



Facultad de Veterinaria  
Universidad Zaragoza



# Trabajo Fin de Grado en Veterinaria

El uso de probióticos en ganado porcino: una alternativa para la  
prevención de patologías

The use of probiotics in swine: an alternative for preventing diseases

Autora

Rus María Montoya Moreno

Directores

Tania Pérez Sánchez, Héctor Fuertes Negro y Jesús Vicente Díaz Cano

Facultad de Veterinaria

2018

## ÍNDICE

<b>1. RESUMEN .....</b>	<b>2</b>
<b>2. INTRODUCCIÓN .....</b>	<b>3</b>
<b>2.1. PRODUCCIÓN PORCINA .....</b>	<b>3</b>
<b>2.2. MICROBIOTA INTESTINAL .....</b>	<b>4</b>
<b>2.3. PREBIÓTICOS, PROBIÓTICOS, SIMBIÓTICOS Y POSTBIÓTICOS .....</b>	<b>6</b>
<b>2.4. DIARREA NEONATAL Y POST-DESTETE .....</b>	<b>12</b>
<b>2.5. TÉCNICA DE DIAGNÓSTICO: METAGENÓMICA .....</b>	<b>14</b>
<b>2.6. ÓXIDO DE ZINC.....</b>	<b>14</b>
<b>3. JUSTIFICACIÓN Y OBJETIVOS.....</b>	<b>16</b>
<b>4. METODOLOGÍA.....</b>	<b>17</b>
<b>4.1. RECOGIDA DE HECES.....</b>	<b>18</b>
<b>4.2. MUESTRA DE SANGRE.....</b>	<b>19</b>
<b>4.3. RASPADO DE MUCOSA INTESTINAL, SOBRE UNA PLACA DE PEYER.....</b>	<b>19</b>
<b>4.4. SECCIÓN INTESTINAL .....</b>	<b>20</b>
<b>4.5. LINFONODO MESENTÉRICO .....</b>	<b>20</b>
<b>4.6. LINFONODO MEDIASTÍNICO .....</b>	<b>20</b>
<b>4.7. BILIS.....</b>	<b>20</b>
<b>5. RESULTADOS Y DISCUSIÓN .....</b>	<b>22</b>
<b>5.1. PERFILES DE LA MICROBIOTA INTESTINAL: .....</b>	<b>22</b>
<b>5.2. PARÁMETROS DE INMUNIDAD INTESTINAL:.....</b>	<b>24</b>
<b>5.3. DE LA MORFOLOGÍA INTESTINAL: .....</b>	<b>27</b>
<b>6. CONCLUSIONES .....</b>	<b>30</b>
<b>7. VALORACIÓN PERSONAL .....</b>	<b>30</b>
<b>8. BIBLIOGRAFÍA.....</b>	<b>31</b>

## 1. RESUMEN

El uso de probióticos constituye una alternativa al tratamiento terapéutico de los problemas patológicos en el ganado porcino. El origen de muchos de estos trastornos radica en una alteración de la microbiota intestinal que puede estar asociada a cambios de manejo, como el destete, ya que el paso de una alimentación líquida a sólida unido a la supresión del aporte inmunitario de la madre constituyen el inicio de alguna de estas alteraciones.

Los mecanismos de acción de las cepas probióticas se basan en fenómenos de exclusión competitiva entre éstas y los patógenos invasores, la estimulación de la respuesta inmunitaria, así como la optimización del aprovechamiento de los nutrientes recibidos mediante la dieta.

El presente trabajo tiene como objetivo realizar una primera aproximación al conocimiento del uso de probióticos en la especie porcina. Para ello, se han diseñado una serie de pruebas experimentales a realizar en explotaciones ganaderas que albergan las diferentes fases de producción (lactación y transición), con el fin de determinar los beneficios que éstos aportan, tales como mejora de los índices productivos o disminución en el tratamiento médico clásico.

La administración de estos componentes se realizará mediante la formulación de un pienso fermentado comercial que incorpora estos ingredientes y que será aplicado en las fases previamente mencionadas. Para la toma de muestras se establecerán diferentes momentos en función de los objetivos planteados.

Los resultados obtenidos en los ensayos concluyen que el uso de Probisán® en la dieta puede tener efectos positivos sobre los lechones en peri-destete al reducir los posibles efectos inflamatorios de los lipopolisacáridos de las bacterias Gram negativas, además de aumentar la respuesta inmune natural contra las bacterias Gram positivas. Probisán® favorece la integridad de la mucosa intestinal, como se deduce del aumento en la altura de las vellosidades intestinales.

### **The use of probiotics in swine: an alternative for preventing diseases**

The use of probiotics is an alternative to the therapeutic treatment of pathological problems in pigs. The source of many of these disorders lies in an alteration of the intestinal microbiota that may be associated with management changes, such as weaning, since the passage from a liquid to a solid diet besides the suppression of the mother's immune contribution constitute the beginning of any of these alterations.

The mechanisms of action of the probiotic strains are based on competitive exclusion phenomena between these and the invading pathogens, the stimulation of the immune response, as well as the optimization of the use of the nutrients received through the diet.

This study/essay aims to make a first approach to the knowledge of the use of probiotics in the porcine species. For that purpose, a series of experimental tests have been designed to be carried out in livestock farms that house the different stages of production (lactation and transition), in order to determine the benefits they bring, such as improvement of production rates or decrease in classic medical treatment.

The said components will be administrated by means of the formulation of a commercial fermented feed that incorporates these ingredients and that will be applied in the aforementioned phases. For the taking of samples, different moments will be established according to the objectives set.

The results obtained in the trials conclude that the use of Probisán® can have positive effects on piglet in peri-weaning by reducing the possible inflammatory effects of the lipopolysaccharides of the Gram-negative bacteria. Probisán® would also increase the natural immune response against the Gram-positive bacteria. Probisán® favors the integrity of the intestinal mucosa, as seems to be inferred from the increase in the height of the intestinal villi.

## **2. INTRODUCCIÓN**

### **2.1. Producción porcina**

La elección de la especie porcina en este estudio radica en que se trata de una de las especies más eficientes en producción de carne, debido a características como la gran precocidad sexual, su elevada prolificidad, su ciclo reproductivo corto o su alto índice de conversión, lo que hace que sea la especie animal más consumida a nivel mundial, seguida de la carne de pollo, vacuno y caprino/ovino. La producción de porcino en cada país varía en función de factores políticos, económicos, sociolegales y tecnológicos (factores PEST) (Magallón et al., 2013a).

Según la Organización de las Naciones Unidas para la alimentación y la Agricultura (FAO), en el 2014 en Asia y Europa se concentra el 70% del censo porcino total. África está incrementando el número de cabezas de ganado porcino donde tradicionalmente ha sido de rumiantes. En los países en desarrollo el 50% de la producción de cerdo se desarrolla en sistemas tradicionales, por lo que para los agricultores el cerdo tiene un valor añadido.

Los principales países productores y comercializadores de carne de cerdo son: China, EE. UU., Alemania y España. De todos ellos, China es el mayor productor y consumidor de carne porcina, seguida por la Unión Europea (UE-27) si la considerásemos un solo país. Dentro de la UE hay que destacar a países como Alemania, España, Francia y Dinamarca que a su vez

poseen netamente un carácter exportador, como por ejemplo se menciona que el 75% de las exportaciones españolas se quedan en la UE. Por otro lado, los principales países importadores de carne de cerdo son Japón, Rusia y China respectivamente (Magallón et al., 2013a).

En España hay que destacar como factores PEST, que inciden de manera positiva, los buenos costes de producción y sacrificio, la alta tecnificación del sector y el gran tamaño de las granjas de madres. Los factores PEST, que inciden de forma negativa, son la fuerte dependencia de las exportaciones, la supeditación en más del 40% de la importación de materias primas y el riesgo sanitario debido a la importación de lechones o reproductores. Cabe destacar la integración ganadera, que facilita menores costes de producción y ayuda a que el ganadero resista mejor las crisis cíclicas de precios.

Aragón es el segundo productor de cerdo de engorde y de reproductoras, detrás de Cataluña y seguido de Castilla y León. Sin embargo, poco más del 26% de los cerdos producidos se sacrifican en Aragón, lo que la convierte en una comunidad exportadora de cerdos para sacrificio, fundamentalmente a mataderos catalanes (Magallón et al., 2013b).

El empleo en el sector porcino favorece el asentamiento de la población rural aragonesa, que supone una cifra muy importante distribuida en; construcción de instalaciones; fabricación y transporte de pienso; mano de obra; sanidad, gestión y servicios; transporte de animales; trabajo en el matadero; y empleo en la industria agroalimentaria (Magallón et al., 2013b).

## **2.2. Microbiota intestinal**

En el sistema de producción intensivo hay que destacar la temprana separación de los lechones de la madre, entre los 21 y 28 días de edad del lechón. El destete supone el fin de la inmunidad transmitida por la leche, y se produce antes de que la población bacteriana intestinal se establezca y de que el sistema inmune sea maduro. Además, el estrés por la transición a una dieta sólida, el transporte y mezcla con otros animales de diferentes orígenes perturba aún más el ecosistema bacteriano del intestino y su respuesta inmune, predisponiéndolos a una mayor susceptibilidad a trastornos intestinales, infecciones entéricas y diarrea bacteriana post-destete (Blanch, 2015a; Fouhse et al., 2017).

La población bacteriana intestinal del cerdo se puede dividir en tres grupos según la relación con el hospedador; simbiosis como los *Lactobacillus* o las *Bifidobacterium*, y comensales como los *Bacteroides* o los *Enterococos*, que cumplen funciones nutricionales, fisiológicas e inmunológicas; y patógenos como *Escherichia coli*, *Salmonella* y *Clostridios*, causantes de enfermedades con morbilidades y mortalidades importantes en producción por lo que se han usado antibióticos de forma profiláctica. Parece que actualmente aún esté permitido este uso de los antibióticos lo que ha aumentado la presión selectiva sobre las bacterias resistentes a

los antibióticos, provocando un problema de salud pública (Fouhse et al., 2017). Para reducir el uso de antibióticos se diseñan dietas que persiguen fomentar las poblaciones simbióticas y aprovechar la relación huésped-microbio, mediante aditivos zootécnicos como prebióticos, cereales con carbohidratos altamente fermentables, probióticos y trasplantes de microbiota, ya que hay una estrecha relación entre la estabilidad de la microbiota intestinal con la salud del animal y su rendimiento, además de mejorar el rendimiento económico puesto que las materias primas suponen un alto porcentaje de los costes de producción (Fouhse et al., 2017; Mercado et al., 2013).

La colonización inicial del intestino del lechón tras el nacimiento se produce por *E. coli* y *Streptococcus spp*, que son los encargados de generar un ambiente anaerobio para la colonización posterior de Bacteroides, Bifidobacterium, Clostridium, y Lactobacillus (Fouhse et al., 2017).

La estructura intestinal que está en contacto con la luz está formada por una única capa de células epiteliales intestinales y proteínas especializadas entre estas células, que proporciona una barrera física a la entrada de patógenos. El mantenimiento y regeneración del epitelio se consigue mediante el suministro constante de energía, en forma de ácidos grasos de cadena corta (AGCC), principalmente del butirato que proporciona la microbiota intestinal fermentando los carbohidratos no digeribles, lo cual es la base de los prebióticos, probióticos, simbióticos y postbióticos que se explicarán posteriormente. Limitar la adhesión de patógenos es otra línea de defensa, por medio de la producción de mucina mediante células caliciformes intestinales, gracias al aumento de bacterias del género *Lactobacillus*. Otro método defensivo es la estimulación de las inmunoglobulinas de la mucosa, IgA, gracias a la fermentación bacteriana, creando una barrera de protección para impedir el paso de patógenos a través de las células epiteliales intestinales (Fouhse et al., 2017).

El destete temprano produce tal estrés que altera la microbiota intestinal y disminuye las defensas facilitando la aparición de diarrea post-destete, caracterizada por la reducción de *Lactobacillus sobrius*, *L. acidophilus* y *L. reuteri* principalmente que son las productoras de ácido láctico, por lo que aumenta el pH intestinal (por la reducción de estas bacterias) y con ello el aumento de *E. coli* patógena, debido a que el pH intestinal bajo es bactericida. Una de las causas principales de la diarrea post-destete es la baja ingesta de alimento y agua después del destete que conlleva a la disfunción de la barrera intestinal. Para tratar esta enfermedad se empezaron a usar antibióticos, posteriormente se dieron cuenta de que a dosis sub-terapéuticas se aumentan las tasas de crecimiento y se maximiza la eficiencia. Sin embargo, tiene efectos negativos a largo plazo sobre el huésped como el aumento de bacterias potencialmente patógenas como *Shigella spp.*, *E. coli* y *Salmonella*. Pero, si la microbiota

intestinal es normal ésta puede detectar patógenos y activar la respuesta inmune innata normal para controlar dicha colonización. Por esto se debe disminuir el uso de antibióticos en grupo y ser sustituido hacia un tratamiento antibiótico individual y así mantener una microbiota sana del rebaño (Fouhse et al., 2017).

