



Facultad de Veterinaria
Universidad Zaragoza



Trabajo Fin de Grado en Veterinaria

Uso de ácidos orgánicos para el control de la colibacilosis en cerdos de
transición

Use of organic acids for the control of colibacilosis in
pigs in the nursery period

Autor/es

Elena Marín Fuentes

Director/es

Raúl Carlos Mainar Jaime

Eloísa Sevilla Romeo

Facultad de Veterinaria

Curso 2017-2018

ÍNDICE

1.	Resumen.....	3
2.	Introducción.....	4
2.1	Diarrea postdestete porcina	4
2.2	Importancia económica	5
2.3	Etiología: <i>Escherichia coli</i>	6
2.4	Factores de virulencia	8
2.5	Control tradicional de la infección por <i>E. coli</i>	11
2.6	Prevención	12
2.7	Ácidos orgánicos como alternativa	15
3.	Justificación y objetivos.....	16
4.	Metodología.....	17
4.1	Productos utilizados	17
4.2	Diseño del estudio	18
4.2.1	Plan de muestreo	18
4.2.2	Análisis laboratoriales	19
4.2.2.1	Recuento de <i>E.coli</i> (método de las diluciones)	19
4.2.2.2	Detección de ETEC	20
4.2.3	Análisis estadísticos	21
5.	Resultados y discusión	21
5.1	Tasa de mortalidad	21
5.2	Peso y ganancia media diaria	22
5.3	Recuento de <i>E.coli</i>	23
5.4	Detección de ETEC	24
6.	Conclusiones	27
7.	Valoración personal	28
8.	Bibliografía	29
9.	Anexos	32

1. RESUMEN

Use of organic acid for the control of colibacillosis in pigs in the nursery period.

Uno de los problemas que genera grandes pérdidas en la producción porcina es la incidencia de diarreas en la transición. Muchas de estas diarreas son producidas por bacterias intestinales como *E. coli*, cuya actividad patógena se ve favorecida por el estrés asociado con el destete y el cambio brusco de dieta. A lo largo del tiempo, estos problemas bacterianos se han tratado y prevenido con antibioterapia, favoreciendo el desarrollo de cepas resistentes, lo que supone un riesgo para la salud animal y pública.

El empleo de los ácidos orgánicos para controlar esta patología en lechones de transición constituye hoy en día una posible alternativa al uso de antibióticos, a la vez que una mejora en la conservación de los piensos. En este estudio se comparó la utilización de dos ácidos orgánicos (butirato sódico encapsulado y ácido fórmico monoesterificado) con respecto a un tratamiento convencional con óxido de Zn y amoxicilina (grupo control). Se analizaron los pesos, el recuento de *E. coli* y la detección de factores de virulencia de ETEC en los tres grupos considerados al inicio y al final de la transición. En general, los ácidos orgánicos no implicaron peores valores en los índices de producción y su efectividad para la prevención del ETEC fue comparable al grupo con óxido de Zn y amoxicilina.

Abstract

One of the problems that causes economic large losses in pig production is the incidence of diarrhea in the nursery period. Many of these diarrheas are produced by intestinal bacteria such as *E.coli*, whose pathogenic activity is enhanced by the stress associated with weaning and the abrupt change of diet. Over time, these bacterial problems have been treated and prevented with antibiotic therapy, favoring the development of resistant strains, which poses a risk to animal and public health.

The use of organic acids to control this pathology in nursery period piglets instead of antibiotics is nowadays an alternative to the use antimicrobials, as well as an improvement in the preservation of feed. In this study the use of two organic acids (encapsulated sodium butyrate and monosterified formic acid) was compared with conventional treatment with Zn oxide and amoxicillin (control group). Weights, *E. coli* count and ETEC virulence factor detection were analyzed in the three groups considered at the beginning and end of the nursery period. Organic acids do not imply worse values in the production indexes and their

effectiveness was comparable to the group with Zn oxide and amoxicillin in order to prevent ETEC.

2. INTRODUCCIÓN

2.1 Diarrea postdestete porcina

El intestino no solo es la porción principal del tracto digestivo, sino además, la parte más extensa del sistema inmune animal. El intestino es responsable de la digestión, absorción de nutrientes y protección del organismo frente a toxinas y patógenos. Mantener el intestino en buena condición fisiológica, especialmente en el periodo de transición en porcino, es un pilar básico en el éxito de la producción porcina. La infección por patógenos entéricos es uno de los mayores retos que implican al intestino en la transición porcina.

En las diarreas postdestete porcinas existen numerosos agentes implicados, desde bacterias como *Escherichia coli* y *Clostridium perfringens* tipo C y A hasta los rotavirus, coccidios y *Enterococcus hirae*. Algunos de estos microorganismos son beneficiosos y constituyen parte de la microflora endógena del intestino, pero cambios en la estabilidad de esa microflora causados por una higiene deficiente, alteraciones ambientales o de alimentación pueden dar lugar a procesos diarreicos. Se sabe que los agentes infecciosos más comunes en casos de diarrea postdestete son *Salmonella enterica* (*S. Typhimurium*) y *E. coli*, particularmente el patotipo enterotoxigénico que posee los antígenos fimbriales F4 (K88) y F18. *Lawsonia intracellularis*, *C. perfringens* y *Brachyspira pilosicoli* también pueden estar implicadas, y ocasionalmente *B. hyodysenteriae*. Las diarreas originadas por rotavirus también son frecuentes y se pueden presentar tras el daño intestinal que se produce durante las coccidiosis o colibacilosis.

No hay que olvidar que también existen causas no infecciosas para esta patología. Cualquier cambio repentino en la alimentación puede precipitar el trastorno digestivo, pero los efectos suelen ser de corta duración. En las primeras fases de crecimiento, los cerdos de alrededor de 25 kg de peso vivo, tienden a ser menos tolerantes con los ingredientes del alimento de baja digestibilidad y, por lo tanto, en este grupo de edad, la especificación del alimento es más crítica. Un destete brusco puede originar profundas alteraciones fisiológicas, especialmente un cambio de pH alto a pH bajo en el estómago y un cambio en el perfil de las enzimas digestivas, particularmente las encargadas de tratar el almidón. Al mismo tiempo, el

retraso en el crecimiento de las vellosidades intestinales reduce la capacidad de absorción en el íleon. Estos cambios hacen que el intestino sea más susceptible a los patógenos en el corto plazo a través de cambios en los sustratos que pueden conducir a patrones de fermentación anormales.

Además se puede producir la ulceración gástrica después del destete, cuando los lechones tienen una ingesta de alimento errática o no comen realmente en las primeras 24-48 horas después del destete, lo que también puede dar lugar a la perturbación de la flora intestinal.

El uso excesivo de antibióticos para una variedad de afecciones también puede causar una alteración grave de la flora intestinal, lo que permite la proliferación de patógenos. Esto conduce a una diarrea persistente, a menudo exacerbada por la administración de un curso adicional de antibióticos en un intento fútil de controlar una situación precipitada por el tratamiento con antibióticos en primer lugar. El uso prolongado de sulfonamidas para el control de *Streptococcus suis* o *Haemophilus parasuis* pueden seleccionar cepas resistentes de *E. coli* y *Salmonella* spp., que pueden conducir a síntomas entéricos que son más difíciles de controlar.

Las malas condiciones de almacenamiento e higiene del pienso pueden conducir a la oxidación de las grasas, al desarrollo de micotoxinas y a la contaminación accidental con muchos tóxicos, todo lo cual puede precipitar o agravar la diarrea. Los factores antinutricionales en las materias primas que pueden precipitar la diarrea episódica incluyen saponinas, fitatos, lectinas e inhibidores de tripsina, pero los mecanismos siguen siendo poco conocidos (Matthew *et al.*, 2013).

2.2 Importancia económica

Las diarreas postdestete suponen una pérdida económica importante para la ganadería porcina. Los lechones muestran una mayor tasa de mortalidad y morbilidad, una disminución de la ganancia media diaria, un bajo peso al comienzo de la transición y alto riesgo de contraer otras enfermedades. Se estima que pueden suponer un coste de hasta 40 euros por cerda y año (Sjolund *et al.*, 2014).

Por este motivo, es importante el conocimiento de su etiología y la aplicación de las medidas de control, ya que dichas acciones reducen la mortalidad y morbilidad de los

animales, lo cual se hace más patente con la práctica continua. El resultado de las medidas se traduce en el beneficio económico directo para la empresa. (Claver, 2016).

2.3 Etiología: *Escherichia coli*

E. coli es una enterobacteria que forma parte de la microbiota intestinal de animales y personas, y en la mayoría de los casos actúa como comensal.

Sin embargo, existen cepas que han adquirido una variedad de factores de virulencia, como adhesinas y toxinas, lo que les confiere un carácter patógeno. Ciertos patotipos de *E. coli* constituyen una de las causas más importantes de la diarrea postdestete en el porcino.

Las cepas patógenas, una vez colonizado el intestino, se unen a un receptor específico en la membrana celular de las células epiteliales intestinales mediante la unión de fimbrias y también de forma no específica en el moco que cubre el epitelio intestinal. Posteriormente, liberan toxinas que son transportadas al interior de los enterocitos. Estas toxinas pueden ser endotoxinas (parte de los lipopolisacáridos, elevadas dosis pueden causar shock septicémico), enterotoxinas (proteínas o polipéptidos causantes de diarrea secretora. Existen varios tipos de enterotoxinas: Termolábiles (LT), Termoestables (ST)) y citotoxinas como la hemolisina o shiga-toxina (STx) (Kaper *et al.*, 2004).

La clasificación en patotipos se basa en los factores de virulencia que poseen los diferentes tipos de cepas de *E. coli* (Tabla 1).

Tabla 1. Principales patotipos, adhesinas y toxinas de *E. coli* en cerdos responsable de la diarrea neonatal y postdestete (Luppi., 2017).

