



Facultad de Veterinaria  
**Universidad Zaragoza**



# **Trabajo Fin de Grado en veterinaria**

**Estudio de la influencia del estrés y contaminación ambiental  
en la patología respiratoria porcina.**

*Study of the influence of stress and environmental pollution on  
porcine respiratory pathology.*

## **Autor**

Belén Beltrán Gómez

## **Directores**

Bernardino Moreno Burgos

Ana Isabel Abad Fau

*Facultad de Veterinaria*

*2024*

## ÍNDICE

I. ABREVIATURAS.....	4
II. RESUMEN/ABSTRACT.....	4
III. INTRODUCCIÓN.....	5
III.1- PATOLOGÍA RESPIRATORIA EN PORCINO DE CEBO.....	5
III.1.1- PRINCIPALES BACTERIAS CAUSANTES DE PATOLOGÍA RESPIRATORIA.....	6
III.1.1.1- <i>Mycoplasma hyopneumoniae</i> .....	6
III.1.1.2- <i>Glasserella parasuis</i> .....	6
III.1.1.3- <i>Bordetella bronchiseptica</i> y <i>Pasteurella multocida</i> .....	7
III.1.1.4- <i>Actinobacillus pleuropneumoniae</i> .....	7
III.1.1.5- <i>Streptococcus suis</i> .....	8
III.1.2- PRINCIPALES VIRUS CAUSANTES DE PATOLOGÍA RESPIRATORIA.....	8
III.1.2.1- VIRUS DEL SÍNDROME RESPIRATORIO Y REPRODUCTIVO PORCINO.....	8
III.1.2.2- VIRUS DE LA INFLUENZA A PORCINA .....	9
III.1.2.3- CIRCOVIRUS PORCINO TIPO 2.....	9
III.1.2.4- CORONAVIRUS PORCINO.....	10
III.1.3- MICOSIS OPORTUNISTAS CON TROPISMO RESPIRATORIO.....	10
III.1.4- PARASITOSIS RESPIRATORIA.....	11
III.2- RELACIÓN ENTRE LA PATOLOGÍA RESPIRATORIA Y EL MANEJO.....	11
III.2.1- EFECTO DEL ENRIQUECIMIENTO DE LOS CORRALES EN LA PATOLOGÍA RESPIRATORIA.....	11
III.2.2- EFECTO DE LA DENSIDAD Y UBICACIÓN DE LAS GRANJAS EN LA PATOLOGÍA RESPIRATORIA.....	12
III.2.3- EFECTO DE LA VENTILACIÓN DE LAS GRANJAS EN LA PATOLOGÍA RESPIRATORIA.....	12
III.3- RELACIÓN ENTRE LA PATOLOGÍA RESPIRATORIA Y EL AMBIENTE.....	13
III.3.1- EFECTO DEL AMONÍACO AMBIENTAL EN LA PATOLOGÍA RESPIRATORIA.....	13
III.3.2- EFECTO DEL CO <sub>2</sub> AMBIENTAL EN LA PATOLOGÍA RESPIRATORIA.....	14
III.3.3- EFECTO DEL SULFURO DE HIDRÓGENO AMBIENTAL EN LA PATOLOGÍA RESPIRATORIA.....	14
III.3.4- EFECTO DEL POLVO AMBIENTAL EN LA PATOLOGÍA RESPIRATORIA.....	14
III.4- BIOMARCADORES DE ESTRÉS EN PORCINO.....	14
III.5- BIOMARCADOR NGAL COMO INDICADOR DE INFLAMACIÓN EN PORCINO.....	16
IV. JUSTIFICACIÓN Y OBJETIVOS.....	16
V. METODOLOGÍA.....	18
VI. RESULTADOS.....	20
VII. DISCUSIÓN.....	25

