



Facultad de Veterinaria
Universidad Zaragoza



Trabajo Fin de Grado en Veterinaria

Uso de lisozima como aditivo en dietas para lechones

Use of lysozyme as an additive in diets for weaned pigs

Autor/es

Inés García Viñado

Director/es

Dr. Manuel Fondevila Camps

Facultad de Veterinaria

2018

ÍNDICE

1. Resumen	2
2. Abstract	3
3. Introducción	4
4. Justificación y objetivos	6
5. Metodología	7
6. Resultados y discusión	9
6.1. Efectos sobre el rendimiento nutricional y la morfología intestinal	15
6.2. Efectos sobre la respuesta inmune ante una infección y en la prevención de patologías	18
7. Conclusiones	30
8. Conclusions	31
9. Valoración personal	32
10. Bibliografía	33

1. Resumen:

La lisozima es una enzima natural que forma parte de secreciones tales como las lágrimas, la saliva o la leche. Su función como agente antibacteriano es debida a que es capaz de catalizar la hidrólisis de las uniones de los disacáridos repetitivos del peptidoglicano de la pared celular de las bacterias, lo que conduce a la muerte celular. Este trabajo trata de hacer una revisión bibliográfica de los últimos estudios realizados sobre el uso de la lisozima como aditivo en dietas de lechones en fase de transición, comparando su efecto con el uso de antibióticos usados tradicionalmente en esta fase de producción para la mejora de la salud y el rendimiento de los lechones. Tras años de estudios es clara la correlación entre la administración de antibióticos y la mejora de la producción. De manera similar, la lisozima, como aditivo en la dieta, mejora el crecimiento y el rendimiento nutricional, pero al contrario que los antibióticos no altera la microbiota intestinal dejándola más expuesta a las patologías sino que la enriquece de probióticos, ni tampoco favorece la aparición de resistencias. Es por ello que la lisozima es una alternativa viable al uso de antibióticos en la producción porcina.

2. Abstract:

Lysozyme is a naturally occurring enzyme found in secretions such as tears, saliva or milk. Its function as an antibacterial agent is due to the fact that it is able to catalyse the hydrolysis of the repeating disaccharide bonds of peptidoglycan in the cell wall of bacteria, which leads to cell death. This manuscript tries to make a literature review of the latest studies on the use of lysozyme as an additive in diets of piglets in the transition phase, comparing its effect with the use of antibiotics traditionally used in this phase of production for the improvement of the health and performance of piglets. After years of studies, the correlation between the administration of antibiotics and the improvement of production is clear. Similarly, lysozyme, as an additive in the diet, improves growth and nutritional performance, but unlike antibiotics does not alter the intestinal microbiota leaving it more exposed to pathologies but enriches it with probiotics, nor does it favor the appearance of resistances. That is why lysozyme is a viable alternative to the use of antibiotics in swine production.

3. Introducción:

El sector porcino español tiene una gran importancia económica en nuestro país ya que es el 12.7% de la Producción Final Agraria. En los últimos años es también un sector que se ha situado en el punto de mira cuando se habla de temas como la resistencia a los antimicrobianos, el bienestar animal y el impacto medioambiental de los purines, que son los tres principales desafíos a los que se enfrenta el sector.

Según el último informe conjunto del ECDC, la EFSA y la EMA (European Centre for Disease Prevention and Control (ECDC), European Food Safety Authority (EFSA), & European Medicines Agency (EMA), 2017), España es de los países europeos que más antibióticos destinados a animales consume, quedando los cuartos en cuanto a antibióticos destinados a consumo humano (Tabla 1). Cabe destacar que actualmente en España consumimos carne libre de antibióticos, este informe sólo demuestra que nuestro consumo de antibióticos es excesivo respecto a otros países, lo cual da una imagen muy negativa.

Tras este informe, uno de los objetivos principales a alcanzar por el sector es la disminución drástica del consumo de antimicrobianos en 3 años, debemos disminuirlos o nos los disminuirán como destacaron los expertos del sector en el último Congreso de la AVPA 2017. Para conseguir este objetivo debemos encontrar alternativas a los antibióticos, ya sea mediante vacunas, prebióticos, probióticos, aditivos en dietas... todo ello siempre acompañado de una buena bioseguridad en las granjas y unas buenas prácticas de manejo. Es decir, nos encontramos con un sector muy desarrollado y competitivo, pero para poder seguir en esta línea debemos encontrar alternativas viables que nos permitan seguir siéndolo.

Ante esta situación de futura imposición nos encontramos ante una encrucijada, o disminuimos el consumo o nos lo disminuirán, por ello la búsqueda de alternativas viables es algo vital para el sector porcino, ya que nuestro consumo de antibióticos es de los más elevados en la producción animal.

En los últimos años se han realizado numerosos experimentos con diversas sustancias buscando una posible alternativa a los antimicrobianos, sustancias con una eficacia similar pero sin los problemas que hoy en día plantean el uso de antibióticos, que no generen resistencias ni residuos. Entre estas alternativas se encuentra la lisozima, una enzima descubierta por Alexander Fleming en 1922 (Fleming, 1922) cuya acción antibacteriana es realmente eficaz frente a Gram + (en menor medida frente a las negativas) y ya se usa desde hace años en la industria alimentaria.

Country	Inclusion of 2014 consumption at the hospital	Consumption in tonnes of active substance			Estimated biomass in 1,000 tonnes			Consumption in mg/kg biomass	
		Humans	Animals	Total	Humans ^(c)	Animals	Total	Humans	Animals
Austria	No	38	53	91	532	948	1,480	70.9	56.3
Belgium	Yes	107	266	373	700	1,678	2,378	153.4	158.3
Bulgaria	Yes	53	33	85	453	393	846	116.0	82.9
Croatia	Yes	34	31	65	265	273	539	128.4	114.8
Cyprus	Yes	7	42	48	54	107	160	124.7	391.5
Czech Republic	No	65	56	121	657	703	1,360	99.4	79.5
Denmark	Yes	50	107	157	352	2,415	2,767	143.5	44.2
Estonia	Yes	6	10	16	82	127	210	71.7	77.1
Finland	Yes	47	11	59	341	509	850	139.2	22.3
France	Yes	717	761	1,479	4,118	7,120	11,238	174.2	107.0
Germany	No	287	1,306	1,593	5,048	8,749	13,797	56.9	149.3
Hungary	Yes	53	150	203	617	779	1,396	86.6	193.1
Iceland	No	2	1	3	20	116	136	101.7	5.2
Ireland	Yes	45	90	134	288	1,866	2,154	155.6	48.0
Italy	Yes	634	1,432	2,064	3,799	3,977	7,776	166.9	359.9
Latvia	Yes	10	6	17	125	173	298	81.6	36.7
Lithuania	Yes	19	12	31	184	335	519	102.5	35.5
Luxembourg	Yes	4	2	7	34	52	86	130.2	40.9
Netherlands	Yes	52	214	264	1,052	3,135	4,187	49.9	68.4
Norway	Yes	45	6	50	319	1,866	2,185	140.1	3.1
Poland	Yes	263	578	829	2,376	4,109	6,485	110.7	140.8
Portugal	Yes	76	190	266	652	942	1,594	116.1	201.6
Romania	Yes	226	98	323	1,247	2,502	3,749	181.7	39.1
Slovakia	Yes	47	16	64	338	248	587	140.2	65.9
Slovenia	Yes	14	6	19	129	171	300	105.5	33.4
Spain	No	327	2,964	3,291	2,907	7,077	9,984	112.6	418.8
Sweden	Yes	72	9	82	603	811	1,414	119.8	11.5
United Kingdom	Yes	518	430	939	4,022	6,915	10,937	128.7	62.1
All^(a)		3,821	8,927	12,720	31,314	58,914	90,228	123.7 ^(d)	151.5

(a): Calculated from the exact figures (not rounded as shown).

(b): The estimates presented are crude and must be interpreted with caution. Countries with less than 95% data coverage for community consumption in humans were Germany (85%) and the Netherlands (92%). In those countries, the consumption expressed in tonnes, without correction for population or biomass, will be an underestimate. For further limitations that may hamper the comparison of the consumptions of antimicrobials in humans and in animals, please see Section 14.

(c): Population covered by data in ESAC-Net.

(d): Population weighted mean.

Tabla 1: Consumo de antimicrobiano en humanos y animales destinados al consumo humano.

(European Centre for Disease Prevention and Control (ECDC) et al., 2017)

4. Justificación y objetivos:

Actualmente, la producción porcina en nuestro país se encuentra en su mejor momento, hemos pasado de ser un país importador a ser exportador y nos hemos afianzado como el tercer país con más producción del sector. Todo esto se ha conseguido gracias a una mejora de las instalaciones, la genética, la alimentación y la bioseguridad.

Sin embargo, tras el último informe conjunto del ECDC, la EFSA y la EMA, el sector debe evolucionar hacia un posible futuro sin antibióticos, o con fuertes restricciones. La responsabilidad del sector de la producción animal en materia de desarrollo de resistencias a los antibióticos es difícil de cuantificar, ya que es un problema multifactorial que necesita de la búsqueda de soluciones y alternativas por parte de todos los implicados.

Este trabajo pretende mostrar la utilidad de la lisozima como prebiótico a través del análisis de diferentes trabajos publicados en los últimos años. Su uso como aditivo en dietas de lechones en transición podría ayudarnos a disminuir el uso de antimicrobianos, siendo una herramienta más a tener en cuenta en esta búsqueda de alternativas, sobre todo en la prevención de enfermedades protagonistas de la etapa de transición de los lechones.

5. Metodología:

En la realización de este documento se ha realizado una investigación documental, recopilando la información existente sobre las posibles alternativas a los antibióticos en producción porcina y, más concretamente, el uso de la lisozima como aditivo en dietas de lechones.

La información recogida proviene de revistas, artículos científicos y libros y se ha procedido a establecer una relación y comparación entre las fuentes para poder realizar un análisis crítico con el fin de llegar a unas conclusiones para ver si los objetivos establecidos son realizables.