Patotipo	Adhesinas	Toxinas	Enfermedad
ETEC	F5 (K99), F6, F41	Sta	Diarrea neonatal
	F4 (K88)	STa, STb, LT, α -hemolisina	
	F4 (K88)	STa, STb, LT, EAST-1, α -hemolisina	Diarrea postdestete
	F18	STa, STb, LT, Stx2e, α -hemolisina	
EPEC	Eae	-	Diarrea postdestete

ETEC: La diarrea provocada por el *E. coli* enterotoxigénico, también se conoce como colibacilosis entérica postdestete, los efectos de las toxinas se explicarán de forma más detallada en la siguiente sección. Se caracteriza por un color amarillento y consistencia muy líquida y pH alcalino. En ocasiones pueden aparecer vómitos. Esta patología en cerdos en transición puede inducir diarrea durante las primeras 2 semanas del periodo posterior al destete, lo que generalmente resulta en deshidratación, reducción de la ganancia de peso y muerte si no se instaura un tratamiento y rehidratación adecuados. Los lechones se presentan deprimidos, con el abdomen flácido y hundido y el pelo en mal estado y color grisáceo. La severidad de la diarrea postdestete se ve favorecida adicionalmente por varios factores, como el estrés del destete, los cambios en la dieta y la deficiencia de anticuerpos en la leche de la cerda. Las lesiones incluyen un estómago lleno e inflamado con infartos venosos, el intestino está dilatado y congestivo con los vasos quilíferos llenos. Además las asas intestinales están distendidas con contenido acuoso-espumoso y amarillento que puede llegar a hemorrágico. (Apolaya *et al.*, 2016)

El ETEC F18+ productor de la toxina Shiga (Stx2e), se le conoce como STEC y produce la Enfermedad de los edemas. En esta enfermedad STEC provoca lesiones en las arterias desencadenando el edema ocular, el edema facial, signos nerviosos y la muerte súbita en casos extremos. Se pueden observar tres formas características:

Posterior al destete, entre los 5-7 días: son características la anorexia temporal y disbiosis de la microflora digestiva, que permite la proliferación de las cepas de *E. coli* responsables de la clínica de edemas en esos primeros días posteriores al destete.

Entre las 6-8 semanas de vida, asociadas normalmente a los cambios de alimentación. Las lesiones características son la enteritis con edema de la submucosa y vasculitis, edema en nódulos mesentéricos y pulmón, con contenido acuoso en colon. No se observan edema facial ni de colon.

Presentaciones tardías, producidas generalmente por fallos de manejo de la alimentación en lechones y o cerdos de todos los rangos de peso dentro de la misma edad. En ellos se podrá observar la enfermedad de los edemas con las típicas lesiones edematosas faciales, oculares y signos nerviosos.

EPEC: La patología provocada por el *E. coli* enteropatogénico no se debe a las toxinas, como en el caso anterior, sino a las lesiones que produce por la adherencia y destrucción de las microvellosidades de los enterocitos al colonizar la mucosa intestinal y reducir la superficie

de absorción. La diarrea desencadenada por la enteritis catarral tiene aspecto mucoso, diferente a la anterior que era mucho más líquida, y llega a hacerse crónica con un color amarillento. Los animales se encuentran letárgicos, apáticos y disminuidos de peso (DebRoy *et al.*, 2000).

Tras el destete, los cambios en la alimentación hacen que la colonización por *E.coli* en el intestino sea más efectiva. La dieta es uno de los factores más importantes que va a determinar el curso de la enfermedad. El óxido de zinc en niveles por encima de 2400ppm en el alimento reduce la gravedad de esta patología. (Riopérez, J. y Rodríguez, M^a L. (2002)).

2.4 Factores de virulencia de ETEC

La diarrea postdestete está causada mayoritariamente por ETEC, un patotipo caracterizado por la presencia de adhesinas, que median en la adherencia de la bacteria al intestino, y la producción de enterotoxinas. Las principales fimbrias presentes en cepas de origen porcino son F4 (K88) y F18. Además, ciertas cepas de ETEC también producen alfa-hemolisina, y en ese caso las colonias bacterianas pueden observarse con zonas de hemólisis en el medio de cultivo agar sangre.

Un segundo patotipo de *E.coli* que está implicado en la diarrea postdestete es el EPEC, el cual es capaz de adherirse y provocar destrucción de las vellosidades del intestino delgado.

Se ha demostrado que estas fimbrias juegan un papel en la colonización de ETEC en la diarrea postdestete.

Fimbrias F4

Las fimbrias F4 aparecen como 3 variantes antigénicas (F4ab, F4ac y F4ad). La "a" es un factor antigénico común y "b", "c" y "d" son factores específicos. Estas 3 variantes de F4 tienen composiciones de aminoácidos ligeramente diferentes en su subunidad principal. Las principales subunidades de F4ab y F4ad están compuestas por 264 residuos de aminoácidos, mientras que la subunidad principal de F4ac tiene 262 residuos de aminoácidos. Entre las 3 variantes de F4, la F4ac es la más frecuente.

Hace algunos años la F4ab se detectaba con relativa frecuencia, sin embargo actualmente la F4ac es el tipo predominante en todo el mundo. Las tres variantes no solo representan las variaciones antigénicas, sino que también muestran las diferentes

especificidades de receptores. Hay cerdos que son susceptibles a los tres tipos, otros que sólo lo son a dos, a uno o ninguno y son resistentes.

La fimbria F4 no se encuentra codificada en plásmidos como la anterior. Sus genes están organizados en un operón de 10 genes, algunos forman una gran subunidad fimbrial FaeG que codifica la adhesina de la fimbria, en el caso de la F18 ésta subunidad es mucho más pequeña. (Rhouma *et al.*, 2017).

Fimbrias F18

La fimbria F18 se muestra como apéndices largos y flexibles que protruyen de 0,5 a 1,5 µm de la superficie de la bacteria con un patrón característico en zigzag. Generalmente aparecen de 100 a 300 fimbrias distribuidas por la superficie. Las fimbrias se pueden clasificar morfológicamente en 2 categorías: pili y fibrillas. El pili tiene estructuras rígidas (7 a 8 nm de diámetro y un agujero axial), mientras que las fibrillas son relativamente delgadas y flexibles con un diámetro indefinido. Las fimbrias F18, que pertenecen a las fibrillas, son filamentos de 1 a 2 mm de longitud basados en una proteína estructural principal llamada FedA (15.1 kDa) con un patrón en zigzag alrededor del eje helicoidal.

La fimbria F18 aparece como dos variantes antigénicas, F18ab y F18ac. La fimbria F18ab se encuentra principalmente en STEC y ETEC, y tienen poca expresividad en los ensayos *in vitro*, al contrario que la fimbria F18ac. Las cepas ETEC F18+ generalmente producen enterotoxinas termoestables (STa y STb), y de forma menos frecuente producen las enterotoxinas termolábiles (LT). Los genes que codifican a la fimbria F18ab se sabe que están codificados en la bacteria en plásmidos.

A pesar de la estrecha relación entre la fimbria F18 y la diarrea postdestete, ésta puede variar según la localización de la explotación y el tiempo. Además, algunos cerdos carecen del receptor para esta fimbria y por lo tanto son resistentes a la ETEC F18+. Una sencilla prueba de PCR puede identificar a los cerdos resistentes y sensibles.

Los genes que codifican las fimbrias se regulan con la temperatura y se expresan a 37°C pero no a 18°C. (Luppi *et al.*, 2016).

Enterotoxinas termolábiles (LT)

Las enterotoxinas termolábiles o LT, son enterotoxinas de estructura proteica tipo A-B, en la cual la subunidad enzimática A se asocia en una unión no covalente con la subunidad B

pentamérica, la cual produce la unión entre la toxina y su receptor. Ambas subunidades se producen en el citoplasma de la bacteria y la toxina se libera en vesículas de membrana.

La LT se une a sus receptores en la superficie de las células epiteliales intestinales, con una gran afinidad por la GM1 monosialotetrahexosylgangliosido, cada subunidad B se une a una de éstas moléculas fuertemente. La LT es introducida en la célula por endocitosis y, por transporte retrógrado, llega al retículo endoplasmático. Finalmente el fragmento A1 es liberado en el citosol. El resultado final es una alteración en la cascada energética y un nivel excesivo de adenosina monofosfatasa cíclica (AMPc) (Figura 1) (DeRoy y Maddox, 2001).

Enterotoxinas termoestables (STa y STb)

Las enterotoxinas termoestables incluyen la STa y la STb. La primera en ser descubierta fue la variante STa, una molécula peptídica de bajo peso molecular que consiste en 18 o 19 aminoácidos con 3 uniones disulfuro. Es hidrosoluble y también soluble en metanol, resiste la cocción durante 15 minutos, la digestión con enzimas proteolíticas y la exposición a ácido y es inactivada por agentes destructores de la unión disulfuro.

La STb es un péptido compuesto por 48 aminoácidos con 4 restos de cisteína implicados en 2 enlaces disulfuro. La STb no es soluble en metanol, pero puede ser digerida por enzimas proteolíticas y está estrechamente relacionada con la diarrea en lechones (Sun, Y. y W. Kim, S. 2017). Esta toxina una vez internalizada, estimula la secreción de HCO_3^- de los enterocitos mediante la alteración del transporte electrolítico de las células intestinales, lo que provoca su acumulación, junto con elevadas concentraciones de Na^+ y Cl^- , en la luz intestinal. (Dubreuil, 2008).

La STa parece estar específicamente asociada con ETEC y causa la enfermedad en animales recién nacidos, pero también puede causar diarrea postdestete en cerdos junto con algunas otras enterotoxinas. Se une a un receptor transmembrana tipo guanilato ciclasa de tipo C y activa el dominio guanilato ciclasa en los enterocitos, lo que da como resultado un aumento de las concentraciones intracelulares de GMP cíclico (GMPc). El aumento de los niveles de GMPc da como resultado una secreción aumentada de Cl^- y H_2O y una inhibición de la absorción de Na^+ en el intestino delgado (Dubreuil, 2008).