Se están empleando alimentos funcionales para conseguir efectos beneficiosos para la salud más allá de los nutricionales, con el fin de mejorar el bienestar, control y prevención de enfermedades. Los prebióticos, probióticos, simbióticos y postbióticos son subgrupos dentro de este tipo de alimentos (Casado, 2016).

### **2.3. Prebióticos, probióticos, simbióticos y postbióticos**

Existen varias definiciones para el concepto de prebiótico. Gibson y Roberfroid (1995) lo definen como “un ingrediente selectivamente fermentado que da lugar a cambios específicos en la composición y/o actividad de la microbiota gastrointestinal, confiriendo así beneficios a la salud del huésped”. Es decir, son sustancias no digeribles que al llegar al intestino grueso son fermentadas por bacterias simbióticas favoreciendo su crecimiento. Otra de las definiciones es que se trata de un compuesto no digerible que se metaboliza en el intestino por medio de microorganismos como *Bifidobacterium* y *Lactobacillus*, modulando la composición y actividad de la microbiota intestinal, lo que beneficia fisiológicamente al huésped (Fouhse et al., 2017). También es interesante saber que los prebióticos se incluyen dentro de la “fibra dietética” por lo que favorecen el tránsito intestinal mecánico (Mercado et al., 2013).

Este grupo está formado por oligosacáridos, polisacáridos no amiláceos (PNA) o fibra soluble y amiláceos como el almidón, siendo la oligofruktosa y la inulina los más estudiados y comercializados. Deben cumplir tres requisitos; llegar al intestino grueso sin ser hidrolizados por el estómago ni por el intestino; ser selectivo para las bacterias beneficiosas del intestino grueso; y tener que producir efectos beneficiosos para el huésped (Blanch, 2015).

Dentro de este grupo tan solo cumplen los criterios de esta clasificación la inulina, los transgalacto-oligosacáridos (TOS), galactooligosacáridos (GOS), la lactulosa y los fructo-oligosacáridos (FOS). Sin embargo, los carbohidratos dietéticos como el almidón de trigo y la pulpa de remolacha promueven la fermentación bacteriana y aumentan las especies beneficiosas de *Lactobacillus* en el intestino delgado. La fermentación microbiana de estos carbohidratos produce ácidos grasos de cadena corta como acético, propiónico, butírico y gases (Mercado et al., 2013), que protegen el intestino disminuyendo el pH intestinal, el cual tiene un efecto bactericida, y aumentando las concentraciones de butirato cecal y colónico,

fuerza de energía de los enterocitos, lo cual se explica más adelante en la definición de postbiótico (Fouhse et al., 2017).

El término de probiótico fue utilizado por primera vez en 1974 por Parker y se considera que son aditivos alimentarios constituidos por microorganismos vivos que administrados en la cantidad adecuada proporcionan un beneficio para la salud del huésped (Blanch, 2015; Fouhse et al., 2017). Se denominan probióticos exógenos a los probióticos propiamente dichos, mientras que los endógenos son las cepas simbióticas del propio organismo que crecen gracias a los prebióticos (Mercado et al., 2013).

Los probióticos deben cumplir los siguientes criterios: resistir a los enzimas gastrointestinales, ser estables a los ácidos y bilis y no conjugarse con las sales biliares, adherirse al epitelio intestinal, colonizar el intestino y producir sustancias antimicrobianas (García et al., 2014). Sus mecanismos de acción son; exclusión competitiva por los nutrientes o por la adhesión en la mucosa intestinal de otros agentes, desactivación de toxinas específicas, crear un ambiente hipóxico que favorece la proliferación de las bacterias anaeróbicas y estas el descenso del pH y así la supresión de microorganismos patógenos, promover la barrera gastrointestinal, regular la permeabilidad del epitelio intestinal y su desarrollo, sintetizar bacteriocinas, inducir la digestión por medio de la actividad enzimática y de la absorción de nutrientes, así como promover efectos inmunomoduladores (Blanch, 2015). Se pueden administrar después del nacimiento del lechón o de manera preventiva antes de un factor que se conoce va a ser desencadenante de enfermedades, o durante un largo período de tiempo tanto en el pienso como en el agua (García et al., 2014).

En 1917 se pensaba que lactobacilus y bifidobacterias eran de la misma familia *Lactobacillaceae*, hasta que en los años 30 se empezó a ver que las bifidobacterias estaban más próximas a *Actinomices* que a Lactobacilos. No fue hasta que se usaron técnicas de secuenciación de ARN ribosomal cuando se estableció oficialmente que las bifidobacterias correspondían al orden *Bifidobacteriales*, dentro de la clase *Actinobacteria*, separado del orden *Lactobacillales*. A pesar de ello, todavía al hablar de bacterias lácticas se puede hacer referencia a las dos.

Las bacterias ácido lácticas (BAL) son un grupo heterogéneo de microorganismos que producen ácido láctico mediante la fermentación de azúcares. Se encuentran dentro del filo *Firmicutes*, clase *Bacilli*, orden *Lactobacillales*, compuesto de seis familias (ver figura 1), que a su vez está formado por diecinueve géneros con características morfológicas, fisiológicas y metabólicas comunes. Entre ellos se diferencian los de morfología cocoide como: *Lactococcus*, *Leuconostoc*, *Oenococcus*, *Pediococcus* o *Streptococcus* con número de especies limitado, y los de morfología bacilo como: *Lactobacillus* que es el género con mayor número de especies.

Suelen ser bacilos o cocos Gram-positivos que se unen formando cadenas o tétradas y filamentos. Son: oxidasa catalasa y bencidina negativas; anaerobios facultativos, microaerófilos o aerotolerantes; por lo general no son móviles ni tienen citocromos; no esporulados; no reductoras de nitrato a nitrito excepto algunas anaerobias estrictas; acidófilos o acidotolerantes con un pH óptimo entre 4 y 4,5; quimiorganotrofos y estrictamente fermentativos de los carbohidratos produciendo ácido láctico a partir de glucosa, manosa, galactosa o fructosa; no crecen fácilmente en cualquier medio. Se encuentran en la boca y el tracto intestinal de los animales, en alimentos y productos lácteos y en jugos vegetales fermentados, y solo unas pocas son altamente patógenas. Clasificar las BAL es difícil por medio de cultivos microbiológicos ya que su nutrición y crecimiento son parecidos. Por ello, para la identificación específica de BAL probióticas, se emplea la técnica de diagnóstico PCR -Reacción en Cadena de la Polimerasa- (Parra, 2010; Aznar y Zúñiga, 2011).

Figura 1 (Aznar y Zúñiga, 2011).

Reino	Filo	Clase	Subclase	Orden	Familia	Género
Bacteria	Actinobacteria	Actinobacteria	Actinobacteridae	Bifidobacteriales	Bifidobacteriaceae	Bifidobacterium
					Aerococcaceae	
					Carnobacteriaceae	Carnobacterium
					Enterococcaceae	Enterococcus
					Lactobacillaceae	Lactobacillus
Bacteria	Firmicutes	Bacilli		Lactobacillales		Pediococcus
					Leuconostocaceae	Leuconostoc
						Oenococcus
						Weissella
					Streptococcaceae	Lactococcus
						Streptococcus

\*Clasificación de la base de datos Taxonomy del National Center for Biotechnology Information (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/guide/taxonomy/>)

En la legislación europea aparecen registrados los siguientes géneros: *Bacillus*, *Lactobacillus*, *Enterococcus*, *Bifidobacterium*, *Clostridium* y *Saccharomyces*, (Blanch, 2015). Sin embargo, los que más se usan son; *Lactobacillus*: *L. acidophilus*, *L. casei*, *L. bulgaricus*, *L. reuteri*, *L. plantarum*; *Bifidobacterium*: *B. bifidum*, *B. longum*, *B. breve*, *B. infantis*, *B. animalis*; y levaduras, del género *Saccharomyces* que se pueden utilizar puras o combinadas (García et al., 2014).

El género *Bacillus* corresponden al filo *Firmicutes* al igual que las bacterias lácticas. Se encuentran en el suelo, heces y comida fermentada. La administración de esporas de *B. licheniformis* y *B. subtilis* tienen un efecto inmunomodulador en el epitelio intestinal lo que reduce la morbilidad y mortalidad en el post-destete, y los recuentos de *E. coli* neonatal en heces; además, en el cebo aumenta el rendimiento productivo y disminuye significativamente el amoníaco ambiental y acidifica las heces (Blanch, 2015a).

El género *Lactobacillus* también corresponde al filo *Firmicutes*. La mayoría tiene morfología de bacilos pero también hay coco-bacilos (Aznar y Zúñiga, 2011). Su fuente de energía son los

carbohidratos fermentables, aminoácidos, vitaminas y nucleótidos, (Parra, 2010). Son los más útiles después del nacimiento cuando la microbiota aún no se ha establecido, o en un brote de estrés por transporte o tras el uso de antibióticos, para colonizar de forma natural el intestino, (García et al., 2014). Se usan tanto en animales jóvenes como en cerdos de engorde y cerdas reproductoras. Los efectos de algunas de ellas en lechones son: mayor ganancia media diaria y reducción de los recuentos de *E. coli* en recto y de otras enterobacterias, disminución de la incidencia de diarrea, mejora de la respuesta inmune durante la infección y reducción de la inflamación lo que permite destinar los nutrientes al crecimiento (Blanch, 2015a; Fohse et al., 2017).

Dentro del orden *Bifidobacteriales*, correspondiente al filo *Actinobacteria*, está la familia *Bifidobacteriaceae* formada por dos géneros *Bifidobacterium* y *Gardnerella*. Las bifidobacterias son bacilos de 2 a 5 micras de longitud, pleomórficas aunque lo más frecuente son formas de V o T. No forman cápsulas ni esporas, carecen de flagelos y no forman filamentos. Son Gram positivas, oxidasa catalasa negativas, anaerobias que pueden crecer en presencia de oxígeno si hay dióxido de carbono, crecen entre 35-39 °C. Son quimiorganotrofos de metabolismo fermentativo, produciendo lactato y acetato principalmente. Normalmente se encuentran en el tracto intestinal o genital de animales. Tienen funciones como estabilizar la microbiota intestinal, prevención de diarrea, potenciador del sistema inmune, inmunoestimulador, productoras de sustancias antimicrobianas, producción de vitaminas esenciales y actividad anticarcinogénica (Aznar y Zúñiga, 2011).

Los *Enterococcus* son un género del orden *Lactobacillales*. El aporte de *E. faecium* desde el nacimiento hasta el destete redujo las diarreas y mejoró el rendimiento con una mayor ganancia diaria. También, su adición como probiótico al post-destete demostró que reducía la población de *E. faecalis*, responsable de diarrea post-destete.

Por último, las levaduras han demostrado una mejora en el rendimiento productivo, el estado sanitario y la respuesta inmunitaria tanto en cerdas reproductoras como en lechones (Blanch, 2015a).

Presentan algunos inconvenientes y es que algunas cepas probióticas contienen genes resistentes a los antibióticos, pudiendo pasar los genes a las bacterias patógenas a través de la transferencia horizontal de genes. Otro inconveniente es mantener la viabilidad de las bacterias tanto en los procesos tecnológicos de fabricación como en el almacenamiento del producto (Aguilar-Toalá, 2018).

Los simbióticos son la combinación de ciertos sustratos prebióticos con algunas cepas probióticas para aprovechar la afinidad entre ellas y aumentar su efectividad, (Mercado et al, 2013). Por un lado, mejorando la supervivencia de los microorganismos del intestino, y por

otro, la colonización, (Blanch, 2015). Se han desarrollado tecnologías de encapsulación para protegerlo y garantizar la resistencia a los procesos tecnológicos o digestivos para llegar a su lugar de acción en el intestino (Mercado et al, 2013).

Según el artículo de Tsilingiri y Rescigno (2012), se considera postbiótico a los metabolitos resultantes de la actividad metabólica de un probiótico o molécula que produzca un efecto beneficioso sobre el hospedador directa o indirectamente.