Esta revisión bibliográfica se ha centrado sobre los trabajos publicados y las opiniones vertidas en redes, que han permitido plantear un punto de partida que abarque los puntos más relevantes relacionados con las ventajas e inconvenientes del uso de la lisozima en dietas de lechones y su papel como potencial alternativa a los antibióticos. Esta información fue extraída de:

- Artículos científicos extraídos del buscador PubMed, Google Scholar y de la red social ResearchGate.
- Revistas de divulgación científica:
 - Revista *PorciNews* nº 2 Julio 2015: “Estrategias nutricionales ante restricciones del Óxido de Zinc” Parte II, Alfred Blanch (pág 21)
 - Revista *Suis* nº 142 – Noviembre 2017: “Últimas investigaciones: Diagnóstico, tratamiento y resistencia antimicrobiana de la colibacilosis entérica porcina” (pág 56)
 - Monográficos *Suis* “Enfermedades entéricas” (2015)
- Libros consultados en la biblioteca de la Universidad de Zaragoza:
 - Gacesa, P., & Hubble, J. (1990). *Tecnología de las enzimas*. Zaragoza (España). Ed. Acribia.
 - Gadd, J. (2009). *Pig production: what the textbooks don't tell you*. Thrumpton (UK). Nottingham University Press.
 - Magallón Botaya. (2017). *Manejo y gestión del postdestete. El lechón destetado* (1a ed. (25/01/2017)). Zaragoza (España). Ed. Servet.
 - Magallón Botaya, E. (2015). *Manejo y gestión de maternidades porcinas. II, II,.* Zaragoza (España). Ed. Servet.

- Pluske, J. R., Le Dividich, J., & Verstegen, M. W. A. (2007). *El Destete en el ganado porcino: conceptos y aplicaciones*. Zaragoza (España). Ed. Servet.
- Wiseman, A. (1991). *Manual de biotecnología de las enzimas*. Zaragoza (España). Ed. Acribia.
- Segundo Informe Conjunto de la EFSA, el ECDC y la EMA sobre el Análisis Integrado del Consumo de Antimicrobianos y la Aparición de Resistencias en Bacterias (European Centre for Disease Prevention and Control (ECDC) et al., 2017)

Por otra parte, se han consultado y revisado diversos artículos sobre el tema, publicados en revistas científicas de impacto, para contrastar y actualizar opiniones generales vertidas en revisiones y especificar aspectos concretos de la actividad y condiciones de empleo de la lisozima en dietas para ganado porcino.

6. Resultados y discusión:

La lisozima o muramidasa es una enzima de 14,4 kilodalton capaz de dañar las células bacterianas catalizando la hidrólisis de las uniones β -1,4 entre los residuos de N-acetilmurámico y N-acetil-D-glucosamina en un peptidoglicano. Esta enzima está presente en secreciones como la saliva, las lágrimas y el moco, en los gránulos citoplasmáticos de neutrófilos polimorfonucleares, en la clara del huevo, en el bazo y los pulmones, leucocitos, así como en plasma, leche y cartílagos.

Fue descubierta por Alexander Fleming en 1922 (Fleming, 1922), quien más tarde, en 1945, en su discurso de aceptación del Premio Nobel de Medicina por el descubrimiento de la penicilina afirmó que esta no era el primer antibiótico que descubrió, sino que el primero había sido la lisozima. La describió como un poderoso fermento antibacteriano con un efecto lítico extraordinario en algunas bacterias y que una suspensión espesa de bacterias podía eliminarse por completo en unos segundos por una fracción de gota de lágrimas humanas o clara de huevo (Imagen 1). También destacó que las bacterias que fueron más fuertemente inhibidas o lisadas por la lisozima no infectaban al hombre. (Tabla 2)



Imagen 1: Cultivo de *M. lysodeikticus* en placa al que se le ha añadido lisozima en el centro, se observa el efecto lítico de la lisozima del que Fleming hablaba en su primer artículo. (Fleming, 1922)

Type of microbe.	Number tested.	Number showing some lysis.	Number showing no lysis.
<i>Streptococci</i>	22	16	6
<i>Staphylococci</i>	4	2	2
<i>B. coli</i>	12	0	12
<i>B. typhosus</i>	1	0	1
<i>B. paratyphosus</i>	2	0	2
<i>B. proteus</i>	2	0	2
<i>B. pyocyaneus</i>	3	0	3
<i>B. pestis</i>	1	0	1
<i>M. melitensis</i>	1	0	1
<i>Diphtheroid Bacilli</i>	3	0	3
<i>Pneumococci</i>	2	0	2

Tabla 2: Efecto de la lisozima contenida en el esputo o lágrimas en bacterias aisladas del cuerpo humano. (Fleming, 1922)

En los primeros experimentos (Fleming, 1922; Fleming & Allison, 1922) se demostró que el moco nasal contenía gran cantidad de lisozima, y más tarde, se observó que, tanto las lágrimas como el esputo, tenía una acción lítica muy potente. Asimismo se descubrieron otros tejidos que contenían lisozimas, y que había diferencias en la velocidad del proceso lítico entre los tejidos. La epidermis, la membrana de revestimiento del tracto respiratorio y especialmente los tejidos conectivos (ya sean fibrosos, grasos o cartilagosos) contienen grandes cantidades de lisozima. En la sangre está presente en los leucocitos, en el plasma y en el suero. (Tablas 3, 4 y 5)

Material examined.	Time of incubation at 45° C.	Dilution of fluid, 1 in :—						
			10	30	90	270	810	2430
Blood serum.....	mins.							
	15		+	+	±	0	0	0
	30		+	+	+	±	trace	0
	60		+	+	+	+	±	0
Saliva		100	300	900	2,700			
	15		+	±	0	0		
	30		+	+	±	0		
	60		+	+	±	0		
Nasal mucus.....		500	1,500	4,500	13,500	40,500	121,500	
	15		+	+	±	±	0	
	30		+	+	+	±	0	
	60		+	+	+	±	0	
Sputum	15		+	+	±	±	0	
	30		+	+	+	±	0	
	60		+	+	+	±	0	
Tears	15		+	+	+	0	0	
	30		+	+	+	±	0	
	60		+	+	+	+	±	

+ signifies complete clearing of the fluid.
± ,, partial ,, ,,
0 ,, no ,, ,,

Tabla 3: El contenido de lisozima de varios fluidos tomados del mismo individuo al mismo tiempo. (Fleming, 1922)

Lytic Power of Normal and Pathological Fluids.

Fluid.	Highest dilution giving complete lysis.	Lowest division giving no lysis.	Time of incubation.
Cerebro-spinal fluid	—	1 in 1	Up to 24 hours.
Normal urine	—	1 in 1	„
Sweat	—	1 in 10	„
Blood—			
{ Citrated plasma	1 in 80	1 in 640	1 hour.
{ Serum from defibrinated blood	1 in 80	1 in 640	„
{ Serum off blood-clot	1 in 40	1 in 320	„
*Blood-serum	1 in 270	1 in 3420	„
*Tears	1 in 40,000	1 in 325,000	„
*Saliva	1 in 300	1 in 2700	„
*Sputum	1 in 13,500	1 in 121,500	„
*Nasal mucus	1 in 13,500	1 in 121,500	„
Pleural effusion (clear)	1 in 81	1 in 2187	„
Ascitic fluid	1 in 50	1 in 1600	„
Hydrocele fluid	1 in 18	1 in 1438	„
Pus (1)	1 in 700	1 in 20,000	„
(2)	1 in 100	1 in 1600	2 hours.
Urine containing pus and albumen	1 in 32	1 in 512	1 hour.
Ovarian cyst fluid	1 in 10	1 in 160	„
Fluid from parotid cyst	1 in 100	1 in 3200	„
Semen	1 in 20	gave partial lysis after 3 hours.	

Tabla 4: Poder lítico de fluidos normales y patológicos que contienen lisozima (Fleming & Allison, 1922)

Tissue.	Highest dilution giving complete lysis.	Lowest dilution showing no lysis.
Liver	1 in 400 (almost complete)	1 in 3200
Tonsil	1 in 400	1 in 6400
Kidney	1 in 100	1 in 800
Intestine	1 in 500	1 in 8000
Stomach	1 in 1000	1 in 32,000
Meninges	1 in 400 (almost complete)	1 in 3200
Skin	Less than 1 in 100	1 in 800
Cartilage	1 in 1300+	—
Turnip	1 in 4	1 in 32

Tabla 5: Poder lítico de tejidos que contienen lisozima (Fleming & Allison, 1922)

Fleming también descubrió que la lisozima estaba presente en otros tejidos de conejos, cerdos de guinea, perros (siendo en los de éste último más activa que en los dos anteriores). También se encontró en la clara de huevo y en el nabo.

Sin embargo, la estructura de la lisozima no fue descrita hasta 1965 cuando David Chilton Phillips consiguió una imagen con una resolución de 2 angstrom. Otros investigadores (H. Florey y E. B. Chain) también investigaron la lisozima, aunque sin demasiados progresos.

Como ya dijo Fleming, la mayoría de las bacterias sensibles a la lisozima no son patogénicas, aunque, en algunos casos, la lisozima es la razón principal por la que estos organismos no lleguen a ser patogénicos. La lisozima ejerce una actividad particularmente intensa sobre los principales componentes de la pared celular de la mayoría de las bacterias Gram+, lo que las torna vulnerables a la lisis. Cataliza la hidrólisis de las uniones entre los azúcares (uniones β -1,4 entre los residuos de N-acetilmurámico y N-acetil-D-glucosamina) en el "esqueleto" de disacáridos repetitivos del peptidoglicano (Ilustración 1), esto conduce a la destrucción casi completa de la pared celular de las bacterias Gram+. El contenido celular que permanece rodeado por la membrana plasmática puede continuar indemne en ausencia de lisis (protoplasto) (Kirby, 2001)

