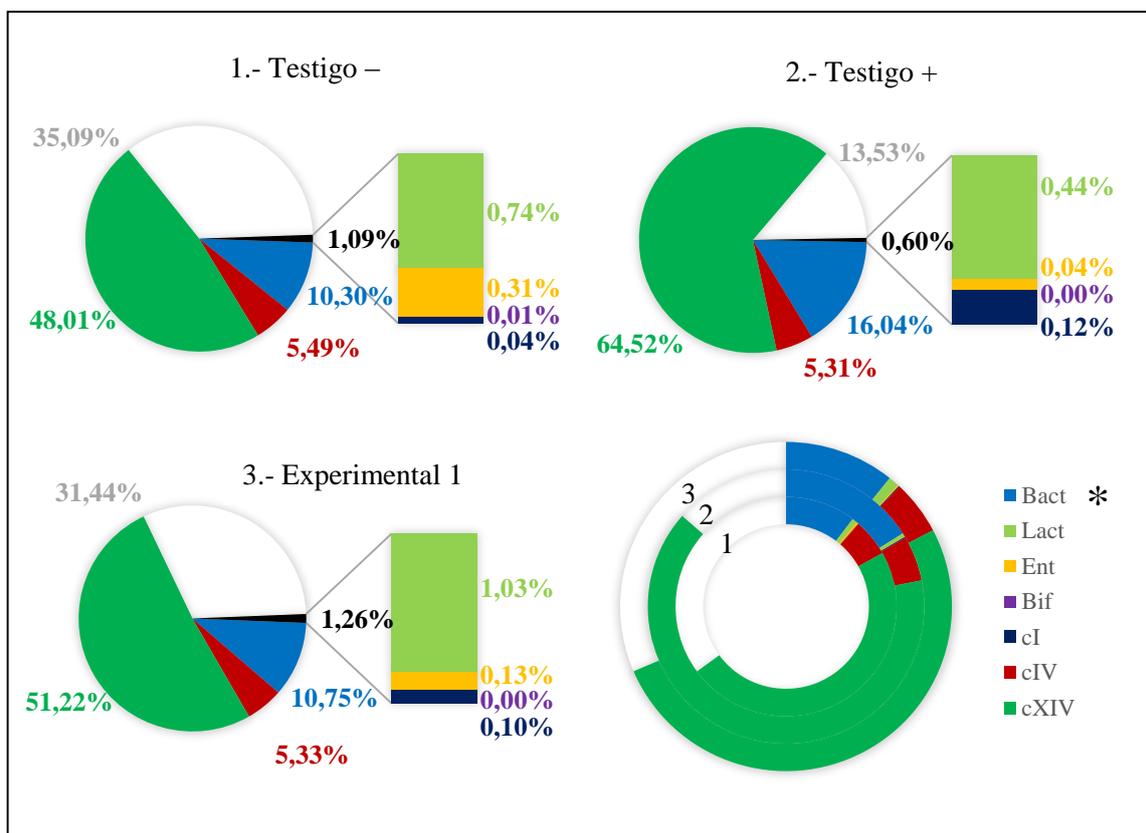


Figura 4.120.- Porcentajes medios relativos de las poblaciones bacterianas de la microbiota digestiva determinadas mediante PCRc en los lechones de los tres grupos experimentales, testigo negativo (1), testigo positivo (2) y grupo experimental 1 (3), en el muestreo realizado a los 14 días del destete (tiempo 2) durante el estudio de dieta 5. Los asteriscos indican diferencias estadísticamente significativas (* $p < 0,05$).

En el segundo muestreo realizado en el estudio de dieta 5, el Índice de Salud Intestinal mostró diferencias significativas entre los tres grupos de lechones ($p = 0,017$), presentando los animales del grupo testigo positivo los mayores valores (Figura 4.121).

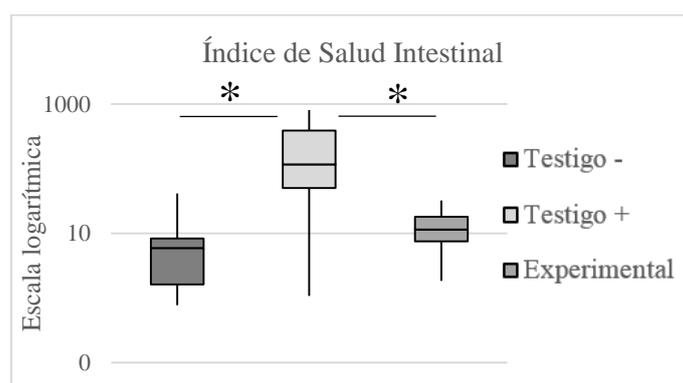


Figura 4.121.- Índice de Salud Intestinal (escala logarítmica) para los tres grupos experimentales, testigo negativo, testigo positivo y experimental 1, en el muestreo realizado a los 14 días del destete de los lechones (tiempo 3) durante el estudio dieta 5. Los asteriscos indican diferencias estadísticamente significativas (* $p < 0,05$).

Los resultados obtenidos en el análisis realizado a la finalización de la etapa de transición (tiempo 3) se muestran en las Figuras 4.122 y 4.123.

Los recuentos de enterobacterias y clostridios del clúster I presentaron diferencias que estuvieron próximas a la significación estadística ($p = 0,075$ y $p = 0,072$, respectivamente), siendo los animales del grupo testigo positivo los que presentaron valores inferiores.

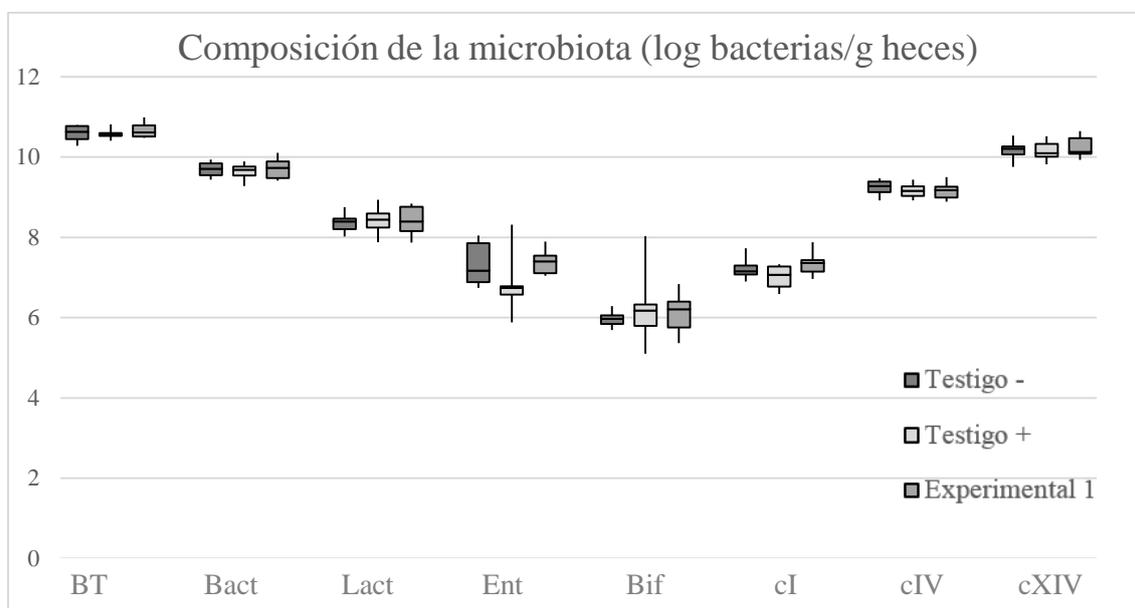


Figura 4.122.- Composición de la microbiota digestiva determinada mediante PCRc en el día anterior a la salida hacia el cebadero (42 días posdestete o tiempo 3) en los animales de los tres grupos experimentales, testigo negativo con dieta habitual sin antibióticos, testigo positivo con dieta habitual y antibióticos y experimental 1 con dieta habitual sin antibióticos suplementado con extractos de plantas, durante el estudio de dieta 5.

En cuanto a la proporción de las poblaciones bacterianas analizadas solo se puede destacar las diferencias observadas en el porcentaje de clostridios del clúster IV ($p = 0,081$), cuyo mayor porcentaje fue observado en los animales que recibieron exclusivamente el pienso sin medicación y sin ningún suplemento (testigo negativo).

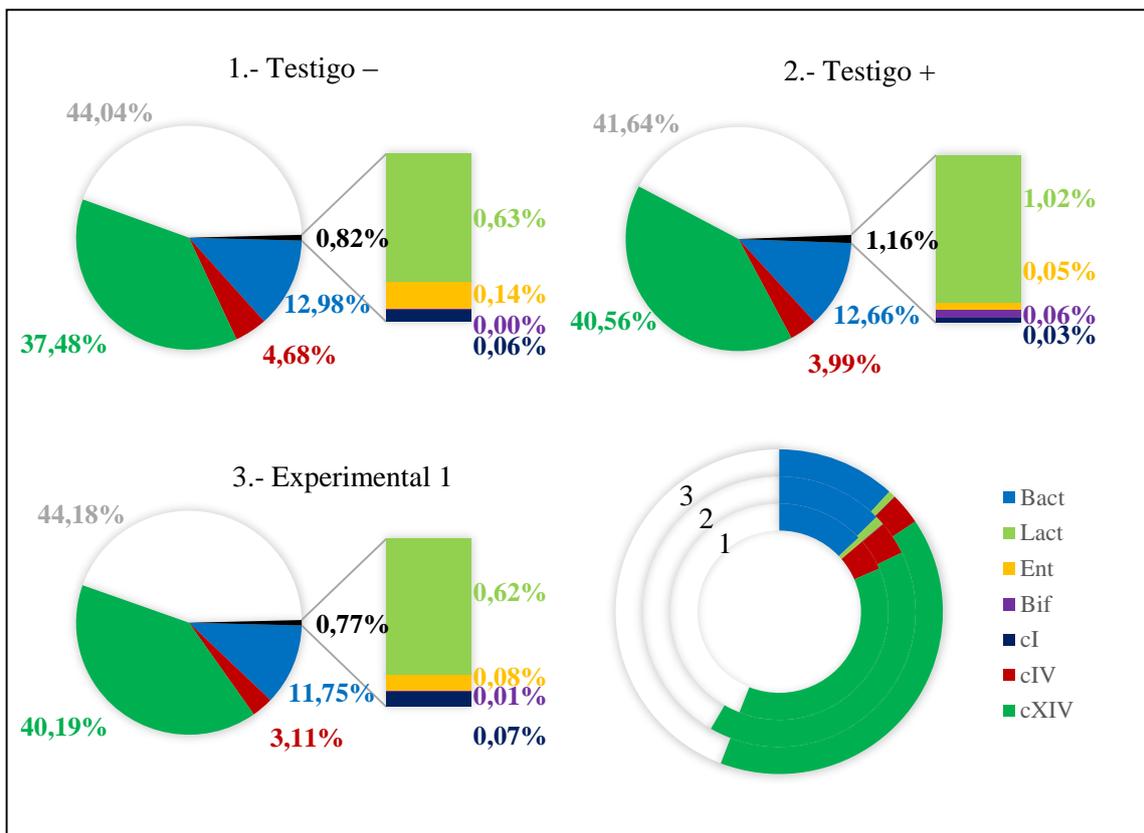


Figura 4.123.- Porcentajes medios relativos de las poblaciones bacterianas de la microbiota digestiva determinadas mediante PCRc en los lechones de los tres grupos experimentales, testigo negativo (1), testigo positivo (2) y grupo experimental 1 (3), en el muestreo realizado al finalizar la transición (42 días posdestete o tiempo 3) durante el estudio de dieta 5.

Finalmente, el Índice de Salud Intestinal en el tercer muestreo realizado en el estudio de dieta 5 mostró diferencias próximas a la significación ($p = 0,061$), cuando se compararon los tres grupos experimentales, presentando los animales del grupo testigo positivo los mejores valores de este índice (Figura 4.124).

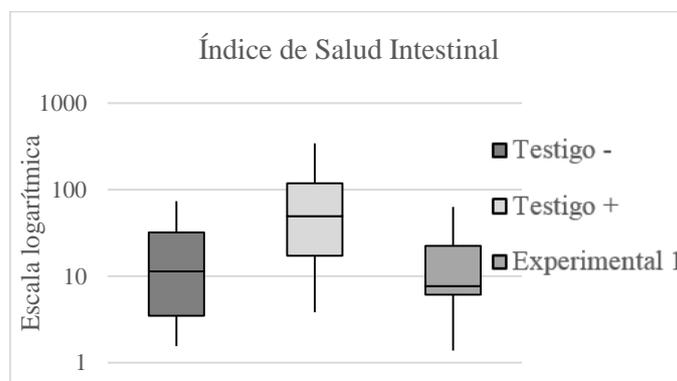


Figura 4.124.- Índice de Salud Intestinal (escala logarítmica) para los tres grupos de animales, testigo negativo, testigo positivo y experimental 1, al finalizar la transición de los lechones (42 días posdestete o tiempo 3) durante el estudio de dieta 5.

5.- Discusión

5.1.- Comparación de las técnicas empleadas: PCRc y NGS

Actualmente la técnica de referencia para el estudio de la composición de la microbiota intestinal es la secuenciación masiva del material genético presente en las muestras (Osman *et al.*, 2018; Hiergeist *et al.*, 2015b). Sin embargo, el tiempo necesario para la obtención de resultados y su coste económico hacen difícil su aplicación en el trabajo veterinario en condiciones de campo. En este sentido, la PCR cuantitativa podría, *a priori*, ser una opción más económica y rápida para el estudio de la microbiota de los animales en las explotaciones porcinas. Por este motivo en esta Tesis se han optimizado PCRc para ocho grupos bacterianos de la microbiota, tratando de diseñar una herramienta que nos permita tener una imagen lo más amplia posible de la composición microbiana con los menores recursos posibles.

Con el fin de validar los resultados obtenidos mediante la PCRc se han procesado por ambas técnicas, PCRc y NGS, las muestras de dos experimentos, uno realizado en la etapa de lactación y otro en la de transición, para tratar de conocer si existen diferencias en los resultados proporcionados por estas dos técnicas.

Se ha realizado una comparación directa de los resultados obtenidos mediante ambas técnicas, es decir, la abundancia relativa de las secuencias obtenidas por NGS y la proporción de cada grupo bacteriano con respecto a las bacterias totales determinada mediante PCRc. Es importante destacar que aunque esta comparación directa entre ambas técnicas no es totalmente adecuada desde un punto de vista formal, debido a las grandes diferencias en eficiencia y sensibilidad entre ambas, nos permite observar de una forma muy rápida las diferencias en los resultados obtenidos.

Entre los factores que afectan a la sensibilidad y eficiencia de la PCRc ocupan un lugar destacado los cebadores, la enzima, el tampón o el detector de fluorescencia que se empleen; así, por ejemplo, al emplear SYBR Green se obtendrán valores de sensibilidad inferiores a los correspondientes a una sonda TaqMan (Malinen *et al.*, 2003) y, a su vez, esta sonda proporcionará menor sensibilidad que una sonda TaqMan-MGB empleada para la misma determinación (Ott *et al.*, 2004).

En cuanto a la secuenciación masiva también existen diversos factores que afectan a los resultados obtenidos como son la región secuenciada, la plataforma y equipo en el que se lleva a cabo o el posterior tratamiento de las secuencias previo a la etapa de análisis. Además, el hecho de que en la secuenciación del gen que codifica para el ARNr 16S es necesario llevar a cabo PCR convencionales previamente a la secuenciación hace que los resultados finales se vean también afectados por las variables que modifican la sensibilidad y eficiencia de esta amplificación inicial.

Para el conjunto de los dos experimentos realizados la relación obtenida al dividir la abundancia relativa determinada por NGS y la proporción obtenida por PCRc para cada grupo bacteriano fue bastante estable a partir del destete. Sin embargo, en los dos

primeros muestreos del estudio, realizados durante la lactación, esta relación mostró una gran variabilidad observándose las mayores diferencias en las muestras tomadas inmediatamente tras el encalostramiento de los lechones. En este muestreo existió una gran dispersión de los resultados, observándose que la desviación estándar para la proporción de algunos de los grupos bacterianos obtenida por PCRc resultó ser superior al valor de la media de dicho valor.

La correlación existente entre las proporciones obtenidas mediante PCRc y las abundancias obtenidas mediante NGS en ambos experimentos fue entre alta y muy alta, con la excepción del primer muestreo realizado tras el encalostramiento de los lechones en el estudio de comparación 1, que, como se ha comentado anteriormente, mostró una gran dispersión de los resultados.

De forma general, las relaciones obtenidas se pueden agrupar en tres grandes grupos: bacteroides y clostridios del clúster IV (NGS/PCRc \approx 2), lactobacilos, enterobacterias y clostridios del clúster I (NGS/PCRc \approx 10) y, finalmente, bifidobacterias y clostridios del clúster XIV (NGS/PCRc $<$ 1). Estas diferencias entre ambas técnicas también se observaron en el estudio de Yang y colaboradores (2015), con diferencias en la cuantificación de algunos filos que llegaron a ser casi del doble o inferiores a una décima parte en las abundancias relativas obtenidas mediante NGS con respecto a las obtenidas mediante PCRc.

Al menos parte de las diferencias observadas al comparar los resultados obtenidos por PCRc y NGS se podrían explicar por las curvas empleadas para estimación del número o recuento de bacterias totales en la PCRc. El número de copias del gen empleado como diana varía entre los diferentes géneros y especies bacterianas. Así, en *E. coli* existen 7 copias, 4 para *L. plantarum* o 10 para *C. perfringens* (Klappenbach *et al.*, 2001; Větrovský y Baldrian, 2013). Por tanto, si se empleara una curva de *L. plantarum* se incrementaría la cantidad de bacterias totales mientras que si se empleara una curva de *C. perfringens* este valor disminuiría. Este inconveniente también está presente en la NGS empleada en esta Tesis habiéndose descrito que tiende a subestimar la abundancia de taxones con números bajos de copias de ARNr 16S y a sobreestimar la abundancia de taxones con alto número de copias de este mismo gen (Větrovský y Baldrian, 2013).

Además, las mayores proporciones obtenidas mediante PCRc para algunos grupos podrían ser debidas a la amplificación inespecífica de otras poblaciones bacterianas no comprobadas en la validación de los cebadores y cuyo fragmento amplificado fuera semejante al fragmento diana y proporcionase una curva de disociación similar a la obtenida con el cultivo puro. Este hecho podría haber ocurrido en el caso de la cuantificación de bifidobacterias y clostridios del clúster XIV.

Por el contrario, la determinación de proporciones inferiores por PCRc con respecto a NGS fue un hallazgo más común, ocurriendo para bacteroides, lactobacilos, enterobacterias y clostridios de los clúster I y IV. Este hecho podría ser debido a la no amplificación, con los cebadores empleados en la PCRc, de una parte de las especies del grupo bacteriano. Aunque este error podría reducirse mediante la comprobación de un mayor número de especies bacterianas en cada grupo, como se ha comentado en la introducción, una parte importante de las bacterias de la microbiota intestinal no han

podido ser cultivadas ni identificadas, por lo que la fuente de error se mantendría (Suau *et al.*, 1999; Lagier *et al.*, 2015).

Un problema adicional en el caso de los resultados de la NGS es la sensibilidad de la misma que viene dada por la profundidad de la secuenciación, es decir, por el número de fragmentos secuenciados en cada muestra. En la mayoría de los estudios de caracterización de la microbiota digestiva este valor varía, aproximadamente, entre 5×10^4 y 1×10^5 secuencias (Slifierz *et al.*, 2015). Teniendo en cuenta que los recuentos de bacterias totales en las muestras de heces estuvieron alrededor de las 10^{11} bacterias/g, teóricamente, para esta profundidad solo se detectarían mediante NGS aquellas poblaciones que se encontrasen en concentraciones superiores a 10^6 bacterias/g. Por el contrario, con las PCRc desarrolladas en el presente trabajo, se pueden llegar a detectar concentraciones de 10^4 bacterias/g y, por ello, aquellos grupos bacterianos que proporcionen recuentos entre estos dos valores no serán evidenciados por secuenciación masiva pero sí por PCRc. Esta circunstancia se ha observado de forma clara en la cuantificación de la población de bifidobacterias pero, en base a los resultados obtenidos en otros experimentos de esta Tesis, también se podría dar en la cuantificación de lactobacilos, enterobacterias y clostridios del clúster I.

En algunos estudios se han observado diferencias entre el número de secuencias obtenidas en una muestra y el número esperado para esa misma muestra partiendo de una concentración conocida de ADN. Así, en el estudio realizado por Wang y colaboradores (2014) se emplearon muestras de 10 especies bacterianas en la misma proporción pero con diferente cantidad total, observándose que algunas de las secuencias obtenidas por NGS se incrementaban mientras que otras se reducían al incrementar la cantidad total de ADN en la reacción. En otro estudio se empleó una concentración conocida de ADN de varias especies por separado y se secuenció por triplicado, observándose desviaciones entre las réplicas de entre un 20 y un 90 %, alcanzándose valores medios próximos al doble del valor esperado para algún taxón (Boers *et al.*, 2017).

La mayoría de los autores que emplean estas dos técnicas para determinar la composición de la microbiota digestiva no comparan los resultados directamente entre ellas ya que, como mencionamos anteriormente, no son directamente comparables por las propiedades intrínsecas de las mismas (Dou *et al.*, 2017). En algunos casos se emplea la PCRc para cuantificar aquellos grupos bacterianos en los que se aprecian diferencias significativas mediante secuenciación masiva (Galán-Ros 2015). En el estudio de Hermann-Bank y colaboradores (2013) aplica la secuenciación masiva sobre el material amplificado mediante un chip que contiene cebadores para amplificar 24 taxones mediante PCRc, por lo que los resultados de ambas técnicas está lógicamente relacionado. A pesar de ello, los resultados obtenidos mediante NGS en dicha investigación presentaron una elevada dispersión, oscilando entre 10 veces por encima y 10 veces por debajo de los valores obtenidos mediante PCRc.

En el análisis longitudinal de los resultados del estudio de comparación 1 realizado durante la lactación se observaron diferencias estadísticamente significativas en todos los grupos bacterianos analizados mediante PCRc salvo para los bacteroides-*Prevotella* y las bifidobacterias. Estas diferencias también fueron observadas en el análisis de los resultados obtenidos mediante secuenciación masiva aunque en este caso, también se

observaron diferencias en la evolución de las familias Bacteroidaceae y Prevotellaceae. Sin embargo, las evoluciones de ambos taxones fueron inversas hecho que podría explicar que la suma de ambas podría no presentar diferencias a lo largo del experimento como mostró la PCRc.

Además, cuando se compararon los dos grupos experimentales, con y sin lactorreemplazante, se comprobó que no existían diferencias significativas en la composición de la microbiota determinada por ambas técnicas en el muestreo realizado a mitad de la lactación. En el tercer muestreo, realizado a los 7 días del destete, no se observaron diferencias entre los animales que recibieron el lactorreemplazante en comparación con los testigos que no lo recibieron mediante PCRc pero sí se observaron diferencias en la familia Clostridiaceae *sensu stricto* mediante secuenciación masiva, aunque únicamente cuando no se aplicaron las correcciones para comparaciones múltiples.

El estudio de comparación 2 se realizó durante la transición con tres grupos de animales sometidos a cambios en su alimentación, reduciendo la cantidad de lisina y antibióticos e introduciendo avena en la composición del pienso.