IX. CONCLUSIONES.....	29
X. VALORACIÓN PERSONAL.....	32
XI. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	33

## **I- ABREVIATURAS**

- Agar tripton-soja (TSA)
- Circovirus Porcino tipo 2 (PCV2)
- Coronavirus Respiratorio Porcino (PRCV)
- Cromogranina A (CgA)
- Dióxido de carbono (CO<sub>2</sub>)
- Lipocalina asociada a gelatinasa de neutrófilos (NGAL)
- Mililitros (ml)
- Nanogramos (ng)
- Partes por millón (ppm)
- Porcine Respiratory Disease Complex (PRDC)
- Presión parcial de oxígeno (PO<sub>2</sub>)
- Sulfuro de hidrógeno (H<sub>2</sub>S)
- Vasostatina I (VST I)
- Virus de la Influenza A porcina (swIAV)
- Virus del Síndrome Respiratorio y Reproductivo Porcino (PRRSV)

## **II- RESUMEN/ABSTRACT**

### **RESUMEN**

El estudio se centró en investigar la influencia del estrés y la contaminación ambiental en la patología respiratoria porcina, evaluando tratamientos alternativos en una explotación porcina con dos naves: una experimental con reducción de amoníaco y otra control. Contrario a la hipótesis inicial, la nave experimental mostró una mayor presencia de microorganismos, tanto patógenos como ambientales, posiblemente debido a efectos secundarios del tratamiento o contaminación cruzada. La identificación de microorganismos mediante el sistema VITEK reveló algunas dificultades técnicas con las muestras. No se encontraron diferencias significativas en la presencia de patógenos específicos entre las naves. Los niveles de cortisol y NGAL fueron inesperadamente más altos en la nave experimental, mientras que los niveles de cromogranina A fueron menores, contradiciendo la expectativa de reducción de estrés. Se destacaron limitaciones en la detección de muestras para los marcadores de estrés. Los análisis estadísticos no confirmaron diferencias significativas en los niveles de estrés entre las poblaciones estudiadas. Se sugiere profundizar en el análisis de las condiciones ambientales y factores adicionales que puedan influir en los resultados. El estudio subraya la complejidad del manejo del estrés y la microbiota en la industria porcina, proponiendo mejorar las

estrategias de manejo y bienestar animal en futuras investigaciones para optimizar la salud y rendimiento de los animales en explotaciones porcinas.

## **ABSTRACT**

The study focused on investigating the influence of stress and environmental contamination on swine respiratory pathology by evaluating alternative treatments in a pig farm with two houses: an experimental house with ammonia reduction and a control house. Contrary to the initial hypothesis, the experimental house showed a higher presence of microorganisms, both pathogenic and environmental, possibly due to side effects of the treatment or cross-contamination. The identification of microorganisms using the VITEK system revealed some technical difficulties with the samples. No significant differences in the presence of specific pathogens were found between the houses. Cortisol and NGAL levels were unexpectedly higher in the experimental barn, while Chromogranin A levels were lower, contradicting the expectation of stress reduction. Limitations in sample detection for stress markers were highlighted. Statistical analyses did not confirm significant differences in stress levels between the populations studied. Further analysis of environmental conditions and additional factors that may influence the results is suggested. The study highlights the complexity of stress and microbiota management in the swine industry, proposing improved management and animal welfare strategies in future research to optimize animal health and performance in swine operations.

## **III- INTRODUCCIÓN**

En este capítulo se presenta el marco teórico que fundamenta el trabajo, en el cual se aborda, a través de la literatura existente en relación a los principales agentes causantes de patología respiratoria en porcino de cebo, la relación existente entre los factores de manejo y la patología respiratoria y la relación entre los factores ambientales y la medición de diferentes biomarcadores en los cerdos que indican la presencia de estrés.

### **III.1- Patología respiratoria en porcino de cebo**

Las afecciones respiratorias en porcino de preengorde, especialmente en su variante crónica, representan uno de los principales desafíos en la cría de cerdos. Estas ocasionan considerables pérdidas económicas debido a la reducción de la ganancia media diaria y la eficiencia en la conversión alimenticia (Gutiérrez y Alonso, 2004).