Los postbióticos son factores solubles generados del metabolismo de los probióticos y liberados al medio extracelular intestinal que son absorbidos por los enterocitos ejerciendo efectos nutricionales, metabólicos y/o inmunomoduladores en el huésped (Álvarez, 2015; Miranda et al., 2017). Algunos de estos metabolitos son ácidos grasos de cadena corta (SCFAs) como el ácido butírico, enzimas, péptidos, endo y exopolisacáridos, vitaminas y ácidos orgánicos (González y Manrique, 2016a; Aguilar-Toalá, 2018). Probablemente el butírico sea el más estudiado por ser el metabolito preferido por los colonocitos (Wielsa, 2015).

El ácido butírico tiene efectos positivos sobre el intestino como; la protección y el desarrollo del epitelio intestinal gracias al incremento de la longitud de las vellosidades y de las secreciones intestinales; el equilibrio de la microbiota intestinal; refuerza las uniones celulares de la mucosa entérica lo que reduce la permeabilidad del intestino; actúa como antiinflamatorio y estimulante del sistema inmunitario local, favoreciendo el predominio de especies saprófitas frente a enteropatógenas; además, inhibe los efectos de la expresión genética de las perforinas por parte de la *Salmonella*, reduciendo su colonización (Wielsa, 2016; González y Manrique, 2016b; Hernández, 2017).

Figura 2 de los múltiples efectos locales del ácido butírico en el intestino (Wielsa, 2015).



De manera natural se encuentra en dos vías; en la leche materna, en forma de triglicéridos, que en la cerda supone un 5% de la grasa; y en la flora digestiva, producido por algunas bacterias del colon.

La administración de este ácido en piensos tiene dos inconvenientes. El mal olor que produce en la fabricación de piensos, y su rápida absorción que impide que llegue a los tramos posteriores del intestino. Aunque cuando se libera en el intestino delgado tiene un efecto antiinflamatorio sobre todo el tracto intestinal, porque el intestino actúa como un todo comunicado (Wielsa, 2016; Wielsa, 2015). Por ello las principales formas de presentación son; en forma de sales (sódicas o cálcicas); sales protegidas (sal de ácido butírico, o butirato, envuelto en grasas) pero la concentración del ingrediente activo es muy baja en el producto comercial, sólo 30% de principio activo; y ésteres de ácido butírico o tributirinas (un glicerol unido mediante esterificación por enlaces covalentes hasta a tres moléculas de ácido butírico). Estas últimas solucionan los inconvenientes principales del olor y concentración de las otras presentaciones, además de que favorece su absorción específica en el intestino (González y Manrique, 2016b; Wielsa, 2016).

Esta última forma de presentación ha sido diseñada por científicos españoles, de manera que las tributirinas quedan microencapsuladas para que puedan llegar al intestino grueso y producir sus efectos beneficiosos, (El Periódico, 2016).

La administración de butirato favorece la colonización por bacterias beneficiosas como los *Clostridium* saprofitos que producen butirato endógeno. Los efectos son muy parecidos a los del ácido butírico, sin embargo, el ácido butírico tiene efectos más significativos sobre el sistema inmune (Wielsa, 2015).

La tributirina es la mejor forma de presentación para llevar el ácido butírico al colon, (González y Manrique, 2017). Las tributirinas, gracias a sus enlaces covalentes, son muy estables a pH, temperatura y humedad, por eso son muy estables al proceso de fabricación y al tránsito intestinal. En el intestino delgado se disocian por las lipasas pancreáticas, liberando ácido butírico y glicerol que son absorbidas por los enterocitos (Wielsa, 2016). Algunos de sus efectos positivos son; incrementar las poblaciones de *Clostridium* beneficiosos; modular la activación de los linfocitos T y su respuesta; modular la actividad y supervivencia de los neutrófilos y la producción de citoquinas, (los neutrófilos envían citoquinas a células del sistema inmune para avisar de la llegada de bacterias patógenas).

En resumen, los prebióticos y los probióticos favorecen la producción de butírico por medio de bacterias, pero ambos medios son complejos y menos eficientes que el suministro directo del butírico esterificado (Wielsa, 2015).

## 2.4. Diarrea neonatal y post-destete

Durante la lactación y las primeras semanas post-destete hay un promedio del 10 al 25% de bajas de las crías, de las cuales el 41,5% de la mortalidad es debida a diarreas, y de estas el 25,5% es a causa de *E.coli* (García et al., 2014). A las diarreas neonatales y post-destete producidas por *E.coli* se le denomina Colibacilosis entérica, en la que están implicados dos patotipos principales: *E.coli* enterotoxigénica (ETEC) y *E.coli* enteropatógena (EPEC), teniendo más importancia el patotipo ETEC. Los brotes por ETEC suelen ser recurrentes y afectan a un gran número de cerdos. La colibacilosis puede conllevar grandes pérdidas económicas debido a la mortalidad, disminución del aumento de peso, coste de los tratamientos, vacunaciones y suplementos alimenticios.

La prevención y el control de esta enfermedad se basan en medidas higiénicas y en bioseguridad tanto interna como externa, junto a otras estrategias como son la administración pasiva de anticuerpos específicos, suplementos dietéticos como prebióticos y probióticos, animales genéticamente resistentes a ETEC y vacunas orales vivas de *E.coli* no enterotoxigénico. La inmunidad pasiva calostrala y lactogénica puede prevenir la infección sobre todo si las cerdas han sido vacunadas o expuestas al mismo *E.coli* patógeno al que están expuestos los lechones gracias al alto nivel de IgA en la leche materna. A pesar de todas estas medidas es frecuente el uso de antibióticos vía oral y parenteral, al igual que la subdosificación vía oral, lo que favorece la aparición de resistencias a los antibióticos.

En animales de un día de edad el epitelio intestinal tarda en regenerarse de 7 a 10 días, mientras que en animales de 3 semanas de edad supone de 2 a 4 días, lo que supone una desventaja en animales recién nacidos ya que la regeneración epitelial se considera como un mecanismo de defensa por la expulsión de las células infectadas.

La diarrea neonatal por *E.coli* ETEC se presenta en lechones de 0 a 4 días de vida, mientras que la diarrea post-destete aparece entre las 2 y 3 semanas después del destete. La diarrea neonatal tiene una textura cremosa o acuosa, olor distintivo y color blanco o amarillo, y la diarrea post-destete es acuosa amarillenta, gris o ligeramente rosada con un olor característico, de una semana de duración. Su pelaje se vuelve húmedo, pegajoso y áspero, pierden el apetito y están deprimidos, también se producen muertes repentinas al principio del brote (infección sobreaguda) que presentan deshidratación con los ojos hundidos. El intestino delgado se puede observar dilatado, ligeramente edematoso e hiperémico, el estómago dilatado y lleno de leche coagulada en el caso de colibacilosis neonatal o con pienso seco en colibacilosis post-destete con hiperemia del fundus. Los ganglios linfáticos mesentéricos se observan inflamados e hiperémicos (Luppi, 2017).

Si hay cerdos con diarrea durante menos de 12-24 horas que no han sido tratados, se realiza una necropsia para evaluar las lesiones macroscópicas en intestino delgado, colon, válvula íleo-cecal y ganglios linfáticos mesentéricos. Se toman muestras de intestino delgado (yeyuno e íleon) y de intestino grueso que se envían al laboratorio para realizar una bacteriología cuantitativa, identificación de factores de virulencia, por PCR e histopatología. Los cultivos se realizan en placas de agar sangre y agar McConckey o agar Hektoen (medios selectivos para *Enterobacteriaceae*). En el intestino de animales sanos también podemos encontrar *E.coli*, por eso para hacer un correcto diagnóstico es necesario el uso de PCR combinada con una bacteriología semi- cuantitativa y la tipificación de aislamientos individuales.

En la histopatología tanto en los casos de colibacilosis neonatal como de DPD por ETEC se observa ETEC F4 positivo en la membrana apical de los enterocitos de yeyuno e íleon. En la colibacilosis neonatal también se puede ver congestión vascular, hemorragias y células inflamatorias. La inmunohistoquímica y la hibridación fluorescente *in situ* se emplean para confirmar la etiología (Luppi, 2017).

El diagnóstico diferencial de la diarrea neonatal por ETEC es; Clostridiosis producida por: *Clostridium perfringens* (el tipo C cuya diarrea es acuosa amarillenta/marrón sangrienta con una mortalidad del 100% en las formas periaguda y aguda, y el tipo A cuya diarrea es mucoide, rosa sin sangre, con mortalidad baja), y por *Clostridium difficile* (con diarrea pastosa y amarilla con una mortalidad variable de hasta un 50%); Coronavirus cuya etiología es el virus de la DEP y de la GET (con una diarrea acuosa amarilla/blanca/gris, verdosa, de pH ácido. La mortalidad es muy alta del 80 al 100% en lactación), Enteritis rotaviral producido por Rotavirus (diarrea acuosa, pastosa, con pH ácido, cuya mortalidad es baja de menos del 20%), y Coccidiosis por *Isospora suis* (su diarrea es pastosa y amarilla con pH alcalino, su mortalidad es muy baja o no observada).

La diarrea post- destete debe diferenciarse de; Disentería porcina producida por *Brachyspira hyodysenterie* (con diarrea mucohemorrágica y mortalidad variable, normalmente baja); Salmonelosis cuyo agente etiológico es *Salmonella typhimurium* (su diarrea es amarillenta, verdosa y mucohemorrágica, y la mortalidad es baja); DEP y GET cuyo agente etiológico es Coronavirus vDEP vGET (con diarrea acuosa amarilla/blanca/ gris, verdosa, de pH ácido, y mortalidad menos alta que en la neonatal); Enteritis rotaviral cuyo agente etiológico es Rotavirus (diarrea acuosa, pastosa de pH ácido y mortalidad baja menos del 20%); y Enteropatía proliferativa cuyo agente etiológico es *Lawsonia intracellularis* (la diarrea puede ser hemorrágica o verdosa y su mortalidad es baja) (Luppi, 2017).

## **2.5. Técnica de diagnóstico: Metagenómica**

Para realizar un estudio amplio de todos los microorganismos contenidos en una muestra se emplea una técnica de diagnóstico reciente, la Metagenómica. La Genómica es el estudio de la información genética que contiene un organismo mientras que la Metagenómica es el estudio de todo el contenido genético que contienen todos los microorganismos dentro de una comunidad o muestra ambiental. Lo que permite estudiar poblaciones enteras, cuál es su función en el medio en el que se encuentran, comprender mejor la etiología de las enfermedades, los virus ambientales, la complejidad de la interacción entre agentes patológicos y huésped, la relación entre la microbiota y las enfermedades o la protección frente a éstas (Pérez, 2017).

A partir de una muestra concreta se realizan diversas técnicas para aislar todos los fragmentos de ADN y ARN que posteriormente se secuenciarán para poder ser leídos y se compararán con todos los guardados en bases de datos, genotecas de ADN donde se almacena la información genética obtenida, para buscar la homología entre ellos (Rubio-Guerri et al., 2012).

Primero se elige una muestra representativa, para después aislar el ADN y ARN de los microorganismos rompiendo las células mediante métodos físicos o químicos (Pérez, 2017). Después se amplifica por medio de una PCR (reacción en cadena de la polimerasa) convencional, pero en este caso los cebadores se unen a todo el ADN y ARN de la muestra. El siguiente paso es la secuenciación a gran escala mediante cualquiera de estas tres técnicas; sanger, ultrasecuenciación o pirosecuenciación, siendo esta última la más utilizada. En esta técnica se emite un haz de luz directamente proporcional al nucleótido que lee, y así conocer la composición de la secuencia. Más tarde se realiza un análisis bioinformático, en el que se establecen homologías entre las secuencias para identificar los diferentes agentes de la muestra. Por último, se diseña una PCR para ese agente concreto y se diagnostica mediante técnicas convencionales. La ventaja de esta técnica es que se pueden detectar e identificar diferentes agentes al mismo tiempo en la muestra. El inconveniente de la pirosecuenciación es que es una técnica cara (Rubio-Guerri et al., 2012).

## **2.6. Óxido de zinc**

Para prevenir la diarrea post-destete se utiliza óxido de zinc en las dietas de manera terapéutica durante las dos semanas posteriores al destete. La dosis es muy superior a la de un aditivo 150 frente a 3.000 ppm respectivamente. El gran inconveniente del uso de dosis elevadas de óxido de zinc es que conlleva una elevada contaminación medioambiental, pero si se reduce la concentración entonces aumentan los casos de diarrea post-destete.