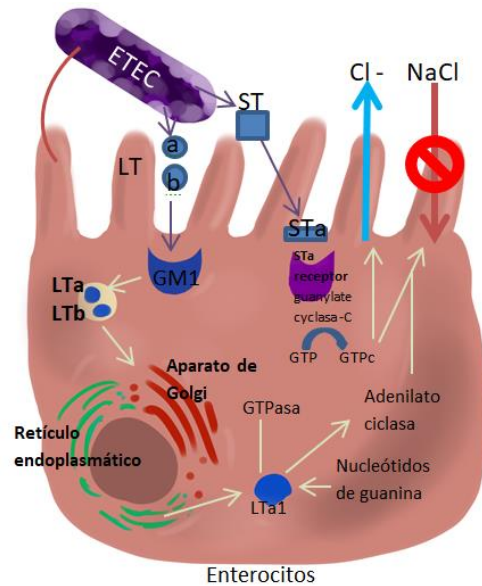


Figura 1. Patogenicidad de *E. coli* enterotoxigénico (ETEC)

2.5 Control tradicional de la infección por *E. coli*

Diagnóstico

El diagnóstico de la infección por ETEC debe incluir el diagnóstico etiológico y la detección de factores de virulencia, como adhesinas y enterotoxinas.

Para el diagnóstico etiológico se deben recoger muestras intestinales o fecales de los animales afectados con hisopos en medio Amies y realizar un cultivo microbiológico en agar MacConkey o un medio cromogénico específico. Después se diagnostican los factores de virulencia que pueden detectarse mediante pruebas tradicionales *in vitro* que incluyen la prueba de aglutinación con látex deslizante y ELISA. Las fimbrias adhesivas se pueden detectar de manera eficiente *in vitro* mediante un método de inmunofluorescencia usando anticuerpos monoclonales o policlonales absorbidos antifimbriales. A diferencia de las fimbrias, las enterotoxinas son mucho más difíciles de detectar *in vitro* con métodos tradicionales, lo que hace necesario desarrollar algunas técnicas avanzadas a nivel molecular. Los métodos de detección molecular basados en ADN (PCR e hibridación de ADN) generalmente se usan para detectar factores de virulencia conocidos. Sin embargo, los métodos tradicionales de detección de ETEC son aún necesarios antes de medir la expresión genética y descubrir nuevos factores de virulencia. (Mackinnon, 2015).

Tratamiento

Hay un amplio rango de antibióticos que se pueden emplear con buena eficacia para esta patología. Sin embargo, cada vez es más frecuente la existencia de resistencias a estas moléculas obligando a realizar antibiogramas para la elección del principio activo más adecuado. Los antibióticos más usados que son activos frente a Gram- son las polimixinas (colistina), aminoglucósidos (neomicina y apramicina) y β -lactámicos (amoxicilina-clavulánico).

Al afectar la infección a la superficie del intestino, las terapias orales vía agua o pienso son muy utilizadas ya que se pueden emplear moléculas de baja o nula absorción.

Como tratamientos sistémicos inyectables se encuentran las quinolonas, los β -lactámicos como cefalosporinas y amoxicilina-clavulánico, etc. Se debe asegurar un uso racional de los antibióticos, comprobando la sensibilidad de la bacteria diana, y respetar los usos registrados para cada producto concreto. Es importante tener en cuenta que los tratamientos antibióticos también pierden eficacia y favorecen el desarrollo de resistencias cuando no se siguen las pautas indicadas en lo que se respecta a la dosis, intervalos o duración del tratamiento.

El tratamiento sintomático mediante el empleo de rehidratantes orales o intraperitoneales está indicado en estos casos para corregir la deshidratación y la acidosis metabólica, y reduce el número de bajas, mejorando su administración el estado de los animales. (Hevia-Miranda *et al.* (2017)).

2.6 Prevención

Las principales medidas para la profilaxis de la colibacilosis incluyen actuaciones sobre el ambiente, la vacunación y la dieta, incluido el empleo de diferentes aditivos. (Apolaya *et al.*, 2016).

- Inmunoprofilaxis: La inmunización activa de la mucosa intestinal es necesaria para proteger a los cerdos recientemente destetados debido a su falta de inmunidad lactógena pasiva. Las vacunas para la diarrea postdestete deben ser capaces de activar el sistema inmune de la mucosa y las respuestas de inmunoglobulinas específicas de antígeno para inducir una inmunidad protectora de la mucosa. Existen vacunas comerciales para *E.coli* junto con *Clostridium* que contienen bacterinas con las principales cepas, antígenos fimbriales y enterotoxinas. También existen las vacunas de subunidades con

antígenos fimbriales y enterotoxinas purificadas. En el caso de detectar cepas o factores de virulencia poco habituales está recomendado el uso de autovacunas. Con el tiempo es necesario actualizar las vacunas dada la presión selectiva que ejercen estas sobre *E.coli*, puesto que se desarrollan en mayor medida aquellas cepas frente a las que no protegemos. (Matías *et al.*, 2017).

- Minerales antimicrobianos: Se ha demostrado que el óxido de zinc tiene un papel importante en el mantenimiento de la integridad y la función de la barrera epitelial intestinal. Existen estudios han demostrado que el uso de óxido de zinc (ZnO) mejoró el rendimiento de crecimiento de los cerdos en transición y redujo los daños a las membranas celulares en los enterocitos inducidos por la infección con ETEC F4+. Nusrat *et al.*, (2000) indicaron que la efectividad del ZnO en cerdos de transición no solo se debía a su actividad antibacteriana, sino también a la mejora de la función y unión de las células epiteliales del intestino mediante la modulación de citoquinas inflamatorias.
- Antibióticos profilácticos: Antibióticos añadidos en la dieta de los lechones, como penicilinas, sulfametazonas o clortetraciclinas, son útiles y tienen efectos beneficiosos sobre el crecimiento de los lechones y como tratamiento preventivo contra las colibacilosis. Sin embargo, el estudio de Looft *et al.*, (2012) determinó que también se produce un aumento en los genes funcionales microbianos. Los resultados también indicaron que los genes para la resistencia bacteriana a los antibióticos aumentan en cantidad y diversidad en la flora intestinal. Incluso, hubo resistencia a antibióticos que no se administraron en el estudio.

De forma menos común se han empezado a emplear alternativas como:

- Plasma sanguíneo: Ha demostrado un efecto inhibitor sobre la colonización intestinal de ETEC, protegiendo a los cerdos que poseen el receptor F4 y pueden desarrollar la colibacilosis, además reduce la respuesta inflamatoria inducida por ETEC y mejora el rendimiento del crecimiento de los animales (Sun *et al.*, 2017)
- Anticuerpos de la yema de huevo: Los anticuerpos de yema de huevo obtenidos de gallinas ponedoras inmunizadas con antígenos fimbriales bacterianos específicos son una fuente relativamente económica de

anticuerpos con la capacidad de proteger contra la infección por ETEC en cerdos. Por otro lado, algunos estudios no observaron diferencias en la incidencia de diarrea o mortalidad cuando los cerdos fueron alimentados con anticuerpos de la yema de huevo. Se necesitan más estudios para validar su papel antes de una aplicación práctica en la alimentación de cerdos en transición.

- Probióticos: Preparaciones que contienen microorganismos vivos que influyen positivamente en la colonización y composición de la microflora intestinal y tienen un efecto estimulante sobre los procesos digestivos y la inmunidad del huésped. Son tales como *Sterptococcus faecium*, *Bifidobacterium lactis* o *Bacillus toyoi*, y resultan eficaces para reducir la infección intestinal de ETEC patógena y las respuestas inflamatorias intestinales.
- Fitobióticos: Los aditivos fitobióticos para piensos son productos derivados de plantas que se suministran a los piensos para mejorar el rendimiento de crecimiento de los cerdos al mejorar la salud intestinal. Los fitobióticos comprenden una amplia variedad de hierbas, especias y productos derivados de los mismos, y son principalmente aceites esenciales.
- Bacteriófagos: Son un grupo de virus que infecta bacterias y destruyen a esas bacterias infectadas con alta especificidad de especie. En un estudio se aisló un bacteriófago específico (PP01) de las heces de cerdos resistentes a la infección por *E. coli* O157: H7, y su alta concentración en las heces de estos cerdos podría indicar su capacidad de suprimir la ETEC en el huésped.
- Nucleótidos: Los nucleótidos actúan como moléculas bioactivas que desempeñan un papel en las funciones metabólicas, estructurales y reguladoras, así como en el mantenimiento del sistema inmune y el equilibrio de re-dox. La suplementación dietética con nucleótidos en dietas de lechones en transición ha mostrado efectos positivos sobre el rendimiento del crecimiento, la hiperemia intestinal y la estimulación de la inmunidad.
- Acidificantes: Ácidos orgánicos que modifican el pH del medio intestinal favoreciendo la persistencia de la flora endógena natural y perjudicando el

crecimiento de otros patógenos en el intestino, de los cuales hablamos más detalladamente en la siguiente sección.

Además, el control sobre el ambiente es muy importante para prevenir la patología. Ejercer un importante presión sobre la bioseguridad de la explotación con vacíos sanitarios, limpieza, desinfección y secado, manejo todo dentro/todo fuera. Tener una adecuada calidad del agua también ayuda a prevenir casos de colibacilosis. Se pueden emplear métodos como la cloración y acidificación del agua. (Fairbrother *et al.*, 2005).

2.7 Ácidos orgánicos como alternativa

El ácido clorhídrico secretado en el estómago puede actuar como un químico antibacteriano y contribuir a la integridad de la barrera intestinal contra los patógenos. Sin embargo, durante el destete, la ingesta de alimentos sólidos aumenta el pH del tracto gastrointestinal. Por lo tanto, la suplementación dietética de ácidos orgánicos podría ser una forma efectiva de controlar el pH del tracto gastrointestinal y el crecimiento de bacterias en el estómago y el intestino a estas edades. De hecho, se ha convertido en una estrategia nutricional importante dirigida a la mejora, el rendimiento y el estado de salud de los lechones alimentados con dietas sin promotores de crecimiento antibacterianos.