Las coinfecciones por varios agentes patógenos son más comunes en explotaciones porcinas que las infecciones individuales. Se emplea el término "Porcine Respiratory Disease Complex" (PRDC) para describir este fenómeno (Saade *et al.*, 2020). El PRDC tiene una naturaleza polimicrobiana, surgida a raíz de una infección que involucra diversas combinaciones de patógenos respiratorios tanto primarios como secundarios. Al tratarse de una enfermedad multifactorial, diversos elementos como las condiciones ambientales, el tamaño poblacional (relacionado con el estrés), las estrategias de gestión y factores específicos relacionados con los cerdos, como la edad y la genética, juegan un papel esencial (Opriessnig *et al.*, 2011).

### **III.1.1- Principales bacterias causantes de patología respiratoria**

Las bacterias que causan patología respiratoria en el ganado porcino de cebo de forma primaria son *Actinobacillus pleuropneumoniae* y *Mycoplasma hyopneumoniae*. De forma secundaria pueden infectarse por bacterias como *Bordetella bronchiseptica* (Saade *et al.*, 2020), *Pasteurella multocida* (Opriessnig *et al.*, 2011), *Glasserella parasuis* (Liu *et al.*, 2017) y *Streptococcus suis* (Obradovic *et al.*, 2021).

#### **III.1.1.1- *Mycoplasma hyopneumoniae***

*M. hyopneumoniae* es el agente causal de la enfermedad llamada neumonía enzoótica porcina. Las infecciones ocasionadas por esta bacteria son frecuentes en todo el mundo. La infección que causa ocasiona un deterioro del epitelio del tracto respiratorio, que puede ser provocado de manera directa, causado por la propia citotoxicidad bacteriana, o de manera indirecta, al desencadenar una intensa y perjudicial respuesta inflamatoria (Leal Zimmer *et al.*, 2020).

La principal vía de transmisión de *M. hyopneumoniae* es por contacto directo, como el contacto nariz a nariz entre cerdos infectados y susceptibles. También puede ocurrir la transmisión de madres infectadas a sus crías (Garza-Moreno *et al.*, 2018).

*M. hyopneumoniae* es una de las principales bacterias que participan en el PRDC. La lesión macroscópica que presenta el ganado porcino tras la infección es una consolidación pulmonar craneoventral, de carácter crónico, la cual con mayor frecuencia es bilateral en los lóbulos apicales, accesorios, intermedio y zona craneal de los diafragmáticos (García-Morante *et al.*, 2015).

#### **III.1.1.2- *Glasserella parasuis***

*G. parasuis*, llamada hasta hace unos años *Haemophilus parasuis* (Mahmmod *et al.*, 2020), es la bacteria causante de la enfermedad de Glässer, la cual causa una infección colonizando el tracto respiratorio superior (Macedo *et al.*, 2015).

*G. parasuis* presenta una mayor prevalencia en la etapa postdestete. Un estudio realizado en 2022 demostró que la vacunación de las cerdas ayuda a disminuir la presencia de esta bacteria en la microbiota nasal de los lechones (Blanco-Fuertes *et al.*, 2022). Las lesiones macroscópicas que caracterizan a esta enfermedad son la presencia de una poliserositis fibrinosa acompañada de meningitis y artritis (Oliveira y Pijoan, 2004). Frecuentemente se aísla de lesiones neumónicas, tanto de lesiones agudas como crónicas, aunque en asociación con otras bacterias (Olvera *et al.*, 2006).

#### **III.1.1.3- *Bordetella bronchiseptica* y *Pasteurella multocida***

*P. multocida* en asociación o no con *B. bronchiseptica* puede causar una enfermedad llamada rinitis atrófica progresiva porcina, siendo un problema a nivel de rebaño (Pedersen y Barfod, 1981). *B. bronchiseptica*, de forma individual, causa la rinitis atrófica no progresiva, que afecta a pocos animales. Ambas formas aparecen principalmente en cerdos jóvenes de seis a doce semanas. Las lesiones se caracterizan por afectar a los cornetes nasales, con atrofia de los mismos (Gutiérrez Hernández *et al.*, 2013). En la presentación más grave de la enfermedad se puede apreciar el hocico deformado e incluso acortado. La patogénesis radica en la capacidad de los osteoclastos de estimular la resorción ósea de los cornetes y/o en la inhibición de la diferenciación de los osteoblastos (Horiguchi, 2012).