El zinc es el segundo elemento traza más abundante en el organismo y tiene funciones bioquímicas, inmunológicas y clínicas como la expresión de genes, estabilización de la estructura de las proteínas, replicación celular, estabilización de las membranas celulares y del citoesqueleto. También es necesario en la estructura y función hormonal como catalítico y regulador de más de 300 metaloenzimas. Tan sólo un 0,1% de éste se encuentra en la sangre, el cual se emplea como indicador. Disminuye tras el destete por lo que puede llegar a ser un nutriente limitante para el crecimiento y la respuesta inmunitaria de los animales.

El aporte de óxido de zinc en la dieta supone la secreción gástrica del péptido grelina que favorece un mayor consumo de alimento. Con el destete los lechones sufren mucho estrés lo que produce más moléculas oxidativas que pueden alterar la homeostasis intestinal. El zinc aumenta la actividad de enzimas antioxidantes que reducen los compuestos oxidativos para que la estructura intestinal no se deteriore y de esta forma absorba mejor los nutrientes de la dieta y confiera mayor protección frente a agentes bacterianos patógenos que puedan producir diarrea. Reduce la población microbiana sin discriminar, así queda más alimento disponible para el crecimiento del animal. Si en las dietas hay un alto porcentaje de fitatos de cereales o de sus subproductos, entonces aumenta la concentración de *E. coli* en las heces de los lechones recién destetados, porque disminuye la disponibilidad del zinc. Por ello es recomendable adicionar la enzima fitasa en las dietas para evitarlo.

Por un lado, nos encontramos que el uso de óxido de zinc conlleva una co-selección de genes de resistencia, porque la mayor parte de los *Staphylococcus aureus* resistentes a la meticilina (MRSA) son también resistentes al óxido de zinc y a las tetraciclinas. Por otro lado, está la eficacia preventiva en casos de enteritis y DPD. Pero si eliminamos el óxido de zinc aparecen patologías que hay que tratar por medio de antibióticos generando más resistencias que queremos evitar, así que es necesario buscar alternativas a la prevención en transición y precebo (Burch, 2017; Medel de la Torre, 2017).

La industria plantea varias soluciones como destetar a los 26-28 días con mayor peso vivo para que la transición al pienso sea menos estresante, reducir la concentración de proteína del pienso y suplementar las dietas con aminoácidos sintéticos para que no se acumule proteína no digestible y prolifere *E.coli*, emplear aditivos con efecto estabilizador de la microbiota intestinal y reducir las fuentes de calcio para evitar la alcalinización intestinal y la proliferación de *E.coli*. (Molist y Davin, 2013).

Entre 2015 y 2016 países como Francia y Holanda vieron el riesgo de contaminación medioambiental de sus suelos y posible contaminación de acuíferos, por ello fueron a la Agencia Europea del Medicamento (EMA) con el artículo 35 de la Directiva 2001/82/EC para que lo retiraran. Dinamarca demostró que se estaba convirtiendo en un país en “peligro

tóxico” porque los niveles de zinc en suelos ácidos y arenosos principalmente habían superado las concentraciones inocuas previstas. Sin embargo, la Asociación Internacional del zinc defiende que éste se une a otros componentes del suelo reduciendo su biodisponibilidad. No considera válidos los análisis realizados en Dinamarca debido a que no se ajustaron al informe de evaluación de riesgos de la UE (Burch, 2017). Llama la atención que en el mapa tanto de España como de Europa los suelos con más concentración de óxido de zinc no corresponden en absoluto a las zonas con más producción de porcino. En el caso de España coinciden con las zonas mineras. (Imágenes), (Agrodigital, 2017).

El Comité de Medicamentos de Uso Veterinario (CVMP) de la Agencia Europea del Medicamento (EMA) anunció que el riesgo medioambiental del uso terapéutico del óxido de zinc era superior respecto a los beneficios que se obtenían en prevención de enteritis y DPD. A pesar de que aprobaran su uso el año anterior (Burch, 2017).

Finalmente, el 26 de Junio de 2017 la Comisión Europea en Bruselas tomó la Decisión 4529/2017 final acerca de las autorizaciones de comercialización, en el marco del artículo 35 de la Directiva 2001/82/CE del Parlamento Europeo y del Consejo, de los medicamentos veterinarios que contengan “óxido de zinc” para su administración por vía oral a las especies destinadas a la producción de alimentos, (D (UE) nº 4529/2017 de la Comisión, de 26 de Junio de 2017). En ella se expone la decisión de retirar la autorización del uso de óxido de zinc en lechones, dejando de margen hasta el 2022. Hay representantes del sector porcino del Reino Unido que consideran insuficiente 5 años para adaptarse a este cambio y piden una ampliación a 10 años, (Morales, 2017).

### **3. JUSTIFICACIÓN Y OBJETIVOS**

Después de la Decisión 4529/2017 acerca de la retirada de la autorización del uso de óxido de zinc en lechones, dejando de margen hasta el 2022, surge la necesidad de buscar alternativas para prevenir la diarrea neonatal y la DPD, y la co-selección de genes de resistencia a determinados antibióticos, además de no generar ningún problema medioambiental. Para ello se han realizado varios estudios en los que se analizan los efectos de un aditivo zootécnico como es Probisán® durante los primeros días post-destete.

Probisán® es un aditivo alimenticio postbiótico obtenido a partir del proceso de fermentación de un cultivo de levaduras y bacterias lácticas. Estos microorganismos están ligados a cierto sustrato vegetal y se mezclan con sustancias biológicamente activas como ácidos orgánicos y vitaminas (del grupo B principalmente). El uso de Probisán® podría modular el crecimiento de la microflora intestinal de los lechones aumentando la actividad del tejido linfoide asociado a

la mucosa (MALT) y podría reducir la incidencia de trastornos digestivos (disbiosis), especialmente para los primeros días del periodo post-destete.

En la producción porcina, la suplementación con antibióticos en el alimento es un cambio importante que debe ser considerado y con el desarrollo de este proyecto se acercó a encontrar posibles soluciones.

El **objetivo** de este tratamiento (dieta Probisan®) respecto a la dieta control es reducir el uso de antibióticos en producción porcina. Para ello se realizan dos ensayos con los que se estudia el efecto de la administración de suplementos alimenticios con Probisan® Swine DI (dieta tratamiento) en la morfología de la mucosa intestinal, en diferentes parámetros inmunes de la mucosa intestinal y en el perfil de la microbiota digestiva, con dos modelos diferentes de tratamiento (con óxido de zinc y Probisan®) y dos perfiles de nutrientes diferentes (HP: perfil alto, LP: perfil bajo), en comparación con una dieta control que tuviera diferentes antibióticos.

#### 4. METODOLOGÍA

Los estudios que se presentan fueron llevados a cabo en dos granjas situadas en las provincias de Zaragoza (granja de campo) y Lérida (granja experimental). Los lechones tuvieron acceso ad libitum al agua, durante todo el período experimental, el agua no se acidificó.

Se realizaron dos ensayos, uno con una dieta alimentaria de perfil alto y otro de perfil bajo (ver composición exacta en las Tablas 1 y 2). La dosis de Probisan® en la dieta de los dos estudios fue 3 Kg/Tm en el pienso pre-starter (de los 0 a los 19 días post-destete), y 1,5 kg/Tm en el pienso Starter (de los 20 a los 39 días post-destete).

TRIAL HP	Pre-starter 19 days	Starter 20 days
	ZnO ppm	ZnO ppm
Probisan	1600	0
Control	1600	0

En el ensayo de perfil alto de nutrientes se medicó durante cuatro días por agua a mitad del ensayo con una combinación de neomicina-colistina, porque los animales presentaron síntomas de diarrea beta-hemolítica.

TRIAL LP	Pre-starter 7 days		Starter – 28 days		
	Doxicilin ppm	ZnO ppm	Amoxycilin ppm	ZnO ppm	Flubendazole ppm
Probisán	0	2500	0	1500	15
Control	250	2500	300	1500	15

El contenido en energía neta (EN), proteína bruta (PB), lisina, metionina + cisteína de ambas dietas era:

	Ensayo HP		Ensayo LP	
	Pre-starter	Starter	Pre-starter	Starter
EN, Kcal/Kg	2630	2480	2445	2410
PB, %	17,5	17,5	16,0	16,0
SID Lys	1,21	1,18	1,05	0,96
SID Met+Cys	0,72	0,71	0,68	0,63

#### Las muestras y los parámetros analizados:

Por un lado tenemos muestras de heces, y por otro, muestras recogidas al final del periodo de destete.

##### 4.1. Recogida de heces

Se hicieron muestreos de heces en tres momentos diferentes, de diez animales tanto en el grupo ensayo como en el grupo control, con un total de 60 muestras. El primer muestreo se hizo 24 horas antes del destete, el segundo a las 48-72 h post-destete, y el tercero al final del periodo de destete. Para la recogida de heces se estimula el esfínter anal con un hisopo de algodón y después se recoge en una placa de Petri. De la placa de Petri se recoge 1 g de heces que se mezcla con 3 ml de etanol en un tubo de muestra, para evitar cambios en la composición de la microbiota después de la recogida de heces, se conserva a 4°C hasta su uso. Los estudios de biodiversidad y perfiles de microbiota se llevan a cabo mediante secuenciación masiva por Ion Torrent.

Para el análisis del microbioma se utilizan cuarenta oligonucleótidos por Ion Torrent chip, uno por muestra, construido por la secuencia común CCATCTCATCCCTGCGTGTCTCCGACTCAG en la posición 5', una secuencia interna de nueve nucleótidos que identifican cada muestra examinada (código de barras) y otra secuencia CAGCAGCCGCGTAATA común en la posición 3', que reconoce una secuencia conservada del gen 16S rRNA. Como un polinucleótido inverso, se utiliza la secuencia 5'-CCTCTCTATGGGCAGTCGGTGATCCGTCWATTCMTTGGAGTTT-3'. Las

secuencias de reconocimiento del gen 16S rRNA se encuentran en las regiones V4-V5 del gen 16S rARN (Lane, 1991) y el amplicón obtenido tiene un tamaño modal de 408 pares de bases. Las secuencias de amplicones obtenidas con el sistema Ion Torrent se multiplexan, filtran por calidad y analizan utilizando el programa QIIME 1.9.1 (Caporaso et al., 2010a). Con este programa, los amplicones se agrupan en unidades taxonómicas operativas (OTU) con una similitud del 97%, utilizando la opción UCLUST del programa assign\_taxonomy.py de QIIME. La asignación taxonómica de OTUs representativas se realiza utilizando el clasificador RDP (Wang et al., 2007) y la base de datos Greengenes v13.8. La secuencia de alineación se realiza con la opción PyNast (Caporaso et al., 2010b) y la script align\_seqs.py de QIIME. El resumen de OTUs por categoría (muestra, prueba, tratamiento) y la construcción de gráficos taxonómicos se llevan a cabo utilizando script summarize\_taxa\_through\_plots.py de QIIME. La diversidad alfa se usa para evaluar el índice de Shannon utilizando el subprograma alpha\_diversity.py de QIIME. Finalmente, la matriz de distancia (Lozupone et al., 2011) se calcula para la construcción de PCoA gráficos para el análisis de diversidad beta.

#### **4.2. Muestra de sangre**

Se recoge sangre mediante vacío, 8 ml cada muestra. Se separa el suero por centrifugación y congelación. De esta muestra no se presentan resultados.

#### **4.3. Raspado de mucosa intestinal, sobre una placa de Peyer**

Usando un raspador de cultivos celulares, se obtienen muestras de la mucosa ileal (alcanzando la mucosa muscular), de un segmento de aproximadamente 4-8cm<sup>2</sup>, que se depositan en tubos con 1ml de ARN-later. Las muestras se congelan inmediatamente y se guardan a -20°C hasta su uso para estudios inmunológicos. Con estas muestras, se procede a estudiar el grado de expresión de ARNm de los genes de diferentes citoquinas (IFN- $\gamma$ , IL-6, IL-10, TNF- $\alpha$ ) o marcadores de superficie celular (TLR-2, TLR-4, MHC clase II glicoproteína [BF-2]), junto con el gen de limpieza GAPDH como control interno. Estas determinaciones se realizan con QuantiTect™ SYBR® verde en un paso de un Kit de RT-PCR [QIAGEN] de acuerdo con las instrucciones del fabricante. La amplificación y detección de los productos específicos se realiza en una PCR a tiempo real con el equipo 7500-Fast (Applied Biosystems, Cal., EE. UU.) con el siguiente gradiente de temperatura y tiempo: un ciclo de 50°C durante 30 minutos, seguido de 95°C durante 15 minutos y 45 ciclos con rampas de 94°C por 30 segundos, 60°C por 30 segundos seguido por 72°C por 30 segundos. Para verificar la especificidad de los productos de amplificación, se usa el método de la curva de disociación (un ciclo a 95°C durante 1 minuto, 55°C durante 30 segundos y 95°C durante 30 segundos) después de la amplificación.