En el análisis longitudinal de los resultados obtenidos mediante PCRc se observaron diferencias significativas para todos los grupos bacterianos salvo para los clostridios del clúster XIV. En cambio, mediante NGS la excepción se localizó en la familia Ruminococcaceae (clostridios del clúster IV). Las evoluciones de las poblaciones bacterianas fueron similares entre ambas técnicas salvo para el clúster XIV que presentó una evolución inversa. Se observó una correlación de Pearson superior a 0,65 ($p < 0,05$) entre la diversidad alfa y el porcentaje de bacterias no determinado por las PCRc, por lo que este valor obtenido mediante PCRc podría dar una aproximación a la diversidad de las muestras de los estudios en los cuales no se realizó secuenciación masiva.

La comparación de los tres grupos experimentales mostró, igualmente, unos resultados muy similares para ambas técnicas en lo que respecta a la composición cuantitativa de la microbiota intestinal. En el segundo muestreo, realizado a los 8 días del destete, no se observaron diferencias significativas por ninguna de las dos técnicas empleadas, aunque el valor absoluto obtenido mediante PCRc de enterobacterias fue significativamente mayor en los animales del grupo experimental 2 con respecto al grupo experimental 1. Tampoco existieron diferencias significativas en las poblaciones bacterianas analizadas mediante PCRc en el tercer muestreo, a la salida de los animales hacia el cebadero aunque mediante NGS se pudo comprobar que los animales del grupo de tratamiento 2 presentaban una menor abundancia relativa para la familia Bacteroidaceae en comparación con el grupo de tratamiento 1.

Por lo tanto, podemos concluir que no existen grandes diferencias entre los resultados de cuantificación de la microbiota obtenidos mediante estas dos técnicas. Aunque, como hemos indicado, los resultados de las PCRc no son directamente comparables con los obtenidos mediante NGS, el análisis estadístico de la evolución de la microbiota en diferentes tiempos o tras diferentes tratamientos proporciona resultados muy similares empleando ambas herramientas. Esto nos permite afirmar que los resultados obtenidos mediante PCRc son perfectamente válidos para llevar a cabo estudios de comparación y seguimiento cuando se introduce cualquier factor que pueda

afectar a la microbiota intestinal. Al tratarse de una técnica más económica y rápida podemos emplearla para obtener una visión general de la composición de la microbiota de forma más sencilla que la secuenciación masiva. Por su parte, los resultados de NGS nos permiten conocer de una forma mucho más detallada la composición de la microbiota, aportando mayor cantidad de información.

5.2.- Evolución de la microbiota

La composición de la microbiota presente en las heces de los lechones presenta una evolución amplia y rápida durante las primeras semanas de vida al estar expuestos los lechones de forma continuada a miles de especies de bacterias y a condiciones alimentarias cambiantes (Slifierz *et al.*, 2015). Las bacterias que colonizan en las primeras etapas de la vida del animal juegan un papel muy importante en la estabilización de la microbiota intestinal, un fenómeno que ocurre, fundamentalmente, a partir de las 2-3 semanas postdestete. La inestabilidad existente en las primeras semanas puede hacer que los lechones sean más susceptibles a la disbiosis y a otras enfermedades, hecho que se ha probado en medicina humana (Munyaka *et al.*, 2014) y que ha dado lugar a la denominada hipótesis de la programación, por la que los estímulos ambientales en las primeras edades predeterminan la manifestación de enfermedades en edades muy posteriores (Azad y Kozyrskyj, 2012). El empleo de antibióticos, el estrés o las prácticas de manejo pueden tener un impacto notable en la microbiota intestinal, favoreciendo o reduciendo la aparición de enfermedades (Thompson *et al.*, 2008; Schmidt *et al.*, 2011; Isaacson y Kim, 2012; Schokker *et al.*, 2015). Así, se ha sugerido, por ejemplo, que la cantidad de lactobacilos presentes en las heces puede influir en la inmunidad del lechón y, por tanto, en la receptividad a las enfermedades debido a la actividad inmunoestimulante e inmunomoduladora de estas bacterias (Schokker *et al.*, 2014).

Una parte importante de los resultados obtenidos mediante el uso de las dos técnicas empleadas en esta Tesis, PCRc y NGS, son los relativos a la composición de la microbiota a lo largo de la vida de los lechones. Para ello se han empleado los diferentes estudios que incluyeron un componente temporal y que fueron llevados a cabo en distintas granjas. Estos estudios son los identificados como comparación 1, comparación 2, estatus sanitario 1 y estudios de dieta 4 y 5 y abarcan la lactación (estudio de comparación 1 y estudio de estatus sanitario 1), el destete y transición (estudio de comparación 1 y 2, estudio de estatus sanitario 1 y estudios de dieta 4 y 5) y el periodo de cebo (estudio de dieta 4).

La población de bacterias totales se mantuvo más o menos estable (10^{10} - 10^{11} bacterias/g) a lo largo de todo el tiempo de seguimiento y para el conjunto de los cinco estudios. Este hecho nos indica que la microbiota intestinal alcanza las concentraciones habitualmente detectadas en las heces en los primeros días o incluso primeras horas de vida de los lechones.

Se demostró que la población de bacteroides-*Prevotella* se incrementa con la edad de los animales ya que en los primeros días (desde el nacimiento hasta la mitad de lactación) presenta los menores recuentos y proporciones mediante PCRc. Los resultados

de secuenciación masiva nos permitieron comprobar que, como se ha mencionado anteriormente, mientras la familia Bacteroidaceae disminuye desde el encalostramiento hasta la salida hacia el cebadero de los lechones, en cambio la familia Prevotellaceae se incrementa en este mismo periodo, por lo que sería esta familia la responsable del incremento observado por PCRc.

Cabe mencionar que en los muestreos realizados alrededor del momento del destete, aquellas muestras que se recogieron en el mismo día del destete presentaron una proporción ligeramente superior bacteroides-*Prevotella* con respecto a las recogidas al día siguiente. Dentro de la familia Prevotelleceae el género detectado más abundante ha sido *Prevotella*, que es un género productor de AGCC (Shah y Collins, 1990). Estos AGCC son absorbidos por los colonocitos y desarrollan importantes y diversas funciones a nivel local. La disminución del género *Bacteroides* y el incremento de *Prevotella* después del destete también ha sido descrita en otros estudios (J. Hu *et al.*, 2016; Pajarillo *et al.*, 2014; Chen *et al.*, 2017; Mach *et al.*, 2015). Además, se ha descrito una correlación positiva de la concentración de Bacteroidetes después del destete con la abundancia temprana de Ruminococcaceae, Prevotellaceae y Lachnospiraceae (Dou *et al.*, 2017).

La población de lactobacilos presenta un comportamiento inicial similar al de los bacteroides, elevándose ligeramente en los primeros días de vida de los lechones (1-3) aunque a los 7 días ya se observa, tanto en los resultados proporcionados por la PCRc como en los de NGS, una ligera disminución que se hace más manifiesta en el destete, permaneciendo a partir de ese momento relativamente estables. Este resultado confirma los hallazgos de otros estudios (J. Hu *et al.*, 2016; Pajarillo *et al.*, 2014; Chen *et al.*, 2017; Mach *et al.*, 2015; Starke *et al.*, 2014), aunque para algunos autores no existe esta disminución (Slifierz *et al.*, 2015) e incluso se puede existir un incremento de los mismos (Frese *et al.*, 2015). Al igual que ocurrió con la población de bacteroides, la población de lactobacilos fue ligeramente superior en los animales muestreados en el mismo día del destete en comparación con los animales muestreados al día siguiente del mismo. Entre los componentes de este grupo bacteriano ocupa una posición destacada el género *Lactobacillus*, bacterias productoras de ácido láctico, molécula que reduce el pH gástrico y retrasa la colonización por *E. coli* enterotoxigénico (Thomlinson y Lawrence, 1981) además de incrementar el rendimiento productivos de los cerdos (Tsiloyiannis *et al.*, 2001). La elevación inicial de esta población podría ser debida en parte a la caseína de la leche de la cerda, que puede formar coágulos en el estómago que favorecen el transporte de los lactobacilos al intestino delgado y que junto al aporte continuo de sustratos para la fermentación favorecen a este grupo bacteriano (Castillo-Gómez 2006).

Las enterobacterias, por su parte, se detectaron en una elevada proporción en las muestras recogidas al nacimiento de los animales (20 %) pero rápidamente redujeron su importancia, observándose a los 3 días proporciones cercanas al 8-6 % (PCRc-NGS). Hacia la mitad de la lactación disminuyeron hasta el 2-5 % (PCRc-NGS) y, a partir de este momento, se mantuvieron relativamente estables hasta el periodo de destete, bajando hasta valores inferiores al 1 % a continuación. La evolución de esta familia observada en nuestros estudios coincide con la descrita para el género *Escherichia-Shigella* en otros estudios (Chen *et al.*, 2017; Mach *et al.*, 2015; Starke *et al.*, 2014). Cabe destacar que las enterobacterias en nuestro estudio presentaron un comportamiento inverso al de los lactobacilos y los bacteroides en las muestras recogidas al destete, siendo la concentración

y la proporción de enterobacterias más elevada en las muestras recogidas al día siguiente en comparación con las correspondientes al día del destete. Además, se ha descrito una correlación negativa de las Enterobacteriaceae después del destete con la abundancia temprana de Ruminococcaceae, Prevotellaceae y Lachnospiraceae (Dou *et al.*, 2017). El papel de este grupo bacteriano se discutirá en más profundidad en apartados posteriores.

La población de bifidobacterias se mantuvo relativamente estable desde el nacimiento de los lechones y hasta los muestreos realizados a la mitad del periodo de cebo de los animales. Se puede mencionar que durante los primeros 10 días de vida alcanzaron recuentos cercanos al 0,1 % mientras que a partir del destete su proporción se situó alrededor del 0,01 %, con la única excepción del muestreo realizado a la entrada al cebadero de los animales del estudio de estatus sanitario 1, que presentó una proporción cercana al 0,6 %. Esta disminución de la población de bifidobacterias tras el destete también fue documentada en el estudio de Starke y colaboradores (2014). Esta población es la única que en alguna de las muestras de heces analizadas no ha podido ser cuantificada al obtener valores inferiores a los límites de detección de las técnicas, lo que ha sido observado en otros estudios (Heinritz *et al.*, 2016).

Los clostridios del clúster I o *sensu stricto* presentaron una proporción más elevada en los 3 primeros días de vida que a mitad de lactación. Aunque en el destete vuelven a elevarse, los valores observados durante la transición y el cebo (0,2-2 %, PCRc-NGS) no llegan a alcanzar las concentraciones determinadas en los dos primeros muestreos durante la lactación (0,6-4 %, PCRc-NGS). Esta evolución concuerda con la descrita por otros autores (Chen *et al.*, 2017; Mach *et al.*, 2015; Starke *et al.*, 2014), aunque en el estudio de Hu y colaboradores (2016) se evidenció, por el contrario, que los *Clostridium sensu stricto* se reducían al avanzar la fase de transición de los lechones. En el estudio de Castillo-Gómez observó que la disminución de este clúster se debía en parte a la disminución de *C. butyricum* durante la lactación.

El clúster IV de clostridios engloba a la familia Ruminococcaceae y presentó el menor porcentaje durante los primeros 10 días de vida de los lechones (3-9 %, PCRc-NGS), elevándose hasta el momento del destete (10-25 %, PCRc-NGS). A partir del destete volvió a disminuir su importancia hasta el final del periodo de transición (7-19 %, PCRc-NGS), tal y como se ha puesto de manifiesto por otros autores (Mach *et al.*, 2015; Starke *et al.*, 2014). El papel de este grupo bacteriano se discutirá en detalle en apartados posteriores.

Finalmente, la familia Lachnospiraceae (clostridios del clúster XIV) presentó un comportamiento bastante similar al observado para el clúster IV aunque los valores observados, como se ha comentado anteriormente, fueron bastante inferiores mediante la técnica de NGS. Así, en los primeros muestreos la abundancia relativa estuvo próxima a un 9 %, elevándose ligeramente en el destete (11 %) y disminuyendo durante la transición (8 %). Esta disminución tras el destete ha sido descrita para esta misma familia por otros autores (Hu *et al.*, 2016; Pajarillo *et al.*, 2014; Chen *et al.*, 2017; Mach *et al.*, 2015). Los resultados de evolución y concentración obtenidos mediante PCRc también fueron similares a los determinados por otros autores empleando la misma técnica para cuantificar este grupo bacteriano (Starke *et al.*, 2014).

En el ganado porcino se ha descrito la existencia de dos enterotipos en los animales después del destete, identificados como ruminococcaeae (tipo 3) y el prevotella (tipo 2) mientras que en humana existe otro enterotipo a mayores, el bacteroides (tipo 1) (Arumugam *et al.*, 2011). Estos enterotipos dependen de la abundancia de *Lactobacillus* y clostridios del clúster XIVa durante la lactación de los lechones (Mach *et al.*, 2015). Los animales con un enterotipo ruminococcaeae presentan mejores parámetros productivos durante la lactación mientras que el enterotipo prevotella tiene peores parámetros durante la lactación pero después del destete tiene mejor ganancia media diaria y mayor peso vivo (Mach *et al.*, 2015). El enterotipo ruminococcaeae está asociado a una mayor abundancia de bacterias que pueden utilizar los oligosacáridos de la leche de la cerda como son Bacteroides y clostridios del clúster IV y XIV (Li *et al.*, 2012). Por el contrario, el enterotipo prevotella está asociado al género del mismo nombre, que como se ha comentado anteriormente está asociado a la fermentación de polisacáridos complejos (Shah y Collins, 1990; Castillo-Gómez, 2006).

Además de estos grupos bacterianos analizados mediante ambas técnicas, podemos destacar resultados correspondientes a una serie de familias identificadas mediante NGS y cuya abundancia fue superior al 1 % que presentaron diferencias significativas en el periodo comprendido entre el encalostramiento de los lechones y la salida hacia el cebadero. La familia Fusobacteriaceae, cuyo género más abundante fue *Fusobacterium*, presentó un porcentaje importante a los 3 días de vida pero a los 10 días solo alcanzaba el 1 % y en el destete no llegaba al 0,01 %. Esta disminución antes del destete ha sido observada en otros estudios similares (Pajarillo *et al.*, 2014; Slifierz *et al.*, 2015; Chen *et al.*, 2017). Por el contrario, la familia Spirochaetaceae mostró un porcentaje inferior al 1 % en los dos primeros muestreos, al inicio y mitad de la lactación, para incrementarse progresivamente hasta alcanzar una proporción del 4 % en el muestreo realizado al final de la transición, con valores muy similares a los obtenidos por Slifierz y colaboradores (2015). Un comportamiento similar lo presentó la familia Veillonellaceae, con valores inferiores al 1 % hasta el destete, ascendiendo hasta valores próximos al 5 % durante el periodo de transición. Finalmente, las familias Rikenellaceae, Erysipelotrichaceae y Christensenellaceae presentaron recuentos inferiores al comienzo y al final del periodo del estudio, alcanzando valores máximos en los muestreos realizados alrededor del destete.

A nivel de filo, todos los muestreos del estudio longitudinal global se podrían agrupar en dos grandes partes cuyo punto de división sería el destete de los animales. En el primer periodo, anterior al destete, los filos dominantes son Firmicutes (53 %), Bacteroidetes (30 %), Proteobacteria (9 %) y Fusobacteria (4 %), mientras que en el segundo, tras el mismo, encontramos Firmicutes (52 %), Bacteroidetes (39 %), Proteobacteria (4 %) y Spirochaetae (3 %). Por lo tanto, los resultados de nuestros estudios confirman que los dos filos más importantes cuantitativamente en la microbiota de los lechones son Firmicutes y Bacteroidetes, tal y como ha sido propuesto por varios autores (Chen *et al.*, 2017; Kim *et al.*, 2011; Hu *et al.*, 2016; Pajarillo *et al.*, 2014; Tajima *et al.*, 2010; Soler *et al.*, 2018). Entre ellos, Firmicutes fue el más abundante en nuestro caso aunque para algunos autores Bacteroidetes es más prevalente entre los animales destetados (Pajarillo *et al.*, 2014; Hu *et al.*, 2016; Guevarra *et al.*, 2018; Poroyko *et al.*, 2010). El filo Proteobacteria ocupó el tercer lugar en importancia a lo largo del estudio aunque mostró una clara disminución durante el seguimiento, tal y como se ha

comprobado en otros estudios (Pajarillo *et al.*, 2014; Niu *et al.*, 2015; Zhao *et al.*, 2015; Looft *et al.*, 2012; Soler *et al.*, 2018; Xie *et al.*, 2017). Este hecho nos permite sugerir que la abundancia de patógenos oportunistas puede decrecer al incrementarse la madurez de la microbiota intestinal, tal y como ha sido propuesto por otros autores (Chen *et al.*, 2017). Los filos Fusobacteria y Spirochaetae también fueron detectados en nuestro estudio con proporciones y evoluciones similares en sus poblaciones a las de otras investigaciones con similar diseño (Chen *et al.*, 2017; Pajarillo *et al.*, 2014; Slifierz *et al.*, 2015).

En cuanto a la diversidad alfa o riqueza obtenida con los resultados de la secuenciación masiva se observó un incremento progresivo a lo largo de todo el seguimiento longitudinal, incrementándose muestreo a muestreo de forma significativa en la mayoría de los casos. Un resultado similar ha sido descrito por diversos autores (Chen *et al.*, 2017; Mach *et al.*, 2015; Niu *et al.*, 2015) aunque también existe algún estudio que detecta una disminución en algunos de los índices tras el destete (Hu *et al.*, 2016). Una mayor riqueza, en principio, provee a la microbiota de una redundancia funcional que ayuda en la homeostasis y a la resiliencia del ecosistema y, por tanto, favorece la salud del lechón (Le Chatelier *et al.*, 2013; Konopka, 2009). Así, por ejemplo, en medicina humana se ha observado que la diversidad reducida en los neonatos nacidos por cesárea puede alterar la colonización por Bacteroidetes (Jakobsson *et al.*, 2014).

Finalmente, la diversidad beta u ordenación puso de manifiesto que las muestras se agrupaban claramente entre ellas en base al tiempo de muestreo o, lo que es lo mismo, en base a la edad del lechón. Los muestreos realizados a los 8 días del destete y al finalizar la transición se encontraban más próximos entre sí, aunque algunos índices, como las distancias de Bray-Curtis permitían separar ambos conjuntos de muestras. También cabe destacar que las muestras de los lechones lactantes se agrupan menos entre ellas y que esta situación revierte a medida que se incrementa la edad. Así, las muestras de animales de más edad tienden a estar más próximas entre sí, con la excepción de las muestras correspondientes a la etapa de transición. Estos resultados nos permiten concluir, en consonancia con otros autores, que la composición de la microbiota es bastante diferente en el caso de los lechones lactantes y que esta microbiota se va asemejando cada vez más, entre los distintos animales, tras el destete (Mach *et al.*, 2015; Slifierz *et al.*, 2015; Chen *et al.*, 2017).

El destete de los lechones es un periodo de grandes cambios en el lechón, como se puede apreciar en los cambios de composición de su microbiota intestinal. De forma general, se ha observado que se produce un incremento en la población de enterobacterias mientras que los bacteroides, lactobacilos, bifidobacterias y clostridios del clúster IV y XIV se reducen en los días siguientes al destete y, con ello, disminuyen los efectos positivos que tienen estas bacterias o sus metabolitos (AGCC). Todos estos cambios de composición podrían ser una de las causas de las disbiosis que se observan frecuentemente tras el destete.

5.3.- Comparación de la composición de la microbiota en animales sanos y con disbiosis, y entre granjas con diferente estatus sanitario

La microbiota digestiva tiene un gran impacto en la salud de animales (Barko *et al.*, 2018) al participar en funciones fisiológicas fundamentales para la salud del hospedador. En los últimos años, en el ganado porcino se ha incrementado la importancia de los problemas digestivos no específicos generalmente asociados a situaciones de disbiosis en la microbiota digestiva (Fouhse *et al.*, 2016; Gresse *et al.*, 2017). Para conocer la composición de la microbiota intestinal en animales sanos y en animales con disbiosis se han empleado las PCRc desarrolladas en este trabajo de Tesis con el fin de determinar de manera rápida y económica las posibles diferencias entre ambos grupos de animales.

En el estudio de disbiosis 1 los animales con un cuadro clínico inespecífico compatible con disbiosis de acuerdo a los veterinarios de las explotaciones afectadas presentaron un recuento superior de enterobacterias y bifidobacterias así como un recuento menor de clostridios de los clúster I y XIV con respecto a los animales considerados sanos. Además, el índice de salud intestinal fue inferior en los animales afectados, a consecuencia del citado mayor incremento de la población de enterobacterias. Un estudio realizado por Dou y colaboradores (2017) demostró un incremento en las enterobacterias asociado a una baja abundancia del filo Bacteroidetes en los animales que presentaron diarrea durante la transición. Por el contrario, nuestros resultados muestran un incremento de ambas poblaciones en los animales con disbiosis. Además, estos mismos autores también observaron que los animales sanos presentaban unas poblaciones de clostridios de los clúster IV y XIV más elevadas que aquellos que presentaron diarrea, en coincidencia con los resultados de nuestro estudio en animales con disbiosis. En este sentido, se ha descrito que géneros como *Blautia* y *Roseburia*, pertenecientes al clúster XIV de los clostridios, se encuentran en mayor proporción en animales sanos con respecto a los animales que tuvieron diarrea (Diao *et al.*, 2018). Estas bacterias son productores de ácido acético y butírico (AGCC), respectivamente para *Blautia* y *Roseburia*, moléculas que regulan la función inmunitaria a través de sus receptores (Duncan *et al.*, 2006; Liu *et al.*, 2008) y que tienen un papel fundamental en la fisiología digestiva manteniendo la homeostasis y el balance electrolítico del intestino y aportando energía a los enterocitos (Ríos-Covián *et al.*, 2016).

En el estudio de disbiosis 2 no se apreciaron diferencias entre los grupos de animales sanos y con posible disbiosis, por lo que los animales que solo presentaron fiebre se unieron en el análisis a los animales testigo. En este segundo análisis, pudimos demostrar la existencia de diferencias en el recuento de bacterias totales y de bifidobacterias, que fueron inferiores en los animales con cuadro clínico asociado a una disbiosis, así como, sorprendentemente, una proporción superior de lactobacilos en este grupo de animales. Al contrario de lo observado en nuestro estudio, para otros autores la mayor proporción de lactobacilos suele asociarse a un estado fisiológico de salud intestinal, existiendo una correlación positiva entre este grupo bacteriano y la ausencia de procesos entéricos (Pärtty *et al.*, 2015; Diao *et al.*, 2018). Las bifidobacterias no son consideradas un componente importante de la microbiota intestinal del cerdo y, en ese

sentido, hemos obtenido concentraciones bajas de este grupo bacteriano aunque se ha descrito que su estimulación puede ser beneficiosas para los lechones (Weiss *et al.*, 2016).

En el estudio de disbiosis 3 no se apreciaron diferencias en los recuentos absolutos de las poblaciones analizadas pero sí en las proporciones de bacteroides y clostridios del clúster IV y XIV, que fueron superiores en los animales que no tenían un cuadro clínico compatible con disbiosis. Como se ha comentado anteriormente, existen estudios previos que han demostrado, de forma similar, proporciones superiores de estos grupos bacterianos asociadas a un estado fisiológico y salud intestinal de los animales (Diao *et al.*, 2018). En los lechones durante la transición se ha descrito que distintos géneros bacterianos de la familia Prevotellaceae incluida en los bacteroides y de las familias de clostridios Ruminococcaceae y Lachnospiraceae están correlacionadas con la eficiencia alimentaria, ya que los lechones más eficientes son los que probablemente tengan una microbiota intestinal más competente para digerir los carbohidratos de la dieta (McCormack *et al.*, 2014).