Los efectos antimicrobianos de estos ácidos son principalmente la modulación del pH extracelular, que permite una proliferación superior de las bacterias lácticas, las cuales compiten por el sustrato con otras bacterias patógenas como ETEC, y el efecto de la forma no disociada de los ácidos que disminuye el pH intracelular, provocando la muerte una vez que penetra en la célula (Creus *et al.*, 2014).

En estudios anteriores, la adición de ácido láctico o cítrico fue efectiva para prevenir la diarrea postdestete y mejorar el crecimiento de los cerdos en transición (Mohana *et al.*, 2016). Además la suplementación dietética del ácido fórmico redujo la excreción fecal de *E. coli* total, mientras que mejoró la morfología intestinal y el rendimiento del crecimiento de los cerdos en transición. (Mohana *et al.*, 2016).

Por otro lado, el uso de ácidos aumenta la digestibilidad de la materia seca en lechones destetados. El aumento en la digestibilidad de los nutrientes podría deberse a la mayor actividad microbiana en el tracto gastrointestinal, dado que se favorece la flora intestinal. Otro de los beneficios es el aumento de la concentración de linfocitos y glóbulos blancos (WBC) en

sangre, y disminución del valor del pH de la ingesta en el tracto gastrointestinal en lechones, principalmente debido a sus actividades antibacterianas y antifúngicas.

Como conclusión de otros estudios se sabe que, durante un brote de diarrea postdestete, la suplementación dietética de varios ácidos orgánicos podría ser efectiva para reducir la aparición y la gravedad de la diarrea y la presencia de ETEC F4 + en el intestino (Che *et al.*, 2012).

De forma general se puede concluir que los ácidos orgánicos en la dieta promoverían una mayor ganancia de peso diaria, un menor índice de conversión y reducirían la incidencia de diarrea postdestete, por lo que resultan una atractiva alternativa a la profilaxis antibacteriana en la dieta actual (Tsiloyiannis *et al.*, 2001).

3. JUSTIFICACIÓN Y OBJETIVOS

En las últimas décadas se ha detectado un incremento de brotes de diarrea que se ha asociado a *E.coli* que muestra ocasiones una multiresistencia a un amplio rango de antimicrobianos incluyendo la apramicina, trimetoprim-sulfamida, espectinomicina y neomicina. El uso de antibióticos como promotores de crecimiento como la Avoparcina, Bacitracina, Spiromicina, Tylosina y Virginiamicina y también como profilácticos está directamente asociado con el incremento de la diarrea, pérdida de peso y mortalidad provocados por *E.coli* en cerdos de postdestete, así como con el desarrollo de resistencias antibióticas (Pérez *et al.*, 2011).

Según el estudio realizado por Pérez *et al.* (2011), se han observado un mayor porcentaje de resistencia frente a tetraciclina y estreptomina. Dependiendo del área geográfica, esta resistencia puede variar del 75-97%, como se observó en la provincia de Villa Clara donde se desarrolló el estudio.

Actualmente algunos antibióticos como la colistina, que se han venido utilizando frente a infecciones entérica por gram -, (e. coli, salmonella) han visto limitadas sus indicaciones veterinarias debido al desarrollo de resistencias y a ser un antimicrobiano de último recurso en medicina humana (Pérez *et al.*, 2011).

El mayor peligro posible del desarrollo de resistencias por parte de estas bacterias es que, a pesar de la especificidad de especie del *E.coli* enterotoxigénico, existe la posibilidad de

que la bacteria sufra una mutación que le permita infectar a los seres humanos siendo resistente a varios antibióticos terapéuticos, resultando en una zoonosis de difícil tratamiento y un peligro relevante para la salud pública. O a la transmisión horizontal de genes de resistencia a cepas humanas.

Otros posible peligro del uso inadecuado de antibióticos es la presencia de sus residuos en carne de consumo humano que no ha pasado los controles apropiados y ha llegado hasta la cadena alimentaria. El consumo de dosis inferiores a las terapéuticas puede producir resistencias en las propias bacterias de la flora del ser humano de forma directa. Por suerte los controles de la cadena alimentaria son suficientemente rigurosos para que este peligro también esté considerado de bajo riesgo (Pérez *et al.*, 2011). Con el fin de aliviar la presión de las multiresistencias a los antimicrobianos y la presencia residual en la carne, es imprescindible desarrollar estrategias profilácticas alternativas para el control de la enfermedad.

Los ácidos orgánicos han demostrado ser efectivos y una posible alternativa para la prevención de la diarrea postdestete en cerdos de transición y su uso se extiende cada vez más. Sin embargo, cada ácido orgánico tiene un efecto inhibitorio diferente para cada microorganismo patógeno, siendo unos más sensibles que otros al mismo ácido.

El objetivo de este trabajo es evaluar el efecto del consumo de ciertos ácidos orgánicos adicionados al pienso en la población de *E. coli* intestinal de lechones en la fase de transición, así como determinar si tiene algún efecto beneficioso en la reducción de ETEC.

4. METODOLOGÍA

4.1. Productos usados

El estudio se basó en la administración de dos ácidos orgánicos en la dieta:

- Ácido fórmico monoesterificado (MOLI MC1, Molimen SL, Barcelona)
- Butirato sódico protegido (DICOSAN+, Norel SA, Madrid)

El MOLI MC1 es un ácido fórmico esterificado en forma de glicérido, principalmente en forma de *1-monoglicérido*. La esterificación consiste en la síntesis de un éster a partir de la reacción química entre un ácido carboxílico y un alcohol. Esto le proporciona al aditivo una mayor resistencia a la disociación y le permite ser efectivo a nivel intestinal, a diferencia del

ácido fórmico. Este producto destaca por su potente actividad antimicrobiana y, según datos de BASF Española (2015), éste ácido es especialmente efectivo frente a bacterias patógenas como *E. coli* o *Salmonella spp.*, y tiene capacidad de resistir temperaturas de granulación y extrusión. Además, presenta la ventaja de no ser corrosivo y puede administrarse con el agua de bebida, lo que mejora su manejo tanto en fábrica como en la granja.

El DICOSAN+ es una forma de butirato de sodio protegido con una sal de sodio obtenida a partir del destilado de ácidos grasos de coco, principalmente ácido láurico (45-53%) junto con los ácidos cáprico y caprílico ($\approx 10\%$). La sustancia empleada para recubrir el ácido orgánico posee ciertas propiedades antimicrobianas *per se*, y además de recubrir y proteger al ácido de la disociación rápida en el estómago, también es capaz de aumentar su potencial antimicrobiano.

El grupo control, por su parte, consumió la dieta estándar de la explotación, la cual contenía como aditivos óxido de zinc (3,1 kg/T pienso *pre-starter*) y amoxicilina (300 ppm en el pienso *starter*).

4.2. Diseño del estudio

4.2.1. Plan de muestreo

Para este trabajo se seleccionó una granja de cerdas reproductoras situada en Huesca (Aragón, España). En la nave de transición, se dispuso un departamento donde se alojaron a los lechones recién destetados trasladados desde la nave de maternidad y se separaron en cuatro grupos de dos corrales cada uno. El plan de muestreo consistió en adjudicar un grupo para el control (15 machos y 15 hembras), otro para el grupo T1 (15 machos y 15 hembras), y un tercero para el T2 (15 machos y 15 hembras), con un total de 90 animales. Los animales adjudicados a los grupos T1 y T2 se sometieron a un tratamiento con ácidos orgánicos en la dieta (T1: **DICOSAN (3 Kg/t)** y T2: **MOLI MC (20Kg/t)**) entre las fechas de 12 de diciembre del 2017 al 24 de enero del 2018. El grupo control (GC) mantuvo la dieta habitual de la explotación que incluía óxido de zinc y amoxicilina.

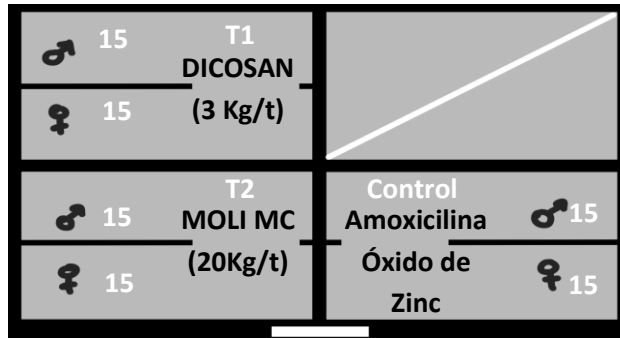


Figura 2. Distribución del muestreo en la nave de transición.

El primer muestreo tuvo lugar el día en el que los animales fueron trasladados de maternidad a la nave de transición (12/12/2017) y consistió en: identificación y registro de los animales mediante crotalado en la oreja izquierda; pesado de los animales de forma individual con una báscula; y recogida de una muestra de heces con ayuda de un hisopo y masaje rectal.

El segundo día de muestreo tuvo lugar el día anterior al traslado de los animales de la nave de transición a la nave de cebo (24/01/2018) y se realizaron los mismos procedimientos que la vez anterior, salvo el crotalado.

A lo largo del estudio se recopiló también información sobre el número de lechones muertos en cada grupo.

4.2.2. Análisis laboratoriales

4.2.2.1. Recuento de *E.coli* (método de las diluciones)

El objetivo de este paso es realizar un recuento de las colonias de *E.coli* para determinar la carga bacteriana de cada individuo.