#### 4.4. Sección intestinal

Para estudiar la morfología de la mucosa intestinal, las muestras de íleo recogidas fueron de 1,5 a 2 cm de longitud próximas al raspado que se depositan en contenedores con formol tamponado para la fijación. Una vez en el laboratorio, las muestras de tejido se deshidratan y embeben en parafina. Las secciones de 3 micras de grosos se tiñen en tinción de PAS. La evaluación de la morfometría se mide con un microscopio óptico (Olympus, BHS, España). Los parámetros evaluados son: altura del villi (VH), profundidad de la cripta (CD) y el número de células caliciformes en villi y criptas. Las medidas se toman de 10 villi y criptas bien orientados. Las medidas del VH y CD se hacen usando un micrómetro ocular lineal (Olympus, ref 209-35040, Microplanet, Barcelona, Spain). El ratio VH/CD es calculado dividiendo VH por CD. Los mismos villis y criptas se usan para determinar el número de células caliciformes; cuyas variables se expresan en 100 micrómetros. Todos los análisis morfométricos son realizados por la misma persona y sin conocimiento de la relación mostrada por el tratamiento.

#### 4.5. Linfonodo mesentérico

Linfonodo mesentérico abierto por la mitad, con etanol. De esta muestra no se presentan resultados.

#### 4.6. Linfonodo mediastínico

Linfonodo mediastínico abierto por la mitad, con etanol. De esta muestra no se presentan resultados.

#### 4.7. Bilis

Bilis aspirada con jeringa, congelada. De esta muestra no se presentan resultados.



Foto 1: mesa con materiales y herramientas. Foto 2: mesa después de la recogida de muestras.



Foto 3



Foto 4

Foto 3: Mesa con muestras de nódulos linfáticos mesentérico y mediastínico, orina, bilis y raspado de mucosa intestinal.

Foto 4: Recogida de muestra de linfonodo en bote con etanol.



Foto 5: Recogida de orina.



Foto 6: Recogida de bilis.



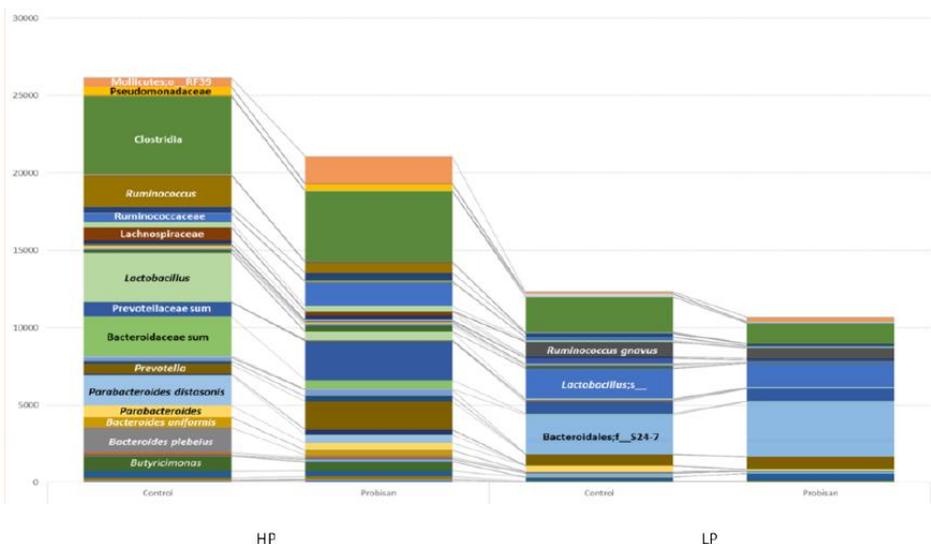
Foto 7: Recogida de linfonodo mediastínico. Foto 8: Raspado de placa de peyer.

Las pruebas laboratoriales que se describen en este Trabajo de Fin de Grado y el análisis estadístico fueron realizados por el Dr. Ignacio Badiola en el Centre de Recerca en Sanitat Animal (CRESA).

## 5. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

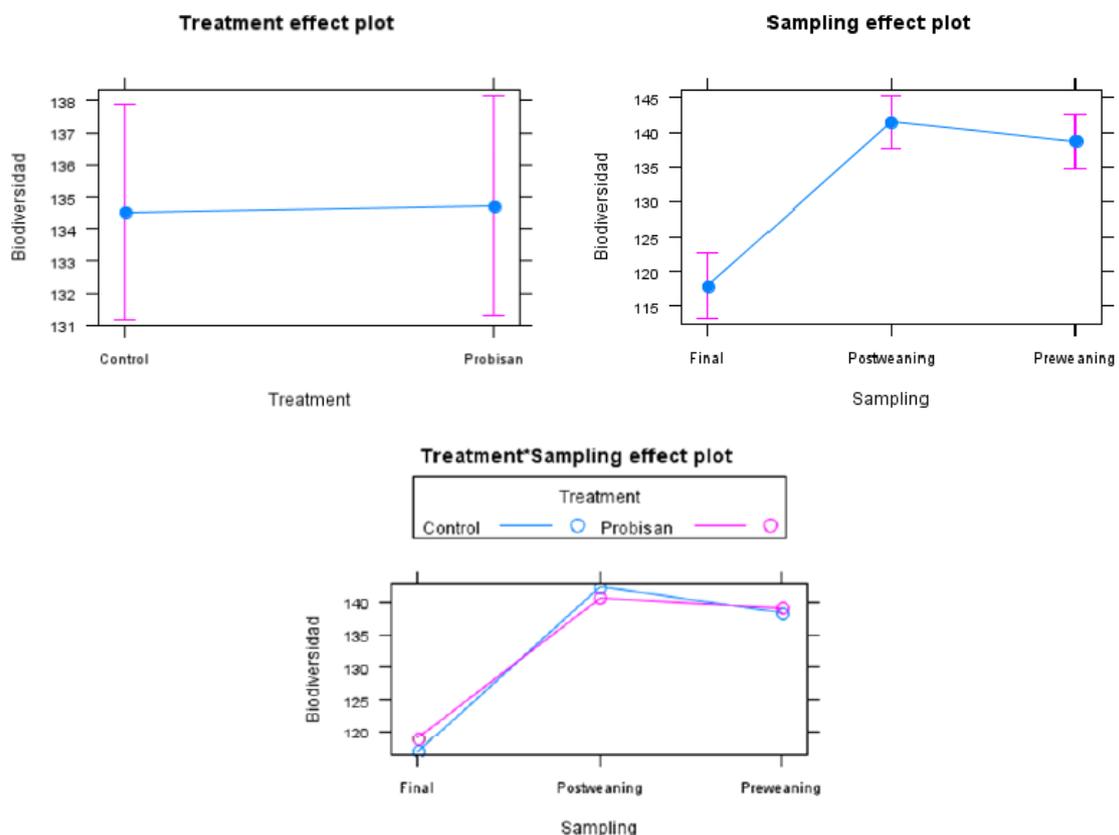
### 5.1. Perfiles de la microbiota intestinal:

La figura 3 muestra las subpoblaciones bacterianas, a diferentes niveles filogenéticos, así como las diferencias estadísticamente significativas se obtuvieron entre los tratamientos después el análisis de Kruskal-Wallis.



**Figura 3:** El número de secuencias acumuladas de los niveles filogenéticos con diferencias significativas entre tratamiento (Control y Probisan®) de los perfiles de microbiota obtenidos por secuenciación masiva por Ion Torrent de las muestras intestinales de los lechones examinados en los ensayos llevados a cabo en HP y LP.

En esta figura 3 se pueden ver diferentes perfiles entre ambas condiciones experimentales (HP vs LP) y entre las muestras de los animales de control y de los animales complementado con Probisan®. Es notable la reducción significativa de *Lactobacillus* spp en animales que recibieron Probisan®, un fenómeno que se puede explicar en la reducción de este tipo de bacterias en animales que recibieron los metabolitos secundarios producidos por *Lactobacilli* presentes en Probisan®, lo que haría innecesaria la proliferación de *Lactobacillus* spp. en la microbiota intestinal de los animales alimentados con alimento suplementado con Probisan®. En la misma figura también podemos observar la reducción de secuencias homólogas con *Clostridium* spp en los animales suplementados con Probisan®, más marcado en el grupo de LP experimental. Por el contrario, en relación con las bacterias Gram-negativas, en el grupo HP experimental, se observó un aumento significativo en el número de secuencias de *Prevotella* spp, en el grupo de animales suplementados con Probisan®, mientras que en el grupo experimental de LP, el aumento en las secuencias se observó en el caso de *Bacteroidales*; *f\_\_S24-7*.

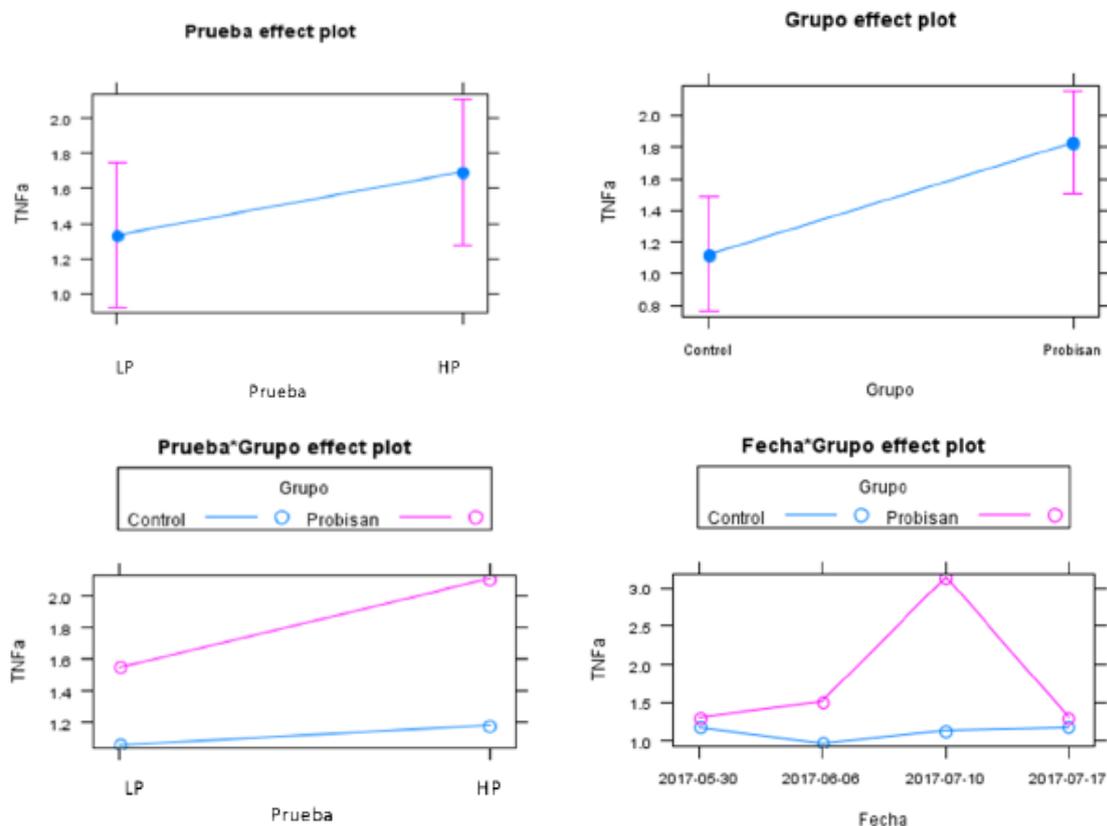


**Figura 4:** El grado de biodiversidad, evaluado por el número de OTU de los perfiles de microbiota obtenidos por secuenciación por Ion Torrent, de las muestras intestinales de los lechones examinados en los ensayos realizados en HP y LP según los tratamientos (control y Probisán®, izquierda), del momento del muestreo (predestete, post-destete) y final, arriba a la derecha) y de la interacción entre ambos factores (Figura a continuación).

Después del análisis del grado de biodiversidad, expresado por el número de OTU de los perfiles de microbiota obtenidos por secuenciación masiva por Ion Torrent, no significativo se observó diferencia entre los tratamientos ( $P= 0,935$ , figura 4, arriba a la izquierda), aunque hizo el momento de muestreo ( $P<0,001$ , figura 4, arriba a la derecha), con significativamente menor biodiversidad al final del ensayo en comparación con la biodiversidad observada en el predestete y muestras posteriores al destete. Esta diferencia significativa, entre los momentos de muestreo, se mantuvo sin cambios entre ambos tratamientos experimentales ( $P= 0,831$ , figura 4, abajo).