Finalmente, en el estudio de disbiosis 4 se observaron las mayores diferencias entre los dos grupos. Los animales que presentaron diarrea durante la transición tuvieron menores recuentos y proporciones de lactobacilos, bifidobacterias y clostridios del clúster I y IV, mayor porcentaje de bacteroides y enterobacterias, y un menor recuento absoluto de clostridios del clúster XIV. Además, el índice de salud intestinal fue superior en los animales que no presentaron diarrea con respecto a aquellos animales que sí la presentaron. Como se ha comentado en los estudios anteriores, estos incrementos en las poblaciones de lactobacilos y clostridios del clúster IV y XIV así como la disminución en la población de enterobacterias están asociados a un beneficio para el lechón (Pärty *et al.*, 2015; Diao *et al.*, 2018; Dou *et al.*, 2017). Sin embargo, el hallazgo de un mayor porcentaje de bacteroides en los animales con diarrea es contrario a lo descrito por otros autores (Hermann-Bank *et al.*, 2015; Dou *et al.*, 2017). Dou y colaboradores (2017) demostraron una clara correlación entre la población de enterobacterias y el contenido seco de las heces diarreicas (con un contenido de extracto seco inferior al 20 %), proponiendo que este grupo podría ser un adecuado indicador de salud intestinal. En el estudio de Hermann-Bank y colaboradores (2015) se observó en las diarreas neonatales un incremento en las enterobacterias y en la familia Prevotellaceae, aunque esta última, como se ha visto anteriormente, no suele ser importante hasta después del destete. Además, este incremento de prevotellas se correlacionó con una disminución en los lactobacilos y en los géneros de los clúster IV y XIV de clostridios, como se ha apreciado en nuestro estudio así como en otros previos (Yang *et al.*, 2017; Kaufmann *et al.*, 1997). La población de bifidobacterias observada también fue inferior. Por el contrario, Yang y colaboradores (2017) observaron en las diarreas neonatales una correlación negativa entre las enterobacterias y prevotellas, siendo éstas más abundantes.

En el estudio de estatus sanitario se analizó la composición de la microbiota de las heces de los lechones de las granjas con diferentes niveles de sanidad: estatus bajo (positivas a disentería y *M. hyopneumoniae* y positivas o negativas inestables a PRRS), estatus medio (negativas a disentería, PRRS estables con vacunación en sabana y positivas a *M. hyopneumoniae*) y estatus elevado (negativas a disentería, PRRS y *M. hyopneumoniae*).

En el muestreo realizado al nacimiento de los lechones se observaron cambios en la proporción de bacteroides, que fue superior en las granjas de estatus bajo, y en el porcentaje de lactobacilos, que fue superior en las granjas de estatus alto. En el muestreo realizado en el destete de los animales existió un menor recuento y proporción de clostridios del clúster I y superior de clostridios del clúster IV en las granjas con estatus bajo con respecto a las granjas con un estatus alto y medio. Además, los animales de granjas con un estatus medio presentaron una proporción inferior de lactobacilos con respecto a los animales de los otros dos grupos y un índice salud intestinal inferior al observado en las granjas con un estatus bajo. Finalmente, en el último muestreo, realizado a la entrada de los animales al cebo, se observaron diferencias en las poblaciones de enterobacterias y clostridios del clúster I y IV. Los animales de las granjas de estatus bajo presentaron una proporción inferior de enterobacterias y superior de clostridios del clúster IV así como un mayor índice de salud intestinal con respecto al resto de explotaciones. Además, los animales de granjas de estatus alto mostraron una mayor población de clostridios del clúster I en comparación con los otros dos estatus sanitarios.

Las diferencias observadas en la población de lactobacilos en el muestreo realizado al nacimiento de los lechones nos indican que las granjas con un alto estatus sanitario tienen cierta ventaja sobre el resto; este grupo bacteriano puede influir en la inmunidad del lechón y en la receptividad a las enfermedades debido a su actividad inmunomoduladora (Schokker *et al.*, 2014). En cuanto a la población de bacteroides, al estar determinada mediante PCRc, no podemos conocer a que familias o géneros pudiera estar asociado el incremento observado. Mientras que las bacterias del género *Bacteroides* tienen un papel metabólico importante en esta fase al usar los oligosacáridos de la leche como fuente de carbono (Guevarra *et al.*, 2018; Frese *et al.*, 2015), las del género *Prevotella* son más relevantes en etapas posteriores al destete (Mach *et al.*, 2015).

Como se ha mencionado anteriormente, se podría decir, en base al porcentaje total de grupos bacterianos analizados mediante PCRc, que la diversidad de la microbiota intestinal es diferente para los tres estatus sanitarios, siendo las granjas con un estatus bajo las que menor diversidad tendrían a lo largo de todo el periodo de seguimiento del estudio. Se ha observado en diversos estudios que un incremento en la diversidad de la microbiota digestiva hace que los cerdos sean más resistentes a algunas infecciones o incluso, una vez infectados por agentes como *Mycoplasma* o PRRS, muestren un cuadro clínico menos severo (Schachtschneider *et al.*, 2011; Niederwerder *et al.*, 2016; Niederwerder, 2017; Ober *et al.*, 2017). Por lo tanto, las granjas con un estatus sanitario elevado y negativas a estos agentes respiratorios tendrían una ventaja frente a la infección por los mismos en comparación con las granjas con un estatus sanitario bajo. Por otra parte, al contrario de lo que se podría esperar, en varios estudios se ha observado que el incremento de la familia Enterobacteriaceae o del filo que la engloba (Proteobacteria) está relacionado con una reducción en el cuadro clínico asociado a la infección por *Brachyspira hamptonii* o PRRS (Niederwerder *et al.*, 2016; Costa *et al.*, 2014), por lo que los animales de las granjas con un estatus alto y medio tendrían cierta ventaja sobre las granjas con un estatus sanitario bajo a la entrada a cebo, que es cuando suelen tener mayor importancia económica estos agentes. Sin embargo y en contraposición, Burrough y colaboradores (2017) observaron que los animales infectados por *B. hyodysenteriae* presentaban en la mucosa intestinal una mayor abundancia de Enterobacteriales. Este mismo estudio demostró mayores poblaciones de lactobacilos, bifidobacterias y

bacteroides en los animales no infectados tras su exposición a espiroquetas intestinales. Además, se ha propuesto que el género *Roseburia* (familia Ruminococcaceae) está incrementado en los cerdos no infectados por *B. hyodysenteriae* con respecto a los infectados (Burrough et al., 2017). De forma similar, la familia Ruminococcaceae está aumentada en los animales infectados por PRRS con mejores índices productivos posteriores a la infección (Ober et al., 2017). Así, los animales de las granjas con un estatus sanitario bajo presentarían, a priori, una microbiota más adecuada para reducir los efectos de las infecciones por parte de estos dos agentes presentes en las explotaciones.

5.4.- Comparación de la composición de la microbiota digestiva en lechones sometidos a diferentes modificaciones de la dieta

El uso metafiláctico y profiláctico de antibióticos en el ganado porcino disminuye la morbilidad y mortalidad durante el periodo de destete así como el riesgo de infección en un sistema productivo muy intensificado, con destetes tempranos en los cuales los lechones aún no tienen un sistema inmunitario totalmente desarrollado para luchar contra los potenciales patógenos (Tajima y Aminov, 2015). Por otro lado, como se ha comentado anteriormente, este empleo origina un efecto directo sobre la composición de la microbiota y genera un incremento de los genes que codifican resistencias a los antibióticos en esta microbiota intestinal.

Por este motivo, en los últimos años se ha incrementado el interés en el desarrollo de alternativas que combinen un efecto positivo sobre la microbiota intestinal con una mejora en la inmunidad, de la salud y del rendimiento productivo de los cerdos. Una buena alternativa para este fin es el empleo de probióticos, bacterias que deben alcanzar su lugar de acción a una concentración adecuada para poder colonizar el intestino y actuar sobre la microbiota, provocando efectos beneficiosos a largo plazo sobre el animal (Soler et al., 2018). Un importante inconveniente que pueden tener algunos probióticos es la facilidad para adquirir y compartir genes de resistencia a través de procesos de transferencia horizontal, como la transformación, la conjugación o la transducción (Verraes et al., 2013), hecho que puede permitirles actuar como reservorio y fuente de resistencias para otros microorganismos. Otras estrategias como el empleo de prebióticos, fitobióticos o modificaciones en la composición de la dieta buscan actuar, de forma similar, sobre la microbiota y la salud intestinal, evitando los riesgos asociados al empleo de bacterias vivas.

En esta Tesis se han llevado a cabo siete estudios en los cuales se ha modificado la composición de la dieta de los lechones, mediante la introducción de nuevos ingredientes y aditivos con capacidad para modular la microbiota y potenciar el sistema inmunitario de una forma más segura que los probióticos, con el objetivo final de reducir los antibióticos empleados en producción porcina.

El estudio de comparación 1 se realizó en dos grupos de lechones durante la fase de lactación, un grupo testigo que recibió una alimentación con la pauta utilizada de forma rutinaria en la explotación (lactación y el suplemento con un pienso de iniciación sin medicación a partir del día 7 de vida), y un grupo experimental que recibió la misma

alimentación pero con la incorporación de un lactorreemplazante sin reconstituir entre los días 3 y 12 de vida.

En la comparación realizada entre las poblaciones bacterianas de ambos grupos de animales no se observaron grandes diferencias; el análisis de los resultados de PCRc demostró una composición similar de la microbiota. La riqueza obtenida a través de los cuatro índices empleados tampoco mostró diferencias significativas a mitad de lactación ni a los 7 días del destete, aunque fue ligeramente superior para los animales que recibieron el lactorreemplazante, hecho que, como se ha comentado anteriormente, supone una ventaja frente a las infecciones oportunistas (Niederwerder *et al.*, 2016; Ober *et al.*, 2017; Le Chatelier *et al.*, 2013; Konopka, 2009). La ordenación o diversidad beta, calculada principalmente por las distancias no ponderadas *Unifrac*, también permitió agrupar las muestras en función del grupo experimental, sobretodo en el tercer muestreo. En cuanto a las diferencias observadas en los géneros con una abundancia superior al 0,1 % se puede mencionar que, a mitad de la lactación, los animales que recibieron el lactorreemplazante presentaron una abundancia superior de *Anaerotruncus* (familia Ruminococcaceae), productor de acético y butírico (Lawson 2015) y de un género de la familia Planctomycetaceae descrito previamente en la microbiota intestinal de los cerdos pero sin relevancia particular conocida (Sun *et al.*, 2015).

A los 7 días del destete los lechones del grupo experimental que recibieron el lactorreemplazante presentaron una mayor abundancia de un género de la familia Lachnospiraceae, productores de AGCC, de *Clostridium sensu stricto*, grupo que incluye especies muy variadas de clostridios, de un género de la familia Peptostreptococcaceae, considerado comensal beneficioso que favorece la homeostasis encontrándose en una proporción superior en la microbiota de animales sanos con respecto a los animales con disbiosis (Leng *et al.*, 2016; Fan *et al.*, 2017), de *Oscillibacter*, productor de ácido valérico (Iino *et al.*, 2007), y de *Ruminococcus* 1, productor de AGCC.

Por el contrario, estos lechones presentaron abundancias inferiores de *Bacillus*, que contiene numerosas especies empleadas como probióticos en porcino (Baker *et al.*, 2013; Balasubramanian *et al.*, 2016) y productoras de diferentes sustancias antimicrobianas como bacterinas o sideróforos (Katz y Demain, 1977; Stein, 2005), y de un género de la familia Ruminococcaceae. A nivel de familia, los géneros productores de AGCC no presentaron diferencias entre los dos grupos de animales, localizándose las diferencias en tres taxones compuestos de bacterias con diversas funciones (*Clostridium sensu stricto*, Peptostreptococcaceae y *Bacillus*).

El estudio de comparación 2 se realizó durante la transición con tres grupos de lechones sometidos a cambios en su alimentación, reduciendo la cantidad de lisina y antibióticos e introduciendo avena en la formulación del pienso. La comparación de los tres grupos experimentales, mediante PCRc, mostró, a los 8 días del destete, una mayor concentración de enterobacterias, en valor absoluto aunque no en su proporción, en los animales que recibieron el tratamiento 2 (sin antibióticos) con respecto a los otros dos grupos de animales. A la salida de los animales hacia el cebadero no se apreciaron diferencias entre los tres grupos de animales del estudio mediante PCRc.

El empleo de técnicas de secuenciación masiva en las muestras de este mismo estudio determinó la existencia de diferencias en la diversidad alfa y beta entre los grupos

de lechones, aunque no alcanzaron la significación estadística. La diversidad alfa en el segundo muestreo fue superior en los animales del grupo de tratamiento 2 mientras que en el último muestreo fue inferior con respecto a los otros dos grupos de animales. Además, la mediana de los índices de diversidad alfa fue superior en el grupo de tratamiento 1 que recibió menor cantidad de lisina en comparación con el grupo testigo. Este resultado es similar al obtenido en otro estudio en el que se aplicó una reducción del 30 % en la concentración de lisina, en lugar del 12 % de reducción de nuestro estudio (Yin *et al.*, 2018).

La mayor riqueza determinada en el segundo muestreo de los animales que no recibieron antibióticos tendría, como se ha comentado anteriormente, un potencial efecto beneficioso al disminuir la receptividad a las infecciones, mientras que la menor diversidad en el tercer muestreo aumentaría esta receptividad (Niederwerder *et al.*, 2016; Ober *et al.*, 2017). En contraposición, otros estudios indican que los animales tratados con antibióticos y con mejores parámetros productivos, como el índice de conversión, muestran una disminución en la diversidad de la microbiota (Soler *et al.*, 2018).

Además, se puede destacar que la diversidad beta calculada por medidas no ponderadas *Unifrac* permitió agrupar las muestras de los lechones que recibieron el tratamiento 2 en el segundo muestreo. Esto nos indica que las bacterias de la microbiota de los animales que recibieron el tratamiento 2 se parecen más entre ellas que con respecto a las bacterias de los otros dos grupos de animales para el mismo muestreo.

En el segundo muestreo se observó que los lechones que recibieron el tratamiento 2 presentaban una abundancia superior de *Desulfovibrio*, grupo que puede contribuir a la inflamación intestinal al estar asociada a la patogénesis de la enfermedad intestinal inflamatoria (Mukhopadhyaya *et al.*, 2012) y del grupo RC9 *gut* de la familia Rikenellaceae, que facilita el metabolismo de proteínas y carbohidratos (Su *et al.*, 2014). Los lechones que recibieron el tratamiento 1 presentaron una menor presencia del grupo RC9 *gut* de la familia Rikenellaceae y una abundancia superior de *Faecalibacterium*, un productor de AGCC. Finalmente, los animales del grupo testigo presentaron una mayor abundancia de *Fusicatenibacter*, que pertenece a la familia Lachnospiraceae y que, como otros géneros de esta familia, son productores de AGCC como el ácido láctico, fórmico, acético o succínico (Takada *et al.*, 2013). Por lo tanto, todos los grupos de lechones mostraron, en este muestreo, un incremento en la abundancia de algún género productor de AGCC.

En el último muestreo, realizado a la salida de los lechones hacia el cebadero, los animales del grupo testigo presentaron mayores abundancias de los géneros *Parabacteroides*, que como los Bacteroidales con capaces de fermentar polisacáridos complejos de la dieta (Sonnenburg *et al.*, 2005; Martens *et al.*, 2008), un género no clasificado de la familia Lachnospiraceae y un género de la familia Ruminococcaceae, aunque otro género de esta misma familia presentó un abundancia menor. Los lechones del grupo de tratamiento 1 presentaron una abundancia superior del género *Bacteroides* y un género de la familia Ruminococcaceae. Por último, los lechones del grupo de tratamiento 2 presentaron una abundancia superior del género *Blautia* y menor de *Bacteroides*. De forma similar a lo ocurrido en el segundo muestreo, todos los grupos de lechones del estudio de comparación 2 presentaron, a la salida hacia el cebadero, una mayor o menor abundancia de algún género potencialmente beneficioso por su capacidad

de fermentar componentes de la dieta no digeribles por lo que no ha sido posible extraer una conclusión clara en cuanto al efecto de las diferentes dietas en la composición microbiana.

El estudio de dieta 1 se realizó en tres grupos de lechones durante la fase de transición; un grupo testigo, con la alimentación y la medicación empleadas habitualmente en la explotación y los grupos experimentales 1 y 2, que recibieron una dieta con menor concentración de lisina así como con menor uso de antibióticos (sin colistina y sin neomicina) en el caso del grupo experimental 2.

Aunque en el segundo muestreo no se observaron diferencias significativas entre los tres grupos, en el muestreo realizado a la salida de los lechones hacia el cebadero los animales del grupo de tratamiento 1 presentaron una población de bacteroides superior a la de los lechones del grupo de tratamiento 2 así como una menor población de bifidobacterias con respecto a los otros dos grupos de lechones, testigo y tratamiento 2. Estos resultados contrastan con los obtenidos por Yin y colaboradores (2018) que describen una elevación del filo que engloba a las bifidobacterias en lechones sometidos a una restricción de lisina en su dieta. En base a nuestros resultados, una disminución de la lisina podría limitar el crecimiento de los lechones y aumentar su receptibilidad a las infecciones, debido a la disminución de este grupo bacteriano, tal y como ha sido propuesto (Everard *et al.*, 2011).

El estudio de dieta 2 se realizó en tres grupos de lechones durante la fase de transición; un grupo testigo, con la alimentación y la medicación habituales, y los grupos experimentales 1 y 2, que recibieron dos suplementos de ácidos grasos diferentes y redujeron la administración de antibióticos empleados en las premezclas, eliminando la colistina y la neomicina.

A los 8 días del destete, los lechones del grupo de tratamiento 1 presentaron poblaciones superiores de clostridios del clúster IV y XIV mientras que los animales del grupo de tratamiento 2 presentaron menos bacteroides y más clostridios del clúster I. En el último muestreo, los lechones que recibieron el tratamiento 1 presentaron poblaciones superiores de bacteroides y clostridios del clúster IV y XIV.

Los resultados obtenidos por el suplemento 1 concuerdan con los de otros investigadores que también administraron AGCM y ácidos orgánicos a lechones destetados y observaron incrementos en las poblaciones de bacteroides y clostridios del clúster IV y XIV (Zentek *et al.*, 2013). Estos investigadores también observaron un incremento de la población de clostridios del clúster I en el estómago. Por tanto, el grupo experimental que recibió el tratamiento 1 presentó una composición de la microbiota potencialmente más beneficiosa para los lechones destetados. Además, estas familias se han asociado a lechones de mayor peso (He *et al.*, 2016). Cabe mencionar que en nuestros estudios no ha sido posible incluir los parámetros productivos recogidos a lo largo del seguimiento, puesto que se trató de información sujeta a confidencialidad por parte de las empresas implicadas.

El estudio de dieta 3 se realizó en tres grupos de lechones durante la fase de transición; el grupo testigo recibió la alimentación y la medicación empleadas habitualmente en la explotación, y los grupos experimentales 1 y 2 recibieron una dieta

que incluía avena como fuente de fibra así como un menor uso de antibióticos (sin colistina y sin neomicina) en el grupo experimental 2.

A los 8 días del destete, los lechones que recibieron el tratamiento 1 presentaron una población inferior de clostridios del clúster IV mientras que los animales que recibieron el tratamiento 2 presentaron una población inferior de enterobacterias que se tradujo en un mayor índice de salud intestinal con respecto a los otros dos grupos de lechones. En el tercer muestreo, las únicas diferencias observadas fueron en la población de bifidobacterias, que fue superior en los lechones que recibieron el tratamiento 2. En contra de lo observado en otros estudios, la introducción de avena como fuente de fibra disminuyó la concentración de clostridios del clúster IV. La avena tiene un porcentaje importante de β -glucanos, en comparación con el trigo, que pueden ser fermentados por la microbiota (Pieper *et al.*, 2008; Rose, 2014) y favorecer a algunas poblaciones como los lactobacilos o los clúster de clostridios productores de AGCC (Ndou *et al.*, 2018). Este último estudio determinó, además, un mayor número de enterobacterias a nivel del lumen cecal en los lechones con una dieta que contenía avena, en contraposición con lo observado a los 8 días del destete para el grupo de animales que recibieron avena y menor cantidad de antibiótico de nuestro estudio. En cuanto a la diversidad microbiana estimada en base al porcentaje de bacterias no cuantificadas por las PCRC empleadas, los dos grupos que recibieron la avena presentaron una menor riqueza, al contrario a lo descrito en otros estudios donde la introducción de ingredientes más fibrosos incrementó la diversidad (Roca-Canudas, 2008).

El estudio de dieta 4 se realizó en tres grupos de lechones durante la fase de transición y cebo que recibieron diferentes suplementos en el pienso: el grupo experimental 1 recibió un suplemento de extractos de aliáceas y orégano (producto A) y ácidos grasos destilados de coco (producto B), el grupo experimental 2 recibió un suplemento de aceites esenciales (producto C) y trigo extrusionado con MG-AGCM (producto D), y el grupo experimental 3 recibió un suplemento con el producto A y el producto D.

A los 8 días del destete no se observaron diferencias aunque se podría mencionar un mayor porcentaje de bacteroides en los lechones que recibieron el tratamiento 3 o una menor concentración de enterobacterias en los animales que recibieron el tratamiento 2. A la salida de los lechones hacia el cebadero, los que recibieron el tratamiento 1 presentaron mayores poblaciones de bacteroides pero también de enterobacterias; los lechones que recibieron el tratamiento 2 mostraron menor cantidad de lactobacilos y los lechones que recibieron el tratamiento 3 tuvieron una proporción inferior de clostridios del clúster XIV y, al presentar unas poblaciones intermedias de lactobacilos y enterobacterias con respecto a los otros dos grupos de animales, presentaron el mayor índice de salud intestinal.

En los primeros días del periodo de cebo, la población de lactobacilos fue superior en los lechones que recibieron el tratamiento 2 con respecto a los animales que recibieron el tratamiento 3, lo que se tradujo en un mayor valor del índice de salud intestinal. Finalmente, en el último muestreo, los cerdos que recibieron el tratamiento 1 presentaron los mayores recuentos de enterobacterias, los que recibieron el tratamiento 2 mostraron los menores recuentos de clostridios del clúster I y los que recibieron el tratamiento 3

presentaron los mayores recuentos de lactobacilos y un índice de salud intestinal más elevado.

La riqueza bacteriana fue inferior en dos de los muestreos en los lechones que recibieron los extractos de plantas y los ácidos grasos de coco. Este hecho ha sido descrito en otros estudios en los cuales los extractos de plantas redujeron la diversidad microbiana, posiblemente debido a su efecto antimicrobiano sobre algunos grupos bacterianos (Roca-Canudas, 2008). Sin embargo, la combinación de estos extractos vegetales con los AGCM incrementó la riqueza en dos de los muestreos mientras que la combinación del trigo extrusionado con MG-AGCM con los aceites esenciales incrementó la riqueza en los dos muestreos restantes. Sin embargo, el empleo de cereales extrusionados suele relacionarse con una disminución de esta riqueza (Moen *et al.*, 2016). En cambio, los aceites esenciales y los ácidos grasos de cadena media se han relacionado con un incremento de la diversidad bacteriana (Soler *et al.*, 2018).