*B. bronchiseptica* puede actuar como patógeno primario en lactantes, provocando una neumonía fibrino-necrótica o, como secundario, en animales de cebo asociado de bronconeumonías catarrales. Por otra parte, *P. multocida* puede aislarse de neumonías agudas o crónicas y es la principal bacteria aislada en neumonías de animales sacrificados en el matadero (Pedersen y Barfod, 1981).

#### **III.1.1.4- *Actinobacillus pleuropneumoniae***

*A. pleuropneumoniae* es una bacteria que afecta al tracto respiratorio pudiendo causar una enfermedad llamada pleuroneumonía porcina, la cual causa grandes pérdidas económicas. La variante aguda de la enfermedad presenta una alta letalidad a causa de una dificultad respiratoria grave (Sassu *et al.*, 2018).

Las lesiones asociadas a la infección por *A. pleuropneumoniae* se corresponden con una neumonía fibrino-hemorrágica a fibrino-necrótica, uni o bilateral, localizada en las zonas dorsales de los lóbulos diafragmáticos y acompañándose de pleuritis fibrinosa (Papatsiros *et al.*, 2023).

### **III.1.1.5- *Streptococcus suis***

*Streptococcus suis* es una bacteria capaz de afectar de forma significativa a los lechones destetados. *S. suis* es un habitante normal del tracto respiratorio superior. La presencia de cepas potencialmente virulentas por sí sola no garantiza la aparición de signos clínicos. La coinfección con otros patógenos virales y bacterianos puede influir en la gravedad de las enfermedades asociadas a *S. suis* (Obradovic *et al.*, 2021).

*S. suis* es un patógeno presente a nivel mundial. Tanto en el hombre como en los cerdos puede cursar con septicemia, neumonía, artritis, endocarditis y meningitis (Haas y Grenier, 2018). *S. suis* tiene varios serotipos, algunos de los cuales son zoonóticos, pudiendo causar meningitis purulenta, especialmente en personas que están expuestas al contacto con cerdos y/o carne de cerdo (Hlebowicz *et al.*, 2019).

### **III.1.2- Principales virus causantes de patología respiratoria**

Los virus son considerados como patógenos primarios y favorecen habitualmente la colonización secundaria de bacterias oportunistas. Los agentes aislados más frecuentemente son el virus del Síndrome Respiratorio y Reproductivo Porcino (PRRSV), el virus de la Influenza A porcina (swIAV), el Circovirus Porcino tipo 2 (PCV2) (Saade *et al.*, 2020) y el Coronavirus Respiratorio Porcino (PRCV) (Brockmeier *et al.*, 2007).

#### **III.1.2.1- Virus del Síndrome Respiratorio y Reproductivo Porcino**

El PRRSV es un virus RNA, perteneciente a la familia *Arteriviridae* con tropismo por los macrófagos alveolares (Meulenbergh, 2000). La enfermedad producida por este virus causa grandes pérdidas económicas en explotaciones porcinas de todo el mundo y se caracteriza por generar complicaciones respiratorias en los cerdos en fase de crecimiento y problemas reproductivos en las cerdas (Ruedas-Torres *et al.*, 2021). Una cepa que actualmente preocupa en España es la llamada cepa Rosalía, la cual ocasionó en el 2022, grandes pérdidas en el sector porcino. Una de las hipótesis que se está valorando actualmente sobre la introducción de la cepa Rosalía en nuestro país es la importación de lechones desde países externos, ya que esta cepa es filogenéticamente similar a las cepas de Italia y Holanda. Esta cepa fue detectada en España por primera vez en el año 2020 (Accensi *et al.*, 2023).

### **III.1.2.2- Virus de la Influenza A porcina**

Antes de profundizar acerca del swIAV, es conveniente mencionar a los llamados influenzavirus, los cuales afectan a varios animales vertebrados. Dentro del grupo de los influenzavirus hay algunos que son zoonóticos, en concreto los que van acompañados por las letras A, B y C (Hutchinson, 2018).