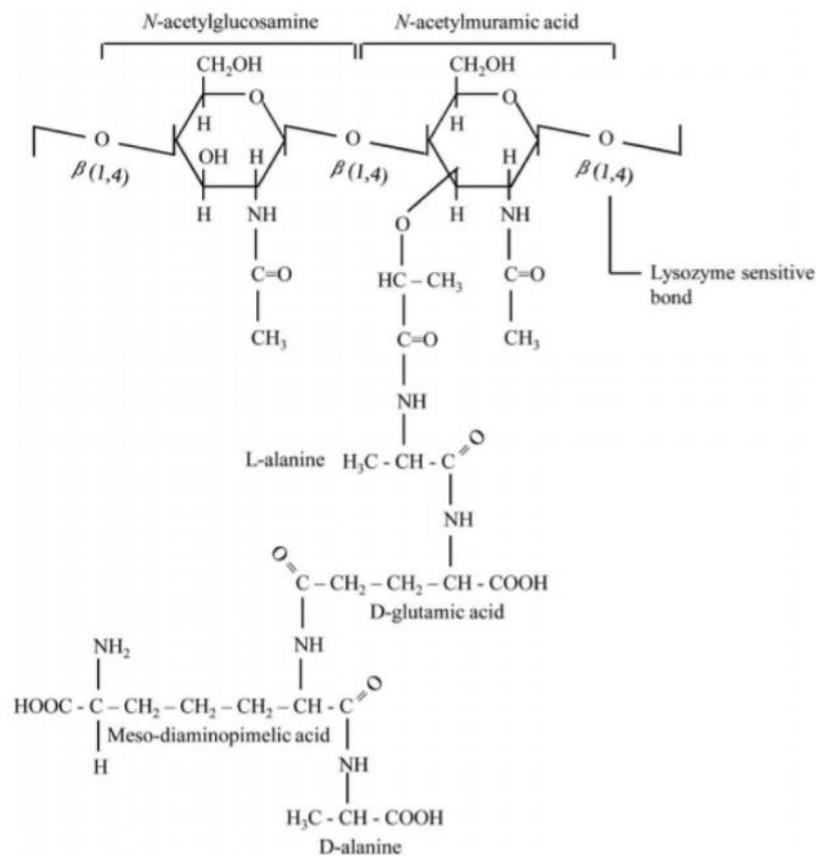


Ilustración 2: Estructura de la unidad repetitiva de los disacáridos que forman el peptidoglicano de la pared celular bacteriana. (Callewaert & Michiels, 2010)

La exposición de las bacterias Gram- a la lisozima, en general, se asocia con un grado de destrucción de la pared celular menor que el observado después de la exposición de bacterias Gram+; en las células Gram- persiste una porción de la membrana externa (Ellison & Giehl, 1991). Se observó también que la actividad lítica de la lisozima en lágrimas y otras

fuentes puede verse influenciada por la temperatura, el pH (Figura 1) y la concentración salina (Salton, 1957). Un incremento de la tasa de lisis ha coincidido con un aumento de la temperatura a 60°C. (Fleming, 1922)

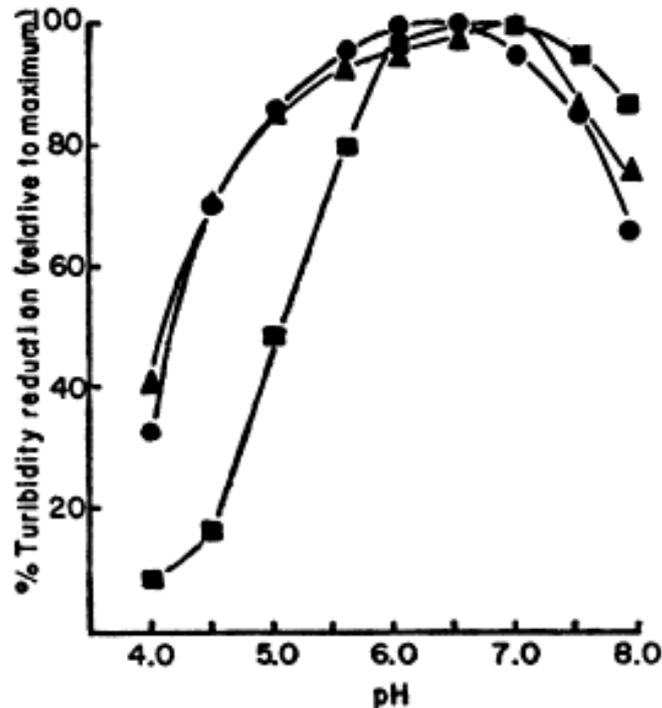


Figura 1: Influencia del pH en la actividad de la lisozima medida por la reducción de la turbidez de 3 suspensiones diferentes de bacterias (● - ● *Micrococcus lysodeikticus*; ▲ - ▲ *Sarcina lutea*; y ■ - ■ *Bacillus megaterium*). Tª de incubación: 37°C. (Salton, 1957)

La lisozima de la clara de huevo ha demostrado tener actividad antibacteriana contra organismos que hacen peligrar la seguridad alimentaria (Hughey & Johnson, 1987), incluyendo *Listeria monocytogenes* y ciertas cepas de *Clostridium botulinum*. También se ha descubierto que *Clostridium thermosaccharolyticum*, una bacteria termófila que causa un deterioro de los alimentos, es susceptible a la lisozima; y se ha confirmado que organismos que causan deterioro, como *Bacillus stearothermophilus* y *Clostridium tyrobutyricum* también son extremadamente sensibles (Tabla 6). Sin embargo, varios patógenos Gram + y Gram - aislados de comidas contaminadas, como *Bacillus cereus*, *Clostridium perfringens*, *Staphylococcus aureus*, *Campylobacter jejuni*, *Escherichia coli* O157:H7, *Salmonella typhimurium* y *Yersinia enterocolitica*, son todos resistentes.

Strains ^a	No. inhibited/ no. tested	Growth after 7 days at lysozyme concn (mg/liter) of ^b :	
		20	200
<i>B. cereus</i>	2/5	+++ (+) ^c	+++ (+) ^c
<i>B. stearothermophilus</i>	2/2	—	—
<i>C. jejuni</i>	1/1	+	+
<i>C. botulinum</i> (proteolytic) types A and B	1/4	++	++
<i>C. thermosaccharolyticum</i>	3/3	—	—
<i>C. tyrobutyricum</i>	3/3	—	—
<i>Y. enterocolitica</i>	1/1	+++ (+ +) ^c	+++ (+ +) ^c

^a Bacteria not inhibited included *C. botulinum* (nonproteolytic) types B and E (four of four strains), *C. butyricum* (one of one), *C. perfringens* (two of two), *C. sporogenes* (three of three), *E. coli* O157:H7 (one of one), *K. pneumoniae* (one of one), *L. monocytogenes* (four of four), *S. typhimurium* (one of one), *S. aureus* (four of four), and *V. cholerae* non O:1 (one of one).

^b All bacterial strains grew to +++ in media without lysozyme.

^c Static cultures.

Tabla 6: Inhibición del crecimiento de ciertas bacterias por la lisozima (Hughey & Johnson, 1987)

Estos resultados indican que la lisozima tiene aplicaciones en la preservación alimentaria, especialmente cuando hay problemas con microorganismos formadores de esporas termófilas, y como protección frente a la intoxicación alimentaria causada por *C. botulinum* y *L. monocytogenes*.

La lisozima es un componente importante en la prevención de crecimiento bacteriano en alimentos de origen animal, como los huevos de gallina y la leche. Es muy atractiva como conservante alimentario, porque es específica para la pared bacteriana e inofensiva para los humanos, aunque nunca se ha usado como antimicrobiano en producción animal como se ha planteado en los experimentos realizados en los últimos años. Desde un punto de vista práctico, la lisozima puede administrarse en forma de granulado en dietas líquidas y sólidas, aunque no se cree que pueda resistir los procesos de fabricación del pienso, por lo que de administrarse debería hacerse mezclándola con el pienso ya fabricado.

Como ya se ha citado, la lisozima es secretada en la leche materna. Sin embargo, en el caso de la cerda su concentración en la leche de esta especie es muy baja (<0.065 µgramos/mL) por lo que no se cree que juegue un papel importante como factor de prevención de infecciones en el caso de los lechones lactantes (Oliver & Wells, 2015).

Los primeros estudios realizados que proponían el uso de la lisozima como posible aditivo para la mejora de la morfología intestinal de los lechones (Brundige, et al., 2008; Lu et al., 2014) y como tratamiento de la diarrea causada por una infección bacteriana del tracto gastrointestinal de los lechones (Cooper, Garas Klobas, Maga, & Murray, 2013) dieron unos resultados muy positivos mostrando que esta enzima tenía unas propiedades

antimicrobianas muy prometedoras. Sin embargo, los experimentos llevados a cabo en estos estudios no son aplicables de manera práctica en la industria porcina actual ya que para obtener la lisozima hacían uso de leche de cabras o de cerdas transgénicas, ambas producían lisozima humana, que es la más activa.

Es por este motivo de aplicación práctica que, en el presente trabajo, para el análisis del efecto de la lisozima en la dieta de lechones la bibliografía científica consultada se ha centrado en aquellos artículos en cuyos experimentos se ha hecho uso de lisozima como aditivo en la dieta sin uso de organismos transgénicos (May, Wells, Maxwell, & Oliver, 2012; Nyachoti, Kiarie, Bhandari, Zhang, & Krause, 2012; Oliver & Wells, 2013; Oliver, Wells, & Maxwell, 2014; Huang et al., 2018)

6.1. Efectos sobre el rendimiento nutricional y la morfología intestinal:

La morfología del intestino ha sido típicamente usada como una estimación de la salud intestinal de los cerdos. En el periodo de postdestete el lechón pasa de una dieta líquida muy digestible a sólida, en este momento el tracto gastrointestinal del animal es inmaduro y su microbiota no está adaptada, y es por ello que en este periodo son más propensos a sufrir una disbiosis, produciéndose diarreas, anorexia, infecciones entéricas... Este cuadro se agrava progresivamente al tener lugar una atrofia del intestino delgado, de las vellosidades y criptas intestinales y una disminución de la absorción intestinal.

Muchos de los estudios realizados en relación a la administración de lisozima han demostrado el efecto beneficioso que produce en la morfología intestinal: muestran unas microvellosidades intestinales más largas que el grupo control y también una disminución de la profundidad de las criptas, tanto en el íleon como en el yeyuno. Estos resultados son similares a los obtenidos en los animales que fueron alimentados con dietas con antibióticos. (May et al., 2012; Nyachoti et al., 2012)

La mejora de la morfología del intestino delgado es una estrategia de los tratamientos antibióticos para mejorar la capacidad de absorción y, por tanto, mejorar la tasa de crecimiento, aunque, en ocasiones, estos tratamientos puedan llevar a empeorar la disbiosis y agravar la situación. Sin embargo, la lisozima administrada en estos tiene el mismo efecto mejorante de la morfología lo que podría ser de gran utilidad como alternativa a otros tratamientos preventivos.