El índice de salud intestinal fue superior en dos de los muestreos en los lechones que recibieron el tratamiento 3 y en un muestreo en los animales que recibieron el tratamiento 2. En el estudio de Castillo-Gómez (2006) se observó un incremento en la relación lactobacilos/enterobacterias en lechones que recibieron extractos de plantas. Los aceites esenciales y los AGCM se han relacionado con un incremento en la población de lactobacilos (Soler *et al.*, 2018; Zeng *et al.*, 2015), como se ha observado en el grupo de tratamiento 2 en el cuarto muestreo y en el grupo de tratamiento 3 en el último muestreo. Los lechones del grupo de tratamiento 1 presentaron mayores recuentos de enterobacterias en dos de los muestreos con respecto a los otros dos grupos de animales que recibieron trigo extrusionado con MG-AGCM, por lo que este efecto podría ser debido a los ácidos grasos de coco ya que los extractos vegetales también fueron administrados al grupo de tratamiento 3.

El estudio de dieta 5 se realizó en tres grupos de lechones durante la fase de transición, un grupo testigo negativo con una alimentación sin antibióticos, un grupo testigo positivo con una alimentación con la prescripción de antimicrobianos utilizados en la explotación (colistina y óxido de zinc), y un grupo de tratamiento que recibió la alimentación sin antimicrobianos y un suplemento de extractos de plantas.

A los 14 días del destete los lechones del grupo testigo positivo presentaron unas poblaciones superiores de bacteroides y clostridios del clúster I, IV y XIV e inferiores de enterobacterias que se tradujo en un valor más elevado del índice de salud intestinal. Además, fue el grupo en el que se identificó un mayor porcentaje global de grupos bacterianos empleando las PCRc, lo que indicaría una menor diversidad bacteriana, hecho que también ha sido observado en otros estudios (Soler *et al.*, 2018). Al final del estudio, los lechones de este grupo testigo positivo presentaron un recuento inferior de enterobacterias y clostridios del clúster I, con un índice de salud intestinal superior a los otros dos grupos de animales. El empleo del óxido de zinc reduce las poblaciones de enterobacterias en la semana 1-2 posdestete, tal y como se ha observado en los resultados obtenidos en nuestro estudio, reduciendo el riesgo de diarreas posdestete, si bien es cierto que esta población aumenta posteriormente (Vahjen *et al.*, 2011; Starke *et al.*, 2014).

En nuestro caso, los lechones que recibieron el óxido de zinc continuaron con un nivel bajo de enterobacterias con respecto a los otros dos grupos de animales durante todo

el periodo de seguimiento. Además, se observó un incremento en las poblaciones de clostridios que también había sido descrito por Starke y colaboradores (2014), probablemente asociado a la resistencia al óxido de zinc de estas bacterias puesto que son negativamente dependiente de la concentración de iones libres de Zn. La concentración de lactobacilos no se suele ver afectada por la presencia del óxido de zinc, como se ha apreciado en nuestro estudio, aunque algunas de las especies sí puedan verse reducidas (Starke *et al.*, 2014). El grupo de lechones que recibió el extracto de plantas apenas presentó diferencias en las poblaciones bacterianas analizadas con respecto al grupo testigo positivo.

Finalmente, se ha optado por realizar una discusión de los resultados en base a los antibióticos recibidos por los animales, reduciendo la repetición de comparaciones con otros estudios. De forma general, no se observaron grandes cambios en la diversidad microbiana, estimada como el porcentaje de bacterias no cuantificado mediante PCRc, en los estudios de dieta en los cuales se eliminaron, en alguno de los grupos, la colistina y la neomicina. Sin embargo, en el último estudio, los animales del grupo testigo positivo que recibieron colistina y óxido de zinc presentaron una menor diversidad en su composición microbiana.

La disminución de la cantidad de antimicrobianos suministrados en las premezclas durante el estudio de dieta 1 se relacionó con una disminución de la población de bacteroides-*Prevotella* al contrario de lo descrito en otros estudios donde fue la administración de antibióticos como la colistina o la clortetraciclina la que produjo esta disminución (Tajima *et al.*, 2010; Looft *et al.*, 2012). Esta disminución de bacteroides puede estar correlacionada con beneficios productivos y el incremento de otros grupos como la familia Ruminococcaceae que mejoran el índice de conversión en los cerdos (Looft *et al.*, 2012). En un estudio de Soler y colaboradores (2018) la administración de amoxicilina y colistina se asoció a una reducción de lactobacilos y enterobacterias y a un subsiguiente incremento en la familia Prevotellaceae, probablemente para ocupar el nicho vacío. El aumento de esta familia podría ser la causa del mayor recuento de bacteroides observado en el grupo testigo positivo del estudio de dieta 5.

La reducción de las bifidobacterias en los grupos que recibieron mayor cantidad de antimicrobianos en el estudio de dieta 3 se ha observado, también, en otros estudios en los cuales se ha aplicado un tratamiento antibiótico *in vitro* en un fermentador (Possemiers *et al.*, 2004). Además y en contra de lo observado en la mayoría de los estudios, los lechones en los cuales se redujo la concentración de antibióticos presentaron una menor cantidad de enterobacterias (Soler *et al.*, 2018).

Finalmente, no se observó ningún efecto de la disminución de los antibióticos sobre la población de lactobacilos. Algunos estudios en los cuales se emplearon avilamicina y/o colistina tampoco observaron cambios en esta población (Castillo-Gómez, 2006; Tajima *et al.*, 2010). En otros, como el estudio de Rettedal y colaboradores (2009) no se observaron cambios a nivel de género con la administración continuada de clortetraciclina aunque a nivel de flean se incrementó el número de *L. amylovorus* y se redujo el de *L. johnsonii*. Además, la administración de una combinación de tilosina con otros antibióticos redujo el número de bacterias presentes pero incrementó la proporción de *Lactobacillus*, lo que tendría un efecto doble, por un lado se incrementaría la energía

disponible para el crecimiento del hospedador y, por otro lado, se producirían los efectos beneficiosos asociados a los lactobacilos (Collier *et al.*, 2003).

5.5.- Concentración de lactoferrina en las heces

Durante la inflamación intestinal los neutrófilos se infiltran en la mucosa y hay lesión de las células epiteliales del intestino, por lo que la lactoferrina se incrementa en las heces de forma proporcional a la lesión epitelial y a la lisis de los neutrófilos en la luz del intestino (Guerrant *et al.*, 1992). La cuantificación de lactoferrina en heces puede, por tanto, detectar la actividad inflamatoria en la mucosa intestinal, incluso antes de que se eleven otros marcadores sistémicos de inflamación como son la velocidad de sedimentación de eritrocitos o la proteína C-reactiva (Zhou *et al.*, 2014).

En el presente trabajo hemos valorado la posibilidad de emplear la concentración de lactoferrina en heces como un posible marcador de salud/inflamación intestinal en el ganado porcino. Como se ha mencionado anteriormente, no existen test comerciales disponibles para la cuantificación de esta molécula en muestras de cerdo. Con respecto a los test empleados en medicina humana, Sinkora y colaboradores (2007) demostraron que un suero hiperinmune de conejo anti-lactoferrina humana marcado con fluorescencia y empleado en una técnica de citometría de flujo para detectar granulocitos daba una señal menor en sangre de cerdos y de vacas. De forma similar, van Berkel (2002) valoró tres anticuerpos monoclonales anti-lactoferrina humana comprobando que solo uno de ellos mostraba reacción cruzada con la lactoferrina porcina. En este sentido, se ha propuesto que el número de epítomos conservados entre las lactoferrinas de diferentes especies es limitado. Así, el empleo de ELISAs comerciales para la detección de lactoferrina de origen humano o incluso de lactoferrina bovina pudieran no tener los mejores resultados aunque compartan un 71 o 73 %, respectivamente, de homología en la secuencia de aminoácidos con la lactoferrina porcina (Lydon *et al.*, 1992). Recientemente se ha descrito que de los 45 aminoácidos del extremo N solo el 48,9 y el 42,2 % de los mismos coinciden con la secuencia de la lactoferrina bovina y humana respectivamente (Luna-Castro *et al.*, 2017). Así pues, el empleo de sueros policlonales frente a la lactoferrina humana requeriría una evaluación individual de cada uno de los lotes producidos, dada su importante variabilidad interlotes, mientras que las reacciones cruzadas en el caso de los anticuerpos monoclonales deberían ser evaluadas para cada uno ellos (Sinkora *et al.*, 2007). Por todo ello, optamos por producir tanto anticuerpos policlonales en conejo como anticuerpos monoclonales específicos frente a lactoferrina porcina, combinando ambos con el fin de obtener una técnica con adecuados valores de sensibilidad y especificidad.

El primer paso en el proceso de validación de la técnica ELISA desarrollada, antes de llevar a cabo la cuantificación de la lactoferrina porcina en las heces de los cerdos, fue la valoración de la especificidad de los anticuerpos mono y policlonales obtenidos frente a la lactoferrina de origen bovino. Este paso es de gran importancia puesto que esta proteína se puede emplear en la alimentación de los cerdos por sus propiedades antimicrobianas o para la mejora de los parámetros productivos (Reznikov *et al.*, 2014; Jahan *et al.*, 2017). Comprobamos que el ELISA desarrollado es capaz de detectar lactoferrina porcina en concentraciones 10.000 veces inferiores a las de la lactoferrina bovina. Este resultado concuerda con lo descrito por Chu y colaboradores (1993) que no

detectaron reacción cruzada entre ambas moléculas aunque solo valoraron una concentración de 1 µg/ml en lugar de los 10.000 µg/g probados en el presente estudio. Este hecho pone de manifiesto que la combinación de un suero policlonal de conejo y de un anticuerpo monoclonal marcado con peroxidasa permite conseguir una alta especificidad en la detección de la lactoferrina de origen porcino.

En un pequeño estudio previo a la cuantificación de lactoferrina en las muestras de heces procedentes de los estudios descritos en esta Tesis se comprobó que la concentración de esta molécula era particularmente elevada en los tres primeros días de vida de los lechones. Así, más del 75 % de los animales presentaron una concentración superior a 2 µg/g en este periodo, reduciéndose progresivamente durante la lactación hasta 1 µg/g en el destete, cuando entre un 25 % y un 40 % de los lechones presentaron una concentración superior a 1 µg/g en sus heces y reduciéndose, de nuevo, durante la transición. Este mismo comportamiento se observó, por tanto, en el estudio longitudinal de la concentración de la lactoferrina en las heces de los lechones del estudio de estatus sanitario.

Estos resultados se confirmaron en el estudio longitudinal que comparó la composición de la microbiota en animales de distintas edades en granjas con la misma genética y alimentación pero con diferentes niveles sanitarios. Se comprobó que existía una reducción significativa de la concentración de lactoferrina determinada entre el primer muestreo (al nacimiento) y el segundo muestreo (al destete), aunque las medianas fueron bastante similares. La mayor concentración de lactoferrina en el primer muestreo se podría explicar por la mayor presencia de lactoferrina en el calostro de las cerdas y la escasa capacidad de digestión proteica que tienen los lechones en los primeros días de vida. La concentración de lactoferrina en el calostro se encuentra alrededor de 1.000 µg/ml hasta el tercer día después del parto disminuyendo por debajo de 300 µg/ml a los 7 días (Elliot *et al.*, 1984).

En lo que respecta a la posible utilidad de esta molécula como biomarcador fecal de inflamación intestinal, en medicina humana se suele emplear como punto de corte valores de 7,25 µg/g (Zhou *et al.*, 2014; Langhorst *et al.*, 2008) aunque algunos autores llevan a cabo una interpretación más restrictiva y reducen este punto de corte hasta los 4 µg/g (Kane *et al.*, 2003). En el caso del ganado porcino no existe un límite establecido en la bibliografía pero, a priori, se podrían establecer valores próximos a los empleados en medicina humana ya que la cuantificación de lactoferrina porcina en muestras de calostro, leche o suero presenta valores ligeramente inferiores a los descritos en medicina humana. En este sentido, cabe mencionar que todos los datos obtenidos en cerdos considerados sanos en nuestro estudio están por debajo de este valor (< 5 µg/g).

Cuando se compararon las concentraciones de lactoferrina determinadas en las heces de los lechones de las granjas con diferentes niveles de sanidad (estudio de estatus sanitario) se comprobó que los animales de las granjas con un estatus bajo (positivas a disentería y *M. hyopneumoniae* y positivas o negativas inestables a PRRS) presentaban concentraciones más elevadas de lactoferrina que las granjas de estatus medio (negativas a disentería, PRRS estables con vacunación en sabana y positivas a *M. hyopneumoniae*) o elevado (negativas a disentería, PRRS y *Mycoplasma hyopneumoniae*) en los tres muestreos realizados, al nacimiento, al destete y a la entrada a cebadero, observándose

las mayores diferencias al nacimiento. Teniendo en cuenta que la principal fuente de lactoferrina en los primeros días de vida es el calostro, podemos concluir que, a priori, las cerdas de estas granjas con bajo nivel sanitario estarán secretando mayores concentraciones de lactoferrina en el calostro que las cerdas de granjas con nivel sanitario más elevado. Sin embargo, cabe destacar que, exceptuando las muestras de animales en los primeros días de vida, las concentraciones de lactoferrina detectadas en las heces de los lechones al destete y a la entrada a cebo se mantuvieron muy por debajo de los valores que anteriormente hemos propuesto como posibles puntos de corte, no existiendo, por tanto, evidencias claras de inflamación intestinal medibles por la concentración de lactoferrina en heces en los animales de los tres grupos experimentales.

También se determinó la concentración de lactoferrina en las heces recogidas en los cuatro estudios llevados a cabo en granjas afectadas de procesos compatibles con disbiosis intestinal. En todos los casos, los cerdos investigados se encontraban en la fase de transición, con edades comprendidas entre las 6 y las 10 semanas de vida.

Tan solo en el estudio de disbiosis 4, cuando se comparó la concentración de lactoferrina en las heces de cerdos afectados y no afectados en una granja de elevado nivel sanitario que presentaba diarreas con elevada morbilidad y en las que se había excluido la participación de los principales agentes etiológicos de diarrea de naturaleza infecciosa o parasitaria, se observó una concentración más elevada de lactoferrina en las heces de los cerdos con diarrea en comparación con los animales sanos. Aunque el valor de concentración alcanzado no nos permite concluir la existencia de inflamación intestinal evidenciable, sí que cabe mencionar que un 25 % de las muestras valoradas en el grupo afectado en este estudio de disbiosis 4 presentaron concentraciones de lactoferrina superiores a 1 µg/ml. En este sentido, creemos que son necesarios más estudios que permitan profundizar en el estudio de los valores fisiológicos de la concentración de lactoferrina en las heces de cerdos sanos de diferentes edades con el fin de poder establecer rangos y puntos de corte que permitan interpretar adecuadamente los resultados obtenidos mediante el empleo de la técnica desarrollada.

En lo que respecta al resto de estudios de disbiosis, cabe mencionar que el cuadro clínico descrito en las explotaciones afectadas se caracterizaba por signos inespecíficos: hinchazón de los párpados (sin llegar a ser edema), presencia de legañas en los ojos, disnea, desmedro en la fase crónica o, incluso, necrosis en el extremo del pabellón auricular (estudio disbiosis 3). Los valores determinados de concentración de lactoferrina fueron similares en los animales afectados y no afectados, con la única excepción del estudio de disbiosis 1 en el que la concentración de lactoferrina en las heces fue más elevada en los animales control en comparación con los animales afectados. Además, en el estudio de disbiosis 2, aunque no existieron diferencias significativas, sí que fue evidente la mayor variabilidad de este parámetro en los animales del grupo afectado.

En su conjunto, los resultados obtenidos no parecen indicar que la determinación de la concentración de lactoferrina en las heces pueda ser una herramienta de utilidad en el diagnóstico de procesos de disbiosis en el ganado porcino. Aunque son necesarios más estudios, únicamente cuando exista una afectación intestinal y signos evidentes de diarrea en los animales afectados, esta determinación podría tener una cierta utilidad. Sin embargo, creemos que esta técnica puede tener una mayor utilidad en el diagnóstico o el

seguimiento de otros procesos entéricos asociados a diarreas exudativas, en los que la inflamación juega un importante papel en la patogenia del cuadro clínico. Este podría ser el caso de la disentería porcina (Prieto-Suárez *et al.*, 2017) o la salmonelosis (Carlson *et al.*, 2012).

6.- Conclusiones

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

1.- La técnica de PCR cuantitativa aplicada sobre un total de ocho grupos bacterianos, todos ellos reconocidos como componentes relevantes de la microbiota intestinal y que incluyen bacterias totales, bacteroides-*Prevotella*, lactobacilos, enterobacterias, bifidobacterias y clostridios de los clúster I, IV y XIV, permite detectar cambios en la composición de la microbiota de los lechones y realizar estimaciones relativas a su diversidad. Aunque la información que proporciona es inferior a la obtenida por técnicas de secuenciación masiva, existe una buena correlación entre ambas herramientas, siendo la PCR una técnica más rápida y económica y, por lo tanto, de gran utilidad en condiciones de campo.

2.- El seguimiento longitudinal de la evolución de la microbiota digestiva en los lechones, desde el nacimiento hasta el periodo de cebo, demostró un incremento de los bacteroides-*Prevotella* a lo largo del periodo de seguimiento. Se observaron los mayores recuentos de lactobacilos durante la lactación, reduciéndose tras el destete. Las enterobacterias también tuvieron un recuento alto en los primeros días, disminuyendo a continuación de forma progresiva pero con un pequeño incremento tras el destete. Por el contrario, los recuentos de bifidobacterias y clostridios del clúster I fueron bajos durante todo el seguimiento, alcanzando valores mínimos en el destete. Finalmente, los clostridios de los clúster IV y XIV presentaron los menores recuentos durante los primeros días de vida de los lechones, alcanzando unas concentraciones más o menos estables tras el destete.

3.- Existen cambios significativos en la composición de la microbiota digestiva de lechones sanos y de lechones con signos clínicos compatibles con disbiosis intestinal. Los lechones afectados presentaron recuentos más elevados de enterobacterias y menor presencia de lactobacilos y clostridios del clúster IV y XIV en comparación con los animales sanos de las mismas explotaciones con similar genética y alimentación.

4.- Los lechones de granjas con un bajo estatus sanitario presentan una menor diversidad en su microbiota. Este hecho, a priori, los hace más receptivos a diferentes infecciones en comparación con los lechones de granjas con un estatus sanitario alto y medio.

5.- A pesar de que el estudio de lechones con un alto estatus sanitario y muy homogéneos, probablemente, redujo las diferencias observadas, se demostró la existencia de variaciones en la composición de la microbiota intestinal tras la exposición a diferentes dietas. Así, la administración de ácidos grasos de cadena media incrementó las poblaciones de bacteroides y clostridios del clúster IV y XIV, y la diversidad en la microbiota digestiva mientras que la introducción de avena redujo la población de clostridios del clúster IV. Por su parte, el empleo de óxido de zinc disminuyó significativamente la concentración de enterobacterias mientras que la reducción de antibióticos en el pienso se asoció a una disminución de la población de bacteroides.

6.- Se ha optimizado una técnica ELISA que permite cuantificar la lactoferrina presente en las heces de los cerdos mediante la combinación de anticuerpos policlonales antilactoferrina para el tapizado y de un anticuerpo monoclonal marcado con peroxidasa para el revelado. Se ha comprobado que la concentración de lactoferrina es particularmente elevada en los primeros días de vida de los lechones, probablemente a consecuencia de la alta concentración de esta molécula en el calostro. Sin embargo, la cuantificación de la lactoferrina en las heces de lechones con signos clínicos compatibles con disbiosis no mostró un aumento significativo de su concentración, descartando, a priori, la presencia de inflamación intestinal asociada a estas disbiosis.

7.- Conclusions

The results obtained in this Thesis have allowed us to draw the following conclusions:

1.- The quantitative PCR focused on a total of eight bacterial groups, all of them recognized as relevant components of gut microbiota, total bacteria, bacteroides-*Prevotella*, lactobacilli, enterobacteria, bifidobacteria and *Clostridium* clusters I, IV and XIV, allowed for the detection of significant changes in the composition of piglet gut microbiota and estimations on its diversity. Although the information offered was less than that obtained by massive sequencing techniques, there was a clear correlation between the tools while qPCR being a faster and more economical technique and, therefore, very useful under field conditions.

2.- Monitoring of gut microbiota in piglets from birth to the fattening period revealed an increase in the bacteroides-*Prevotella* population throughout the follow-up period. Lactobacilli counts were higher during lactation and decrease after weaning. Enterobacteria also had high counts during the first days of life and decreased progressively, although a slight increase was observed at weaning. Moreover, bifidobacteria and *Clostridium* cluster I counts were low throughout the follow-up period, reaching minimum values at weaning. Finally, the *Clostridium* clusters IV and XIV showed the lowest counts during the first days of live, reaching steady concentrations after weaning.

3.- Significant changes in the composition of gut microbiota in healthy and diseased piglets with clinical signs compatible with intestinal dysbiosis were observed. Diseased piglets had higher counts of enterobacteria and lower presence of lactobacilli and *Clostridium* clusters IV and XIV as compared to healthy animals from the same farms with similar genetics and feed.

4.- Piglets reared in low sanitary standard farms had a lower diversity in their gut microbiota. According to this, these piglets had a theoretically higher susceptibility to different infectious diseases.

5.- Although high health and homogeneity probably reduced the differences observed, we detected changes in the composition of gut microbiota after exposure to different diets. Thus, the administration of medium chain fatty acids increased the bacteroides and *Clostridium* clusters IV and XIV populations as well as the diversity in gut microbiota, while the supplementation with oatmeal reduced *Clostridium* cluster IV population. Moreover, the use of zinc oxide significantly decreased the concentration of enterobacteria while the reduction of antibiotics in the feed was associated with a decrease in the bacteroides population.