El swIAV es capaz de transmitirse de cerdos a humanos. Además, es un virus que se encuentra extendido por todo el mundo lo cual sigue dificultando su control y la creación de vacunas eficaces (Ma, 2020). El Centro Europeo para la Prevención y el Control de Enfermedades informó, en enero del 2020, que las autoridades españolas notificaron un posible caso de infección humana por el virus de la gripe porcina en un trabajador de una granja de Cataluña, el cual fue posteriormente confirmado. El trabajador se recuperó completamente y no se detectaron más casos (Villalvilla, 2024).

Un estudio basado en la toma de muestras de saliva en lechones, previo al destete demostró que los lechones se pueden infectar del swIAV sin mostrar síntomas evidentes o visibles, pasando desapercibida la infección (Panyasing *et al.*, 2014). En otro estudio realizado en 2012 se observó que el virus no causaba casi mortalidad en cerdos cuando no había coinfecciones y/o estrés ambiental asociado, también que el virus se transmitía de forma horizontal (Williamson *et al.*, 2012).

Aunque es un virus que puede pasar desapercibido sin dar síntomas, también puede mostrar clínica. En lechones destetados y en crecimiento puede dar algunos de los siguientes síntomas: se acuestan repentinamente, tienen dificultad para respirar, presentan tos severa o síntomas inespecíficos similares. Lesionalmente, la influenza porcina se caracteriza por una bronconeumonía intersticial caracterizada por atelectasia, moderada consolidación pulmonar de distribución lobulillar e infiltrado intersticial (Pig333., no date).

### **III.1.2.3- Circovirus porcino tipo II**

El PCV2 tiene tropismo por el tejido linfóide, causando una inmunosupresión y camuflándose del sistema inmune. Este virus habita en las células del sistema inmune del hospedador una vez es alcanzado, que pueden ser las células dendríticas o los macrófagos, modulando su funcionamiento (Meng, 2013).

El PCV2 es capaz de afectar a cerdos en fase de crecimiento. El PCV2 puede encontrarse en el semen de verracos infectados, los cuales al montar a la hembra o cuando la hembra es inseminada con el semen de dichos verracos, la infectan, infectando esta de forma vertical al feto. A causa de la transmisión vertical aumenta el número de lechones no viables y de fetos momificados. Sin embargo, los lechones que nacen infectados por la transmisión vertical de la enfermedad no suelen mostrar signos clínicos, aunque tienen un periodo de viremia en el cual pueden infectar al resto de la explotación de manera horizontal (Madson y Opriessnig, 2011).

La infección por el PCV2 se relaciona con varios síndromes en porcino, como el síndrome de desmedro posdestete, el síndrome de dermatitis y nefropatía porcina, además de trastornos digestivos, respiratorios y reproductivos (Segalés, 2012). A nivel respiratorio, produce una neumonía intersticial, asociándose también con una forma especial de neumonía denominada neumonía necrotizante y fibrosante (Szeredi *et al.*, 2012).

#### **III.1.2.4- Coronavirus porcino**

Actualmente se conocen seis coronavirus que pueden infectar al cerdo, siendo uno de ellos el PRCV (Turlewicz-Podbielska y Pomorska-Mól, 2021). Se realizó un modelo experimental de coinfección con *B. bronchiseptica* y PRCV en el que se observó que las lesiones pulmonares macroscópicas e histopatológicas fueron más graves en el grupo coinfectado en comparación con los grupos infectados con *B. bronchiseptica* o PRCV solo (Brockmeier *et al.*, 2007). El PRCV por sí solo, sin presencia de coinfecciones causa una infección subclínica (Laude *et al.*, 1993).

#### **III.1.3- Micosis oportunistas con tropismo respiratorio**

Las infecciones fúngicas pueden ser primarias u oportunistas. Las infecciones oportunistas se aprovechan de factores predisponentes (Szalk y Prinz, 1991). Algunos hongos pueden colonizar el pulmón de los cerdos, provocando una neumonía y generando pérdidas económicas en las explotaciones. Se han aislado varias especies de hongos en neumonías porcinas, tales como hongos de la familia *Pneumocystis*, asociándose a neumonías intersticiales y o broncointersticiales. Estas lesiones se han observado en lechones destetados, demostrándose una participación activa en la transmisión horizontal de la micosis (Sanches *et al.*, 2007). *Aspergillus fumigatus* también tiene la capacidad de actuar como oportunista en el pulmón de los suidos. Las células inmunitarias de la mucosa pulmonar juegan un papel muy importante en este tipo de infecciones ya que de ellas depende que se propaguen o no (Schmidt *et al.*, 2020).