El método consiste en realizar diluciones seriadas (10^{-1} a 10^{-6}) a partir de 5 gramos de heces en una solución de agua de peptona. A partir de ahí, se siembran 0,1 ml de cada dilución en un medio cromogénico para los organismos coliformes (Chapman-TTC / Tergitol-7 Agar, Laboratorios Microkit, Madrid, España) (Dibujo 3). Se consideran colonias de *E.coli* aquellas colonias amarillas con centro naranja rodeadas de medio amarillo, de acuerdo con las instrucciones del fabricante. El número total de UFC / g de heces se calcula de acuerdo con la fórmula:

$$\text{UFC/g} = n^{\circ} \text{ UFC} \times 1/\text{volumen sembrado} \times 1/\text{dilución empleada}$$

Los resultados del recuento de *E. coli* se expresan como el logaritmo del número de UFC de *E. coli* encontradas (log (UFC/g.)).

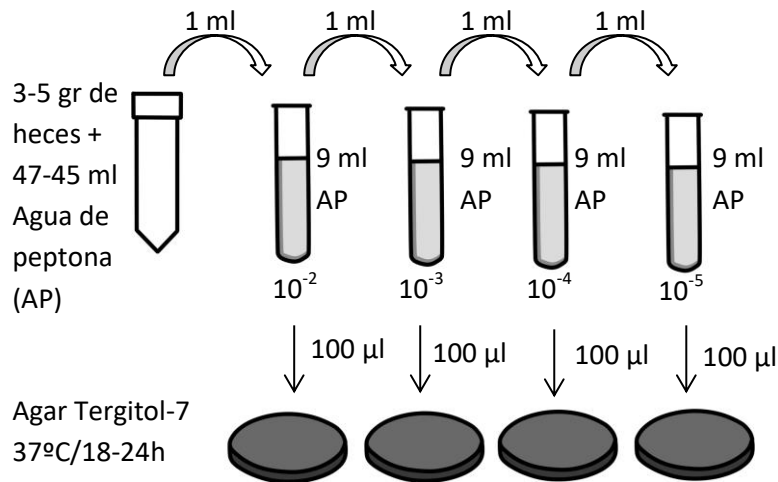


Figura 3. Método de las diluciones.

4.2.2.2. Detección de ETEC

El objetivo de este paso era detectar, mediante PCR, la presencia de los principales factores de virulencia asociados a ETEC en las muestras procedentes de los grupos de estudio.

El método se basa en la detección de ETEC a partir de las mismas muestras utilizadas para el recuento de *E. coli* y consiste en la amplificación mediante PCR de regiones de ADN específicas. La reacción de PCR se lleva a cabo usando cebadores específicos para cinco factores de virulencia que caracterizan ETEC de origen porcino: Fimbrias F4 y F18 y enterotoxinas STa, STb y LT.

En primer lugar, se diluyó un gramo de cada muestra de heces en 9 ml de agua de peptona tamponada (BPW) y se incubó a 37 ° durante 24h. A continuación se diluyó un volumen de 500 μ l de BPW incubado en caldo Luria-Bertani (LB) y se incubó a 37 ° durante 24h. De cada muestra incubada, se guardó 1 ml a -30 ° para el análisis posterior. (Dibujo 4).

La extracción de ADN se llevó a cabo mediante cocción. La detección de F18 se realizó mediante PCR convencional y los genes que codifican F4, STa, STb, LT se detectaron mediante PCR múltiple, de acuerdo con el protocolo descrito por el Laboratorio de Referencia para *E. coli* (ECL, Universidad de Montreal, Canadá): http://www.apzec.ca/en/APZEC/Protocols/APZEC_PCR_en.aspx. Se utilizaron las cepas de referencia ECL 8559 y ECL 14724 como controles positivos en la técnica de PCR.

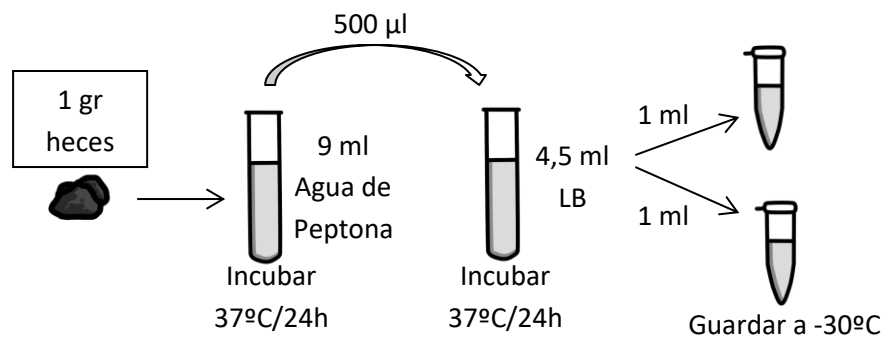


Figura 4. Método obtención de muestras para extracción de ADN.

4.2.3 Análisis estadísticos

Para la comparación de pesos, Ganancia Media Diaria (GMD) y UFC de *E. coli*/g entre el grupo control y los dos grupos tratados se empleó la prueba *t* de Student. Para comparar la prevalencia de genes de virulencia entre los grupos se realizó el test exacto de Fisher (MedCalc Statistical Software version 18.2.1, Ostend, Belgium; <http://www.medcalc.org>; 2018). Se consideró un resultado significativo si $P \leq 0,05$.

5. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

5.1 Tasa de mortalidad

Un total de 29 animales fueron seguidos hasta el final del estudio. La Tabla X muestra los resultados de mortalidad de cada grupo al final del estudio.

Tabla 2. Mortalidad estimada para cada grupo

	N	Nº muertos	% mortalidad	<i>P</i> *
GC	29	1	3,45%	0,35 ^a
T1	29	4	13,8%	
T2	29	5	17,2%	0,19 ^b

*Test exacto de Fisher

^aComparación entre GC y T1; ^bComparación entre GC y T2

Aparentemente se observa una mayor mortalidad en los grupos con tratamiento con respecto al control (aunque las diferencias no eran estadísticamente significativas). Sin embargo, aproximadamente la mitad de los animales que murieron en los grupos T1 y T2 lo

hicieron inmediatamente tras el destete, y por lo tanto antes de que el tratamiento pudiera tener algún efecto.

5.2 Peso y ganancia media diaria

La Tabla 2 muestra el peso medio para el GC y el T1 al comienzo y al final del período de transición. En la Tabla 4 se muestra la ganancia diaria media (ADG) para ambos grupos, GC y T1. En las tablas 5 y 6 aparecen los mismos datos para los grupos GC y T2.

El número de lechones pesados al final de la transición fue menor que el inicialmente diseñado debido a un problema con la báscula de pesado una vez que llegamos a la granja, por lo que sólo pudimos pesar ocho lechones del GC, siete del T1 y 8 del T2. En general, los lechones en el T1 fueron significativamente más pesados al inicio del ensayo que los del GC (6,99 kg vs. 6,19). Esta diferencia se mantuvo al final del período de transición, aunque las diferencias no llegaron a ser significativas (21,35 vs. 20,70). La falta de diferencias estadísticamente significativas probablemente se relacionó con el pequeño número de lechones pesados en la segunda vez. De una manera general, estos resultados sugerían que el grupo control se desempeñó mejor que el T1 o T2. De hecho, la ganancia media diaria fue prácticamente la misma para todos los grupos (Tabla 4 y 6).

Tabla 3. Peso medio (kg) Para el grupo control y el grupo tratado con DICOSAN+ (T1) al inicio y final de la transición.

	Inicio de transición		Final de transición	
	Control	T1	Control	T1
N	28	25	8	7
Peso medio	6.19	6.99	20.70	21.35
(95%CI)	(5.9-6.4)	(6.7-7.3)	(19.3-22.1)	(18.9-23.7)
<i>p</i> *	<0.01		0.56	

**t*-test.

Tabla 4. Ganancia media diaria (GMD) en kg. calculada para un periodo de 42 días para el grupo control y el grupo tratado con DICOSAN+ (T1).

	GMD	IC95% (GMD)	<i>P</i> *
Control (N= 8)	0.35	0.31-0.38	0.98
T1 (N= 7)	0.35	0.29-0.40	

**t*-test.

Tabla 5. Peso medio (en kg) para el grupo control (GC) y el tratado con MOLI MC (GT) al inicio y al final de la transición.

	Inicio de transición		Final de transición	
	Control	T2	Control	T2
N	28	26	8	8
Peso medio (IC95%)	6,19 (5,9-6,4)	6,39 (5,9-6,9)	20,70 (19,3-22,1)	20,70 (17,7-23,6)
<i>P</i> *	0,45		1	

**t*-test.

Tabla 6. Ganancia media diaria (GMD) en kg. calculada para 42 días para el grupo control y el tratado con MOLI MC (T2) .

Muestreo	GMD	IC95% (GMD)	<i>P</i> *
Control (N= 8)	0,35	0,31-0,38	0,73
T2 (N= 8)	0,34	0,28-0,39	

**t*-test.

El tratamiento con ácidos orgánicos por lo tanto no implicó una reducción de pesos al final del periodo de transición ni de la ganancia media diaria con respecto al tratamiento convencional con ZnO+amoxicilina.

5.3 Recuento de *E.coli*

La media del recuento de *E. coli* para cada grupo se representa en la Tabla 6.

 Tabla 7. Recuento medio de *E. coli* (log UFC/g) para el grupo control y el grupo tratado con DICOSAN+ (T1) al Inicio y al final del periodo de transición.

	Inicio de transición		Final de transición	
	GC	T1	GC	T1
N	13	10	15	10
Media log UFC/g (95%CI)	8.96 (8.6-9.3)	8.96 (8.4-9.4)	10.88 (10.5-11.2)	10.97 (10.7-11.3)
<i>P</i> *	0.98		0.67	

**t*-test.

Tabla 8. Valores medios (log UFC/g *E.coli*) para el grupo control y el tratado con MOLI MC (T2) al inicio y al final de la transición.