6.- A sandwich ELISA based on a polyclonal antilactoferrin hyperimmune sera for coating and a peroxidase-labelled antilactoferrin monoclonal antibody for development has been optimized for the quantification of lactoferrin in pig faeces. The concentration of this molecule was particularly high in the first few days of life of the

piglets, probably as a consequence of the high lactoferrin concentrations in colostrum. Moreover, quantification of fecal lactoferrin in piglets with clinical signs compatible with dysbiosis provided similar values to that of healthy animals of the same age which suggests that dysbiosis is not associated with intestinal inflammation

8.- Bibliografía

- ABRAHAM, B.P. y KANE, S., 2012. Fecal Markers: Calprotectin and Lactoferrin. *Gastroenterology Clinics of North America*, vol. 41, no. 2, pp. 483-495. ISSN 08898553. DOI 10.1016/j.gtc.2012.01.007.
- ACTOR, J.K., HWANG, S.-A. y KRUZEL, M.L., 2009. Lactoferrin as a natural immune modulator. *Current pharmaceutical design*, vol. 15, no. 17, pp. 1956-1973. ISSN 1873-4286.
- ALTSCHUL, S.F., GISH, W., MILLER, W., MYERS, E.W. y LIPMAN, D.J., 1990. Basic local alignment search tool. *Journal of Molecular Biology*, vol. 215, no. 3, pp. 403-410. ISSN 00222836. DOI 10.1016/S0022-2836(05)80360-2.
- ANDREWS, S. (Babraham I., 2016. *FastQC: A Quality Control tool for High Throughput Sequence Data*. 2016. S.l.: Babraham Bioinformatics.
- ARUMUGAM, M., RAES, J., PELLETIER, E., LE PASLIER, D., YAMADA, T., MENDE, D.R., FERNANDES, G.R., TAP, J., BRULS, T., BATTO, J.M., BERTALAN, M., BORRUEL, N., CASELLAS, F., FERNANDEZ, L., GAUTIER, L., HANSEN, T., HATTORI, M., HAYASHI, T., KLEEREBEZEM, M., KUROKAWA, K., LECLERC, M., LEVENEZ, F., MANICHANH, C., NIELSEN, H.B., NIELSEN, T., PONS, N., POULAIN, J., QIN, J., SICHERITZ-PONTEN, T., TIMS, S., TORRENTS, D., UGARTE, E., ZOETENDAL, E.G., WANG, J., GUARNER, F., PEDERSEN, O., DE VOS, W.M., BRUNAK, S., DORÉ, J., WEISSENBACH, J., EHRLICH, S.D. y BORK, P., 2011. Enterotypes of the human gut microbiome. *Nature*, vol. 473, no. 7346, pp. 174-180. ISSN 14764687. DOI 10.1038/nature09944.
- AZAD, M.B. y KOZYRSKYJ, A.L., 2012. Perinatal programming of asthma: The role of gut microbiota. *Clinical and Developmental Immunology*, vol. 2012, no. 932072, pp. 1-9. ISSN 17402522. DOI 10.1155/2012/932072.
- BAKER, A.A., DAVIS, E., SPENCER, J.D., MOSER, R. y REHBERGER, T., 2013. The effect of a *Bacillus*-based direct-fed microbial supplemented to sows on the gastrointestinal microbiota of their neonatal piglets. *Journal of Animal Science*, vol. 91, no. 7, pp. 3390-3399. ISSN 00218812. DOI 10.2527/jas.2012-5821.
- BALASUBRAMANIAN, B., LI, T. y KIM, I.H., 2016. Effects of supplementing growing-finishing pig diets with *Bacillus* spp. probiotic on growth performance and meat-carcass grade quality traits. *Revista Brasileira de Zootecnia*, vol. 45, no. 3, pp. 93-100. ISSN 18069290. DOI 10.1590/S1806-92902016000300002.
- BARKO, P.C., MCMICHAEL, M.A., SWANSON, K.S. y WILLIAMS, D.A., 2018. The gastrointestinal microbiome: A review. *Journal of Veterinary Internal Medicine*, vol. 32, no. 1, pp. 9-25. ISSN 19391676. DOI 10.1111/jvim.14875.
- BARTOSCH, S., FITE, A., MACFARLANE, G.T. y MCMURDO, M.E.T., 2004. Characterization of bacterial communities in feces from healthy elderly volunteers and hospitalized elderly patients by using real-time PCR and effects of antibiotic treatment on the fecal microbiota. *Applied and environmental microbiology*, vol. 70, no. 6, pp. 3575-3581. ISSN 0099-2240. DOI 10.1128/AEM.70.6.3575-3581.2004.
- BEARFIELD, C., DAVENPORT, E.S., SIVAPATHASUNDARAM, V. y ALLAKER, R.P., 2002. Possible association between amniotic fluid micro-organism infection and microflora in the mouth. *BJOG: An International Journal of Obstetrics & Gynaecology*, vol. 109, no. 5, pp. 527-533. ISSN 1471-0528. DOI 10.1111/j.1471-0528.2002.01349.x.

- BENSON, D.A., KARSCH-MIZRACHI, I., LIPMAN, D.J., OSTELL, J. y WHEELER, D.L., 2005. GenBank. *Nucleic Acids Research*, vol. 33, no. DATABASE ISS., pp. D34-8. ISSN 03051048. DOI 10.1093/nar/gki063.
- BERNHARD, A.E. y FIELD, K.G., 2000. Identification of nonpoint sources of fecal pollution in coastal waters by using host-specific 16S ribosomal DNA genetic markers from fecal anaerobes. *Applied and Environmental Microbiology*, vol. 66, no. 4, pp. 1587-1594. ISSN 00992240. DOI 10.1128/AEM.66.4.1587-1594.2000.
- BHULLAR, K., WAGLECHNER, N., PAWLOWSKI, A., KOTEVA, K., BANKS, E.D., JOHNSTON, M.D., BARTON, H.A. y WRIGHT, G.D., 2012. Antibiotic resistance is prevalent in an isolated cave microbiome. *PLoS ONE*, vol. 7, no. 4, pp. e34953. ISSN 19326203. DOI 10.1371/journal.pone.0034953.
- BILEN, M., DUFOUR, J.-C., LAGIER, J.-C., CADORET, F., DAOUD, Z., DUBOURG, G. y RAOULT, D., 2018. The contribution of culturomics to the repertoire of isolated human bacterial and archaeal species. *Microbiome*, vol. 6, no. 94, pp. 1-11. ISSN 2049-2618. DOI 10.1186/s40168-018-0485-5.
- BOERS, S.A., HAYS, J.P. y JANSEN, R., 2017. Novel micelle PCR-based method for accurate, sensitive and quantitative microbiota profiling. *Scientific Reports*, vol. 7, no. 1, pp. 45536. ISSN 20452322. DOI 10.1038/srep45536.
- BOETS, E., DEROOVER, L., HOUBEN, E., VERMEULEN, K., GOMAND, S. V., DELCOUR, J.A. y VERBEKE, K., 2015. Quantification of in vivo colonic short chain fatty acid production from inulin. *Nutrients*, vol. 7, no. 11, pp. 8916-8929. ISSN 20726643. DOI 10.3390/nu7115440.
- BUDUNELI, N., BAYLAS, H., BUDUNELI, E., TÜRKÖ?LU, O., KÖSE, T. y DAHLEN, G., 2005. Periodontal infections and pre-term low birth weight: a case-control study. *Journal of clinical periodontology*, vol. 32, no. 2, pp. 174-181. ISSN 1600-051X. DOI 10.1111/j.1600-051X.2005.00670.x.
- BURROUGH, E.R., ARRUDA, B.L. y PLUMMER, P.J., 2017. Comparison of the luminal and mucosa-associated microbiota in the colon of pigs with and without swine dysentery. *Frontiers in Veterinary Science*, vol. 4, no. August, pp. 139. ISSN 2297-1769. DOI 10.3389/fvets.2017.00139.
- CANI, P.D. y DELZENNE, N.M., 2011. The gut microbiome as therapeutic target. *Pharmacology and Therapeutics*, vol. 130, no. 2, pp. 202-212. ISSN 01637258. DOI 10.1016/j.pharmthera.2011.01.012.
- CANIBE, N., HØJBERG, O., HØJSGAARD, S. y JENSEN, B.B., 2005. Feed physical form and formic acid addition to the feed affect the gastrointestinal ecology and growth performance of growing pigs. *Journal of Animal Science*, vol. 83, no. 6, pp. 1287-1302. ISSN 00218812. DOI 10.2527/2005.8361287x.
- CAPORASO, J.G., BITTINGER, K., BUSHMAN, F.D., DESANTIS, T.Z., ANDERSEN, G.L. y KNIGHT, R., 2010. PyNAST: A flexible tool for aligning sequences to a template alignment. *Bioinformatics*, vol. 26, no. 2, pp. 266-267. ISSN 14602059. DOI 10.1093/bioinformatics/btp636.

- CAPORASO, J.G., KUCZYNSKI, J., STOMBAUGH, J., BITTINGER, K., BUSHMAN, F.D., COSTELLO, E.K., FIERER, N., PEÑA, A.G., GOODRICH, J.K., GORDON, J.I., HUTTLEY, G.A., KELLEY, S.T., KNIGHTS, D., KOENIG, J.E., LEY, R.E., LOZUPONE, C.A., MCDONALD, D., MUEGGE, B.D., PIRRUNG, M., REEDER, J., SEVINSKY, J.R., TURNBAUGH, P.J., WALTERS, W.A., WIDMANN, J., YATSUNENKO, T., ZANEVELD, J. y KNIGHT, R., 2010. QIIME allows analysis of high-throughput community sequencing data. *Nature methods*, vol. 7, no. 5, pp. 335-336. ISSN 1548-7105. DOI 10.1038/nmeth.f.303.
- CARLSON, S.A., BARNHILL, A.E. y GRIFFITH, R.W., 2012. Salmonellosis. En: J.J. ZIMMERMAN, L.A. KARRIKER, A. RAMIREZ, K.J. SCHWARTZ y G.W. STEVENSON (eds.), *Diseases of swine*. 10th. S.I.: Wiley-Blackwell, pp. 821-833. ISBN 978-0-8138-2267-9.
- CASTILLO-GÓMEZ, M.S., 2006. *Development of gut microbiota in the pig: modulation of bacterial communities by different feeding strategies*. S.I.: Universitat Autònoma de Barcelona.
- CASTILLO, M., MARTÍN-ORÚE, S.M., ROCA, M., MANZANILLA, E.G., BADIOLA, I., PEREZ, J.F. y GASA, J., 2006. The response of gastrointestinal microbiota to avilamycin, butyrate, and plant extracts in early-weaned pigs. *Journal of Animal Science*, vol. 84, no. 10, pp. 2725-2734. ISSN 00218812. DOI 10.2527/jas.2004-556.
- CASTILLO, M., SKENE, G., ROCA, M., ANGUITA, M., BADIOLA, I., DUNCAN, S.H., FLINT, H.J. y MARTÍN-ORÚE, S.M., 2007. Application of 16S rRNA gene-targeted fluorescence in situ hybridization and restriction fragment length polymorphism to study porcine microbiota along the gastrointestinal tract in response to different sources of dietary fibre. *FEMS Microbiology Ecology*, vol. 59, no. 1, pp. 138-146. ISSN 01686496. DOI 10.1111/j.1574-6941.2006.00204.x.
- CHEN, C.C., CHANG, C.J., LIN, T.Y., LAI, M.W., CHAO, H.C. y KONG, M.S., 2011. Usefulness of fecal lactoferrin in predicting and monitoring the clinical severity of infectious diarrhea. *World Journal of Gastroenterology*, vol. 17, no. 37, pp. 4218-4224. ISSN 10079327. DOI 10.3748/wjg.v17.i37.4218.
- CHEN, L., XU, Y., CHEN, X., FANG, C., ZHAO, L. y CHEN, F., 2017. The maturing development of gut microbiota in commercial piglets during the weaning transition. *Frontiers in Microbiology*, vol. 8, no. SEP, pp. 1688. ISSN 1664302X. DOI 10.3389/fmicb.2017.01688.
- CHEN, X., XU, J., REN, E., SU, Y. y ZHU, W., 2018. Co-occurrence of early gut colonization in neonatal piglets with microbiota in the maternal and surrounding delivery environments. *Anaerobe*, vol. 49, pp. 30-40. ISSN 10958274. DOI 10.1016/j.anaerobe.2017.12.002.
- CHU, R.M., WANG, S.R., WENG, C.N. y PURSEL, V.G., 1993. Isolation and characterization of porcine milk lactoferrin. *American Journal of Veterinary Research*, vol. 54, no. 7, pp. 1154-1159.
- CLARRIDGE, J.E., 2004. Impact of 16S rRNA gene sequence analysis for identification of bacteria on clinical microbiology and infectious diseases. *Clinical Microbiology Reviews*, vol. 17, no. 4, pp. 840-862. ISSN 08938512. DOI 10.1128/CMR.17.4.840-862.2004.
- COLLIER, C.T., SMIRICKY-TJARDES, M.R., ALBIN, D.M., WUBBEN, J.E., GABERT, V.M., DEPLANCKE, B., BANE, D., ANDERSON, D.B. y GASKINS, H.R., 2003. Molecular ecological analysis of porcine ileal microbiota responses to antimicrobial growth promoters. *Journal of Animal Science*, vol. 81, no. 12, pp. 3035-3045. ISSN 00218812. DOI 10.2527/2003.81123035x.

- COLLINDER, E., BJÖRNHAG, G., CARDONA, M., NORIN, E., REHBINDER, C. y MIDTVEDT, T., 2003. Gastrointestinal host-microbial interactions in mammals and fish: comparative studies in man, mice, rats, pigs, horses, cows, elk, Reindeer, salmon and cod. *Microbial Ecology in Health and Disease*, vol. 15, no. 2-3, pp. 66-78. ISSN 0891060X. DOI 10.1080/08910600310014980.
- CONESA, C., SÁNCHEZ, L., ROTA, C., PÉREZ, M.D., CALVO, M., FARNAUD, S. y EVANS, R.W., 2008. Isolation of lactoferrin from milk of different species: Calorimetric and antimicrobial studies. *Comparative Biochemistry and Physiology - B Biochemistry and Molecular Biology*, vol. 150, no. 1, pp. 131-139. ISSN 10964959. DOI 10.1016/j.cbpb.2008.02.005.
- COSTA, J., 2004. Reacción en cadena de la polimerasa (PCR) a tiempo real. *Enferm Infecc Microbiol Clin*, vol. 22, no. 5, pp. 299-305. ISSN 0213005X. DOI 10.1016/S0213-005X(04)73092-X.
- COSTA, M.O., CHABAN, B., HARDING, J.C.S. y HILL, J.E., 2014. Characterization of the fecal microbiota of pigs before and after inoculation with «*Brachyspira hamptonii*». *PLoS ONE*, vol. 9, no. 8, pp. e106399. ISSN 19326203. DOI 10.1371/journal.pone.0106399.
- COSTILLAS-ALONSO, S., MIRANDA-HEVIA, R., CARVAJAL-URUEÑA, A. y RUBIO-NISTAL, P., 2015. Colonización del tracto gastrointestinal de lechones por *Megasphaera elsdenii*: evaluación temporal. *VI Workshop Probióticos, Prebióticos y Salud: Evidencia científica*. Oviedo: GRUPO AULA MEDICA, S.L., pp. 138-139. DOI DOI:10.3305/nh.2015.31.sup1.8717.
- CRESPO-PIAZUELO, D., ESTELLÉ, J., REVILLA, M., CRIADO-MESAS, L., RAMAYO-CALDAS, Y., ÓVILO, C., FERNÁNDEZ, A.I., BALLESTER, M. y FOLCH, J.M., 2017. Caracterización del microbioma intestinal a lo largo del tracto digestivo en cerdos ibéricos. *AIDA, XVII Jornadas sobre Producción Animal*, pp. 567-569.
- CRESPO-PIAZUELO, D., ESTELLÉ, J., REVILLA, M., CRIADO-MESAS, L., RAMAYO-CALDAS, Y., ÓVILO, C., FERNÁNDEZ, A.I., BALLESTER, M. y FOLCH, J.M., 2018. Characterization of bacterial microbiota compositions along the intestinal tract in pigs and their interactions and functions. *Scientific Reports*, vol. 8, no. 1, pp. 12727. ISSN 2045-2322. DOI 10.1038/s41598-018-30932-6.
- D' COSTA, V.M., KING, C.E., KALAN, L., MORAR, M., SUNG, W.W.L., SCHWARZ, C., FROESE, D., ZAZULA, G., CALMELS, F., DEBRUYNE, R., GOLDING, G.B., POINAR, H.N. y WRIGHT, G.D., 2011. Antibiotic resistance is ancient. *Nature*, vol. 477, no. 7365, pp. 457-461. ISSN 0028-0836.
- DANTZER, R., COHEN, S., RUSSO, S.J. y DINAN, T.G., 2018. Resilience and immunity. *Brain, Behavior, and Immunity*. 10 agosto 2018. ISSN 10902139.
- DE FILIPPO, C., CAVALIERI, D., DI PAOLA, M., RAMAZZOTTI, M., POULLET, J.B., MASSART, S., COLLINI, S., PIERACCINI, G. y LIONETTI, P., 2010. Impact of diet in shaping gut microbiota revealed by a comparative study in children from Europe and rural Africa. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, vol. 107, no. 33, pp. 14691-14696. ISSN 0027-8424. DOI 10.1073/pnas.1005963107.
- DELROISSE, J.M., BOULVIN, A.L., PARMENTIER, I., DAUPHIN, R.D., VANDENBOL, M. y PORTETELLE, D., 2008. Quantification of *Bifidobacterium* spp. and *Lactobacillus* spp. in rat fecal samples by real-time PCR. *Microbiological Research*, vol. 163, no. 6, pp. 663-670. ISSN 09445013. DOI 10.1016/j.micres.2006.09.004.

- DIAO, H., YAN, H.L., XIAO, Y., YU, B., ZHENG, P., HE, J., YU, J., MAO, X.B. y CHEN, D.W., 2018. Modulation of intestine development by fecal microbiota transplantation in suckling pigs. *RSC Advances*, vol. 8, no. 16, pp. 8709-8720. ISSN 20462069. DOI 10.1039/c7ra11234c.
- DONOVAN, S.M., 2016. The Role of Lactoferrin in Gastrointestinal and Immune Development and Function: A Preclinical Perspective. *The Journal of Pediatrics*, vol. 173, no. Suppl, pp. S16-S28. ISSN 10976833. DOI 10.1016/j.jpeds.2016.02.072.
- DOU, S., GADONNA-WIDEHEM, P., ROME, V., HAMOUDI, D., RHAZI, L., LAKHAL, L., LARCHER, T., BAHJ-JABER, N., PINON-QUINTANA, A., GUYONVARCH, A., HUËROU-LURON, I.L.E. y ABDENNEBI-NAJAR, L., 2017. Characterisation of early-life fecal microbiota in susceptible and healthy pigs to post-weaning diarrhoea. *PLoS one*, vol. 12, no. 1, pp. e0169851. ISSN 19326203. DOI 10.1371/journal.pone.0169851.
- DOWARAH, R., VERMA, A.K. y AGARWAL, N., 2017. *The use of Lactobacillus as an alternative of antibiotic growth promoters in pigs: A review*. 1 marzo 2017. S.I.: Elsevier. ISBN 2405-6545.
- DUNCAN, S.H., AMINOV, R.I., SCOTT, K.P., LOUIS, P., STANTON, T.B. y FLINT, H.J., 2006. Proposal of *Roseburia faecis* sp. nov., *Roseburia hominis* sp. nov. and *Roseburia inulinivorans* sp. nov., based on isolates from human faeces. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, vol. 56, no. 10, pp. 2437-2441. ISSN 14665026. DOI 10.1099/ij.s.0.64098-0.
- DUTTA, S., CHATTERJEE, A., DUTTA, P., RAJENDRAN, K., ROY, S., PRAMANIK, K.C. y BHATTACHARYA, S.K., 2001. Sensitivity and performance characteristics of a direct PCR with stool samples in comparison to conventional techniques for diagnosis of *Shigella* and enteroinvasive *Escherichia coli* infection in children with acute diarrhoea in Calcutta, Ind. *Journal of Medical Microbiology*, vol. 50, no. 8, pp. 667-674. ISSN 00222615. DOI 10.1099/0022-1317-50-8-667.
- EBERL, G., 2010. A new vision of immunity: homeostasis of the superorganism. *Mucosal Immunol*, vol. 3, no. 5, pp. 450-460. ISSN 1933-0219.
- EDGAR, R.C., 2010. Search and clustering orders of magnitude faster than BLAST. *Bioinformatics*, vol. 26, no. 19, pp. 2460-2461. ISSN 13674803. DOI 10.1093/bioinformatics/btq461.
- ELLIOT, J.I., SENFR, B., ERHARDT, G. y FRASER, D., 1984. Isolation of Lactoferrin and Its Concentration in Sows ' Colostrum and Milk during a 21-Day Lactation. *Journal of animal science*, vol. 59, no. 4, pp. 1080-1084. DOI 10.1124/dmd.106.009340.ities.
- ENDRES, K. y SCHÄFER, K.H., 2018. Influence of commensal microbiota on the enteric nervous system and its role in neurodegenerative diseases. *Journal of Innate Immunity*, vol. 10, no. 3, pp. 172-180. ISSN 16628128. DOI 10.1159/000488629.
- EUROPEAN COMMISSION, 2003. *Regulation (EC) No 1831/2003 of the European Parliament and of the Council of 22 September 2003 on additives for use in animal nutrition*. 2003.
- EVERARD, A., LAZAREVIC, V., DERRIEN, M., GIRARD, M., MUCCIOLI, G.M., NEYRINCK, A.M., POSSEMIERS, S., VAN HOLLE, A., FRANÇOIS, P., DE VOS, W.M., DELZENNE, N.M., SCHRENZEL, J. y CANI, P.D., 2011. Responses of gut microbiota and glucose and lipid metabolism to prebiotics in genetic obese and diet-induced leptin-resistant mice. *Diabetes*, vol. 60, no. 11, pp. 2775-2786. ISSN 00121797. DOI 10.2337/db11-0227.

- FAN, P., LIU, P., SONG, P., CHEN, X. y MA, X., 2017. Moderate dietary protein restriction alters the composition of gut microbiota and improves ileal barrier function in adult pig model. *Scientific Reports*, vol. 7, no. 1, pp. 43412. ISSN 20452322. DOI 10.1038/srep43412.
- FOUHSE, J.M., ZIJLSTRA, R.T. y WILLING, B.P., 2016. The role of gut microbiota in the health and disease of pigs. *Animal Frontiers*, vol. 6, no. 3, pp. 30. ISSN 2160-6064. DOI 10.2527/af.2016-0031.
- FRAHER, M.H., O'TOOLE, P.W. y QUIGLEY, E.M.M., 2012. Techniques used to characterize the gut microbiota: A guide for the clinician. *Nature Reviews Gastroenterology and Hepatology*, vol. 9, no. 6, pp. 312-322. ISSN 17595045. DOI 10.1038/nrgastro.2012.44.
- FRANKS, A.H., HARMSSEN, H.J.M., RAANGS, G.C., JANSEN, G.J., SCHUT, F. y WELLING, G.W., 1998. Variations of bacterial populations in human feces measured by fluorescent in situ hybridization with group-specific 16S rRNA-targeted oligonucleotide probes. *Applied and Environmental Microbiology*, vol. 64, no. 9, pp. 3336-3345. ISSN 00992240. DOI 10.12938/BIFIDUS1996.19.79.
- FRESE, S.A., PARKER, K., CALVERT, C.C. y MILLS, D.A., 2015. Diet shapes the gut microbiome of pigs during nursing and weaning. *Microbiome*, vol. 3, no. 28, pp. 1-10. ISSN 2049-2618. DOI 10.1186/s40168-015-0091-8.
- FU, C.J., CARTER, J.N., LI, Y., PORTER, J.H. y KERLEY, M.S., 2006. Comparison of agar plate and real-time PCR on enumeration of *Lactobacillus*, *Clostridium perfringens* and total anaerobic bacteria in dog faeces. *Letters in Applied Microbiology*, vol. 42, no. 5, pp. 490-494. ISSN 02668254. DOI 10.1111/j.1472-765X.2006.01893.x.
- FURET, J.-P., FIRMESSE, O., GOURMELON, M., BRIDONNEAU, C., TAP, J., MONDOT, S., DORÉ, J. y CORTHIÉ, G., 2009. Comparative assessment of human and farm animal faecal microbiota using real-time quantitative PCR. *FEMS Microbiology Ecology*, vol. 68, no. 3, pp. 351-362. ISSN 01686496. DOI 10.1111/j.1574-6941.2009.00671.x.
- GALÁN-ROS, J., 2015. *Caracterización de la microbiota intestinal mediante "NGS" en patología neoplásica de colon*. S.l.: Universidad de Murcia.
- GARCÍA-FELIZ, C., COLLAZOS, J.A., CARVAJAL, A., HERRERA, S., ECHEITA, M.A. y RUBIO, P., 2008. Antimicrobial Resistance of Salmonella enterica isolates from apparently healthy and clinically ill finishing pigs in Spain. *Zoonoses and public health*, vol. 55, no. 4, pp. 195-205.
- GARCÍA-MONTOYA, I.A., CENDÓN, T.S., ARÉVALO-GALLEGOS, S. y RASCÓN-CRUZ, Q., 2012. Lactoferrin a multiple bioactive protein: An overview. *Biochimica et Biophysica Acta - General Subjects*, vol. 1820, no. 3, pp. 226-236. ISSN 03044165. DOI 10.1016/j.bbagen.2011.06.018.
- GENSOLLEN, T., IYER, S.S., KASPER, D.L. y BLUMBERG, R.S., 2016. How colonization by microbiota in early life shapes the immune system. *Science*, vol. 352, no. 6285, pp. 539-544. ISSN 10959203. DOI 10.1126/science.aad9378.
- GILBERT, S.F., SAPP, J. y TAUBER, A.I., 2012. A symbiotic view of life: We have never been individuals. *The Quarterly review of biology*, vol. 87, no. 4, pp. 325-341.
- GISBERT, J.P., GONZÁLEZ-LAMA, Y. y MATÉ, J., 2007. *Papel de los marcadores biológicos en la enfermedad inflamatoria intestinal*. 1 marzo 2007. S.l.: Elsevier.
- GÓMEZ-DOÑATE, M., BALLESTÉ, E., MUNIESA, M. y BLANCH, A.R., 2012. New molecular quantitative PCR assay for detection of host-specific Bifidobacteriaceae suitable for microbial source tracking. *Applied and Environmental Microbiology*, vol. 78, no. 16, pp. 5788-5795. ISSN 00992240. DOI 10.1128/AEM.00895-12.