Por el contrario en algunos de estos estudios, no se observaron cambios en la morfología del íleo (Oliver & Wells, 2013) aunque sí hubo una gran mejoría en el yeyuno: la

altura de sus microvellosidades era un 28% mejor que el control (35% en la dieta de antibióticos) y la profundidad de las criptas disminuyó en un 23% respecto a la dieta control (27% en la de antibióticos). (Figura 2)

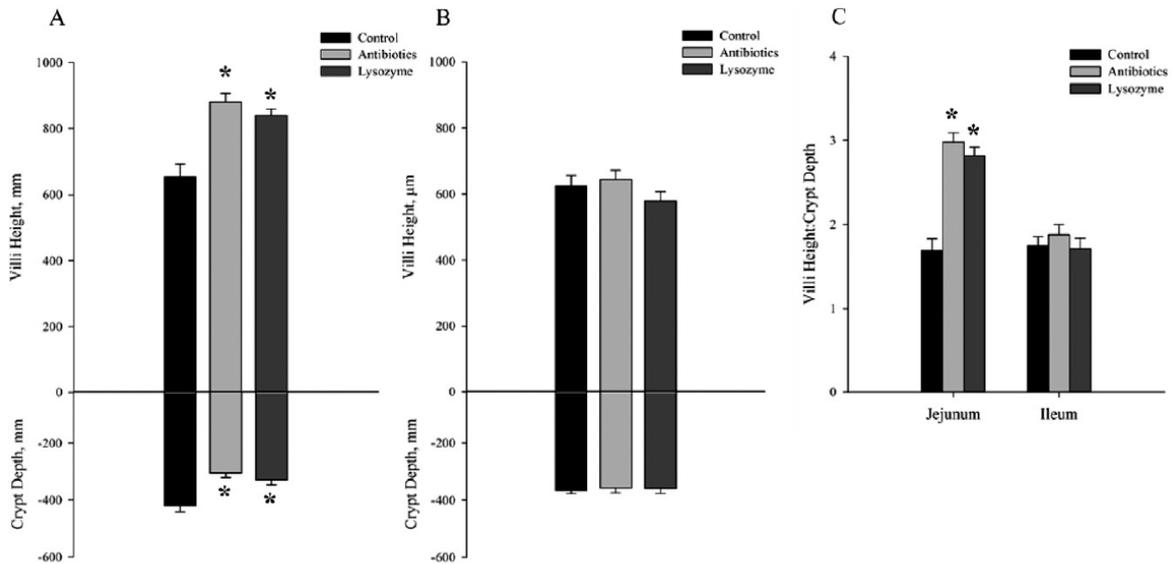


Figura 2: Efecto de los antibióticos o la lisozima en dietas de lechones sobre la altura de las microvellosidades y la profundidad de las criptas en el yeyuno (A) y el íleo (B). También se muestra el radio microvellosidad-criptas (C). (Oliver & Wells, 2013)

Así como en el anterior estudio sólo se observaron cambios en la morfología del yeyuno, en otro estudio (May et al., 2012) en el que se administró dieta líquida suplementada con antibiótico, lisozima o control sí que se detectaron cambios tanto en íleon como en yeyuno, fundamentalmente un aumento de la altura de las microvellosidades y de la profundidad de las criptas tanto en el íleon como en el yeyuno en ambos grupos suplementados con lisozima y antibióticos, comparados con el grupo control (Figura 3). Esto puede deberse principalmente a la forma física de la dieta, ya que la forma líquida es más digestible y el mayor desgaste de la morfología intestinal se produce cuando se pasa de una dieta líquida a una sólida.

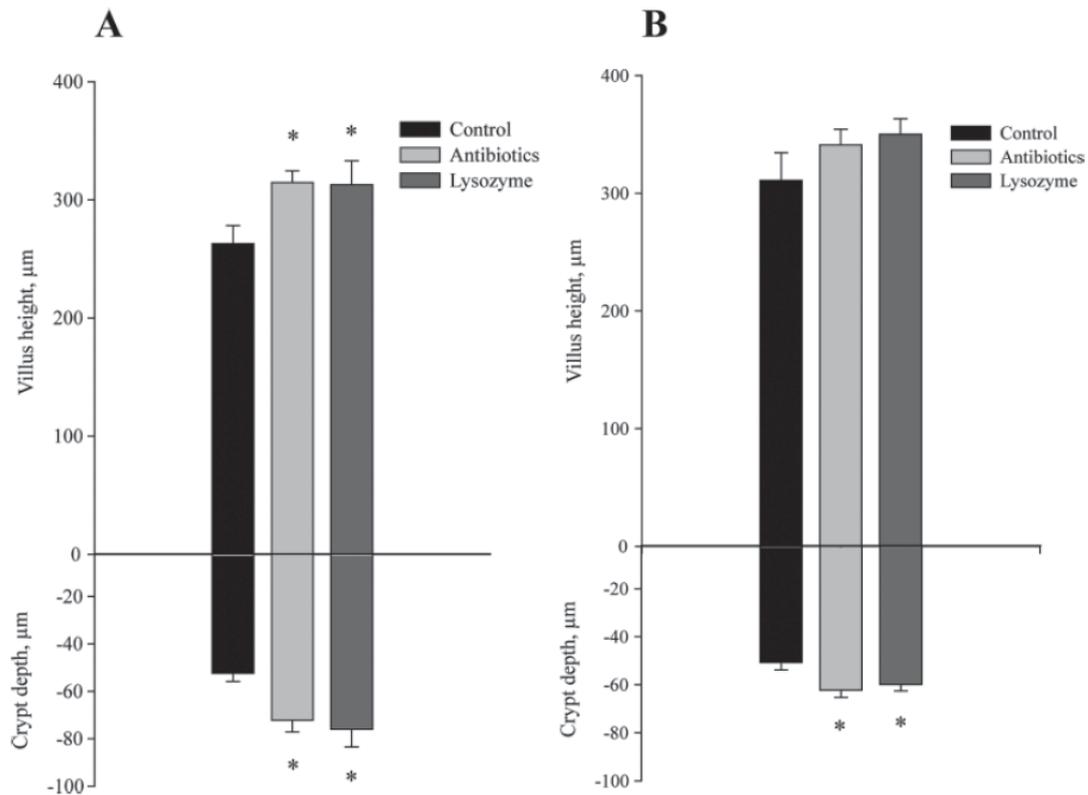


Figura 3: Efecto de las dietas con antibióticos o lizozima sobre la altura de las vellosidades y la profundidad de las criptas en íleo (A) y yeyuno (B). (May et al., 2012)

En cuanto a la mejora del crecimiento debido a la adición de lizozima en la dieta es un hecho que ya quedó demostrado (Oliver & Wells, 2013), que obtuvieron resultados similares a los de la dieta suplementada con antibióticos: se mejoró el índice de conversión en un 7.3% en dietas con lizozima, la eficiencia alimentaria mejoró un 8.3% para ambos grupos, antibiótico y lizozima, respecto al grupo control y tras los 28 días que duró el experimento el ritmo de crecimiento fue mayor en el grupo lizozima y en el de antibióticos. (Tabla 7)

Variable	Diet		
	Control	C + A	C + Lyso
BW, kg			
d 0	7.73 ± 0.12	7.83 ± 0.13	7.85 ± 0.15
d 14	11.09 ± 0.20 ^a	11.60 ± 0.19 ^b	11.41 ± 0.19 ^b
d 28	18.83 ± 0.32 ^a	20.00 ± 0.31 ^b	19.80 ± 0.29 ^b
ADG, kg/d			
d 0 to 14	0.243 ± 0.009 ^a	0.271 ± 0.010 ^b	0.255 ± 0.008 ^a
d 14 to 28	0.555 ± 0.012 ^a	0.601 ± 0.012 ^b	0.598 ± 0.014 ^b
d 0 to 28	0.398 ± 0.008 ^a	0.433 ± 0.009 ^b	0.421 ± 0.008 ^b
ADFI, kg×pen ⁻¹ ×d ⁻¹			
d 0 to 14	1.32 ± 0.03	1.34 ± 0.04	1.36 ± 0.04
d 14 to 28	3.25 ± 0.11	3.23 ± 0.10	3.18 ± 0.09
d 0 to 28	2.32 ± 0.06	2.26 ± 0.06	2.23 ± 0.06
G:F, kg/kg			
d 0 to 14	0.720 ± 0.029	0.801 ± 0.025	0.756 ± 0.028
d 14 to 28	0.675 ± 0.016 ^a	0.738 ± 0.015 ^b	0.745 ± 0.020 ^b
d 0 to 28	0.695 ± 0.019 ^a	0.756 ± 0.014 ^b	0.750 ± 0.021 ^b

^{a,b}Within a row, means without a common superscript differ ($P < 0.05$).

¹Values are least squares means ± SEM; for BW and ADG, $n = 60$ to 63 per treatment; for ADFI and G:F, $n = 16$ per treatment.

Tabla 7: Rendimiento de los lechones destetados a los 24 días de edad y alimentados con dietas control, dietas control + antibióticos y dietas control + lizozima durante 28 días. (Oliver & Wells, 2013)

6.2. Efectos sobre la respuesta inmune ante una infección y en la prevención de patologías:

La mayoría de las bacterias sensibles a las lisozimas no son patogénicas (Fleming, 1922; Salton, 1957) (Tabla 2), aunque en algunos casos, la lisozima es la razón principal por la que estos organismos no lleguen a ser patogénicos. Esta enzima ejerce una actividad particularmente intensa sobre los principales componentes de la pared celular de las bacterias Gram+, lo que las torna vulnerables a la lisis (Fleming, 1922; Kirby, 2001). Cataliza la hidrólisis de las uniones entre los azúcares (uniones β -1,4 entre los residuos de N-acetilmurámico y N-acetil-D-glucosamina) en el "esqueleto" de disacáridos repetitivos del peptidoglicano (Ilustración 1), lo que conduce a la destrucción casi completa de la pared celular de las bacterias Gram+. Por el contrario, las bacterias Gram- son resistentes a la lisozima, aunque ésta ha demostrado ser efectiva ante este tipo de bacterias cuando actúa junto a lactoferrina (Ellison & Giehl, 1991) (Figura 4)