### 5.2. Parámetros de inmunidad intestinal:

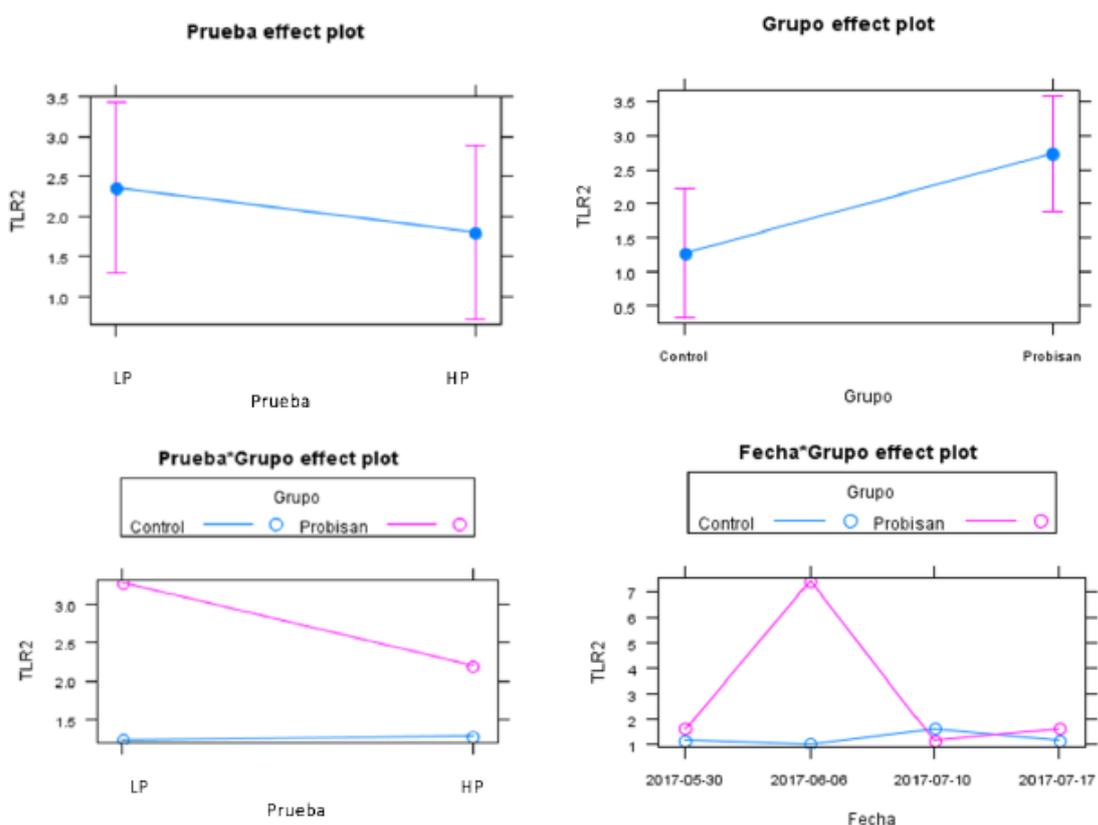
Los resultados del estudio estadístico P por GLM de la relación entre diferentes marcadores del sistema inmune de la mucosa intestinal de las muestras se explican en la figura 5.



**Figura 5:** El promedio +- de error estándar (EE) del grado de expresión del gen TNF-a de las muestras de acuerdo al ensayo (LP o HP, gráfico superior izquierdo), el tipo de tratamiento

(Control y Probisán®, gráfico superior derecho) y la interacción del ensayo: tratamiento (gráfico inferior izquierdo) y la fecha de interacción: tratamiento (gráfico inferior izquierdo).

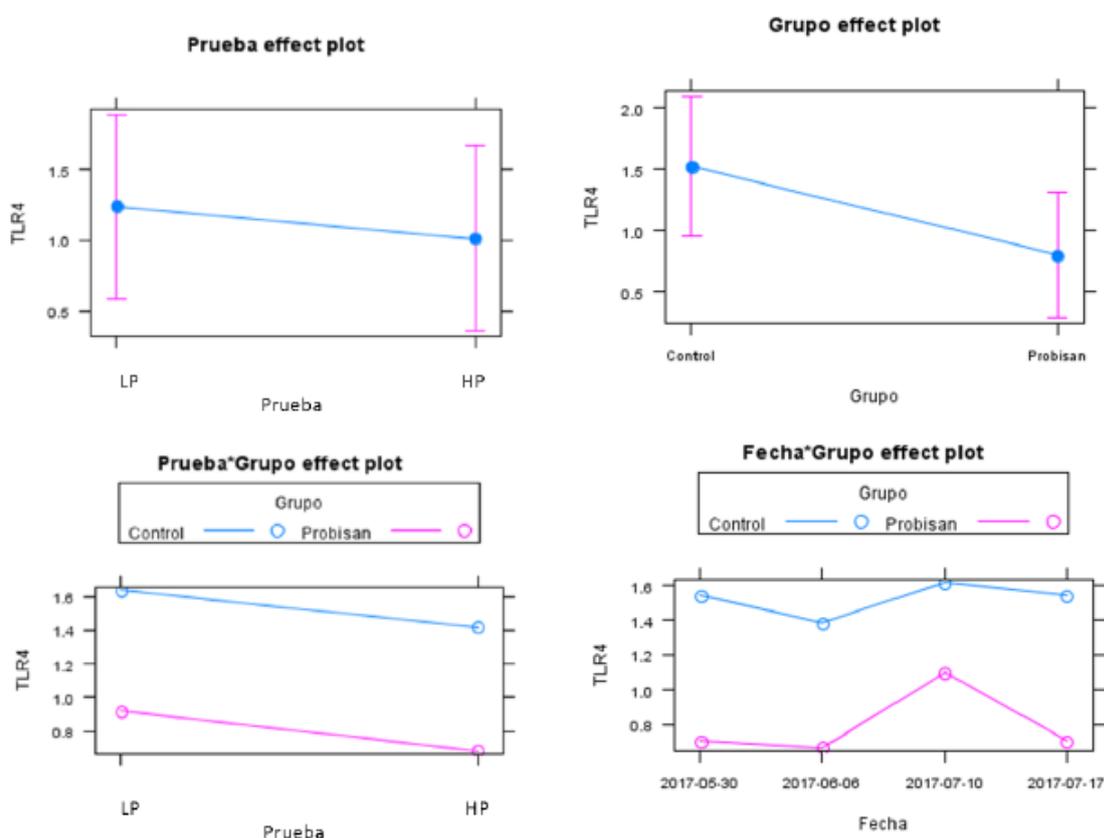
La figura 6 muestra el efecto significativo del tratamiento en el grado de expresión del gen TNF-a ( $P= 0,005$ ), esta diferencia significativa se debe a un mayor grado de expresión en los animales alimentados con la alimentación suplementada con Probisán® y estaría relacionado con la activación local del endotelio vascular, liberación de óxido nítrico con vasodilatación y aumento de la permeabilidad vascular, lo que daría como resultado el reclutamiento de células inflamatorias, inmunoglobulinas y complemento en el intestino de animales tratados con Probisán®, causando la activación de los linfocitos T y B. En la mucosa intestinal, el gen TNF-a se expresa principalmente en linfoblastos B y células dendríticas.



**Figura 6:** El promedio +- de error estándar (EE) del grado de expresión del gen TLR-2 de las muestras según la prueba (LP o HP, gráfico superior izquierdo), el tipo de tratamiento (control y Probisán®, gráfico superior derecho) y el ensayo de interacción: tratamiento (gráfico superior derecho) y el ensayo de interacción: tratamiento (gráfico inferior izquierdo) y la fecha de interacción: tratamiento (gráfico inferior izquierdo).

La figura 6 muestra el efecto significativo del tratamiento sobre el grado de expresión del gen del receptor de superficie TLR-2 ( $P= 0,022$ ), esta diferencia significativa es debida a un mayor

grado de expresión en animales que recibieron la alimentación complementada con Probisán® (Figura 6, arriba a la derecha) y estaría relacionado con una mayor estimulación por bacterias Gram positivas, el componente principal de Probisán®. En ambos ensayos, el grado de expresión del gen TLR-2 fue mayor en los animales alimentados con la alimentación suplementada con Probisán® (Figura 6, abajo a la izquierda). En la mucosa intestinal, el gen TLR-2 es expresado principalmente en monocitos.



**Figura 7:** El promedio  $\pm$  de error estándar (EE) del grado de expresión del gen TLR-4 de las muestras según la prueba (Prueba: LP o HP, gráfico superior izquierdo), el tipo de tratamiento (grupo: control y Probisán®, gráfico superior derecho) y el ensayo de interacción: tratamiento (gráfico inferior izquierdo) y fecha e interacción: tratamiento (gráfico inferior derecho).

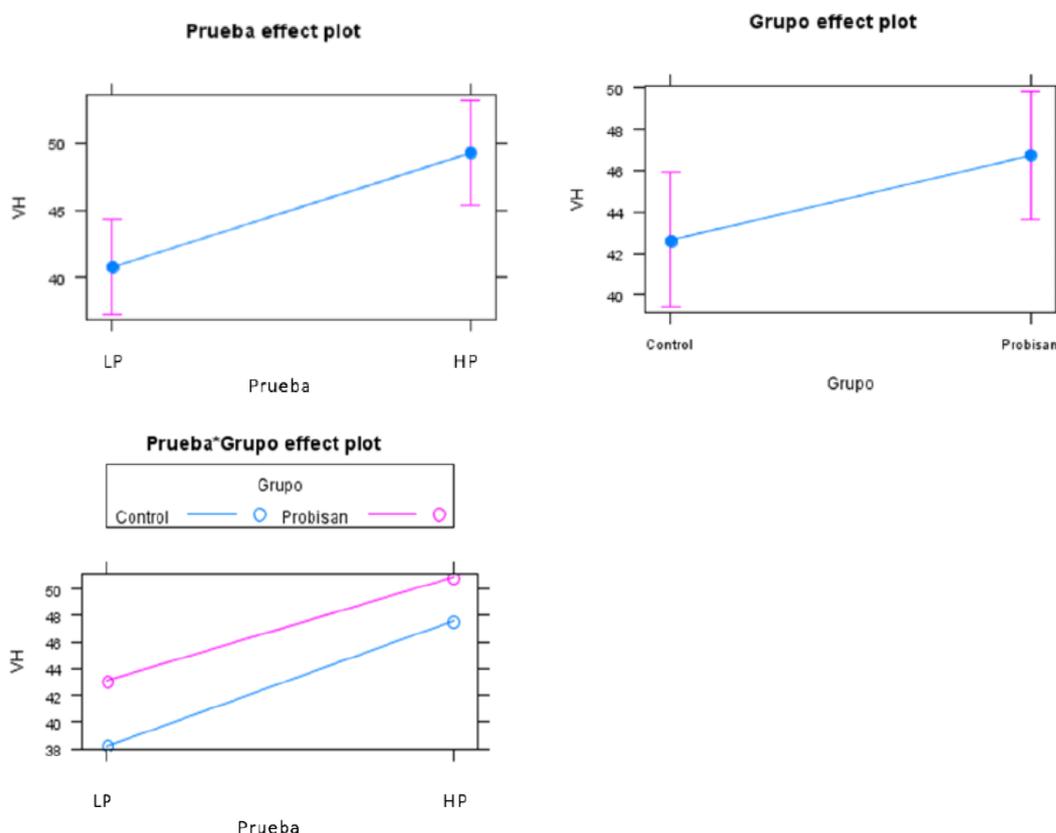
La figura 7 muestra la tendencia del tratamiento en el grado de expresión del gen TLR-4 del receptor de superficie ( $P= 0,066$ ). Esta diferencia significativa se debe a un menor grado de expresión en los animales alimentados con pienso, complementado con Probisán® (Figura 7, arriba a la derecha) y estaría relacionado con una estimulación más baja por LPS de bacterias Gram-negativas. Esta reducción en el grado de expresión del gen marcador de superficie TLR-4 podría asociarse con una menor presencia de LPS en el contenido intestinal. El LPS de las bacterias Gram negativas comensales y patógenas están involucradas en el aumento de procesos inflamatorios por la activación de TLR-4. En ambos ensayos, el grado de expresión del

gen TLR-4 fue menor en los animales alimentados con la alimentación suplementada con Probisán® (Figura 7, abajo a la izquierda). Como en el caso de TLR-3, en la mucosa intestinal, el gen TLR-4 se expresa principalmente en monocitos.