- GOSALBES, M.J., LLOP, S., VALLÈS, Y., MOYA, A., BALLESTER, F. y FRANCINO, M.P., 2013. Meconium microbiota types dominated by lactic acid or enteric bacteria are differentially associated with maternal eczema and respiratory problems in infants. *Clinical and Experimental Allergy*, vol. 43, no. 2, pp. 198-211. ISSN 09547894. DOI 10.1111/cea.12063.
- GRESSE, R., CHAUCHEYRAS-DURAND, F., FLEURY, M.A., VAN DE WIELE, T., FORANO, E. y BLANQUET-DIOT, S., 2017. Gut microbiota dysbiosis in postweaning piglets: Understanding the keys to health. *Trends in Microbiology*, vol. 25, no. 10, pp. 851-873. ISSN 18784380. DOI 10.1016/j.tim.2017.05.004.
- GUEIMONDE, M., TÖLKKÖ, S., KORPIMÄKI, T. y SALMINEN, S., 2004. New real-time quantitative PCR procedure for quantification of bifidobacteria in human fecal samples. *Applied and Environmental Microbiology*, vol. 70, no. 7, pp. 4165-4169. ISSN 0099-2240. DOI 10.1128/AEM.70.7.4165.
- GUERRA, N.P., BERNÁRDEZ, P.F., MÉNDEZ, J., CACHALDORA, P. y PASTRANA CASTRO, L., 2007. Production of four potentially probiotic lactic acid bacteria and their evaluation as feed additives for weaned piglets. *Animal Feed Science and Technology*, vol. 134, no. 1-2, pp. 89-107. ISSN 0377-8401. DOI 10.1016/j.anifeedsci.2006.05.010.
- GUERRANT, R.L., ARAUJO, V., SOARES, E., KOTLOFF, K. I, LIMA, A.A.M., COOPER, W.H. y LEE, A.G., 1992. Measurement of fecal lactoferrin as a marker of fecal leukocytes. *Journal of Clinical Microbiology*, vol. 30, no. 5, pp. 1238-1242. ISSN 00951137.
- GUEVARRA, R.B., HONG, S.H., CHO, J.H., KIM, B.R., SHIN, J., LEE, J.H., KANG, B.N., KIM, Y.H., WATTANAPHANSAK, S., ISAACSON, R.E., SONG, M. y KIM, H.B., 2018. The dynamics of the piglet gut microbiome during the weaning transition in association with health and nutrition. *Journal of Animal Science and Biotechnology*, vol. 9, no. 1, pp. 54. ISSN 20491891. DOI 10.1186/s40104-018-0269-6.
- HAN, K.-S., BALAN, P., MOLIST GASA, F. y BOLAND, M.J., 2011. Green kiwifruit modulates the colonic microbiota in growing pigs. *Letters in Applied Microbiology*, vol. 52, no. 4, pp. 379-385. ISSN 02668254. DOI 10.1111/j.1472-765X.2011.03012.x.
- HAWRELAK, J.A. y MYERS, S.P., 2004. The causes of intestinal dysbiosis: A review. *Alternative Medicine Review*, vol. 9, no. 2, pp. 180-197. ISSN 10895159. DOI 10.1016/0965-2299(93)90012-3.
- HE, M., FANG, S., HUANG, X., ZHAO, Y., KE, S., YANG, H., LI, Z., GAO, J., CHEN, C. y HUANG, L., 2016. Evaluating the contribution of gut microbiota to the variation of porcine fatness with the cecum and fecal samples. *Frontiers in Microbiology*, vol. 7, no. DEC, pp. 2108. ISSN 1664302X. DOI 10.3389/fmicb.2016.02108.
- HEILIG, H.G.H.J., ZOETENDAL, E.G., VAUGHAN, E.E., MARTEAU, P., AKKERMANS, A.D.L. y DE VOS, W.M., 2002. Molecular diversity of *Lactobacillus* spp. and other lactic acid bacteria in the human intestine as determined by specific amplification of 16S ribosomal DNA. *Applied and environmental microbiology*, vol. 68, no. 1, pp. 114-123. ISSN 0099-2240. DOI 10.1128/AEM.68.1.114.
- HEINRITZ, S.N., WEISS, E., EKLUND, M., AUMILLER, T., LOUIS, S., RINGS, A., MESSNER, S., CAMARINHA-SILVA, A., SEIFERT, J., BISCHOFF, S.C. y MOSENTHIN, R., 2016. Intestinal microbiota and microbial metabolites are changed in a pig model fed a high-fat/low-fiber or a low-fat/high-fiber diet. *PLoS ONE*, vol. 11, no. 4, pp. 1-21. ISSN 19326203. DOI 10.1371/journal.pone.0154329.
- HERMANN-BANK, M.L., 2014. *Characterization of the bacterial gut microbiota in new neonatal porcine diarrhoea*. S.l.: Technical University of Denmark.

- HERMANN-BANK, M.L., SKOVGAARD, K., STOCKMARR, A., LARSEN, N. y MØLBAK, L., 2013. The Gut Microbiotassay: A high-throughput qPCR approach combinable with next generation sequencing to study gut microbial diversity. *BMC Genomics*, vol. 14, no. 788. ISSN 14712164. DOI 10.1186/1471-2164-14-788.
- HERMANN-BANK, M.L., SKOVGAARD, K., STOCKMARR, A., STRUBE, M.L., LARSEN, N., KONGSTED, H., INGERSLEV, H.C., MØLBAK, L. y BOYE, M., 2015. Characterization of the bacterial gut microbiota of piglets suffering from new neonatal porcine diarrhoea. *BMC Veterinary Research*, vol. 11, no. 1, pp. 139. ISSN 17466148. DOI 10.1186/s12917-015-0419-4.
- HIERGEIST, A., GLÄSNER, J., REISCHL, U. y GESSNER, A., 2015. Analyses of intestinal microbiota: Culture versus sequencing. *ILAR Journal*, vol. 56, no. 2, pp. 228-240. ISSN 19306180. DOI 10.1093/ilar/ilv017.
- HIGHLANDER, S.K., 2012. High throughput sequencing methods for microbiome profiling: application to food animal systems. *Animal Health Research Reviews*, vol. 13, no. 01, pp. 40-53. ISSN 1466-2523. DOI 10.1017/S1466252312000126.
- HOLMAN, D.B., BRUNELLE, B.W., TRACHSEL, J. y ALLEN, H.K., 2017. Meta-analysis To Define a Core Microbiota in the Swine Gut. *mSystems*, vol. 2, no. 3, pp. e00004-17. ISSN 2379-5077. DOI 10.1128/mSystems.00004-17.
- HONG, P.-Y., LEE, B.W., AW, M., SHEK, L.P.C., YAP, G.C., CHUA, K.Y. y LIU, W.-T., 2010. Comparative analysis of fecal microbiota in infants with and without eczema. *PLoS ONE*, vol. 5, no. 4, pp. e9964. ISSN 1932-6203. DOI 10.1371/journal.pone.0009964.
- HOOPER, L. V., LITTMAN, D.R. y MACPHERSON, A.J., 2012. Interactions between the microbiota and the immune system. *Science*, vol. 336, no. 6086, pp. 1268-1273. ISSN 10959203. DOI 10.1126/science.1223490.
- HU, J., NIE, Y., CHEN, J., ZHANG, Y., WANG, Z., FAN, Q. y YAN, X., 2016. Gradual changes of gut microbiota in weaned miniature piglets. *Frontiers in Microbiology*, vol. 7, no. NOV, pp. 1-15. ISSN 1664302X. DOI 10.3389/fmicb.2016.01727.
- HU, W., ZHAO, J., WANG, J., YU, T., WANG, J. y LI, N., 2012. Transgenic milk containing recombinant human lactoferrin modulates the intestinal flora in piglets. *Biochemistry and Cell Biology*, vol. 90, no. 3, pp. 485-496. ISSN 0829-8211. DOI 10.1139/o2012-003.
- HUNG, C.H., CHENG, C.H., CHENG, L.H., LIANG, C.M. y LIN, C.Y., 2008. Application of *Clostridium*-specific PCR primers on the analysis of dark fermentation hydrogen-producing bacterial community. *International Journal of Hydrogen Energy*, vol. 33, no. 5, pp. 1586-1592. ISSN 03603199. DOI 10.1016/j.ijhydene.2007.09.037.
- IINO, T., MORI, K., TANAKA, K., SUZUKI, K.I. y HARAYAMA, S., 2007. *Oscillibacter valericigenes* gen. nov., sp. nov., a valerate-producing anaerobic bacterium isolated from the alimentary canal of a Japanese corbicula clam. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, vol. 57, no. 8, pp. 1840-1845. ISSN 14665026. DOI 10.1099/ijs.0.64717-0.
- ILLUMINA, 2013. 16S Metagenomic Sequencing Library Preparation. *Illumina.com* [en línea]. [Consulta: 5 septiembre 2017]. Disponible en: http://support.illumina.com/content/dam/illumina-support/documents/documentation/chemistry_documentation/16s/16s-metagenomic-library-prep-guide-15044223-b.pdf.
- INOUE, R., TSUKAHARA, T., NAKANISHI, N. y USHIDA, K., 2005. Development of the intestinal microbiota in the piglet. *The Journal of General and Applied Microbiology*, vol. 51, no. 4, pp. 257-265. ISSN 0022-1260. DOI 10.2323/jgam.51.257.

- ISAACSON, R. y KIM, H.B., 2012. The intestinal microbiome of the pig. *Animal Health Research Reviews*, vol. 13, no. 1, pp. 100-109. ISSN 14752654. DOI 10.1017/S1466252312000084.
- JAHAN, M., KRACHT, S., HO, Y., HAQUE, Z., BHATTACHATYIA, B.N., WYNN, P.C. y WANG, B., 2017. Dietary lactoferrin supplementation to gilts during gestation and lactation improves pig production and immunity. *PLoS ONE*, vol. 12, no. 10, pp. e0185817. ISSN 19326203. DOI 10.1371/journal.pone.0185817.
- JAKOBSSON, H.E., ABRAHAMSSON, T.R., JENMALM, M.C., HARRIS, K., QUINCE, C., JERNBERG, C., BJÖRKSTÉN, B., ENGSTRAND, L. y ANDERSSON, A.F., 2014. Decreased gut microbiota diversity, delayed Bacteroidetes colonisation and reduced Th1 responses in infants delivered by caesarean section. *Gut*, vol. 63, no. 4, pp. 559-566. ISSN 14683288. DOI 10.1136/gutjnl-2012-303249.
- JENSEN, B.B. y JORGENSEN, H., 1994. Effect of dietary fiber on microbial activity and microbial gas production in various regions of the gastrointestinal tract of pigs. *Applied and Environmental Microbiology*, vol. 60, no. 6, pp. 1897-1904. ISSN 0099-2240; 0099-2240.
- JI, Y.S., KIM, H.N., PARK, H.J., LEE, J.E., YEO, S.Y., YANG, J.S., PARK, S.Y., YOON, H.-S., CHO, G.-S., FRANZ, C.M.A.P., BOMBA, A., SHIN, H.K. y HOLZAPFEL, W.H., 2012. Modulation of the murine microbiome with a concomitant anti-obesity effect by *Lactobacillus rhamnosus* GG and *Lactobacillus sakei* NR28. *Beneficial Microbes*, vol. 3, no. 1, pp. 13-22. ISSN 18762883. DOI 10.3920/BM2011.0046.
- JIMÉNEZ-QUINTANA, E.A., 2010. *Fuentes de bacterias para la colonización del intestino del neonato: aplicación para el tratamiento de las mastitis lactacionales*. S.l.: Universidad Complutense de Madrid.
- JIMÉNEZ, E., MARÍN, M.L., MARTÍN, R., ODRIOZOLA, J.M., OLIVARES, M., XAUS, J., FERNÁNDEZ, L. y RODRÍGUEZ, J.M., 2008. Is meconium from healthy newborns actually sterile? *Research in microbiology*, vol. 159, no. 3, pp. 187-193. ISSN 0923-2508. DOI <http://dx.doi.org/10.1016/j.resmic.2007.12.007>.
- KANE, S. V., SANDBORN, W.J., RUFO, P.A., ZHOLUDEV, A., BOONE, J., LYERLY, D., CAMILLERI, M. y HANAUER, S.B., 2003. Fecal lactoferrin is a sensitive and specific marker in identifying intestinal inflammation. *American Journal of Gastroenterology*, vol. 98, no. 6, pp. 1309-1314. ISSN 00029270. DOI 10.1111/j.1572-0241.2003.07458.x.
- KATZ, E. y DEMAIN, A.L., 1977. The peptide antibiotics of Bacillus: chemistry, biogenesis, and possible functions. *Bacteriological reviews*, vol. 41, no. 2, pp. 449-74. ISSN 0005-3678.
- KAUFMANN, P., PFEFFERKORN, A., TEUBER, M. y MEILE, L., 1997. Identification and quantification of Bifidobacterium species isolated from food with genus-specific 16S rRNA-targeted probes by colony hybridization and PCR. *Applied and Environmental Microbiology*, vol. 63, no. 4, pp. 1268-1273. ISSN 00992240.
- KIM, H.B., BOREWICZ, K., WHITE, B.A., SINGER, R.S., SREEVATSAN, S., TU, Z.J. y ISAACSON, R.E., 2011. Longitudinal investigation of the age-related bacterial diversity in the feces of commercial pigs. *Veterinary Microbiology*, vol. 153, no. 1-2, pp. 124-133. ISSN 03781135. DOI 10.1016/j.vetmic.2011.05.021.
- KLAPPENBACH, J.A., SAXMAN, P.R., COLE, J.R. y SCHMIDT, T.M., 2001. rrndb: the Ribosomal RNA Operon Copy Number Database. *Nucleic Acids Research*, vol. 29, no. 1, pp. 181-184. ISSN 13624962. DOI 10.1093/nar/29.1.181.

- KOK, R.G., DE WAAL, A., SCHUT, F., WELLING, G.W., WEENK, G. y HELLINGWERF, K.J., 1996. Specific detection and analysis of a probiotic *Bifidobacterium* strain in infant feces. *Applied and Environmental Microbiology*, vol. 62, no. 10, pp. 3668-3672. ISSN 00992240.
- KONOPKA, A., 2009. What is microbial community ecology. *The ISME Journal*, vol. 3, no. 11, pp. 1223-1230. ISSN 17517362. DOI 10.1038/ismej.2009.88.
- KONSTANTINOV, S.R., AWATI, A.A., WILLIAMS, B.A., MILLER, B.G., JONES, P., STOKES, C.R., AKKERMANS, A.D.L., SMIDT, H. y DE VOS, W.M., 2006. Post-natal development of the porcine microbiota composition and activities. *Environmental microbiology*, vol. 8, no. 7, pp. 1191-1199. ISSN 1462-2920. DOI 10.1111/j.1462-2920.2006.01009.x.
- KRAUSE, D.O., HOUSE, J.D. y NYACHOTI, C.M., 2005. Alternatives to antibiotics in swine diets: A molecular approach. *Proceedings of the Manitoba Swine Seminar*, pp. 57-66.
- KUBISTA, M., ANDRADE, J.M., BENGTTSSON, M., FOROOTAN, A., JONÁK, J., LIND, K., SINDELKA, R., SJÖBACK, R., SJÖGREEN, B., STRÖMBOM, L., STÅHLBERG, A. y ZORIC, N., 2006. The real-time polymerase chain reaction. *Molecular Aspects of Medicine*, vol. 27, no. 2-3, pp. 95-125. ISSN 00982997. DOI 10.1016/j.mam.2005.12.007.
- LAGIER, J.C., HUGON, P., KHELAIPIA, S., FOURNIER, P.E., LA SCOLA, B. y RAOULT, D., 2015. The rebirth of culture in microbiology through the example of culturomics to study human gut microbiota. *Clinical Microbiology Reviews*, vol. 28, no. 1, pp. 237-264. ISSN 10986618. DOI 10.1128/CMR.00014-14.
- LANGA-MARCANO, S., 2006. *Interacciones entre bacterias lácticas, células del epitelio intestinal y células del sistema inmunitario. Desarrollo de modelos in vitro*. S.I.: Universidad Complutense de Madrid.
- LANGHORST, J., ELSENBRUCH, S., KOELZER, J., RUEFFER, A., MICHALSEN, A. y DOBOS, G.J., 2008. Noninvasive markers in the assessment of intestinal inflammation in inflammatory bowel diseases: Performance of fecal lactoferrin, calprotectin, and PMN-elastase, CRP, and clinical indices. *American Journal of Gastroenterology*, vol. 103, no. 1, pp. 162-169. ISSN 00029270. DOI 10.1111/j.1572-0241.2007.01556.x.
- LARKIN, M.A., BLACKSHIELDS, G., BROWN, N.P., CHENNA, R., MCGETTIGAN, P.A., MCWILLIAM, H.P., VALENTIN, F., WALLACE, I.M., WILM, A., LOPEZ, R., THOMPSON, J.D., GIBSON, T.J. y HIGGINS, D.G., 2007. Clustal W and Clustal X version 2.0. *Bioinformatics*, vol. 23, no. 21, pp. 2947-2948. ISSN 13674803. DOI 10.1093/bioinformatics/btm404.
- LAWSON, P.A., 2015. *Anaerotruncus*. *Bergey's Manual of Systematics of Archaea and Bacteria*. Chichester, UK: John Wiley & Sons, Ltd, pp. 1-4.
- LAYTON, A., MCKAY, L., WILLIAMS, D., GARRETT, V., GENTRY, R. y SAYLER, G., 2006. Development of *Bacteroides* 16S rRNA gene taqman-based real-time PCR assays for estimation of total, human, and bovine fecal pollution in water. *Applied and Environmental Microbiology*, vol. 72, no. 6, pp. 4214-4224. ISSN 00992240. DOI 10.1128/AEM.01036-05.
- LE BOURHIS, A.G., SAUNIER, K., DORÉ, J., CARLIER, J.P., CHAMBA, J.F., POPOFF, M.R. y THOLOZAN, J.L., 2005. Development and validation of PCR primers to assess the diversity of *Clostridium* spp. in cheese by temporal temperature gradient gel electrophoresis. *Applied and Environmental Microbiology*, vol. 71, no. 1, pp. 29-38. ISSN 00992240. DOI 10.1128/AEM.71.1.29-38.2005.

- LE CHATELIER, E., NIELSEN, T., QIN, J., PRIFTI, E., HILDEBRAND, F., FALONY, G., ALMEIDA, M., ARUMUGAM, M., BATTO, J.-M., KENNEDY, S., LEONARD, P., LI, J., BURGDORF, K., GRARUP, N., JØRGENSEN, T., BRANDSLUND, I., NIELSEN, H.B., JUNCKER, A.S., BERTALAN, M., LEVENEZ, F., PONS, N., RASMUSSEN, S., SUNAGAWA, S., TAP, J., TIMS, S., ZOETENDAL, E.G., BRUNAK, S., CLÉMENT, K., DORÉ, J., KLEEREBEZEM, M., KRISTIANSEN, K., RENAULT, P., SICHERITZ-PONTEN, T., DE VOS, W.M., ZUCKER, J.-D., RAES, J., HANSEN, T., BORK, P., WANG, J., EHRLICH, S.D., PEDERSEN, O., KHACI, G., GUCHTE, M. van de, VANDEMEULEBROUCK, G., JAMET, A., DERVYN, R., SANCHEZ, N., MAGUIN, E., HAIMET, F., WINOGRADSKI, Y., CULTRONE, A., LECLERC, M., JUSTE, C., BLOTTIÈRE, H., PELLETIER, E., LEPASLIER, D., ARTIGUENAVE, F., BRULS, T., WEISSENBACH, J., TURNER, K., PARKHILL, J., ANTOLIN, M., MANICHANH, C., CASELLAS, F., BORUEL, N., VARELA, E., TORREJON, A., GUARNER, F., DENARIAZ, G., DERRIEN, M., Vlieg, J.E.T. van H., VEIGA, P., OOZEER, R., KNOL, J., RESCIGNO, M., BRECHOT, C., M'RINI, C., MÉRIEUX, A., YAMADA, T., BORK, P., WANG, J., EHRLICH, S.D. y PEDERSEN, O., 2013. Richness of human gut microbiome correlates with metabolic markers. *Nature*, vol. 500, no. 7464, pp. 541-546. ISSN 0028-0836. DOI 10.1038/nature12506.
- LEGRAND, D., 2016. Overview of Lactoferrin as a Natural Immune Modulator. *Journal of Pediatrics*, vol. 173, pp. S10-S15. ISSN 10976833. DOI 10.1016/j.jpeds.2016.02.071.
- LENG, Y., YI, M., FAN, J., BAI, Y., GE, Q. y YAO, G., 2016. Effects of acute intra-abdominal hypertension on multiple intestinal barrier functions in rats. *Scientific Reports*, vol. 6, no. 1, pp. 22814. ISSN 20452322. DOI 10.1038/srep22814.
- LI, M., BAUER, L.L., CHEN, X., WANG, M., KUHLENSCHMIDT, T.B., KUHLENSCHMIDT, M.S., FAHEY, G.C. y DONOVAN, S.M., 2012. Microbial composition and in vitro fermentation patterns of human milk oligosaccharides and prebiotics differ between formula-fed and sow-reared piglets. *Journal of Nutrition*, vol. 142, no. 4, pp. 681-689. ISSN 0022-3166. DOI 10.3945/jn.111.154427.
- LILLEHOJ, H., LIU, Y., CALSAMIGLIA, S., FERNANDEZ-MIYAKAWA, M.E., CHI, F., CRAVENS, R.L., OH, S. y GAY, C.G., 2018. Phytochemicals as antibiotic alternatives to promote growth and enhance host health. *Veterinary Research*, vol. 49, no. 1, pp. 76. ISSN 12979716. DOI 10.1186/s13567-018-0562-6.
- LIU, C., FINEGOLD, S.M., SONG, Y. y LAWSON, P.A., 2008. Reclassification of *Clostridium coccoides*, *Ruminococcus hansenii*, *Ruminococcus hydrogenotrophicus*, *Ruminococcus luti*, *Ruminococcus productus* and *Ruminococcus schinkii* as *Blautia coccoides* gen. nov., comb. n. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, vol. 58, no. 8, pp. 1896-1902. ISSN 14665026. DOI 10.1099/ij.s.0.65208-0.
- LOOFT, T., JOHNSON, T.A., ALLEN, H.K., BAYLES, D.O., ALT, D.P., STEDTFELD, R.D., SUL, W.J., STEDTFELD, T.M., CHAI, B., COLE, J.R., HASHSHAM, S.A., TIEDJE, J.M. y STANTON, T.B., 2012. In-feed antibiotic effects on the swine intestinal microbiome. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, vol. 109, no. 5, pp. 1691-1696. ISSN 0027-8424. DOI 10.1073/pnas.1120238109.
- LOZUPONE, C. y KNIGHT, R., 2005. UniFrac: A new phylogenetic method for comparing microbial communities. *Applied and Environmental Microbiology*, vol. 71, no. 12, pp. 8228-8235. ISSN 00992240. DOI 10.1128/AEM.71.12.8228-8235.2005.
- LUNA-CASTRO, S., SAMANIEGO-BARRÓN, L., SERRANO-RUBIO, L.E., CEBALLOS-OLVERA, I., AVALOS-GÓMEZ, C. y GARZA, M. de la, 2017. Lactoferrin: A powerful antimicrobial protein present in milk. *J Adv Dairy Res*, vol. 5, no. 4 (195), pp. 1-10. ISSN 2329888X. DOI 10.4172/2329-888X.1000195.