	Inicio transición		Final transición	
	GC	T2	GC	T2
N	13	13	15	12
Media log UFC/g (IC95%)	8,96 (8,6-9,3)	8,91 (8,5-9,3)	10,88 (10,5-11,2)	11,16 (10,4-11,9)
<i>p</i> *	0,81		0,46	

**t*-test.

No se observaron diferencias significativas entre los grupos con respecto al número medio de *E. coli* al comienzo o al final del período de transición. Sin embargo, se observó un aumento significativo en el número de *E. coli* a lo largo del período de transición para ambos grupos. Este aumento en el número total de *E. coli* al final de la transición puede estar probablemente asociado con la maduración de la microbiota intestinal esperada, es decir, la colonización y el establecimiento después del destete.

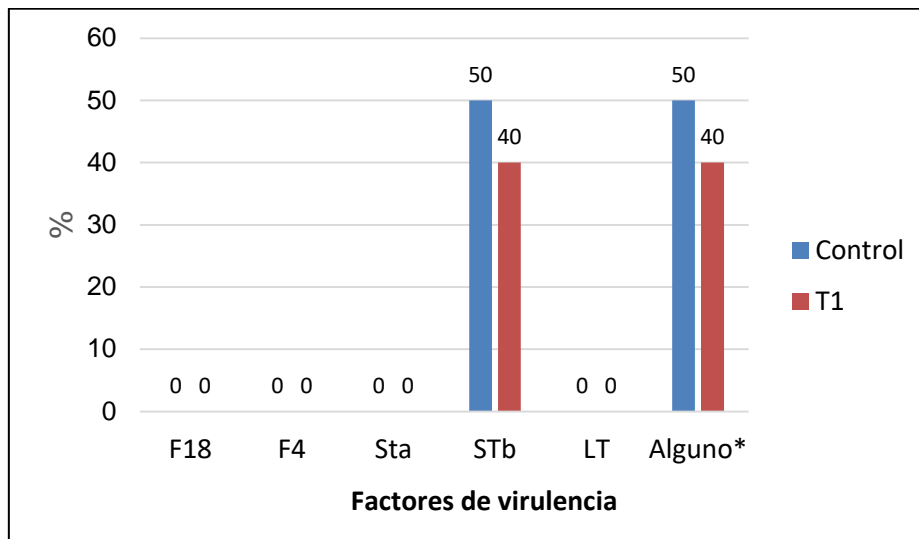
La presencia de carbohidratos fermentables de la nueva dieta en transición se ha observado que estimula el crecimiento microbiano pues las bacterias del colon son capaces de metabolizar los carbohidratos disponibles generando energía para su crecimiento y mantenimiento. Los nutrientes no digeridos y no absorbidos, presentes en la luz intestinal, sirven de sustrato para las bacterias enteropatógenas como ETEC. Las bacterias metabolizan Algunos compuestos específicos de la dieta pueden tener efectos más precisos en especies bacterianas particulares, promoviendo o dificultando su crecimiento. (Reis de Souza *et al.*, 2012).

Por lo tanto, es probable que la mayoría de *E. coli* detectado fueran parte de la microbiota comensal, desarrollada tras el cambio de dieta en transición.

5.4 Detección de ETEC

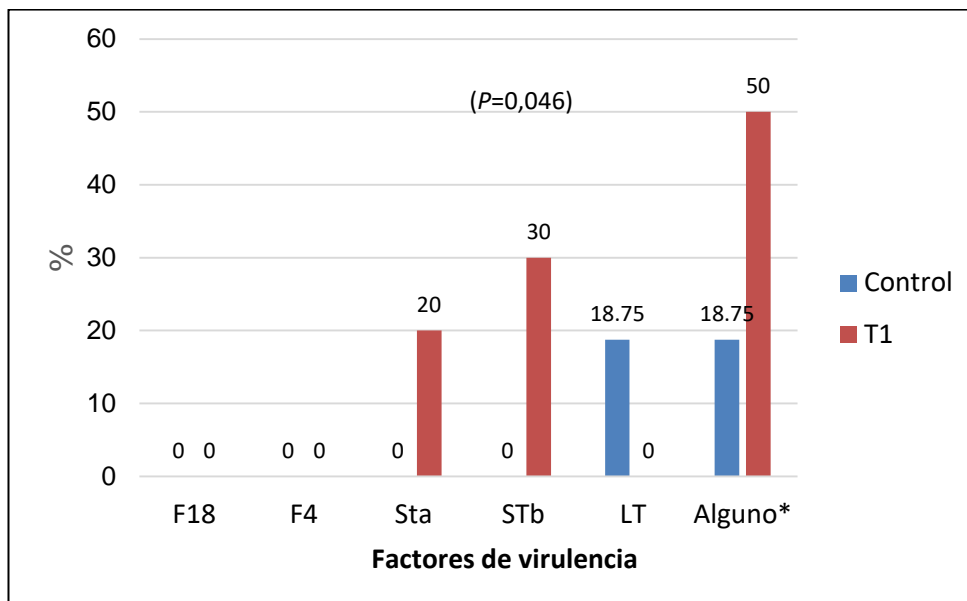
Las Gráficas 2 y 3 representan la proporción de lechones que muestran cualquiera de los factores de virulencia de ETEC buscados tanto al comienzo como al final del período de transición, respectivamente, para el GC vs. T1. Las Gráficas 4 y 5 representan los resultados para el GC vs. T2.

Gráfica 2. Proporción de lechones del grupo control y T1 que presentan algún factor de virulencia (F4, F18, STa, STb y LT) para ETEC al **inicio del periodo de transición**.



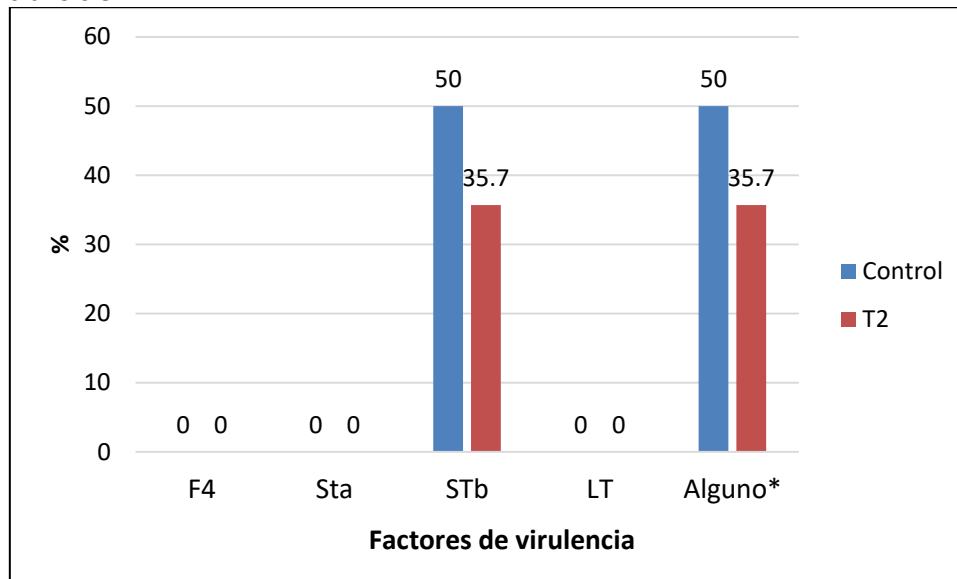
*Alguno (Cualquier factor de virulencia)

Gráfica 3. Proporción de lechones del grupo control y T1 que presentan algún factor de virulencia (F4, F18, STa, STb y LT) para ETEC al **final del periodo de transición**.



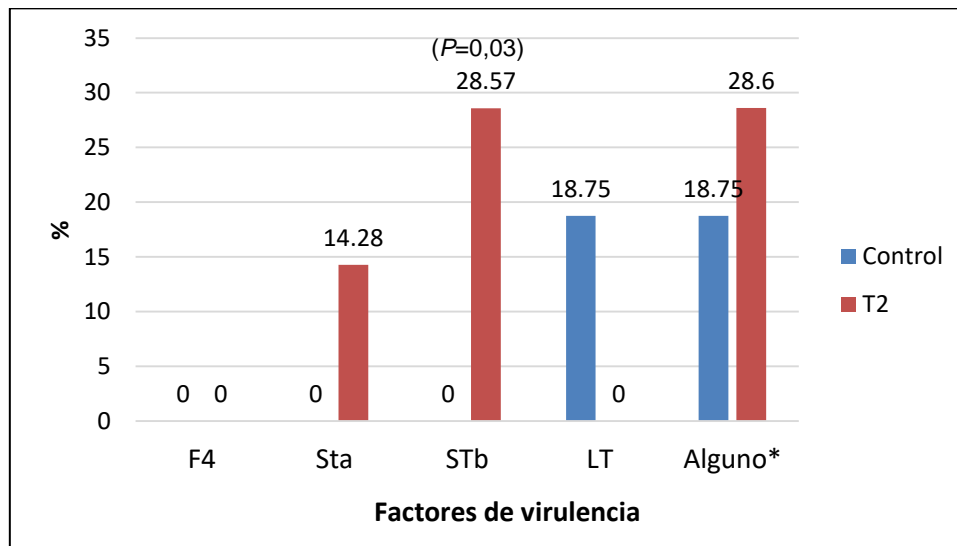
*Alguno (Cualquier factor de virulencia).

Gráfica 4. Proporción de lechones del grupo control y T2 que presentan algún factor de virulencia (F4, STa, STb y LT) para ETEC al **inicio del periodo de la transición**.



*Alguno (Cualquier factor de virulencia).

Gráfica 5. Proporción de lechones del grupo control y T2 que presentan algún factor de virulencia (F4, STa, STb y LT) para ETEC al **final del periodo de la transición**.



*Alguno (Cualquier factor de virulencia).

En la búsqueda de los factores de virulencia de ETEC, solo el gen que codifica la enterotoxina STb se encontró al comienzo de la prueba de campo en todos los grupos y en una proporción similar de lechones (alrededor del 40-50%) (Gráfica 2 y 4). Después del período de transición, STb ya no se detectó en el grupo control, pero LT se identificó en tres animales.