A partir del conjunto de resultados de los diferentes parámetros del sistema inmune analizados, se puede inferir la mayor estimulación de la inmunidad natural contra bacterias Gram-positivas en animales, lo que podría suponer una mayor protección contra enteritis inespecífica causado por diferentes especies de *Clostridium*. Además, la estimulación más baja de la inmunidad natural se ha observado con bacterias Gram-negativas, probablemente debida a una reducción en la concentración de LPS en el contenido intestinal. Teniendo en cuenta que *E.coli*, una bacteria Gram-negativa es la principal causa de diarrea post-destete en cerdos, los resultados obtenidos podrían constituir un aspecto positivo de Probisán® como controlador de diarrea colibacilar en lechones.

### 5.3. De la morfología intestinal:

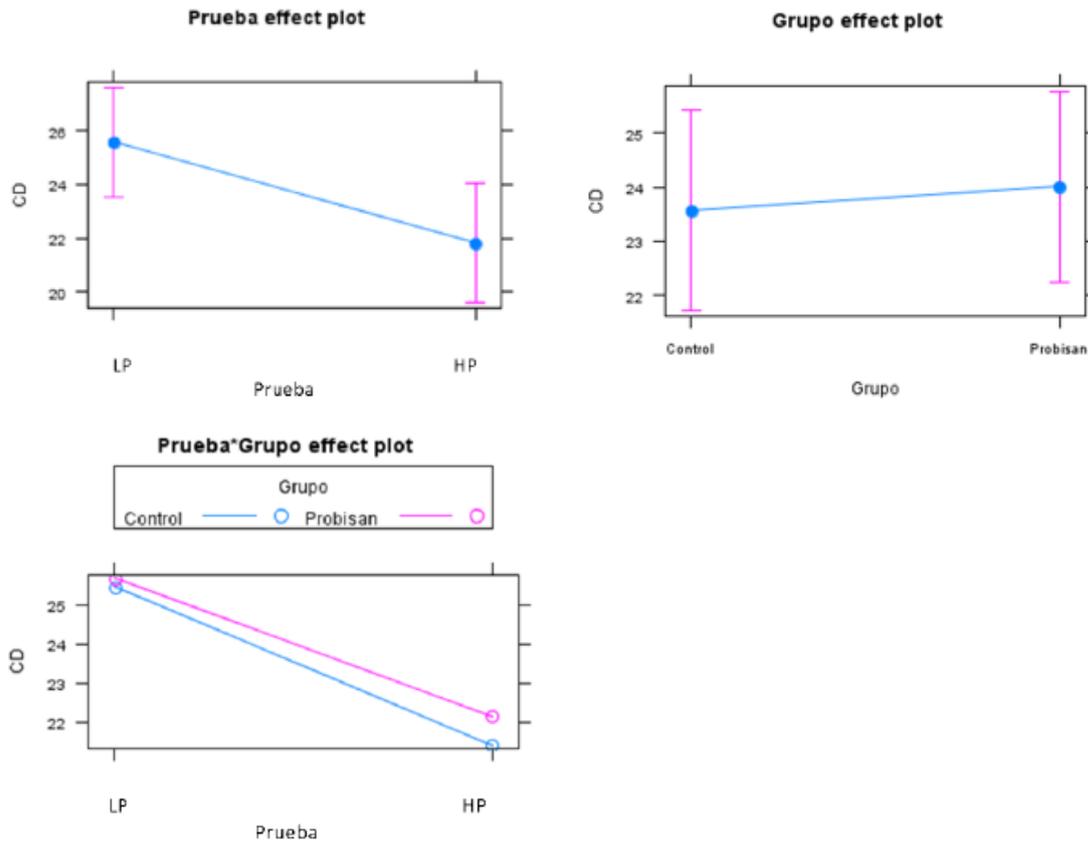
Los resultados del análisis de la mucosa linfoide intestinal (GML) (ANOVA) de los datos de la altura del villi (VH) de las muestras analizadas se resumen en figura 8.



**Figura 8:** El promedio +- el error estándar (EE) de la altura de las vellosidades, en micras, de las muestras según el ensayo (Prueba: LP p HP, gráfico superior izquierdo), el tipo de tratamiento

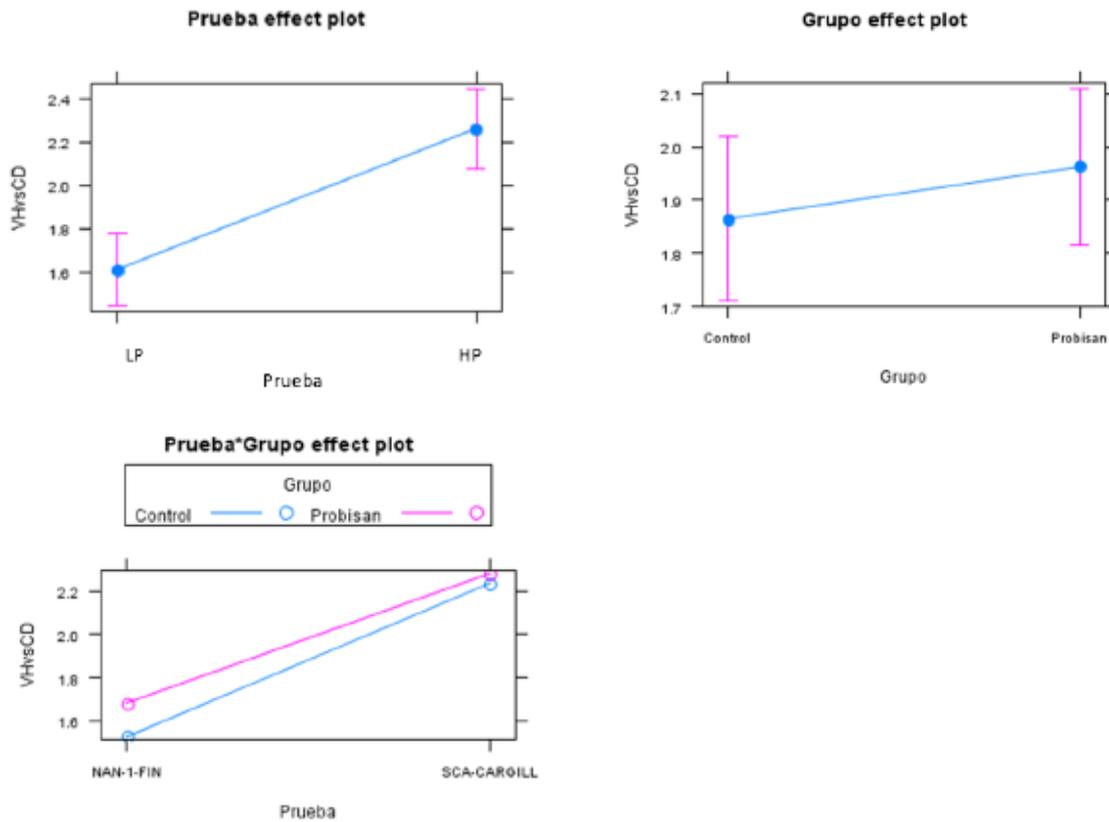
(Grupo: control y Probisan®, gráfico superior derecho) y el ensayo de interacción: tratamiento (gráfico inferior).

La figura 9 resume los resultados del análisis GLM (ANOVA) de las criptas y datos de profundidad (CD) de las muestras analizadas.



**Figura 9:** El promedio +- del error estándar (EE) de la profundidad de las criptas (CD), en micras, de las muestras de acuerdo al ensayo (Prueba: LP o HP, gráfico superior izquierdo), el tipo de tratamiento (Grupo: control y Probisan®, gráfico superior derecho) y la interacción del ensayo: tratamiento (gráfico inferior).

La figura 10 resume los resultados del análisis por GLM (ANOVA) de los datos de la relación entre la altura del villi y la profundidad de las criptas de las muestras analizadas.



**Figura 10:** El promedio +- el error estándar (EE) de la relación entre la altura del villi y la profundidad de las criptas (VHvsCD) de las muestras de acuerdo al ensayo (Prueba: LP o HP, gráfico superior izquierdo), el tipo de tratamiento (Grupo: control o Probisan®, gráfico superior derecho) y la interacción del ensayo: tratamiento (gráfico inferior).

Los resultados del estudio de la morfología intestinal mostraron una marcada diferencia entre los dos ensayos realizados, con una diferencia estadísticamente significativa para los tres parámetros analizados. De estos resultados puede ser inferido que hay más problemas entéricos en el ensayo de LP, desde la altura del villi en los animales del ensayo LP fue menor que el observado en el ensayo de animales HP y que la profundidad de las criptas en los animales del ensayo LP fue mejor que la profundidad de las criptas del ensayo de animales con HP. Estos dos puntos resultaron en un mayor grado de lesión intestinal en los animales del ensayo LP (baja altura del villi) con una mayor regeneración de la mucosa intestinal (mayor profundidad de las criptas).

Puede ser inferido que la suplementación alimentaria con Probisan® supuso la mejora de los parámetros histológicos de salud intestinal, con tendencia estadística en el caso de la altura del villi ( $P= 0,077$ ). Estas diferencias tuvieron más peso cuando se observaban (Figura 8-inferior) que la altura del villi superior en los animales tratados con Probisan® ambos en los ensayos LP y HP.

La relación entre la altura del villi y la profundidad de las criptas, aunque no fuera una diferencia significativa de acuerdo con el tratamiento ( $P= 0,333$ ), fue también superior en los animales tratados con Probisán® en ambos experimentos.

A partir de estos resultados se puede inferir que la suplementación de la alimentación con Probisán® tiene un efecto regenerador en la mucosa intestinal y aumenta la superficie de la absorción digestiva, favoreciendo la salud intestinal.

## 6. CONCLUSIONES

A partir de estos dos ensayos, se puede inferir que el uso de Probisán® puede tener efectos positivos sobre los lechones en peri-destete al reducir los posibles efectos inflamatorios de los LPS de las bacterias Gram negativas, un aspecto clave en los procesos diarreicos causados por *Escherichia coli* al destete. Probisán® también aumentaría la respuesta inmune natural contra las bacterias Gram positivas, por lo que podría desempeñar un papel primordial contra la enteritis no específica de la primera edad producida por *Clostridium* spp. La suplementación con Probisán® favorece la integridad de la mucosa intestinal, como se deduce del aumento en la altura de las vellosidades intestinales en animales alimentados con alimento suplementado con Probisán®.

From these two trials, it can be inferred that the use of PROBISAN® can have positive effects on piglet peri-weaning by reducing the possible inflammatory effects of LPS of Gram-negative bacteria, a key aspect in the diarrheic processes caused by *Escherichia coli* at weaning. Probisán® would also increase the natural immune response against Gram-positives, so it could play a positive role against non-specific enteritis of the first age produced by *Clostridium* spp. Supplementation with PROBISAN® favors the integrity of the intestinal mucosa, as seems to be inferred from the increase in the height of the intestinal villi in animals fed with feed supplemented with Probisán®.

## 7. VALORACIÓN PERSONAL

La realización de este trabajo me ha servido para profundizar en el conocimiento de los aditivos zootécnicos, en especial sobre los prebióticos, probióticos y postbióticos, en la producción porcina. Durante el Grado este tema, el de los aditivos zootécnicos, se trata de manera bastante superficial, sin llegar a verse la gran importancia que tienen como herramienta de mejora en la nutrición animal de cara al futuro, en el que se deben encontrar

alternativas al uso de antibióticos y óxido de zinc para la prevención de patologías, sobre todo en el periodo de destete y transición.

Además de ampliar el conocimiento en este tema, el presente trabajo me ha permitido desarrollar otras competencias transversales, como la búsqueda de información científica fiable, gestionar y organizar la información recogida, y a citar y referenciar las fuentes bibliográficas.

Ha supuesto un gran reto adentrarme en la investigación de temas que desconocía pero también ha sido una experiencia muy gratificante, tanto a nivel personal como académico, y estoy segura de que las habilidades y conocimientos adquiridos, me resultarán de utilidad en el futuro.

Por último, me gustaría agradecer a mis orientadores Tania, Héctor y Jesús la dedicación, disponibilidad y esfuerzo que me han brindado durante todo este tiempo, gracias. Agradecer también a todos los participantes que se han implicado para que esta investigación pueda llevarse a cabo.