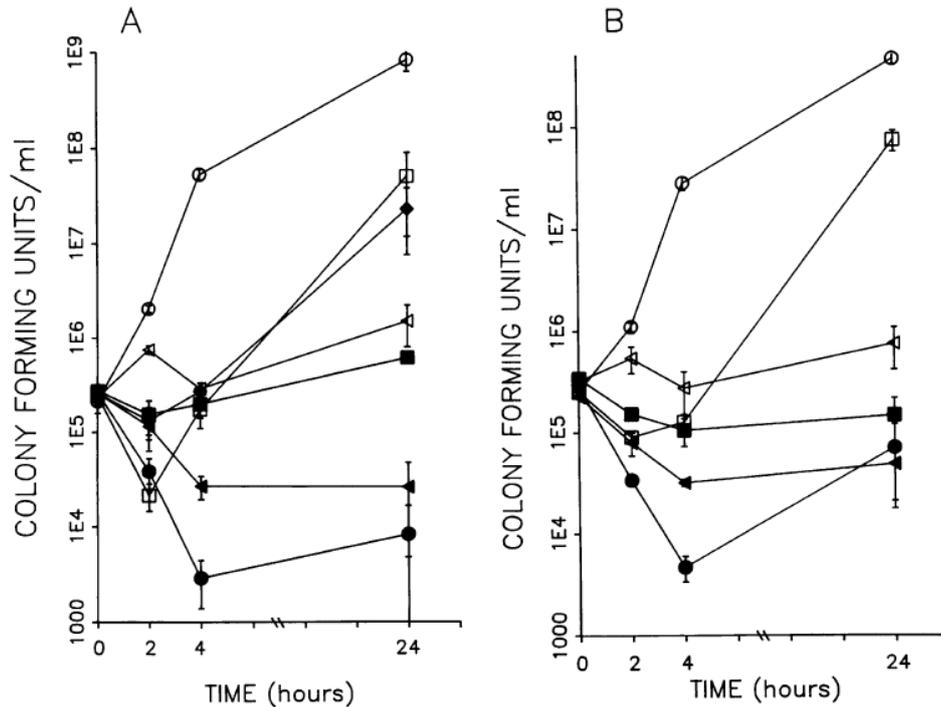


Figura 4: A) Efecto de la variación de la concentración de lactoferrina en su interacción con lisozima contra *E.coli* 5448. ○ Cultivo en agar proteosa peptona nº 3; Δ 2 mg/ml de lactoferrina; □ 0.025 mg/ml de lisozima; ● 4 mg/ml de lactoferrina + lisozima; ▲ 2 mg/ml de lactoferrina + lisozima; ■ 1 mg/ml de lactoferrina + lisozima; ◆ 0.5 mg/ml de lactoferrina + lisozima.
 B) Efecto de la variación de lisozima en su interacción con lisozima contra *E.coli* 5448. ○ Cultivo en agar proteosa peptona nº 3; Δ 2 mg/ml de lactoferrina; □ 0.025 mg/ml de lisozima; ● lactoferrina + 0.05 mg/ml de lisozima; ▲ lactoferrina + 0.025 mg/ml de lisozima; ■ lactoferrina + 0.0125 mg/ml de lisozima; ◆ lactoferrina + 0.0063 mg/ml de lisozima.

(Ellison & Giehl, 1991)

El destete de los lechones es un momento crítico del ciclo de producción ya que los individuos se ven sometidos a un gran nivel de estrés: cambios ambientales, nutricionales... Es el llamado Síndrome Postdestete (Magallón Botaya, 2017). Todos estos cambios tienen una repercusión en la microbiota del tracto digestivo de los lechones, la cual se encuentra en un tracto gastrointestinal inmaduro en cuanto a su desarrollo, y no está adaptada a los cambios. Por ello, la microbiota pasa de estar en equilibrio a una disbiosis, aumentando los *E.coli* o los anaerobios facultativos en detrimento de los lactobacilos, dejando al animal más predispuesto a infecciones por otros agentes potencialmente más patógenos. Todo este proceso puede acabar desembocando en diarreas, infecciones secundarias, mala absorción de nutrientes, retraso en el crecimiento, etc., con graves consecuencias sobre los rendimientos productivos.

Entre las soluciones para restaurar la microbiota intestinal se encuentran las vacunas, los bacteriófagos y los aditivos en la dieta como: aceites esenciales, ácidos orgánicos, prebióticos y probióticos. A menudo se intentan minimizar las consecuencias de este síndrome con antimicrobianos, los cuales acaban agravando la situación, ya de por sí grave, en la que se encuentra la microbiota intestinal del animal

Es en esta situación en la que se necesita una alternativa a los antibióticos, para lo cual la lisozima ha demostrado en varios estudios ser eficaz: se ha probado que es efectiva frente a varios patógenos, entre los que se incluye *E. coli* (Ellison & Giehl, 1991). Se realizó un estudio (Nyachoti et al., 2012) para probar que la lisozima suplementada en el agua de bebida de los lechones era un método de prevención efectivo contra la proliferación intestinal de *ETEC* en lechones cuando éstos consumían una dieta libre de antibióticos y antes de ser infectados intencionalmente con esta bacteria. Se quería probar que su efecto de prevención era parecido al de los lechones en cuya dieta se había incluido antibióticos.

Los resultados indicaron que la lisozima a dosis más bajas prevenía la adherencia de la bacteria a la mucosa intestinal minimizando así el daño asociado, lo que apoya los resultados obtenidos sobre morfología intestinal (Tabla 8). También se determinó la concentración sérica de TNF- α e IL-6 para comprobar si la administración de lisozima mitigaba la respuesta inmunológica asociada a una infección por *ETEC*, al observarse que la inflamación producida era menor en aquellos individuos que había consumido la enzima en el agua de bebida (Tabla 9)

Item	Treatment ²				SEM	P-value
	CONT	AB	Entegard supplement ³			
			EG1	EG2		
Total coliform count, ⁴ log ₁₀ cfu/g						
Ileal mucosal scrapings	5.60 ^a	4.25 ^b	4.33 ^b	4.74 ^{ab}	0.32	0.03
Colon digesta	5.52	4.58	5.19	5.48	0.55	0.59
<i>E. coli</i> K88 ⁺ count, ⁵ log ₁₀ cfu/g						
Ileal mucosal scrapings	4.75 ^a	2.68 ^b	2.47 ^b	3.83 ^a	0.40	<0.01
Colon digesta	4.42 ^a	3.00 ^b	2.90 ^b	3.39 ^{ab}	0.36	0.03
Digesta pH						
Ileum	6.75	6.52	7.07	6.83	0.17	0.14
Colon	6.58	6.26	6.55	6.27	0.14	0.22
Colon digesta organic acids, mmol/L						
Acetic	27.4	28.8	25.7	27.5	4.7	0.97
Propionic	13.5	17.3	14.4	17.7	1.6	0.18
BCVFA ⁶	10.7	14.0	9.1	13.9	2.2	0.30
Lactic	0.19	0.20	0.10	0.45	0.17	0.50
Total ⁷	51.7	60.3	49.3	59.4	6.7	0.56

^{a,b}Within a row, values with different superscripts are different, $P < 0.05$.

¹Piglets exposed to treatments throughout the entire experimental period, challenged with *E. coli* K88 on d 8, and killed on d 14 for organ and sample collection.

²CONT = control, no dietary or drinking water additive; AB = antibiotic, Aureo S-P 250 (Alpharma Animal Health, Bridgewater, NJ) at 2.5 mg/kg of control feed and no drinking water additive; EG1 = control diet + 0.1% Entegard supplement (Neova Technologies Inc., Abbotsford, British Columbia, Canada) in drinking water; EG2 = control diet + 0.2% Entegard supplement (Neova Technologies Inc.) in drinking water. n = 9.

³Supplement: 4,000 lysozyme units/mg.

⁴Plated on eosin methylene blue agar.

⁵Plated on eosin methylene blue agar containing 0.5 µg of ciprofloxacin/mL (Opapeju et al., 2009).

⁶BCVFA = branched-chain VFA, sum of isobutyrate, isovalerate, butyrate, and valerate.

⁷Sum of acetic, propionic, BCVFA, and lactic acids.

Tabla 8: Efecto de la suplementación con antibióticos y lisozima sobre la actividad microbiana gastrointestinal en lechones infectados con *E. coli* K88⁺¹. (Nyachoti et al., 2012)

Item	Treatment ²				SEM	P-value
	CONT	AB	Entegard supplement ³			
			EG1	EG2		
TNF-α, pg/mL						
Prechallenge	111.4 ^b	62.9 ^c	193.1 ^a	99.8 ^b	8.7	<0.01
Postchallenge	162.1 ^a	150.0 ^a	132.4 ^a	89.9 ^b	9.4	<0.01
IL-6, pg/mL						
Prechallenge	48.0 ^b	25.8 ^b	159.7 ^a	41.9 ^b	7.3	<0.01
Postchallenge	85.8 ^a	81.2 ^a	60.7 ^{ab}	48.6 ^b	7.0	<0.01

^{a-c}Within a row, values with different superscripts are different, $P < 0.05$.

¹Piglets exposed to treatments at weaning and challenged with *E. coli* K88⁺ on d 8. Prechallenge = morning of d 8 before challenge; postchallenge = morning of d 14.

²CONT = control, no dietary or drinking water additive; AB = antibiotic, Aureo S-P 250 (Alpharma Animal Health, Bridgewater, NJ) at 2.5 mg/kg of control feed and no drinking water additive; EG1 = control diet + 0.1% Entegard supplement (Neova Technologies Inc., Abbotsford, British Columbia, Canada) in drinking water; EG2 = control diet + 0.2% Entegard supplement (Neova Technologies Inc.) in drinking water. n = 9.

³Supplement: 4,000 lysozyme units/mg.

Tabla 9: Efecto de la suplementación con antibióticos y lisozima sobre la concentración sérica de TNF-α e IL-6 en lechones infectados con *E. coli* K88⁺¹. (Nyachoti et al., 2012)

Todo ello reafirma la afirmación de que la lisozima es capaz de minimizar la infección por *E. coli*, así como sus consecuencias sobre el rendimiento de los lechones y la morfología intestinal. (Tablas 10 y 11)

Item	Treatment ²				SEM	P-value
	CONT	AB	Entegard supplement ³			
			EG1	EG2		
Initial BW, kg	4.92	4.90	4.90	4.72	0.14	0.76
ADG, g/d						
Prechallenge	75	138	86	86	20	0.14
Postchallenge	117	209	183	135	32	0.19
ADFI, g/d						
Prechallenge	115	153	117	156	17	0.22
Postchallenge	186	278	237	218	33	0.24
G:F, g/g						
Prechallenge	0.64	0.83	0.77	0.54	0.15	0.56
Postchallenge	0.66	0.79	0.74	0.67	0.13	0.86
Fecal consistency score, ⁴ time postchallenge						
6 h	1.07	0.97	0.40	0.95	0.27	0.32
24 h	1.30	1.04	0.88	1.10	0.27	0.74
36 h	1.73	1.18	1.02	1.45	0.30	0.37
48 h	1.73	1.21	0.93	1.36	0.28	0.26
60 h	1.73	1.40	0.90	1.46	0.30	0.27
72 h	1.71	1.41	0.87	1.26	0.29	0.24
84 h	1.71	1.43	0.87	1.26	0.29	0.24
96 h	1.44	1.19	0.86	1.16	0.30	0.62
108 h	1.26	0.70	0.86	0.98	0.25	0.46
120 h	0.94	0.48	0.60	0.74	0.26	0.66
Average	1.49	1.08	0.82	1.16	0.25	0.31

¹Piglets exposed to treatments at weaning and challenged with *E. coli* K88⁺ on d 8. Prechallenge = weaning to d 7; postchallenge = d 8 to 14.