### **III.1.4- Parasitosis respiratoria**

Uno de los principales parásitos que causa patología respiratoria en el ganado porcino pertenece a la familia *Ascarididae*. Los parásitos de esta familia son nemátodos pulmonares que están bastante extendidos en el ganado porcino y también pueden afectar a la especie humana (Dold y Holland, 2011).

La infección por *Ascaris suum* es frecuente en cerdos destetados y engordados y reducen el valor de la canal. Lo ideal para prevenir el parásito es aplicar medidas higiénicas en la etapa de parto y cría de lechones (Joachim y Dauschies, 2000).

### **III.2- Relación entre la patología respiratoria y el manejo**

El estrés puede causar un estado de inmunosupresión, haciendo que un hospedador sea más propenso a desarrollar infecciones (van Dixhoorn *et al.*, 2016). Dentro del manejo del ganado porcino, hay algunos factores importantes a considerar dado que pueden contribuir a la diseminación de enfermedades respiratorias (Elbers *et al.*, 1992). Algunos de estos factores son el enriquecimiento de los corrales (van Dixhoorn *et al.*, 2016), la densidad y ubicación de las granjas (Jara *et al.*, 2021) o el efecto de la ventilación (Boehme *et al.*, 2019).

#### **III.2.1- Efecto del enriquecimiento de los corrales en la patología respiratoria**

Está demostrado que un buen enriquecimiento ambiental, teniendo en cuenta factores como por ejemplo los sistemas de drenaje o el tipo de suelo, permite aumentar el bienestar animal. Este suceso está asociado a una reducción del estrés. La paja se considera uno de los tipos de suelo más adecuados para fomentar el bienestar (Morgan y Raz, 2019).

Un estudio reciente (van Dixhoorn *et al.*, 2016) evaluó la relación entre las condiciones de manejo y la susceptibilidad de contraer una enfermedad. Se valoró la susceptibilidad a la enfermedad en dos tipos de corrales, uno de ellos enriquecido y el otro no, en los que se inocularon dos patógenos (*A. pleuropneumoniae* y PRRSV) durante el experimento. El corral enriquecido disponía de virutas de madera, 1kg de paja, 160 litros de turba húmeda, ramas de escoba y sacos de yute. Además, se reponía la paja y las virutas de madera todos los días y se volvían a añadir ramas de escoba de madera, sacos de yute y 20 L de turba todas las semanas. Por otra parte, tanto el corral enriquecido como el no enriquecido disponían de las mismas condiciones de temperatura, ambos disponían de dos bebederos, uno para los lechones y otro para las cerdas y en ambos se retiraban diariamente las

heces. La conclusión del estudio fue que el enriquecimiento de los corrales había influido de manera positiva en la respuesta inmunológica de los cerdos (van Dixhoorn *et al.*, 2016).

Por otra parte, en 2017, Casal *et al.*, investigaron el efecto de diversos tipos de enriquecimiento ambiental y la suplementación con compuestos vegetales en los biomarcadores fisiológicos de estrés, tanto agudo como crónico. Entre estos, se cuantificaron el cortisol y la cromogranina A. El estudio se realizó con cerdos jóvenes en crecimiento, demostrándose que suministrar materiales para el enriquecimiento o algún compuesto herbal disminuye los niveles de estrés en los cerdos en crecimiento (Casal *et al.*, 2017).

La mordedura de cola entre cerdos, es decir, la caudofagia, es un fenómeno bastante común en porcino de cebo. Los animales se muerden las colas haciéndose heridas que les generan dolor, lo que, consecuentemente aumenta el estrés de los animales. Éste fenómeno se puede reducir mediante el enriquecimiento ambiental, por ejemplo, proporcionándoles cuerdas para que las muerdan (D'Eath *et al.*, 2014).