## 8. BIBLIOGRAFÍA

- 1.- Aguilar-Toalá, J. E., García-Varela, R., García, H. S., Ata-Haro, V. M., González-Córdova, A. F., Vallejo-Cordoba, B., y Hernández-Mendoza, A. (2018). "Postbióticos". *Apsal*. Disponible en: <http://apsal.org/postbioticos/> [Consultado 7-8-2018].
- 2.- Álvarez Calatayud, G. (2015). "¿Qué son los posbióticos?". *El probiótico*. Disponible en: <https://www.elprobiotico.com/que-son-los-posbioticos/> [Consultado 7-8-2018].
- 3.- Aznar, R., y Zúñiga, M. (2011). *¿Qué son las bacterias lácticas?*. Artículo de divulgación. Universidad de Valencia. Disponible en: <http://redbal.iata.csic.es/documentos/sabiasque/Que%20son%20las%20bacterias%20lacticas.pdf> [Consultado 27-7-2018]. Accedido desde: [http://redbal.iata.csic.es/sabias\\_que.php](http://redbal.iata.csic.es/sabias_que.php)
- 4.- Blanch, A. (2015). "Aplicación de probióticos, prebióticos y simbióticos en porcino". *NutriNews*. Disponible en: <https://nutricionanimal.info/aplicacion-de-probioticos-prebioticos-y-simbioticos-en-porcino/> [consultado 17-02-2018].
- 5.- Blanch, A. (2015). "Probióticos, prebióticos y simbióticos en nutrición y salud animal". *NutriNews*. Disponible en: <https://nutricionanimal.info/download/0615-blanch-Pre-probioticos&simbioticos-en-nutricion-animal.pdf> [Consultado 7-8-2018].
- 6.- Burch, D. (2017). "Situación actual del uso del óxido de zinc para la prevención de la enteritis/diarrea post-destete en la UE". *3tres3*. Disponible en:

[https://www.3tres3.com/articulos/situacion-actual-del-uso-del-oxido-de-zinc-en-la-ue\\_37722/](https://www.3tres3.com/articulos/situacion-actual-del-uso-del-oxido-de-zinc-en-la-ue_37722/)

[Consultado 9-7-2018].

7.- Casado Muñoz, M. C. (2016). **Análisis de la resistencia a agentes antimicrobianos en bacterias lácticas aisladas de aceitunas aloreña para su uso como probióticos**. Tesis doctoral.

Universidad de Jaén. Disponible en: <file:///C:/Users/Usuario/Downloads/9788491590187.pdf>

[consultado 18/7/2018].

8.- El Periódico. (2016). “Novedoso suplemento nutricional desarrollado por aragoneses”. **El Periódico de Aragón**, 6 de Diciembre. Disponible en:

[http://www.elperiodicodearagon.com/noticias/aragon/novedoso-suplemento-nutricional-desarrollado-aragoneses\\_1164719.html](http://www.elperiodicodearagon.com/noticias/aragon/novedoso-suplemento-nutricional-desarrollado-aragoneses_1164719.html) [Consultado 7-8-2018].

9.- FAO. (2014). Cerdos y la producción animal.

<http://www.fao.org/ag/againfo/themes/es/pigs/production.html>

10.- Fouhse, J. M., Zijlstra, R. T., y Willing, B. P. (2017). “Rol de la microbiota intestinal en la salud y la enfermedad de los cerdos”. **Avances en tecnología porcina**, (XIV, 6), pp. 6-16.

11.- García Curbelo, Y., García, Y. y Bocourt Salabarría, R. (2014). “Los probióticos como alimento funcional”. **Albèitar**. Disponible en:

<https://albeitar.portalveterinaria.com/noticia/10233/articulos-nutricion-archivo/los-probioticos-como-alimento-funcional.html> [Consultado 9-7-2018].

12.- González Sánchez, M. E., y Manrique Vergara, D. (2017). “Ácido butírico: Innovación en formulación de liberación entérica”. **Farmacia Hispalense**. Disponible en:

<file:///C:/Users/Usuario/Downloads/Acido%20Butirico%20Farmacia%20Hispalense%20sep.2017.pdf> [Consultado 7-8-2018].

13.- González, M. E., y Manrique, D. (2016a). “¿Qué es un postbiótico?”. Elieh Health Solutions. Disponible en: <https://eliehs.com/es/what-is-a-postbiotic/> [Consultado 7-8-2018].

14.- González, M. E., y Manrique, D. (2016b). “Suplementación nutricional con ácido butírico. ¿Qué evidencias tenemos?”. Elieh Health Solutions. Disponible en:

<https://eliehs.com/es/tag/acido-butirico/> [Consultado 7-8-2018].

15.- Hernández, J. M. (2017). “Butirato de sodio y sus efectos en dietas de aves y cerdos”. **Actualidad porcina**. Disponible en: <http://www.actualidadporcina.com/articulos/butirato-de-sodio-y-sus-efectos-en-dietas-de-aves-y-cerdos.html> [Consultado 7-8-2018].

16.- **Las mayores concentraciones de óxido de zinc en los suelos no se dan en las zonas productoras de cerdos**. [En línea]. En: Agrodigital, 2017. Disponible en:

<https://www.agrodigital.com/2017/11/29/las-mayores-concentraciones-de-oxido-de-zinc-en-los-suelos-no-se-dan-en-las-zonas-productoras-de-cerdos/> [Consultado 11-8-2018].

- 17.- Luppi, A. (2017). "Colibacilosis porcina: diagnóstico, tratamiento y resistencia antimicrobiana". *Avances en tecnología porcina*, (XIV, 142), pp. 8-24.
- 18.- Magallón, E., Tainta, M., Gil, P., Sánchez, F., Barbero, R., Espada, M., Iguacel, F., y Falceto, V. (2013). "Perspectivas en España. Un ejemplo local: el sector porcino en Aragón". *SUIS*, (97), pp. 42-47.
- 19.- Magallón, E., Tainta, M., Gil, P., Sánchez, F., Barbero, R., y Falceto, V. (2013). "Situación mundial de la producción de carne de cerdo". *SUIS*, (96), pp. 36-47.
- 20.- Medel de la Torre, P. (2017). "Transición a dietas sin óxido de zinc". *3tres3*. Disponible en: <https://www.3tres3.com/articulos/transicion-a-dietas-sin-oxido-de-zinc-37932/> [Consultado 11-8-2018].
- 21.- Mercado, E., Tomás, C., Gómez-Izquierdo, E., y Gómez-Fernández, J. (2013). "¿Cómo saber si funcionan los prebióticos y probióticos en porcino?". *Albèitar*. Disponible en: <https://albeitar.portalveterinaria.com/noticia/12451/articulos-nutricion-archivo/como-saber-si-funcionan-los-prebioticos-y-probioticos-en-porcino.html> [Consultado 9-7-2018].
- 22.- Miranda, R., Carvajal, A., y Rubio, P. (2017). "Conversamos con tres miembros del grupo DIGESPORC sobre la importancia de la microbiota y sus implicaciones sobre la salud de los animales". *Producción animal*. 33 (300), pp. 18-20. Disponible en: <http://www.produccionanimal.com/online/300/html5/> [Consultado 7-8-2018].
- 23.- Molist, F., y Davin, R. (2013). "Utilización del óxido de zinc en lechones para el control de la diarrea post-destete". *Albèitar*. Disponible en: <https://albeitar.portalveterinaria.com/noticia/11972/articulos-porcino-archivo/utilizacion-del-oxido-de-cinc-en-lechones-para-el-control-de-la-diarrea-posdestete.html> [Consultado 9-7-2018].
- 24.- Morales, D. (2017). "Retirada la autorización para el uso de óxido de zinc en lechones". *PorciNews*. Disponible en: [https://porcino-info.cdn.ampproject.org/v/s/porcino.info/retirada-la-autorizacion-uso-oxido-zinc-lechones/amp/?amp\\_js\\_v=a2&amp\\_gsa=1&usqp=mq331AQCCAE%3D#referrer=https%3A%2F%2Fwww.google.com&amp\\_tf=De%20%251%24s&ampshare=https%3A%2F%2Fporcino.info%2Fretirada-la-autorizacion-uso-oxido-zinc-lechones%2F](https://porcino-info.cdn.ampproject.org/v/s/porcino.info/retirada-la-autorizacion-uso-oxido-zinc-lechones/amp/?amp_js_v=a2&amp_gsa=1&usqp=mq331AQCCAE%3D#referrer=https%3A%2F%2Fwww.google.com&amp_tf=De%20%251%24s&ampshare=https%3A%2F%2Fporcino.info%2Fretirada-la-autorizacion-uso-oxido-zinc-lechones%2F) [Consultado 11-8-2018].
- 25.- Parra Huertas, R. A. (2010). "*Bacterias ácido lácticas: papel funcional en los alimentos*". Revisión. Universidad Pedagógica y Tecnológica de Colombia. Disponible en: <http://www.scielo.org.co/pdf/bsaa/v8n1/v8n1a12.pdf/> [Consultado 8-8-2018]. Accedido desde: C:\Users\Usuario\Downloads\Bacterias ácido lácticas - EcuRed.mhtml

- 26.- Pérez, L. (2017). “¿Qué es la Metagenómica?”. **PorciNews**. Disponible en: [https://porcino-info.cdn.ampproject.org/v/s/porcino.info/que-es-la-metagenomica/amp/?amp\\_js\\_v=a2&amp\\_gsa=1&usqp=mq331AQCCAE%3D#referrer=https%3A%2F%2Fwww.google.com&amp\\_tf=De%20%251%24s&ampshare=https%3A%2F%2Fporcino.info%2Fque-es-la-metagenomica%2F](https://porcino-info.cdn.ampproject.org/v/s/porcino.info/que-es-la-metagenomica/amp/?amp_js_v=a2&amp_gsa=1&usqp=mq331AQCCAE%3D#referrer=https%3A%2F%2Fwww.google.com&amp_tf=De%20%251%24s&ampshare=https%3A%2F%2Fporcino.info%2Fque-es-la-metagenomica%2F) [Consultado 12-8-2018].
- 27.- Rubio-Guerri, C., Vicente-Rubiano, M., y Sánchez-Vizcaíno, J. M. (2012). **Metagenómica, la técnica que “descubre” nuevos virus**. Artículo de divulgación. Centro de Vigilancia Sanitaria Veterinaria (VISAVET). Universidad Complutense de Madrid. Disponible en: <https://www.visavet.es/es/metagenomica-la-tecnica-que-descubre-nuevos-virus/12=361/> [Consultado 12/8/2018]. Acceso a [http://www.colvema.org/WV\\_descargas/metagenweb-15022012152421.pdf](http://www.colvema.org/WV_descargas/metagenweb-15022012152421.pdf)
- 28.- Tsilingiri, K y Rescigno, M. (2013). “Postbiotics: What else?”. **Wageningen Academic Publishers**. Disponible en [https://www.researchgate.net/publication/233999264\\_Postbiotics\\_What\\_else?enrichId=rgreq-4979647a6a144d11fb038c7c90097524-XXX&enrichSource=Y292ZXJQYWdIOzIzMzk5OTI2NDtBUzozMjUxMDQxMjM4MjYxNzIAMTQ1NDUyMjMjEwMw%3D%3D&el=1\\_x\\_2&esc=publicationCoverPdf](https://www.researchgate.net/publication/233999264_Postbiotics_What_else?enrichId=rgreq-4979647a6a144d11fb038c7c90097524-XXX&enrichSource=Y292ZXJQYWdIOzIzMzk5OTI2NDtBUzozMjUxMDQxMjM4MjYxNzIAMTQ1NDUyMjMjEwMw%3D%3D&el=1_x_2&esc=publicationCoverPdf) [Consultado 16-9-2018].
- 29.- Unión Europea. Decisión (UE) nº 4529/2017 de la Comisión, de 26 de Junio de 2017, por la que se prohíbe la comercialización de los medicamentos veterinarios que contengan “óxido de zinc” para su administración por vía oral a las especies destinadas a la producción de alimentos. Diario Oficial de las Comunidades Europeas, 26 de Junio de 2017 (4529), 1-4. Disponible en: [https://ec.europa.eu/health/documents/community-register/2017/20170626136754/dec\\_136754\\_es.pdf](https://ec.europa.eu/health/documents/community-register/2017/20170626136754/dec_136754_es.pdf) [Consultado 11-8-2018].
- 30.- Wielsa, G. (2015). “Tributirina, la influencia de una nueva forma de ácido butírico sobre la integridad digestiva”. **NutriNews**. Disponible en: <https://nutricionanimal.info/tributirina-la-influencia-de-una-nueva-forma-de-acido-butirico-sobre-la-integridad-digestiva/> [Consultado 7-8-2018].
- 31.- Wielsa, G. (2016). “Butírico & Salud intestinal. Descubriendo los mecanismos de acción”. **NutriNews**. Disponible en: <https://nutricionanimal.info/butirico-salud-intestinal-descubriendo-los-mecanismos-accion/> [Consultado 7-8-2018].