²CONT = control, no dietary or drinking water additive; AB = antibiotic, Aureo S-P 250 (Alpharma Animal Health, Bridgewater, NJ) at 2.5 mg/kg of control feed and no drinking water additive; EG1 = control diet + 0.1% Entegard supplement (Neova Technologies Inc., Abbotsford, British Columbia, Canada) in drinking water; EG2 = control diet + 0.2% Entegard supplement (Neova Technologies Inc.) in drinking water. n = 9.

³Supplement: 4,000 lysozyme units/mg.

⁴Scores: 0 = normal; 1 = soft feces; 2 = mild diarrhea; 3 = severe diarrhea (Marquardt et al., 1999).

Tabla 10: Efecto de la suplementación con antibióticos y lisozima sobre el rendimiento y puntuaciones de consistencia fecal de los lechones infectados con *E. coli* K88⁺. (Nyachoti et al., 2012)

Item	Treatment ²				SEM	P-value
	CONT	AB	Entegard supplement ³			
			EG1	EG2		
Organ weight, g/kg of BW						
Stomach	9.16	8.93	8.81	8.33		
Small intestine	50.5 ^b	57.2 ^a	57.5 ^a	55.0 ^{ab}	1.784	0.05
Large intestine	22.0	20.8	20.9	24.3	1.011	0.07
GIT ⁴	62.6	66.1	66.3	63.3	2.345	0.59
Liver	28.5	34.4	29.4	29.0	2.564	0.35
Spleen	2.83	2.70	2.70	2.83	0.238	0.26
Ileal morphology						
Villi height, μ m	363 ^b	458 ^a	428 ^a	362 ^b	10.1	<0.01
Crypt depth, μ m	276	280	285	269	18.1	0.93
Villi height: crypt depth ratio	1.34 ^b	1.69 ^a	1.56 ^{ab}	1.38 ^{ab}	0.10	0.05

^{a,b}Within a row, values with different superscripts are different, $P < 0.05$.

¹Piglets exposed to treatments throughout the entire experimental period, challenged with *E. coli* K88⁺ on d 8, and killed on d 14 for organ and sample collection.

²CONT = control, no dietary or drinking water additive; AB = antibiotic, Aureo S-P 250 (Alpharma Animal Health, Bridgewater, NJ) at 2.5 mg/kg of control feed and no drinking water additive; EG1 = control diet + 0.1% Entegard supplement (Neova Technologies Inc., Abbotsford, British Columbia, Canada) in drinking water; EG2 = control diet + 0.2% Entegard supplement (Neova Technologies Inc.) in drinking water. n = 9.

³Supplement: 4,000 lysozyme units/mg.

⁴Gastrointestinal tract, summation of stomach, small intestine, and large intestine.

Tabla 11: Efecto de la suplementación con antibióticos y lisozima sobre el peso de las vísceras y la morfología ileal de los lechones infectados con *E. coli* K88⁺. (Nyachoti et al., 2012)

En un estudio reciente (Huang et al., 2018) se probó que la lisozima protegía a lechones neonatos contra *ETEC*, tanto a los que se infectaba intencionadamente como a los que cohabitaban con ellos, aunque en este estudio se usaron cerdas transgénicas que secretaban lisozima humana en la leche, lo que tiene muchas limitaciones en la práctica. Los resultados obtenidos fueron muy positivos: se redujo la severidad y la duración de la diarrea tanto en los lechones infectados inicialmente como en los que convivían con ellos (Figura 5) y se observó un enriquecimiento de probióticos en el intestino de los lechones asociado a este consumo de lisozima (Figura 6). Al igual que en el anterior estudio, también se observó una concentración sérica menor de IL-6 y TNF-alfa los días posteriores a la infección (Figura 7), indicando una respuesta inflamatoria menor frente a la infección en ambos grupos.

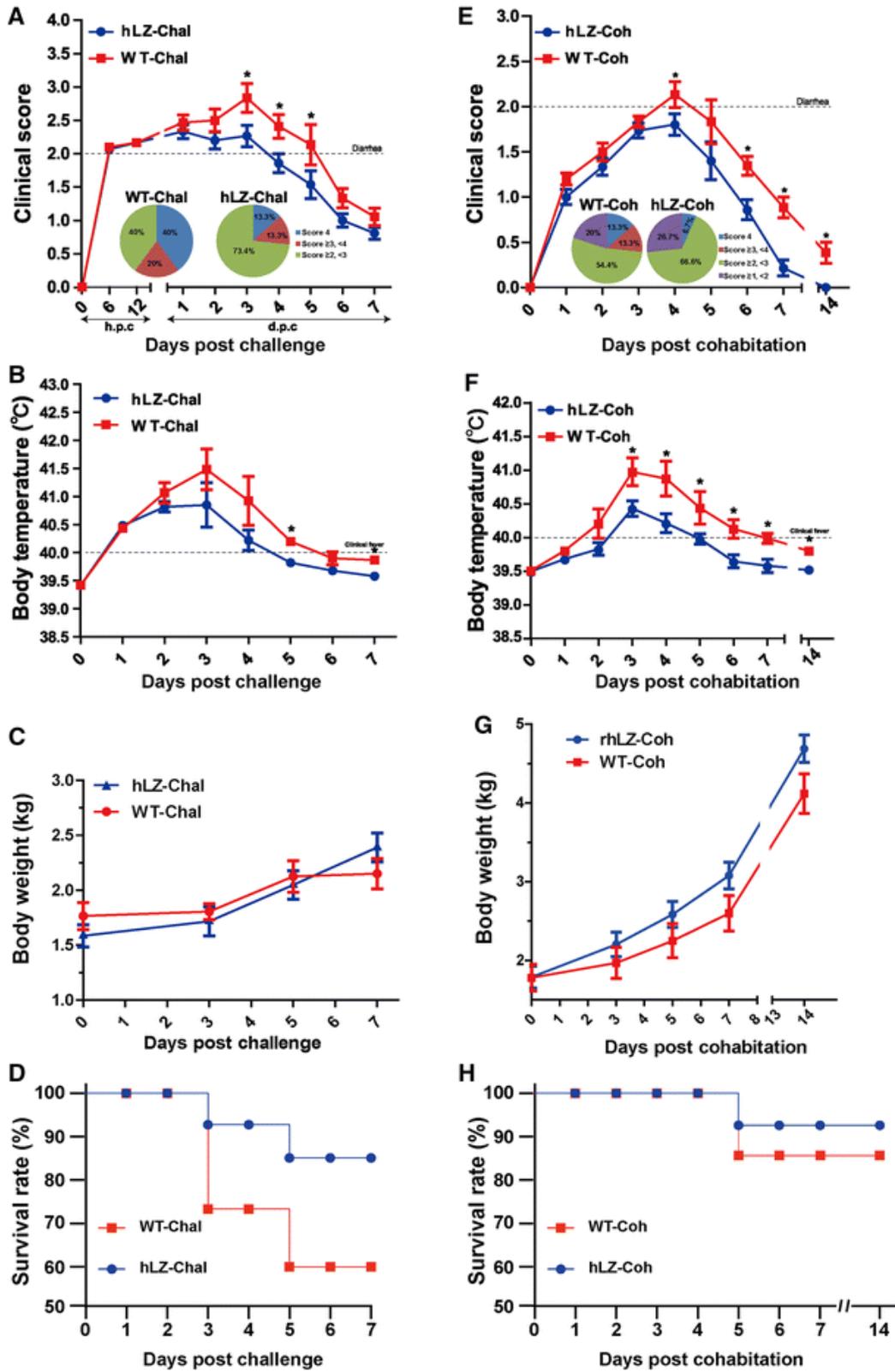


Figura 5: La columna de la izquierda (A-D) representa los datos recogidos de los lechones infectados con *ETEC*, y la de la derecha (E-H) representa los datos de los que convivían con los infectados que de manera pasiva se infectaron. El tiempo 0 es el momento en el cual los lechones fueron infectados y colocados en el mismo lote que los sanos. (Huang et al., 2018)