Curiosamente, este último factor de virulencia no estaba presente en el T1 ni en el T2, en el que STa también se detectó junto con STb (Gráficas 3 y 5). Teniendo en cuenta que las fimbrias y las enterotoxinas investigadas en este estudio generalmente están codificadas por plásmidos (DebRoy and Maddox, 2000), es probable que se haya podido producir cierta transferencia genética horizontal entre *E. coli*, lo que explica la presencia de patrones de genes de toxinas algo diferentes en el GC, T1 y T2.

En general, 5 animales en el T1, 4 en el T2 y 3 en el GC presentaron al menos uno de los genes que codifican las toxinas, pero ni el factor de virulencia F4 ni el F18, que codifican las fimbrias F4 y F18 (adhesinas), estuvieron presentes en ninguno de los animales de los grupos. ETEC se caracteriza por presentar al menos una adhesina y una toxina ya que ambas deben estar presentes en la bacteria para poder producir la enfermedad. Por lo tanto, podemos concluir que la ETEC no fue prevalente en la población de lechones considerada en este estudio. Un verdadero GC, es decir, un grupo de lechones sin tratamiento alguno, podría haber ayudado a evaluar la presencia real de ETEC en la transición, pero el ganadero no lo aceptó debido a los riesgos sanitarios y económicos que implicaba. Por lo tanto, la falta de ETEC en la transición puede deberse bien a una ausencia real de este patógeno en este grupo de animales o debido al efecto beneficioso de los tratamientos convencionales y alternativos.

6. CONCLUSIONES

En este estudio no se observan diferencias significativas entre el GC con el tratamiento convencional (ZnO + amoxicilina), y los grupos T1 (DICOSAN +) y el T2 (MOLI MC +) para las variables consideradas, a saber, Ganancia Media Diaria, recuento de *E. coli* y presencia de factores de virulencia de ETEC. En general, podemos concluir que no se observaron diferencias perjudiciales cuando se utilizaron los tratamientos alternativos con ácidos orgánicos frente al tratamiento convencional. ETEC parecía no ser prevalente en esta población, lo que podría ser consecuencia de la efectividad de los tratamientos convencionales y alternativos, o simplemente debido a la ausencia real de ETEC en este lote de cerdos.

No significant differences between the CG with the conventional treatment (ZnO + amoxicillin) and groups T1 (DICOSAN +) and T2 (MOLI MC +) were observed for the variables considered, Average Daily Gain, *E. coli* enumeration and presence of ETEC virulence factors. In general, we can conclude that no harmful differences were observed using alternative treatments with organic acids against the conventional treatment. ETEC seemed not to be

prevalent in this population, which could be either the consequence of the effectiveness of the three of the conventional and alternative treatments, or simply due to the true absence of ETEC in this batch of pigs.

7. VALORACIÓN PERSONAL

Ésta asignatura me ha aportado una experiencia muy importante, considero que aprender a elaborar ya sea un trabajo de investigación o una revisión bibliográfica es una parte fundamental de la educación dentro de una carrera de cualquier campo. No sólo aprendí a buscar información de manera adecuada en fuentes fiables, también a redactar de forma ordenada y precisa y a escribir las referencias bibliográficas de forma correcta.

En el caso de un trabajo de investigación, como éste caso, el seguimiento del proceso de la investigación me ha ofrecido la posibilidad de experimentar el trabajo en varios escenarios, ya sea en campo, en laboratorio e incluso en entrevistas con terceros involucrados en el estudio, lo que ha favorecido mi confianza y desenvoltura en dichos campos.

He considerado muy importante la influencia de los tutores, que han ejercido sobre mí. Han sido los encargados de guiar en el proceso de elaboración, redacción y presentación de este trabajo. Generaron apoyo y dieron consejos aplicables a cualquier trabajo futuro que pudiera elaborar, no solo al Trabajo de Fin de Grado.

En conclusión, es un trabajo con alto valor académico y educativo en mi opinión, que favorece al alumno tanto durante el curso como una vez terminada la carrera.

8. BIBLIOGRAFÍA

- Apolaya, M., Fernández, M. y Saavedra, J. (2016). *Colibacilosis neonatal y de transición: Patotipos, Virotipificación, Patogenicidad, Control y la Autovacuna*. Disponible en: <http://www.actualidadporcina.com/articulos/Colibacilosis-neonatal-y-de-transicion.html>. [Consultado: 05-06-2018]
- APZEC Database (2013). APZEC Database. Disponible en: <http://www.apzec.ca/en/Protocols> [Consultado 23-04-2018]
- B. Kaper, J., P. Nataro, J. y L. T. Mobley, H. (2004). "Pathogenic *Escherichia coli*". *Nature*, 2(), pp. 123-140. DOI: 10.1038/nrmicro818 [Consultado: 02-05-2018]
- Camino, Y. *et al.* (2004). "Uso del ácido acético en la prevención y tratamiento de la colibacilosis porcina". *Revista Computadorizada de Producción Porcina*, 11(2), pp. 46-51. ISSN: 1026-9053. [Consultado: 05-06-2018]
- Claver, M. (2016). *Diarrea post-destete, abordaje integral*. Disponible en: <https://porcino.info/diarrea-post-destete-abordaje-integral/> [Consultado: 04-06-2018]
- Creus *et al.* (2014). "Actualización en el control de la salmonelosis porcina a través de la alimentación (I)". *Avances*, 10, pp. 36-47. DOI: desconocido. Disponible en: https://www.researchgate.net/publication/283894191_ACTUALIZACION_EN_EL_CONTROL_DE_LA_SALMONELOSIS_PORCINA_A_TRAVES_DE_LA_ALIMENTACION_I [Consultado 20-06-2018]
- Che, T. M. *et al.* (2012) "Effect of Dietary Acids on Growth Performance of Nursery Pigs: A Cooperative Study". *Journal of Animal Science*, 90(12), pp. 4408-4413. DOI: 10.2527/jas.2012-5110. [Consultado: 04-06-2018]
- D. Mackinnon, J. (2015). *Differential diagnosis of post-weaning diarrhoea in pigs*. Disponible en: https://www.pig333.com/articles/differential-diagnosis-of-post-weaning-diarrhoea-in-pigs_10484/ [Consultado: 04-06-2018]
- DebRoy, C. y W. Maddox, C. (2001). "Identification of virulence attributes of gastrointestinal *Escherichia coli* isolates of veterinary significance". *Animal Health Research Reviews*, 1(2), pp. 129–140. DOI: 10.1079/AHRR200131 [Consultado: 01-05-2018]
- Dubreuil, J.D. (2008). "*Escherichia coli* STb toxin and colibacillosis: knowing is half the battle". *FEMS Microbiology Letters*, 278(2), pp. 137-145. DOI: 10.1111/j.1574-6968.2007.00967.x [Consultado 21-06-2018]

- Hevia-Miranda *et al.* (2017). *Etiología y control de la colibacilosis porcina*. Disponible en: <http://albeitar.portalveterinaria.com/noticia/15836/articulos-porcino/etiologia-y-control-de-la-colibacilosis-porcina.html> [Consultado: 04-06-2018]
- L. Pérez, L. *et al.* (2011). *Sensibilidad y resistencia a drogas antimicrobianas en aislados de e. Coli procedentes de cerdos con síndrome diarreico*. Disponible en : <https://www.engormix.com/porcicultura/articulos/resistencia-antomicrobiana-en-cerdos-t28788.htm> [Consultado: 04-06-2018]
- Luppi *et al.* (2016). "Prevalence of virulence factors in enterotoxigenic Escherichia coli isolated from pigs with post-weaning diarrhoea in Europe". *Porcine Health Management*, (2016), pp. 2-20. DOI: 10.1186/s40813-016-0039-9 [Consultado: 01-05-2018]
- Luppi, A. (2017). "Swine enteric colibacillosis: diagnosis, therapy and antimicrobial resistance" *Porcine Health Management*, 3(16), pp. 1-18. DOI: 10.1186/s40813-017-0063-4. [Consultado 20-06-2018]
- M. Fairbrother, J., Nadeau, E. y L. Gyles, C. (2005). "Escherichia coli in postweaning diarrhea in pigs: an update on bacterial types, pathogenesis, and prevention strategies". *Animal Health Research Reviews*, 6(1), pp. 17-39. DOI: 10.1079/AHR2005105 [Consultado: 01-05-2018]
- Matías, J. *et al.* (2017). "Maternal Vaccination. Immunization of Sows during Pregnancy against ETEC Infections". *Vaccines (Basel)*, 5(4), pp. 44-48. DOI: 10.3390/vaccines5040048. [Consultado: 04-06-2018]
- Matthew *et al.* (2013). "Recent Advances in Understanding Enteric Pathogenic Escherichia coli". *Clinical Microbiology Reviews*, 26(4), pp. 822-880. DOI: 10.1128/CMR.00022-13 [Consultado: 30-04-2018]
- Reis de Souza, T. *et al.* (2012) "Nutritional changes in piglets and morphophysiological development of their digestive tract". *Veterinaria México*, 43(2). ISSN: 0301-5092. [Consultado: 05-06-2018]
- Rhouma *el al.* (2017). "The fecal presence of enterotoxin and F4 genes as an indicator of efficacy of treatment with colistin sulfate in pigs". *BMC Microbiology*, 17(6). DOI: 10.1186/s12866-016-0915-0 [Consultado: 23-04-2018]
- Riopérez, J. y Rodríguez, M^a L. (2002). "Principales patologías específicas del lechón (II)". *Mundo ganadero*, (enero, 2002), pp. 50-54. DOI: desconocido. [Consultado: 04-06-2018]

- S. Mohana, D., Y. Lee, K. y H. Kim, I. (2016). "Analysis of the effect of dietary protected organic acid blend on lactating sows and their piglets". *Revista Brasileira de Zootecnia*, 45(2), pp. 39-47. DOI: desconocido. [Consultado 24-04-2018]
- Sun, Y. y W. Kim, S. (2017). "Intestinal challenge with enterotoxigenic *Escherichia coli* in pigs, and nutritional intervention to prevent postweaning diarrhea". *Animal Nutrition*, 3(4), pp. 322-330. DOI: 10.1016/j.aninu.2017.10.001. [Consultado 03-6-2018]
- Tsiloyiannis *et al.* (2001). "The effect of organic acids on the control of porcine post-weaning diarrhea". *Veterinary Science*, 70, pp. 287–293. DOI: 10.1053/rvsc.2001.0476. [Consultado 23-04-2018]

9. ANEXOS

Recuento de *E.coli* mediante el **método de las diluciones**:

Fases:

1. La primera dilución se realiza diluyendo una muestra de 5 g de heces en 45 ml de agua de peptona en un tubo falcon, (dilución 10^{-1}).
2. Transferir 1ml de la primera de la primera dilución a un tubo con 9 ml de agua de peptona, y así sucesivamente hasta la dilución 10^{-5} .
3. Sembrar en masa 100 μ l de las diluciones 10^{-2} hasta 10^{-7} , utilizando el medio cromogénico Tergitol-7 (Chapman-TTC/Tergitol-Agar).
4. Incubar a 37°C durante 18-24 horas.