- LYDON, J.P., O'MALLEY, B.R., SAUCEDO, O., LEE, T., HEADON, D.R. y CONNEELY, O.M., 1992. Nucleotide and primary amino acid sequence of porcine lactoferrin. *Biochim et Biophysica Acta*, vol. 1132, no. 1, pp. 97-99. ISSN 01674781. DOI 10.1016/0167-4781(92)90061-4.
- MACH, N., BERRI, M., ESTELLÉ, J., LEVENEZ, F., LEMONNIER, G., DENIS, C., LEPLAT, J.J., CHEVALEYRE, C., BILLON, Y., DORÉ, J., ROGEL-GAILLARD, C. y LEPAGE, P., 2015. Early-life establishment of the swine gut microbiome and impact on host phenotypes. *Environmental Microbiology Reports*, vol. 7, no. 3, pp. 554-569. ISSN 17582229. DOI 10.1111/1758-2229.12285.
- MAGOČ, T. y SALZBERG, S.L., 2011. FLASH: Fast length adjustment of short reads to improve genome assemblies. *Bioinformatics*, vol. 27, no. 21, pp. 2957-2963. ISSN 13674803. DOI 10.1093/bioinformatics/btr507.
- MALINEN, E., KASSINEN, A., RINTTILÄ, T. y PALVA, A., 2003. Comparison of real-time PCR with SYBR green I or 5'-nuclease assays and dot-blot hybridization with rDNA-targeted oligonucleotide probes in quantification of selected faecal bacteria. *Microbiology*, vol. 149, no. 1, pp. 269-277. ISSN 13500872. DOI 10.1099/mic.0.25975-0.
- MAPAMA, MINISTERIO DE AGRICULTURA Y PESCA, A. y M.A., 2015. *Plan de vigilancia Colistina*. 2015. España: Ministerio de Agricultura y Pesca, Alimentación y Medio Ambiente.
- MARRAS, S.A.E., TYAGI, S. y KRAMER, F.R., 2006. Real-time assays with molecular beacons and other fluorescent nucleic acid hybridization probes. *Clinica Chimica Acta*, vol. 363, no. 1-2, pp. 48-60. ISSN 00098981. DOI 10.1016/j.cccn.2005.04.037.
- MARTENS, E.C., CHIANG, H.C. y GORDON, J.I., 2008. Mucosal glycan foraging enhances fitness and transmission of a saccharolytic human gut bacterial symbiont. *Cell Host and Microbe*, vol. 4, no. 5, pp. 447-457. ISSN 19313128. DOI 10.1016/j.chom.2008.09.007.
- MATSUKI, T., WATANABE, K., FUJIMOTO, J., MIYAMOTO, Y., TAKADA, T., MATSUMOTO, K., OYAIZU, H. y TANAKA, R., 2002. Development of 16S rRNA-gene-targeted group-specific primers for the detection and identification of predominant bacteria in human feces. *Applied and Environmental Microbiology*, vol. 68, no. 11, pp. 5445-5451. ISSN 00992240. DOI 10.1128/AEM.68.11.5445-5451.2002.
- MATSUKI, T., WATANABE, K., FUJIMOTO, J., TAKADA, T. y TANAKA, R., 2004. Use of 16S rRNA Gene-Targeted Group-Specific Primers for Real-Time PCR Analysis of Predominant Bacteria in Human Feces. *Applied and Environmental Microbiology*, vol. 70, no. 12, pp. 7220-7228. ISSN 0099-2240. DOI 10.1128/AEM.70.12.7220-7228.2004.
- MAYEUR, S., SPAHIS, S., POULIOT, Y. y LEVY, E., 2016. Lactoferrin, a Pleiotropic Protein in Health and Disease. *Antioxidants & Redox Signaling*, vol. 24, no. 14, pp. 813-836. ISSN 1523-0864. DOI 10.1089/ars.2015.6458.
- MCCORMACK, U.M., CURIÃO, T., BUZOIANU, S.G., PRIETO, M.L., RYAN, T., VARLEY, P., CRISPIE, F., MAGOWAN, E., METZLER-ZEBELI, B.U., BERRY, D., O'SULLIVAN, O., COTTER, P.D., GARDINER, G.E. y LAWLOR, P.G., 2014. Exploring a possible link between the intestinal microbiota and feed efficiency in pigs. *Applied and Environmental Microbiology*, vol. 83, no. 15, pp. e00380-17. ISSN 10985336. DOI 10.1128/AEM.00380-17.
- MCMURDIE, P.J. y HOLMES, S., 2013. Phyloseq: An R Package for Reproducible Interactive Analysis and Graphics of Microbiome Census Data. *PLoS ONE*, vol. 8, no. 4, pp. e61217. ISSN 19326203. DOI 10.1371/journal.pone.0061217.

- MINISTRO, P. y MARTINS, D., 2017. Fecal biomarkers in inflammatory bowel disease: how, when and why? *Expert Review of Gastroenterology & Hepatology*, vol. 11, no. 4, pp. 317-328. ISSN 1747-4124. DOI 10.1080/17474124.2017.1292128.
- MOEN, B., BERGET, I., RUD, I., HOLE, A.S., KJOS, N.P. y SAHLSTRØM, S., 2016. Extrusion of barley and oat influence the fecal microbiota and SCFA profile of growing pigs. *Food and Function*, vol. 7, no. 2, pp. 1024-1032. ISSN 2042650X. DOI 10.1039/c5fo01452b.
- MØLBAK, L., THOMSEN, L.E., JENSEN, T.K., BACH KNUDSEN, K.E. y BOYE, M., 2007. Increased amount of *Bifidobacterium thermacidophilum* and *Megasphaera elsdenii* in the colonic microbiota of pigs fed a swine dysentery preventive diet containing chicory roots and sweet lupine. *Journal of Applied Microbiology*, vol. 103, no. 5, pp. 1853-1867. ISSN 13645072. DOI 10.1111/j.1365-2672.2007.03430.x.
- MONTEAGUDO-MERA, A., 2011. *Selección in vitro de microorganismos con potencial probiótico*. S.l.: Universidad de León.
- MSHVILDADZE, M., NEU, J., SHUSTER, J., THERIAQUE, D., LI, N. y MAI, V., 2010. Intestinal microbial ecology in premature infants assessed with non-culture-based techniques. *Journal of Pediatrics*, vol. 156, no. 1, pp. 20-25. ISSN 00223476. DOI 10.1016/j.jpeds.2009.06.063.
- MUKHOPADHYA, I., HANSEN, R., EL-OMAR, E.M. y HOLD, G.L., 2012. IBD-what role do Proteobacteria play? *Nature Reviews Gastroenterology and Hepatology*, vol. 9, no. 4, pp. 219-230. ISSN 17595045. DOI 10.1038/nrgastro.2012.14.
- MUNYAKA, P.M., KHAFIPOUR, E. y GHIA, J.-E., 2014. External influence of early childhood establishment of gut microbiota and subsequent health implications. *Frontiers in Pediatrics*, vol. 2, no. October, pp. 1-9. ISSN 2296-2360. DOI 10.3389/fped.2014.00109.
- MURALIDHARA, K.S., SHEGGEBY, G.G., ELLIKER, P.R., ENGLAND, D.C. y SANDINE, W.E., 1977. Effect of feeding lactobacilli on the coliform and *Lactobacillus* flora of intestinal tissue and feces from piglets. *Journal of Food Protection*, vol. 40, no. 5, pp. 288-295. ISSN 0362-028X. DOI 10.4315/0362-028X-40.5.288.
- NAUTA, A., VAN DEN HEUVEL, E.G.H.M., VEURINK, J.H. y GEURST, J.M.W., 2008. Bifidobacteria - the invention provides means and methods for detecting, amplifying, quantifying and/or isolating nucleic acid of at least one member of *Bifidobacterium*. EP 1 997 906 A1. EP 1 997 906 A1.
- NDOU, S.P., TUN, H.M., KIARIE, E., WALSH, M.C., KHAFIPOUR, E. y NYACHOTI, C.M., 2018. Dietary supplementation with flaxseed meal and oat hulls modulates intestinal histomorphometric characteristics, digesta- and mucosa-associated microbiota in pigs. *Scientific Reports*, vol. 8, no. 1, pp. 5880. ISSN 20452322. DOI 10.1038/s41598-018-24043-5.
- NEWTON, R.J., VANDEWALLE, J.L., BORCHARDT, M.A., GORELICK, M.H. y MCLELLAN, S.L., 2011. Lachnospiraceae and bacteroidales alternative fecal indicators reveal chronic human sewage contamination in an Urban harbor. *Applied and Environmental Microbiology*, vol. 77, no. 19, pp. 6972-6981. ISSN 00992240. DOI 10.1128/AEM.05480-11.
- NIEDERWERDER, M.C., 2017. Role of the microbiome in swine respiratory disease. *Veterinary Microbiology*, vol. 209, pp. 97-106. ISSN 18732542. DOI 10.1016/j.vetmic.2017.02.017.

- NIEDERWERDER, M.C., JAING, C.J., THISSEN, J.B., CINO-OZUNA, A.G., MCLOUGHLIN, K.S. y ROWLAND, R.R.R., 2016. Microbiome associations in pigs with the best and worst clinical outcomes following co-infection with porcine reproductive and respiratory syndrome virus (PRRSV) and porcine circovirus type 2 (PCV2). *Veterinary Microbiology*, vol. 188, pp. 1-11. ISSN 18732542. DOI 10.1016/j.vetmic.2016.03.008.
- NIU, Q., LI, P., HAO, S., ZHANG, Y., KIM, S.W., LI, H., MA, X., GAO, S., HE, L., WU, W., HUANG, X., HUA, J., ZHOU, B. y HUANG, R., 2015. Dynamic distribution of the gut microbiota and the relationship with apparent crude fiber digestibility and growth stages in pigs. *Scientific Reports*, vol. 5, pp. 1-7. ISSN 20452322. DOI 10.1038/srep09938.
- O'HARA, A.M. y SHANAHAN, F., 2006. The gut flora as a forgotten organ. *EMBO Reports*, vol. 7, no. 7, pp. 688-693. ISSN 1469221X. DOI 10.1038/sj.embor.7400731.
- OBER, R.A., THISSEN, J.B., JAING, C.J., CINO-OZUNA, A.G., ROWLAND, R.R.R. y NIEDERWERDER, M.C., 2017. Increased microbiome diversity at the time of infection is associated with improved growth rates of pigs after co-infection with porcine reproductive and respiratory syndrome virus (PRRSV) and porcine circovirus type 2 (PCV2). *Veterinary Microbiology*, vol. 208, no. June, pp. 203-211. ISSN 18732542. DOI 10.1016/j.vetmic.2017.06.023.
- ODAMAKI, T., KATO, K., SUGAHARA, H., HASHIKURA, N., TAKAHASHI, S., XIAO, J.Z., ABE, F. y OSAWA, R., 2016. Age-related changes in gut microbiota composition from newborn to centenarian: A cross-sectional study. *BMC Microbiology*, vol. 16, no. 1, pp. 90. ISSN 14712180. DOI 10.1186/s12866-016-0708-5.
- OHASHI, Y. y USHIDA, K., 2009. Health-beneficial effects of probiotics: Its mode of action. *Animal Science Journal*, vol. 80, no. 4, pp. 361-371.
- OSMAN, M.-A., NEOH, H.-M., AB MUTALIB, N.-S., CHIN, S.-F. y JAMAL, R., 2018. 16S rRNA Gene Sequencing for Deciphering the Colorectal Cancer Gut Microbiome: Current Protocols and Workflows. *Frontiers in microbiology*, vol. 9, pp. 767. ISSN 1664-302X. DOI 10.3389/fmicb.2018.00767.
- OTT, S.J., MUSFELDT, M., ULLMANN, U., HAMPE, J. y SCHREIBER, S., 2004. Quantification of intestinal bacterial populations by real-time PCR with a universal primer set and minor groove binder probes: A global approach to the enteric flora. *Journal of Clinical Microbiology*, vol. 42, no. 6, pp. 2566-2572. ISSN 00951137. DOI 10.1128/JCM.42.6.2566-2572.2004.
- PAJARILLO, E.A.B., CHAE, J.-P., P. BALOLONG, M., BUM KIM, H. y KANG, D.-K., 2014. Assessment of fecal bacterial diversity among healthy piglets during the weaning transition. *The Journal of General and Applied Microbiology*, vol. 60, no. 4, pp. 140-146. ISSN 0022-1260. DOI 10.2323/jgam.60.140.
- PÄRTTY, A., LEHTONEN, L., KALLIOMÄKI, M., SALMINEN, S. y ISOLAURI, E., 2015. Probiotic *Lactobacillus rhamnosus* GG therapy and microbiological programming in infantile colic: A randomized, controlled trial. *Pediatric Research*, vol. 78, no. 4, pp. 470-475. ISSN 15300447. DOI 10.1038/pr.2015.127.
- PEREZ-COBAS, A.E., GOSALBES, M.J., FRIEDRICHS, A., KNECHT, H., ARTACHO, A., EISMANN, K., OTTO, W., ROJO, D., BARGIELA, R., VON BERGEN, M., NEULINGER, S.C., DAUMER, C., HEINSEN, F.A., LATORRE, A., BARBAS, C., SEIFERT, J., SANTOS, V.M. Dos, OTT, S.J., FERRER, M., MOYA, A., PÉREZ-COBAS, A.E., BERGEN, M. Von, DÄUMER, C., MARTINS, V. y DOS SANTOS, V.M., 2012. Gut microbiota disturbance during antibiotic therapy: a multi-omic approach. *Gut*, vol. 62, no. 11, pp. 1-11. ISSN 1468-3288. DOI 10.1136/gutjnl-2012-303184.

- PÉREZ DE ROZAS, A.M., ROCA, M., CARABAÑO, R., DE BLAS, C., FRANCESCH, M., BRUFAU, J., MARTÍN-ORÚE, S., GASA, J., CAMPOY, S., BARBÉ, J. y BADIOLA, I., 2003. El estudio de la diversidad intestinal por RFLP. *XIX Curso de especialización FEDNA*.
- PETERSSON, A., DOMIG, K.J., NAGEL, P., ZOLLITSCH, W., HAGMÜLLER, W. y KNEIFEL, W., 2009. Denaturing gradient gel electrophoresis (DGGE)-based monitoring of intestinal lactobacilli and bifidobacteria of pigs during a feeding trial. *Archives of Animal Nutrition*, vol. 63, no. 2, pp. 112-126. ISSN 1745039X. DOI 10.1080/17450390902733959.
- PIEPER, R., JHA, R., ROSSNAGEL, B., VAN KESSEL, A.G., SOUFFRANT, W.B. y LETERME, P., 2008. Effect of barley and oat cultivars with different carbohydrate compositions on the intestinal bacterial communities in weaned piglets. *FEMS Microbiology Ecology*, vol. 66, no. 3, pp. 556-566. ISSN 01686496. DOI 10.1111/j.1574-6941.2008.00605.x.
- PLUSKE, J.R., KIM, J.C. y BLACK, J.L., 2018. Manipulating the immune system for pigs to optimise performance. *Animal Production Science*, vol. 58, no. 4, pp. 666-680. ISSN 18365787. DOI 10.1071/AN17598.
- POROYKO, V., WHITE, J.R., WANG, M., DONOVAN, S., ALVERDY, J., LIU, D.C. y MOROWITZ, M.J., 2010. Gut microbial gene expression in mother-fed and formula-fed piglets. *PLoS ONE*, vol. 5, no. 8, pp. e12459. ISSN 19326203. DOI 10.1371/journal.pone.0012459.
- POSSEMIERS, S., BOLCA, S., BOON, N. y VERSTRAETE, W., 2004. Molecular techniques for the structural analysis and quantification of an in vitro cultured intestinal microbial community. *Reproduction Nutrition Development*, vol. 44, no. Suppl. 1, pp. III S8. DOI 10.1051/rnd:20044400.
- PRIETO-SUÁREZ, C., MARTÍNEZ-LOBO, F.J., SEGALÉS-I-COMA, J. y CARVAJAL-URUEÑA, A.M., 2017. *Enfermedades infecciosas del ganado porcino*. S.I.: Servet. ISBN 9788416818778.
- PRYOR, R.J. y WITTEWER, C.T., 2006. Real-Time Polymerase Chain Reaction and melting curve analysis. *Methods in Molecular Biology*, pp. 19-32. ISBN 978-1-58829-348-0.
- QUAST, C., PRUESSE, E., YILMAZ, P., GERKEN, J., SCHWEER, T., YARZA, P., PEPLIES, J. y GLÖCKNER, F.O., 2013. The SILVA ribosomal RNA gene database project: Improved data processing and web-based tools. *Nucleic Acids Research*, vol. 41, no. D1. ISSN 03051048. DOI 10.1093/nar/gks1219.
- QUILODRÁN-VEGA, S.R., VILLENA, J., VALDEBENITO, J., SALAS, M.J., PARRA, C., RUIZ, A., KITAZAWA, H. y GARCÍA, A., 2016. Isolation of lactic acid bacteria from swine milk and characterization of potential probiotic strains with antagonistic effects against swine-associated gastrointestinal pathogens. *Canadian Journal of Microbiology*, vol. 62, no. 6, pp. 514-524. ISSN 0008-4166. DOI 10.1139/cjm-2015-0811.
- RAJILIĆ-STOJANOVIĆ, M., SMIDT, H. y DE VOS, W.M., 2007. Diversity of the human gastrointestinal tract microbiota revisited. *Environmental Microbiology*, vol. 9, no. 9, pp. 2125-2136. ISSN 1462-2912. DOI 10.1111/j.1462-2920.2007.01369.x.
- RAMIREZ-FARIAS, C., SLEZAK, K., FULLER, Z., DUNCAN, A., HOLTROP, G. y LOUIS, P., 2009. Effect of inulin on the human gut microbiota: Stimulation of *Bifidobacterium adolescentis* and *Faecalibacterium prausnitzii*. *British Journal of Nutrition*, vol. 101, no. 4, pp. 541-550. ISSN 00071145. DOI 10.1017/S0007114508019880.

- RESCIGNO, M., URBANO, M., VALZASINA, B., FRANCOLINI, M., ROTTA, G., BONASIO, R., GRANUCCI, F., KRAEHENBUHL, J.-P. y RICCIARDI-CASTAGNOLI, P., 2001. Dendritic cells express tight junction proteins and penetrate gut epithelial monolayers to sample bacteria. *Nature immunology*, vol. 2, no. 4, pp. 361-367. ISSN 1529-2908.
- RETTEDAL, E., VILAIN, S., LINDBLOM, S., LEHNERT, K., SCOFIELD, C., GEORGE, S., CLAY, S., KAUSHIK, R.S., ROSA, A.J.M., FRANCIS, D. y BRÖZEL, V.S., 2009. Alteration of the ileal microbiota of weanling piglets by the growth-promoting antibiotic chlortetracycline. *Applied and Environmental Microbiology*, vol. 75, no. 17, pp. 5489-5495. ISSN 00992240. DOI 10.1128/AEM.02220-08.
- REZNIKOV, E.A., COMSTOCK, S.S., YI, C., CONTRACTOR, N. y DONOVAN, S.M., 2014. Dietary Bovine Lactoferrin Increases Intestinal Cell Proliferation in Neonatal Piglets. *The Journal of Nutrition*, vol. 144, no. 9, pp. 1401-1408. ISSN 0022-3166. DOI 10.3945/jn.114.196568.
- RINTTILÄ, T., KASSINEN, A., MALINEN, E., KROGIUS, L. y PALVA, A., 2004. Development of an extensive set of 16S rDNA-targeted primers for quantification of pathogenic and indigenous bacteria in faecal samples by real-time PCR. *Journal of Applied Microbiology*, vol. 97, no. 6, pp. 1166-1177. ISSN 13645072. DOI 10.1111/j.1365-2672.2004.02409.x.
- RÍOS-COVIÁN, D., RUAS-MADIEDO, P., MARGOLLES, A., GUEIMONDE, M., DE LOS REYES-GAVILÁN, C.G. y SALAZAR, N., 2016. Intestinal short chain fatty acids and their link with diet and human health. *Frontiers in Microbiology*, vol. 7, no. FEB, pp. 185. ISSN 1664302X. DOI 10.3389/fmicb.2016.00185.
- ROCA-CANUDAS, M., 2008. *Estudio del ecosistema bacteriano del tracto digestivo del cerdo mediante técnicas moleculares*. S.l.: Universitat Autònoma de Barcelona.
- RODRÍGUEZ-GONZÁLEZ, M., 2009. *Aislamiento y selección de cepas del género Lactobacillus con capacidad probiótica e inmunomoduladora*. S.l.: Universitat Autònoma de Barcelona.
- ROSE, D.J., 2014. Impact of whole grains on the gut microbiota: The next frontier for oats? *British Journal of Nutrition*, vol. 112, pp. S44-S49. ISSN 14752662. DOI 10.1017/S0007114514002244.
- ROSENBERG, E., SHARON, G. y ZILBER-ROSENBERG, I., 2009. The hologenome theory of evolution contains Lamarckian aspects within a Darwinian framework. *Environmental microbiology*, vol. 11, no. 12, pp. 2959-2962.
- ROSENBERG, E. y ZILBER-ROSENBERG, I., 2018. The hologenome concept of evolution after 10 years. *Microbiome*, vol. 6, no. 1, pp. 78. ISSN 2049-2618. DOI 10.1186/s40168-018-0457-9.
- ROSENBERG, E. y ZILBER-ROSENBERG, I., 2011. Symbiosis and development: the hologenome concept. *Birth Defects Research Part C: Embryo Today: Reviews*, vol. 93, no. 1, pp. 56-66.
- SÁENZ, Y., ZARAZAGA, M., BRIÑAS, L., LANTERO, M., RUIZ-LARREA, F. y TORRES, C., 2001. Antibiotic resistance in Escherichia coli isolates obtained from animals, foods and humans in Spain. *International journal of antimicrobial agents*, vol. 18, no. 4, pp. 353-358.
- SÁNCHEZ-DÍAZ, A.C., 2012. *Identificación y cuantificación de especies del género Merluccius mediante la utilización de PCR a tiempo real*. S.l.: Universidad de Vigo.