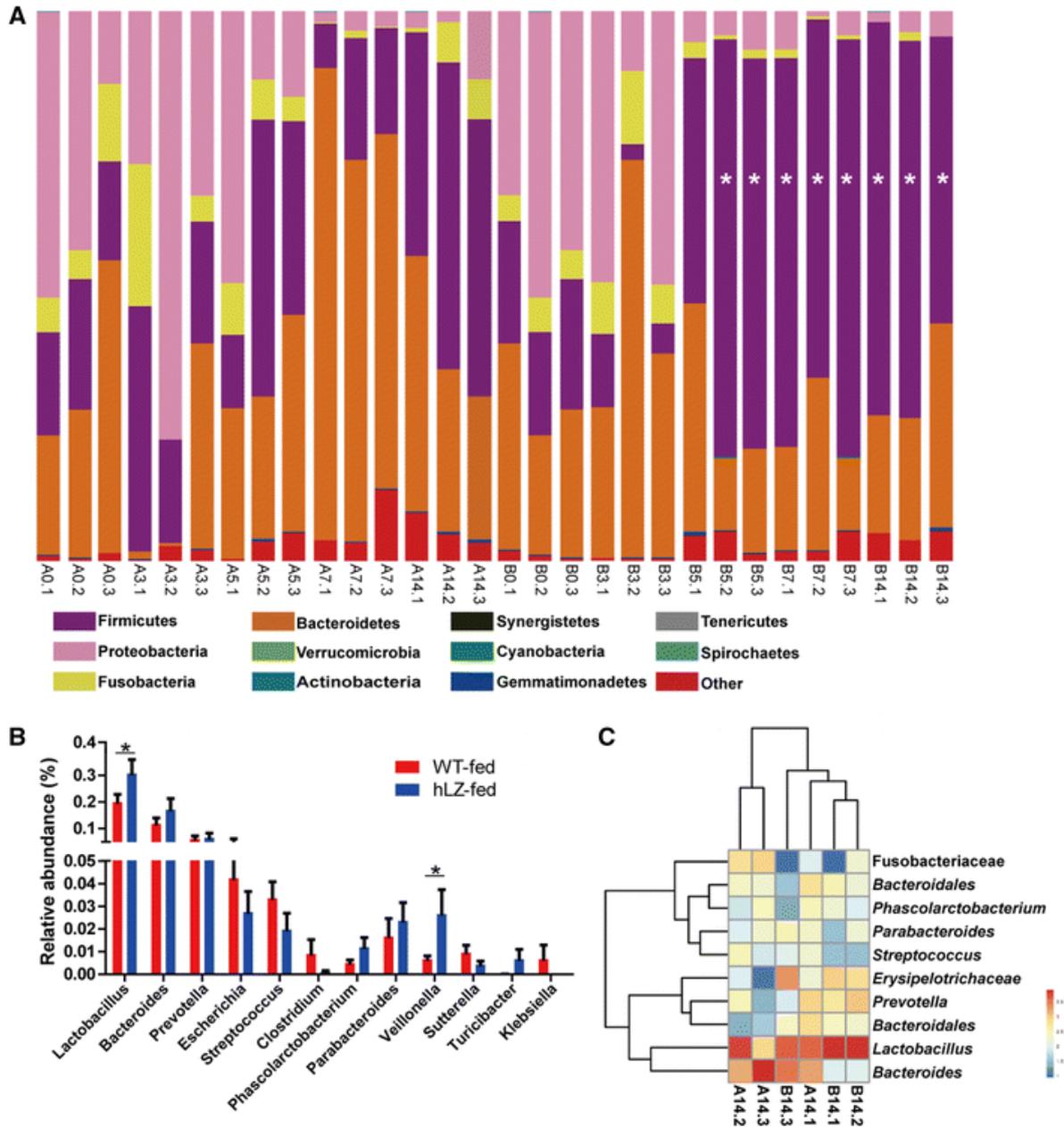


Figura 6: A) Enriquecimiento de la microbiota intestinal de los grupos control y los alimentados con lisozima en los días 0, 3, 5, 7 y 14. B) Géneros bacterianos enriquecidos en los intestinos de los grupos control y lisozima el día 14. C) Clasificación taxonómica de los géneros presentes en las muestras fecales obtenidas en el día 14, sólo se muestran los 10 géneros más abundantes. (Huang et al., 2018)

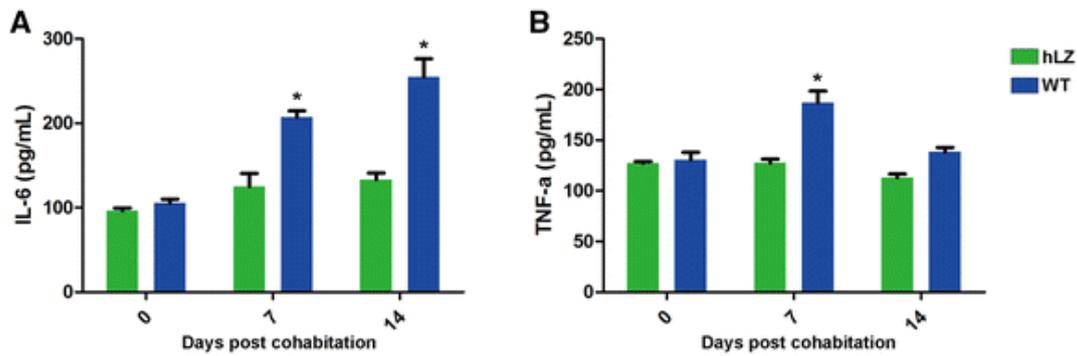


Figura 7: Niveles séricos de citoquinas pro-inflamatorias IL-6 (A) y TNF- α (B) en lechones infectados y no infectados, medidos los días 0, 7 y 14. (Huang et al., 2018)

Ambos estudios anteriormente citados, prueban de manera convincente los efectos positivos del uso de la lisozima como medida preventiva frente a una infección aguda por *ETEC*, pero no aclaran su papel potencial frente a una infección de carácter subclínico.

En otro experimento (Oliver et al., 2014) se colocaron a los lechones en dos enfermerías separadas: una de ellas había sido limpiada y desinfectada mientras que la otra se había dejado sin limpiar tras su vaciado. En cada enfermería había tres lotes de igual número de lechones con una dieta control, con una dieta control y antibióticos y con la misma dieta control y lisozima. Cuando los lechones sufren una patología subclínica la eficiencia nutricional disminuye ya que se usan los nutrientes para defenderse ante la agresión y se frena o enlentece el crecimiento. En este experimento se observó que tanto los lechones que consumieron lisozima como los del grupo de antibiótico mejoraron su índice de crecimiento, tanto en el ambiente sucio como en el limpio (Tabla 12), y también se disminuyó la severidad de la respuesta inmune.

Variable	Clean nursery			Dirty nursery			SEM	P-values		
	Control	C + A	C + Lyso	Control	C + A	C + Lyso		Diet	Nursery	Diet × nursery
Live weight, kg										
d 0	8.46	8.65	8.53	8.46	8.65	8.60	0.12	0.226	0.799	0.947
d 14	10.83	11.08	11.10	11.18	11.09	11.19	0.14	0.922	0.394	0.718
d 28	16.67	17.53	17.45	16.49	17.25	17.36	0.15	<0.001	0.715	0.752
ADG, kg/d										
d 0 to 14	0.138	0.172	0.170	0.163	0.174	0.179	0.018	0.048	0.980	0.768
d 14 to 28	0.415	0.462	0.471	0.401	0.444	0.439	0.014	<0.001	0.046	0.199
d 0 to 28	0.292	0.317	0.322	0.286	0.315	0.314	0.015	<0.001	0.109	0.426
ADFI, kg pen ⁻¹ d ⁻¹										
d 0 to 14	3.57	3.78	3.42	3.52	3.57	3.26	0.19	0.486	0.530	0.962
d 14 to 28	8.70	7.24	7.29	8.88	7.95	7.22	0.32	0.477	0.612	0.827
d 0 to 28	6.25	5.55	5.36	6.15	5.76	5.24	0.38	0.112	0.866	0.870
G:F										
d 0 to 14	0.587	0.641	0.663	0.605	0.671	0.694	0.019	0.002	0.159	0.955
d 14 to 28	0.712	0.724	0.688	0.668	0.694	0.657	0.012	0.161	0.032	0.922
d 0 to 28	0.665	0.690	0.674	0.625	0.683	0.662	0.013	0.005	0.049	0.389
Days to market ²	96.4	92.1	92.8	98.1	93.6	93.4	0.3	0.041	0.086	0.682

¹Values are least squares means; *n* = 16 per treatment.

²Days to reach 120 kg BW.

Tabla 12: Efecto de un desafío inmunológico indirecto en lechones destetados a los 26 días y alimentados con dietas control, control + antibióticos (C + A) o control + lisozima (C + L) durante 28 días. (Oliver et al., 2014)

En un estudio posterior (Wells et al., 2015) diseñado de manera similar al anterior, primero se determinó si los lotes eran positivos o no a determinados patógenos que frecuentemente proliferan en ambientes sucios (por ejemplo, *Campylobacter*) y luego se observó la reacción que tenían ante los tres diferentes tratamientos administrados. Se observó que tras 28 días, en los lotes tratados con lisozima había un 50% menos animales positivos a *Campylobacter spp.* respecto a los lotes tratados con antibióticos y control; incluso en estos se observó que a lo largo del experimento la prevalencia de *Campylobacter* aumentaba de manera significativa (Figura 8). En el caso del lote tratado con antibióticos (clortetraciclina y tiamulina) se piensa que se obtuvieron estos resultados debido a que *Campylobacter* podría haber desarrollado una cierta resistencia a estas sustancias. También hay otro estudio (May et al., 2012) en el que se administró lisozima granulada en una dieta líquida a lechones de 10 días y se observó si se reducía la diseminación de *Campylobacter* (Figura 9). Tras dos semanas, en el lote control el 27% de los animales diseminaba *Campylobacter*, una cifra que se vio muy disminuida en el lote que consumía lisozima (8%) y antibiótico (5%).

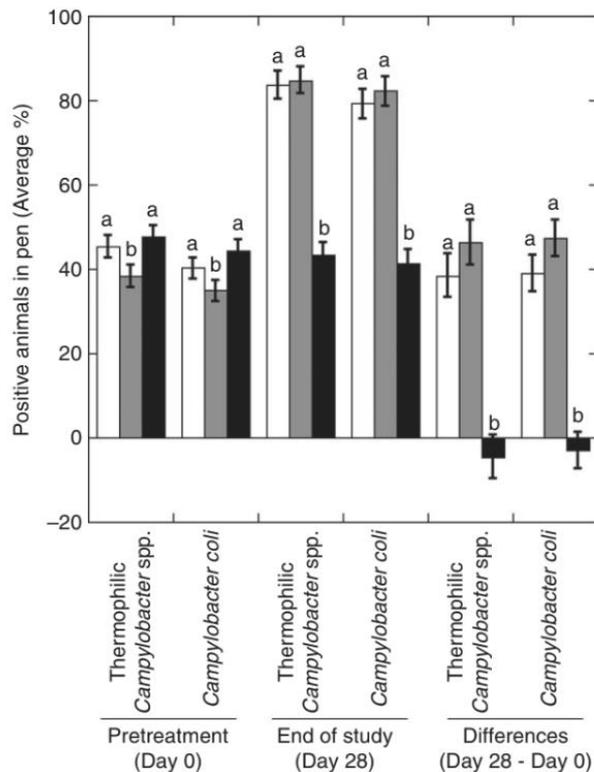


Figura 8: Porcentaje medio de hisopos rectales de lechones procedentes de los tres tratamientos, control (barras blancas), control + antibióticos (barras grises) y control + lisozima (barras negras), positivos para *Campylobacter spp.* termófilos (*C. jejuni*, *C. coli*, *C. lari* y *C. upsaliensis*) y *Camp.coli*.