El aspecto típico de las colonias de *E.coli* en este medio es color amarillo con centro naranja/medio amarillo.

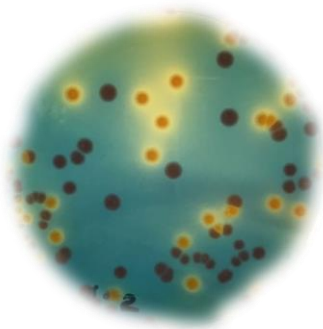


Foto 1. Cultivo en medio cromogénico Tergitol-7.

La metodología específica para la **detección de ETEC** contempla varias fases:

1. Extracción de ADN:

- i) Pesar 1 gramo de heces y añadir a 9 ml de Agua de Peptona. Incubar a 37 ± 1 °C durante 24h.
- ii) Transferir 500 μ l del Agua de Peptona incubada a 4,5 ml de caldo Luria Bertani (LB). Incubar a 37 ± 1 °C durante 24h.
- i) Guardar a -30°C por duplicado 1 ml del caldo LB incubado en un eppendorf identificado con el número de muestra, el grupo al que pertenece y si es del primer muestreo o del segundo.

2. Molde de ADN:

- i) Centrifugar 1 ml de muestra de caldo LB incubado, a 12 000 rpm durante 2 minutos.
- ii) Desechar el sobrenadante en un cementerio de pipetas con desinfectante reservado para este uso.
- iii) Agregar 1 ml de PBS al sedimento, mezclar bien (vortex o hacia arriba y abajo con pipeta).
- iv) Centrifugar a 12 000 rpm durante 2 minutos, eliminar el sobrenadante y resuspender el sedimento en 0,5 ml de agua estéril Milli-Q (vortex o arriba y abajo con pipeta)
- v) Calentar al baño maría a 100 ° C durante 10 minutos y centrifugar a 12 000 rpm durante 2 minutos.
- vi) Transferir el sobrenadante con el ADN contenido a otro tubo.
- vii) Al preparar una gran cantidad de tubos, asegurarse de que los tubos que contienen ADN se mantengan en hielo o en frío. Conservar muestras de ADN a -20 °C para su posterior análisis.

3. Configuración de la reacción de PCR:

- i) Para cada muestra, elaborar una mezcla de reacción de PCR en un volumen final de 25 µl.

Primero añadir 3 µl de ADN (o de agua MiliQ para el control negativo) en cada eppendorf. Después añadir 22 µl del mix elaborado con el resto de los componentes.

10X PCR buffer	25 µl
2 mM MgCl ₂	10 µl
2 mM dNTP mix	25 µl
Solution of 10 µM primer LT _{for}	10 µl
Solution of 10 µM primer LT _{rev}	10 µl
Solution of 5 µM primer STa _{for}	10 µl
Solution of 5 µM primer STa _{rev}	10 µl
Solution of 10 µM primer STb _{for}	12.5 µl
Solution of 10 µM primer STb _{rev}	12.5 µl
Solution of 10 µM primer F4 _{for}	12.5 µl
Solution of 10 µM primer F4 _{rev}	12.5 µl
H ₂ O Milli-Q, sterile, kept at room temperature	48 µl
2 U Taq DNA Polymerase (5 U/µl)	2 µl
For a total of	200 µl

Tabla 8. Mezcla de reacción de PCR. (Ecl, Universidad de Montreal, Canadá): http://www.apzec.ca/en/APZEC/Protocols/APZEC_PCR_en.aspx

Virulence factor	Gene name	Accession no	Primer sequence	Amplicon size (bp)	TM	Control strain	Reference
LT	<i>eltB</i>	J01646	for 5' TTA CGG CGT TAC TAT CCT CTC TA	275	60°	ECL 7805	Furrer et al., 1990. <i>Leit. Appl. Microbiol.</i> 10: 31-34.
LT	<i>eltB</i>	J01646	rev 5' GGT CTC GGT CAG ATA TGT GAT TC	275	60°	ECL 7805	Furrer et al., 1990. <i>Leit. Appl. Microbiol.</i> 10: 31-34.
STa	<i>estA</i>	M58746	for 5' TCC CCT CTT TTA GTC AGT CAA CTG	163	60°	ECL 7805	Ngeleka et al., 2003. <i>J. Vet. Invest.</i> 15: 242-252.
STa	<i>estA</i>	M58746	rev 5' GCA CAG GCA GGA TTA CAA CAA AGT	163	60°	ECL 7805	Ngeleka et al., 2003. <i>J. Vet. Invest.</i> 15: 242-252.
STb	<i>estB</i>	M35586	for 5' GCA ATA AGG TTG AGG TGA T	368	60°	ECL 7805	Lortie et al., 1991. <i>J. Clin. Micro.</i> 29: 656-659.
STb	<i>estB</i>	M35586	rev 5' GCC TGC AGT GAG AAA TGG AC	368	60°	ECL 7805	Lortie et al., 1991. <i>J. Clin. Micro.</i> 29: 656-659.
F4 K88ab1 and K88ab2	<i>faeG</i>	M29374	for 5' ATC GGT GGT AGT ATC ACT GC	601	60°	ECL 7805	Ojeniyi et al., 1994. <i>Zentralbl. Veterinarmed.</i> 41: 49-59.
F4 K88ab1 and K88ab2	<i>faeG</i>	M29374	rev 5' AAC CTG CGA CGT CAA CAA GA	601	60°	ECL 7805	Ojeniyi et al., 1994. <i>Zentralbl. Veterinarmed.</i> 41: 49-59.

Tabla 9. Primers utilizados en la técnica de PCR para la detección de los factores de virulencia del ETEC (LT, STa, STb y F4). (ECL, Universidad de Montreal, Canadá): http://www.apzec.ca/en/APZEC/Protocols/APZEC_PCR_en.aspx

El control positivo es E. coli ECL7805.

La técnica de PCR se realizó en las siguientes condiciones:

5. Program temperature cycles

- Cycle 60 Ecl Laboratory
 1. 95°C for 2 minutes
 2. 94°C for 30 seconds
 3. 60°C for 30 seconds
 4. 72°C for 30 seconds
 5. Repeat from 2 for 24 more cycles
 6. 4°C until the end
 - Cycle 55 Ecl Laboratory
 1. 95°C for 2 minutes
 2. 94°C for 30 seconds
 3. 55°C for 30 seconds
 4. 72°C for 30 seconds
 5. Repeat from 2 for 24 more cycles
 6. 4°C until the end

(ECL, Universidad de Montreal, Canadá): http://www.apzec.ca/en/APZEC/Protocols/APZEC_PCR_en.aspx

[apzec.ca/en/APZEC/Protocols/APZEC_PCR_en.aspx](http://www.apzec.ca/en/APZEC/Protocols/APZEC_PCR_en.aspx)

4. Electroforesis con gel de Agarosa:

- i) Preparar un gel de agarosa al 1.5% (p / v) en TBE 1X (Tris, borato y EDTA), utilizando 3 µl de GelGreen (GelGreen Nucleic Acid Stain 10000x in water, Biotium) para permitir la visualización de ADN.
- ii) Cada pocillo del gel se carga con 8 µl del producto de PCR junto con buffer de carga (azul de bromofenol). Los primeros pocillos de cada fila se cargan con el marcador de peso molecular de 100 pb a un volumen de 7 µl.
- iii) Una vez preparado el gel se aplicó un voltaje constante (120V) durante 30 minutos. El ADN amplificado se visualizó mediante exposición del gel a luz ultravioleta.

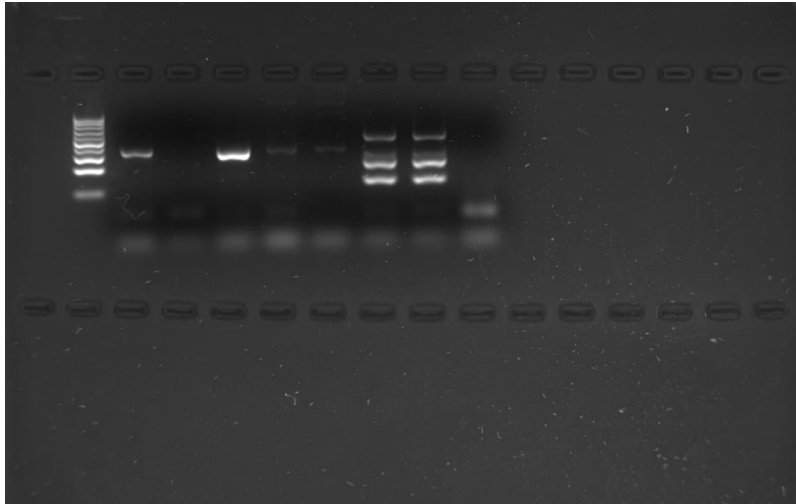


Foto 2. Resultado de la prueba de PCR tras la migración de los productos amplificados en gel de agarosa.