- SÁNCHEZ, L., CALVO, M. y BROCK, J.H., 1992. Biological role of lactoferrin. *Archives of Disease in Childhood*, vol. 67, no. 5, pp. 657-661. ISSN 00039888. DOI 10.1136/adc.67.5.657.
- SÁNCHEZ, L., PEIRÓ, J.M., CASTILLO, H., PÉREZ, M.D., ENA, J.M. y CALVO, M., 1992. Kinetic Parameters for Denaturation of Bovine Milk Lactoferrin. *Journal of Food Science*, vol. 57, no. 4, pp. 873-879. ISSN 17503841. DOI 10.1111/j.1365-2621.1992.tb14313.x.
- SATOKARI, R., GRÖNROOS, T., LAITINEN, K., SALMINEN, S. y ISOLAURI, E., 2009. Bifidobacterium and Lactobacillus DNA in the human placenta. *Letters in applied microbiology*, vol. 48, no. 1, pp. 8-12. ISSN 1472-765X. DOI 10.1111/j.1472-765X.2008.02475.x.
- SCHACHTSCHNEIDER, K.M., SCHOOK, L.B. y PIETERS, M., 2011. Manipulation of commensal gut microbiota as a tool to decrease the effect of respiratory disease in swine. *Proceedings 42nd Annual Meeting of American Association of Swine Veterinarians*. Phoenix (USA), pp. 373.
- SCHMIDT, B., MULDER, I.E., MUSK, C.C., AMINOV, R.I., LEWIS, M., STOKES, C.R., BAILEY, M., PROSSER, J.I., GILL, B.P., PLUSKE, J.R. y KELLY, D., 2011. Establishment of normal gut microbiota is compromised under excessive hygiene conditions. *PLoS ONE*, vol. 6, no. 12, pp. e28284. ISSN 19326203. DOI 10.1371/journal.pone.0028284.
- SCHMIEDER, R. y EDWARDS, R., 2011. Quality control and preprocessing of metagenomic datasets. *Bioinformatics*, vol. 27, no. 6, pp. 863-864. ISSN 13674803. DOI 10.1093/bioinformatics/btr026.
- SCHOKKER, D., ZHANG, J., VASTENHOUW, S.A., HEILIG, H.G.H.J., SMIDT, H., REBEL, J.M.J. y SMITS, M.A., 2015. Long-lasting effects of early-life antibiotic treatment and routine animal handling on gut microbiota composition and immune system in pigs. *PLoS ONE*, vol. 10, no. 2, pp. 1-18. ISSN 19326203. DOI 10.1371/journal.pone.0116523.
- SCHOKKER, D., ZHANG, J., ZHANG, L.L., VASTENHOUW, S.A., HEILIG, H.G.H.J., SMIDT, H., REBEL, J.M.J. y SMITS, M.A., 2014. Early-life environmental variation affects intestinal microbiota and immune development in new-born piglets. *PLoS ONE*, vol. 9, no. 6. ISSN 19326203. DOI 10.1371/journal.pone.0100040.
- SEKIROV, I., RUSSELL, S.L., ANTUNES, L.C.M. y FINLAY, B.B., 2010. Gut Microbiota in Health and Disease. *Physiological Reviews*, vol. 90, no. 3, pp. 859-904. ISSN 0031-9333. DOI 10.1152/physrev.00045.2009.
- SHAH, H.N. y COLLINS, D.M., 1990. *Prevotella*, a new genus to include *Bacteroides melaninogenicus* and related species formerly classified in the genus *Bacteroides*. *International Journal of Systematic Bacteriology*, vol. 40, no. 2, pp. 205-208. ISSN 0020-7713. DOI 10.1099/00207713-40-2-205.
- SHANAHAN, F., 2012. The gut microbiota—a clinical perspective on lessons learned. *Nature Reviews Gastroenterology & Hepatology*, vol. 9, no. 10, pp. 609-614. ISSN 1759-5045. DOI 10.1038/nrgastro.2012.145.
- SHREINER, A.B., KAO, J.Y. y YOUNG, V.B., 2015. The gut microbiome in health and in disease. *Current opinion in Gastroenterology*, vol. 31, no. 1, pp. 69-75. ISBN 15317056. DOI 10.1097/MOG.0000000000000139.
- SIDDIQUI, I., MAJID, H. y ABID, S., 2017. Update on clinical and research application of fecal biomarkers for gastrointestinal diseases. *World Journal of Gastrointestinal Pharmacology and Therapeutics*, vol. 8, no. 1, pp. 39-46. ISSN 2150-5349. DOI 10.4292/wjgpt.v8.i1.39.

- SIMPSON, J.M., MCCRACKEN, V.J., WHITE, B.A., GASKINS, H.R. y MACKIE, R.I., 1999. Application of denaturant gradient gel electrophoresis for the analysis of the porcine gastrointestinal microbiota. *Journal of Microbiological Methods*, vol. 36, no. 3, pp. 167-179. ISSN 01677012. DOI 10.1016/S0167-7012(99)00029-9.
- SINKORA, J., SAMANKOVA, P., KUMMER, V., LEVA, L., MASKOVA, J., REHAKOVA, Z. y FALDYNA, M., 2007. Commercially available rabbit anti-human polyclonal antisera as a useful tool for immune system studies in veterinary species. *Veterinary Immunology and Immunopathology*, vol. 119, no. 1-2, pp. 156-162. ISSN 01652427. DOI 10.1016/j.vetimm.2007.06.023.
- SIQUEIROS-CENDÓN, T., ARÉVALO-GALLEGOS, S., IGLESIAS-FIGUEROA, B.F., GARCÍA-MONTOYA, I.A., SALAZAR-MARTÍNEZ, J. y RASCÓN-CRUZ, Q., 2014. Immunomodulatory effects of lactoferrin. *Acta Pharmacologica Sinica*, vol. 35, no. 5, pp. 557-566. ISSN 17457254. DOI 10.1038/aps.2013.200.
- SKÅNSENG, B., SVIHUS, B., RUDI, K., TROSVIK, P. y MOEN, B., 2013. Effect of different feed structures and bedding on the horizontal spread of *Campylobacter jejuni* within broiler flocks. *Agriculture*, vol. 3, no. 4, pp. 741-760. ISSN 2077-0472. DOI 10.3390/agriculture3040741.
- SLIFIERZ, M.J., FRIENDSHIP, R.M. y WEESE, J.S., 2015. Longitudinal study of the early-life fecal and nasal microbiotas of the domestic pig. *BMC Microbiology*, vol. 15, no. 1, pp. 1-12. ISSN 14712180. DOI 10.1186/s12866-015-0512-7.
- SOKOL, H., SEKSIK, P., FURET, J.P., FIRMESSE, O., NION-LARMURIER, I., BEAUGERIE, L., COSNES, J., CORTHER, G., MARTEAU, P. y DORÉ, J., 2009. Low counts of *Faecalibacterium prausnitzii* in colitis microbiota. *Inflammatory Bowel Diseases*, vol. 15, no. 8, pp. 1183-1189. ISSN 10780998. DOI 10.1002/ibd.20903.
- SOLER, C., GOOSSENS, T., BERMEJO, A., MIGURA-GARCÍA, L., CUSCO, A., FRANCINO, O. y FRAILE, L., 2018. Digestive microbiota is different in pigs receiving antimicrobials or a feed additive during the nursery period. *PLoS ONE*, vol. 13, no. 5, pp. 1-22. ISSN 19326203. DOI 10.1371/journal.pone.0197353.
- SOMMER, F. y BÄCKHED, F., 2013. The gut microbiota-masters of host development and physiology. *Nature Reviews Microbiology*, vol. 11, no. 4, pp. 227-238. ISSN 17401526. DOI 10.1038/nrmicro2974.
- SOMMER, M.O.A., 2015. Advancing gut microbiome research using cultivation. *Current Opinion in Microbiology*, vol. 27, pp. 127-132. ISSN 18790364. DOI 10.1016/j.mib.2015.08.004.
- SONG, Y., LIU, C. y FINEGOLD, S.M., 2004. Real-Time PCR Quantitation of Clostridia in Feces of Autistic Children. *Applied and Environmental Microbiology*, vol. 70, no. 11, pp. 6459-6465. ISSN 0099-2240. DOI 10.1128/AEM.70.11.6459.
- SONNENBURG, J.L., XU, J., LEIP, D.D., CHEN, C.H., WESTOVER, B.P., WEATHERFORD, J., BUHLER, J.D. y GORDON, J.I., 2005. Glycan foraging in vivo by an intestine-adapted bacterial symbiont. *Science*, vol. 307, no. 5717, pp. 1955-1959. ISSN 00368075. DOI 10.1126/science.1109051.
- STANTON, T.B., 2013. A call for antibiotic alternatives research. *Trends in microbiology*, vol. 21, no. 3, pp. 111-113. ISSN 0966-842X. DOI 10.1016/j.tim.2012.11.002.
- STARKE, I.C., PIEPER, R., NEUMANN, K., ZENTEK, J. y VAHJEN, W., 2014. The impact of high dietary zinc oxide on the development of the intestinal microbiota in weaned piglets. *FEMS Microbiology Ecology*, vol. 87, no. 2, pp. 416-427. ISSN 01686496. DOI 10.1111/1574-6941.12233.

- STEIN, H.H., 2002. Experience of feeding pigs without antibiotics: A european perspective. *Animal Biotechnology*, vol. 13, no. 1, pp. 85-95. ISSN 1049-5398. DOI 10.1081/ABIO-120005772.
- STEIN, T., 2005. *Bacillus subtilis* antibiotics: structures, syntheses and specific functions. *Molecular Microbiology*, vol. 56, no. 4, pp. 845-857. ISSN 0950382X. DOI 10.1111/j.1365-2958.2005.04587.x.
- STOKES, C.R., 2017. The development and role of microbial-host interactions in gut mucosal immune development. *Journal of Animal Science and Biotechnology*, vol. 8, no. 1, pp. 12. ISSN 20491891. DOI 10.1186/s40104-016-0138-0.
- SU, X.L., TIAN, Q., ZHANG, J., YUAN, X.Z., SHI, X.S., GUO, R.B. y QIU, Y.L., 2014. *Acetobacteroides hydrogenigenes* gen. nov., sp. nov., an anaerobic hydrogen-producing bacterium in the family Rikenellaceae isolated from a reed swamp. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, vol. 64, no. Pt 9, pp. 2986-2991. ISSN 14665026. DOI 10.1099/ijs.0.063917-0.
- SUAU, A., BONNET, R., SUTREN, M., GODON, J.J., GIBSON, G.R., COLLINS, M.D. y DORÉ, J., 1999. Direct analysis of genes encoding 16S rRNA from complex communities reveals many novel molecular species within the human gut. *Applied and environmental microbiology*, vol. 65, no. 11, pp. 4799-4807. ISSN 0099-2240.
- SUN, Y., ZHOU, L., FANG, L., SU, Y. y ZHU, W., 2015. Responses in colonic microbial community and gene expression of pigs to a long-term high resistant starch diet. *Frontiers in Microbiology*, vol. 6, no. AUG, pp. 877. ISSN 1664302X. DOI 10.3389/fmicb.2015.00877.
- SUZUKI, M.T., TAYLOR, L.T. y DELONG, E.F., 2000. Quantitative analysis of small-subunit rRNA genes in mixed microbial populations via 5'-nuclease assays. *Applied and Environmental Microbiology*, vol. 66, no. 11, pp. 4605-4614. ISSN 00992240. DOI 10.1128/AEM.66.11.4605-4614.2000.
- SWORDS, W.E., WU, C.C., CHAMPLIN, F.R. y BUDDINGTON, R.K., 1993. Postnatal changes in selected bacterial groups of the pig colonic microflora. *Neonatology*, vol. 63, no. 3, pp. 191-200. ISSN 16617819. DOI 10.1159/000243931.
- TAJIMA, K. y AMINOV, R., 2015. Structure and function of a nonruminant gut: A porcine model. *Rumen Microbiology: From Evolution to Revolution*. New Delhi: Springer India, pp. 47-75. ISBN 9788132224013.
- TAJIMA, K., KOBASHI, Y., OHMORI, H., ASHIHARA, A. y KAWASHIMA, T., 2010. Bacterial community composition in faeces from pigs in an outdoor production system without prophylactic or growth-promoting antibiotics. *Livestock Science*, vol. 133, no. 1-3, pp. 110-112. ISSN 18711413. DOI 10.1016/j.livsci.2010.06.038.
- TAJIMA, K., OHMORI, H., AMINOV, R.I., KOBASHI, Y. y KAWASHIMA, T., 2010. Fermented liquid feed enhances bacterial diversity in piglet intestine. *Anaerobe*, vol. 16, no. 1, pp. 6-11. ISSN 10759964. DOI 10.1016/j.anaerobe.2009.04.002.
- TAKADA, T., KURAKAWA, T., TSUJI, H. y NOMOTO, K., 2013. *Fusicatenibacter saccharivorans* gen. nov., sp. nov., isolated from human faeces. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, vol. 63, no. PART10, pp. 3691-3696. ISSN 14665026. DOI 10.1099/ijs.0.045823-0.
- TAMURA, K., STECHER, G., PETERSON, D., FILIPSKI, A. y KUMAR, S., 2013. MEGA6: Molecular evolutionary genetics analysis version 6.0. *Molecular Biology and Evolution*, vol. 30, no. 12, pp. 2725-2729. ISSN 07374038. DOI 10.1093/molbev/mst197.

- THOMLINSON, J.R. y LAWRENCE, T.L., 1981. Dietary manipulation of gastric pH in the prophylaxis of enteric disease in weaned pigs: some field observations. *The Veterinary record*, vol. 109, no. 6, pp. 120-122. ISSN 00424900. DOI 10.1136/vr.109.6.120.
- THOMPSON, C.L., WANG, B. y HOLMES, A.J., 2008. The immediate environment during postnatal development has long-term impact on gut community structure in pigs. *ISME Journal*, vol. 2, no. 7, pp. 739-748. ISSN 17517362. DOI 10.1038/ismej.2008.29.
- TSILOYIANNIS, V.K., KYRIAKIS, S.C., VLEMMAS, J. y SARRIS, K., 2001. The effect of organic acids on the control of porcine post-weaning diarrhoea. *Research in Veterinary Science*, vol. 70, no. 3, pp. 287-293. ISSN 00345288. DOI 10.1053/rvsc.2001.0476.
- VAAHTOVUO, J., KORKEAMÄKI, M., MUNUKKA, E., VILJANEN, M.K. y TOIVANEN, P., 2005. Quantification of bacteria in human feces using 16S rRNA-hybridization, DNA-staining and flow cytometry. *Journal of Microbiological Methods*, vol. 63, no. 3, pp. 276-286. DOI 10.1016/j.mimet.2005.03.017.
- VAHJEN, W., PIEPER, R. y ZENTEK, J., 2011. Increased dietary zinc oxide changes the bacterial core and enterobacterial composition in the ileum of piglets. *Journal of Animal Science*, vol. 89, no. 8, pp. 2430-2439. ISSN 00218812. DOI 10.2527/jas.2010-3270.
- VAN BERKEL, P.H.C., VAN VEEN, H.A., GEERTS, M.E.J. y NUIJENS, J.H., 2002. Characterization of monoclonal antibodies against human lactoferrin. *Journal of Immunological Methods*, vol. 267, no. 2, pp. 139-150. ISSN 00221759. DOI 10.1016/S0022-1759(02)00184-9.
- VAN DYKE, M.I. y MCCARTHY, A.J., 2002. Molecular biological detection and characterization of *Clostridium* populations in municipal landfill sites. *Applied and Environmental Microbiology*, vol. 68, no. 4, pp. 2049-2053. ISSN 00992240. DOI 10.1128/AEM.68.4.2049-2053.2002.
- VÁZQUEZ-BAEZA, Y., PIRRUNG, M., GONZALEZ, A. y KNIGHT, R., 2013. EMPeror: A tool for visualizing high-throughput microbial community data. *GigaScience*, vol. 2, no. 1, pp. 16. ISSN 2047217X. DOI 10.1186/2047-217X-2-16.
- VERRAES, C., VAN BOXSTAEL, S., VAN MEERVENNE, E., VAN COILLIE, E., BUTAYE, P., CATRY, B., DE SCHAEZTEN, M.A., VAN HUFFEL, X., IMBERECHTS, H., DIERICK, K., DAUBE, G., SAEGERMAN, C., DE BLOCK, J., DEWULF, J. y HERMAN, L., 2013. Antimicrobial resistance in the food chain: A review. *International Journal of Environmental Research and Public Health*, vol. 10, no. 7, pp. 2643-2669. ISSN 16617827. DOI 10.3390/ijerph10072643.
- VĚTROVSKÝ, T. y BALDRIAN, P., 2013. The variability of the 16S rRNA gene in bacterial genomes and its consequences for bacterial community analyses. *PLoS ONE*, vol. 8, no. 2, pp. e57923. ISSN 19326203. DOI 10.1371/journal.pone.0057923.
- WALTER, J., HERTEL, C., TANNOCK, G.W., LIS, C.M., MUNRO, K. y HAMMES, W.P., 2001. Detection of *Lactobacillus*, *Pediococcus*, *Leuconostoc*, and *Weissella* species in human feces by using group-specific PCR primers and denaturing gradient gel electrophoresis. *Applied and Environmental Microbiology*, vol. 67, no. 6, pp. 2578-2585. ISSN 00992240. DOI 10.1128/AEM.67.6.2578-2585.2001.
- WANG, B., YAO, M., LV, L., LING, Z. y LI, L., 2017. The human microbiota in health and disease. *Engineering*, vol. 3, no. 1, pp. 71-82. ISSN 20958099. DOI 10.1016/J.ENG.2017.01.008.

- WANG, H., DU, P., LI, J., ZHANG, Y., ZHANG, W., HAN, N., WOO, P.C.Y. y CHEN, C., 2014. Comparative analysis of microbiome between accurately identified 16S rDNA and quantified bacteria in simulated samples. *Journal of Medical Microbiology*, vol. 63, pp. 433-440. ISSN 00222615. DOI 10.1099/jmm.0.060616-0.
- WANG, S., LIU, G., CAI, L., DING, J. y YIN, Y., 2013. Development of micro-ecological system in small and large intestine of piglets. *Nutritional and Physiological Functions of Amino Acids in Pigs*. Vienna: Springer Vienna, pp. 75-87.
- WEISS, E., AUMILLER, T., SPINDLER, H.K., ROSENFELDER, P., EKLUND, M., WITZIG, M., JØRGENSEN, H., BACH KNUDSEN, K.E. y MOSENTHIN, R., 2016. Wheat and barley differently affect porcine intestinal microbiota. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, vol. 96, no. 6, pp. 2230-2239. ISSN 10970010. DOI 10.1002/jsfa.7340.
- WICKHAM, H., 2009. *Ggplot2: elegant graphics for data analysis*. S.l.: Springer. ISBN 9780387981413.
- WILLNER, D. y HUGENHOLTZ, P., 2013. Metagenomics and community profiling: culture-independent techniques in the clinical laboratory. *Clinical Microbiology Newsletter*, vol. 35, no. 1, pp. 1-9. ISSN 01964399. DOI 10.1016/j.clinmicnews.2012.12.001.
- XIANG, Z., QI, H., HAN, G., LIU, J., HUANG, Z., YU, B. y CHEN, D., 2011. Real-time TaqMan polymerase chain reaction to quantify the effects of different sources of dietary starch on *Bifidobacterium* in the intestinal tract of piglets. *African Journal of Biotechnology*, vol. 10, no. 25, pp. 5059-5067. ISSN 1684-5315. DOI <http://dx.doi.org/10.5897/AJB10.2471>.
- XIE, Z., HU, L., LI, Y., GENG, S., CHENG, S., FU, X., ZHAO, S. y HAN, X., 2017. Changes of gut microbiota structure and morphology in weaned piglets treated with fresh fermented soybean meal. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, vol. 33, no. 12, pp. 1-12. ISSN 15730972. DOI 10.1007/s11274-017-2374-7.
- YAN, S.S. y GILBERT, J.M., 2004. Antimicrobial drug delivery in food animals and microbial food safety concerns: an overview of in vitro and in vivo factors potentially affecting the animal gut microflora. *Veterinary Drug Delivery: Part VI*, vol. 56, no. 10, pp. 1497-1521. ISSN 0169-409X. DOI <http://dx.doi.org/10.1016/j.addr.2004.02.010>.
- YANG, Q., HUANG, X., ZHAO, S., SUN, W., YAN, Z., WANG, P., LI, S., HUANG, W., ZHANG, S., LIU, L. y GUN, S., 2017. Structure and function of the fecal microbiota in diarrheic neonatal piglets. *Frontiers in Microbiology*, vol. 8, no. MAR, pp. 1-13. ISSN 1664302X. DOI 10.3389/fmicb.2017.00502.
- YANG, Y.W., CHEN, M.K., YANG, B.Y., HUANG, X.J., ZHANG, X.R., HE, L.Q., ZHANG, J. y HUA, Z.C., 2015. Use of 16S rRNA gene-targeted group-specific primers for real-time PCR analysis of predominant bacteria in mouse feces. *Applied and Environmental Microbiology*, vol. 81, no. 19, pp. 6749-6756. ISSN 10985336. DOI 10.1128/AEM.01906-15.
- YIN, J., HAN, H., LI, Y., LIU, Z., ZHAO, Y., FANG, R., HUANG, X., ZHENG, J., REN, W., WU, F., LIU, G., WU, X., WANG, K., SUN, L., LI, C., LI, T. y YIN, Y., 2018. Lysine restriction affects feed intake and amino acid metabolism via gut microbiome in piglets. *Cellular Physiology and Biochemistry*, vol. 44, no. 5, pp. 1749-1761. ISSN 14219778. DOI 10.1159/000485782.
- 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*, vol. 86, no. 3, pp. 279-285. ISSN 17400929. DOI 10.1111/asj.12277.

- ZENTEK, J., FERRARA, F., PIEPER, R., TEDIN, L., MEYER, W. y VAHJEN, W., 2013. Effects of dietary combinations of organic acids and medium chain fatty acids on the gastrointestinal microbial ecology and bacterial metabolites in the digestive tract of weaning piglets. *Journal of Animal Science*, vol. 91, no. 7, pp. 3200-3210. ISSN 00218812. DOI 10.2527/jas.2012-5673.
- ZHAO, W., WANG, Y., LIU, S., HUANG, J., ZHAI, Z., HE, C., DING, J., WANG, J., WANG, H., FAN, W., ZHAO, J. y MENG, H., 2015. The dynamic distribution of porcine microbiota across different ages and gastrointestinal tract segments. *PLoS ONE*, vol. 10, no. 2, pp. 1-13. ISSN 19326203. DOI 10.1371/journal.pone.0117441.
- ZHOU, X. lu, XU, W., TANG, X. xiao, LUO, L. sheng, TU, J. feng, ZHANG, C. jing, XU, X., WU, Q. dong y PAN, W. sheng, 2014. Fecal lactoferrin in discriminating inflammatory bowel disease from Irritable bowel syndrome: A diagnostic meta-analysis. *BMC Gastroenterology*, vol. 14, no. 1, pp. 1-8. ISSN 1471230X. DOI 10.1186/1471-230X-14-121.
- ZILBER-ROSENBERG, I. y ROSENBERG, E., 2008. Role of microorganisms in the evolution of animals and plants: The hologenome theory of evolution. *FEMS Microbiology Reviews*, vol. 32, no. 5, pp. 723-735. ISSN 01686445. DOI 10.1111/j.1574-6976.2008.00123.x.