(Wells et al., 2015)

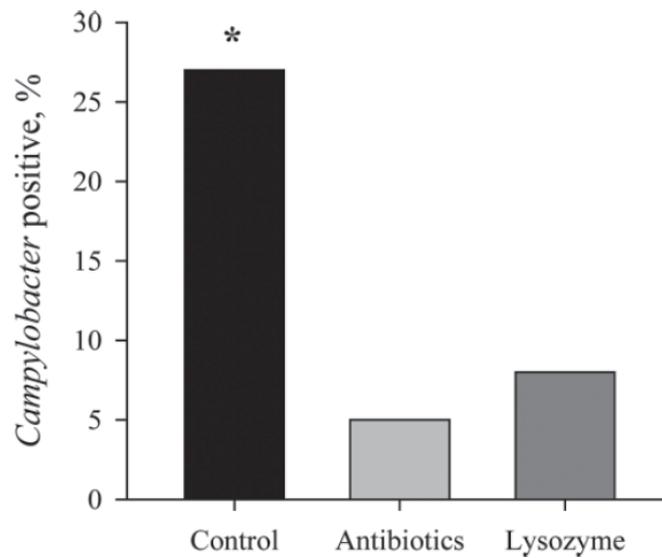


Figura 9: Efecto de las dietas líquidas control, control + antibióticos y control + lisozima durante 14 días sobre el porcentaje de hisopos rectales positivos a *Campylobacter spp.* (May et al., 2012)

Aunque estos estudios demuestran que *Campylobacter* podría verse afectado en dietas suplementadas con lisozima de manera similar que en el caso de usar antibióticos, se debe destacar que *Campylobacter* es un Gram- por lo que no cabe esperar que se vea afectado por la lisozima ya que es resistente a su acción (Hughey & Johnson, 1987). Lo más probable es que los resultados observados se deban a cambios en la morfología intestinal y en la microbiota, lo que indirectamente influye en la colonización y diseminación de la bacteria. (May et al., 2012)

7. Conclusiones:

Actualmente, el sector porcino, al igual que otros sectores de la producción animal, se encuentra bajo presión para reducir o eliminar significativamente el uso de antibióticos debido a la preocupación sobre el desarrollo de resistencias, tanto por parte de los expertos como de la sociedad.

La búsqueda de posibles alternativas es esencial y permitiría mantener la salud y el bienestar animal así como las ventajas económicas que ofrece el uso de antibióticos, pero sin los inconvenientes derivados del mismo. La lisozima es un antimicrobiano natural ya usado en otras facetas de la industria alimentaria, reduce el potencial de diseminación de patógenos y mejora la tasa de crecimiento y la morfología intestinal.

Su posible uso como aditivo en dietas de lechones podría ser de gran utilidad, si bien no sustituiría del todo a los antibióticos, ya que su efecto, aunque similar, no es equiparable. Se espera que en un futuro se realicen más estudios para esclarecer su alcance como herramienta de prevención de patologías gastrointestinales de la etapa de transición de los lechones, que analicen sus efectos tanto directos como indirectos y el efecto dosis-respuesta de su administración.

8. Conclusions:

Currently, the pig sector, like other sectors of animal production, is under pressure to reduce or eliminate significantly the use of antibiotics due to concerns about the development of resistance, both by experts and society.

The search for possible alternatives is essential and would allow maintaining animal health and welfare as well as the economic advantages offered by the use of antibiotics, but without the drawbacks derived from it. Lysozyme is a natural antimicrobial already used in other facets of the food industry, reduces the potential for the spread of pathogens and improves the rate of growth and intestinal morphology.

Its possible use as an additive in piglet diets could be very useful, although it would not completely replace antibiotics, since its effect, although similar, is not comparable. It is expected that in the future more studies will be carried out to clarify its scope as a tool for the prevention of gastrointestinal pathologies of the transition stage of piglets, which analyse their direct and indirect effects and the dose-response effect of their administration.

9. Valoración personal:

El presente Trabajo de Fin de Grado me ha permitido ampliar mis conocimientos sobre el sector porcino, en concreto sobre los aspectos relacionados con la producción y sanidad de los lechones en fase de transición. He aprendido a realizar una búsqueda de bibliografía haciendo uso de bases de datos fiables, realizando posteriormente una revisión exhaustiva, seleccionando y esquematizando la información de la manera más eficaz y correcta. Asimismo, gracias a la realización de este trabajo he mejorado mi comprensión lectora en inglés y he adquirido un vocabulario técnico en dicho idioma que me será de gran utilidad en un futuro.

Por último, quiero agradecer al Dr. Manuel Fondevila Camps por su tiempo y su labor como profesor y tutor de este trabajo, sin cuya inestimable ayuda no hubiera sido posible la realización del mismo.

10. Bibliografía

- Brundige, D. R., Maga, E. A., Klasing, K. C., & Murray, J. D. (2008). Lysozyme transgenic goats' milk influences gastrointestinal morphology in young pigs. *The Journal of Nutrition*, *138*(5), 921-926.
- Callewaert, L., & Michiels, C. W. (2010). Lysozymes in the animal kingdom. *Journal of Biosciences*, *35*(1), 127-160. <https://doi.org/10.1007/s12038-010-0015-5>
- Cooper, C. A., Garas Klobas, L. C., Maga, E. A., & Murray, J. D. (2013). Consuming Transgenic Goats' Milk Containing the Antimicrobial Protein Lysozyme Helps Resolve Diarrhea in Young Pigs. *PLoS ONE*, *8*(3), e58409. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0058409>
- Ellison, R. T., 3rd, & Giehl, T. J. (1991). Killing of gram-negative bacteria by lactoferrin and lysozyme. *The Journal of Clinical Investigation*, *88*(4), 1080-1091. <https://doi.org/10.1172/JCI115407>
- European Centre for Disease Prevention and Control (ECDC), European Food Safety Authority (EFSA), & European Medicines Agency (EMA). (2017). ECDC/EFSA/EMA second joint report on the integrated analysis of the consumption of antimicrobial agents and occurrence of antimicrobial resistance in bacteria from humans and food-producing animals: Joint Interagency Antimicrobial Consumption and Resistance Analysis (JIACRA) Report. *EFSA Journal*, *15*(7). <https://doi.org/10.2903/j.efsa.2017.4872>
- Fleming, A. (1922). On a Remarkable Bacteriolytic Element Found in Tissues and Secretions. *Proceedings of the Royal Society of London. Series B, Containing Papers of a Biological Character*, *93*(653), 306-317.
- Fleming, A., & Allison, V. D. (1922). Observations on a Bacteriolytic Substance ("Lysozyme") Found in Secretions and Tissues. *British journal of experimental pathology*, *3*(5), 252-260.

- Huang, G., Li, X., Lu, D., Liu, S., Suo, X., Li, Q., & Li, N. (2018). Lysozyme improves gut performance and protects against enterotoxigenic *Escherichia coli* infection in neonatal piglets. *Veterinary Research*, *49*(1), 20. <https://doi.org/10.1186/s13567-018-0511-4>
- Hughey, V. L., & Johnson, E. A. (1987). Antimicrobial activity of lysozyme against bacteria involved in food spoilage and food-borne disease. *Applied and Environmental Microbiology*, *53*(9), 2165-2170.
- Johnson, L. N. (2000). David Chilton Phillips, Lord Phillips of Ellesmere, K.B.E. 7 March 1924 — 23 February 1999. *Biographical Memoirs of Fellows of the Royal Society*, *46*, 377. <https://doi.org/10.1098/rsbm.1999.0092>
- Kirby, A. J. (2001). The lysozyme mechanism sorted -- after 50 years. *Nature Structural Biology*, *8*(9), 737-739. <https://doi.org/10.1038/nsb0901-737>
- Lu, D., Li, Q., Wu, Z., Shang, S., Liu, S., Wen, X., ... Li, N. (2014). High-Level Recombinant Human Lysozyme Expressed in Milk of Transgenic Pigs Can Inhibit the Growth of *Escherichia coli* in the Duodenum and Influence Intestinal Morphology of Sucking Pigs. *PLoS ONE*, *9*(2), e89130. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0089130>
- Magallón Botaya. (2017). *Manejo y gestión del posdestete. El lechón destetado* (1ª ed. (25/01/2017)). Editorial Servet.
- May, K. D., Wells, J. E., Maxwell, C. V., & Oliver, W. T. (2012). Granulated lysozyme as an alternative to antibiotics improves growth performance and small intestinal morphology of 10-day-old pigs¹. *Journal of Animal Science*, *90*(4), 1118-1125. <https://doi.org/10.2527/jas.2011-4297>
- Nyachoti, C. M., Kiarie, E., Bhandari, S. K., Zhang, G., & Krause, D. O. (2012). Weaned pig responses to *Escherichia coli* K88 oral challenge when receiving a lysozyme supplement^{1,2}. *Journal of Animal Science*, *90*(1), 252-260. <https://doi.org/10.2527/jas.2010-3596>

- Oliver, W. T., & Wells, J. E. (2013). Lysozyme as an alternative to antibiotics improves growth performance and small intestinal morphology in nursery pigs. *Journal of Animal Science*, *91*(7), 3129-3136. <https://doi.org/10.2527/jas.2012-5782>
- Oliver, W. T., & Wells, J. E. (2015). Lysozyme as an alternative to growth promoting antibiotics in swine production. *Journal of Animal Science and Biotechnology*, *6*(1), 35. <https://doi.org/10.1186/s40104-015-0034-z>
- Oliver, W. T., Wells, J. E., & Maxwell, C. V. (2014). Lysozyme as an alternative to antibiotics improves performance in nursery pigs during an indirect immune challenge^{1,2}. *Journal of Animal Science*, *92*(11), 4927-4934. <https://doi.org/10.2527/jas.2014-8033>
- Salton, M. R. (1957). The properties of lysozyme and its action on microorganisms. *Bacteriological Reviews*, *21*(2), 82-100.
- Wells, J. E., Berry, E. D., Kalchayanand, N., Rempel, L. A., Kim, M., & Oliver, W. T. (2015). Effect of lysozyme or antibiotics on faecal zoonotic pathogens in nursery pigs. *Journal of Applied Microbiology*, *118*(6), 1489-1497. <https://doi.org/10.1111/jam.12803>