### **III.2.2- Efecto de la densidad y ubicación de las granjas en la patología respiratoria**

Un estudio realizado en el año 2021 (Jara *et al.*, 2021) demostró que la densidad de cerdos en las explotaciones y la ubicación de las granjas pueden contribuir a la transmisión del PRRSV. En este estudio los resultados indican que las explotaciones que estaban ubicadas próximas a carreteras principales (de 0,5 a 0,7km de éstas) y con densidades de entre 500 y 1000 cerdos/km<sup>2</sup> tienen más probabilidad de infectarse con el virus del PRRS. Sin embargo, aquellas explotaciones más alejadas y ubicadas alrededor de una abundante cantidad de vegetación tienen menos probabilidad de ser infectadas por este virus (Jara *et al.*, 2021). Además, la caudofagia, aunque tiene un origen multifactorial, puede ser favorecida por las altas densidades ganaderas (Sonoda *et al.*, 2013).

### **III.2.3- Efecto de la ventilación de las granjas en la patología respiratoria**

Se conoce que la ventilación mecánica puede causar inflamación pulmonar. En 2019 se realizó un estudio para comprobar si los mecanismos no mecánicos del ventilador (como las oscilaciones de la presión parcial de oxígeno (PO<sub>2</sub>)) también contribuyen a dichas afección y sus efectos sobre el sistema respiratorio del ganado porcino. En conclusión, los autores demostraron que los mecanismos no mecánicos también producen inflamación pulmonar (Boehme *et al.*, 2019).

Una buena ventilación ayuda a mejorar la calidad del aire. Una mala calidad puede ser un factor predisponente en la conducta de caudofagia de los cerdos, además de afectar negativamente a su nivel de estrés (Sonoda *et al.*, 2013).

### **III.3- Relación entre la patología respiratoria y el ambiente**

La existencia de unas condiciones ambientales exigentes, como las descritas en esta sección, pueden causar estrés y éste, a su vez, es capaz de inducir inmunodepresión en el animal, favoreciendo la aparición de enfermedades infecciosas (van Dixhoorn *et al.*, 2016). En las explotaciones porcinas existen algunos factores ambientales importantes a considerar, que pueden contribuir a aumentar la susceptibilidad de los animales a contraer enfermedades respiratorias. Algunos de estos factores son la cantidad de amoníaco en el ambiente (Hamilton *et al.*, 1996), el porcentaje de CO<sub>2</sub> (Schneberger *et al.*, 2015), el efecto del sulfuro de hidrógeno (H<sub>2</sub>S) (Santana *et al.*, 2021) o el efecto del polvo ambiental (McClendon *et al.*, 2015).

#### **III.3.1- Efecto del amoníaco ambiental en la patología respiratoria**

El amoníaco es un gas presente en las explotaciones porcinas debido a la degradación microbiana de sus excrementos y las altas concentraciones se deben habitualmente a altas densidades de población (Donham, 1991). Es un gas perjudicial capaz de causar estrés oxidativo en los pulmones de los animales (Li *et al.*, 2023).

En 1996, se hizo un estudio experimental sobre el efecto del amoníaco en lechones tras una semana postdestete (Hamilton *et al.*, 1996). Los animales se dividieron en grupos y fueron expuestos a diferentes partes por millón (ppm) de amoníaco. Tras una semana de exposición se inoculó a todos los grupos con la misma dosis de *P. multocida* tipo D. A las 4 semanas todos los lechones fueron sacrificados para observar el grado de rinitis atrófica (deformación de los cornetes nasales) que presentaban. La gravedad de las lesiones de la rinitis atrófica fue máxima a 10 ppm de amoníaco (siendo también mayor a 5 ppm que a 0 ppm). Sin embargo, a partir de 25 ppm el efecto fue disminuyendo. En este estudio se observó que el número de bacterias de *P. multocida* presentes en los cornetes estaba relacionado con la gravedad de las lesiones y que, a mayor concentración de amoníaco, más facilidad tenía *P. multocida* para sobrevivir y crecer en el tracto respiratorio de los lechones. Otro hallazgo observado en el estudio fue que, incluso en ausencia de *B. bronchiseptica* o de *P. multocida*, aquellos lechones que habían estado expuestos a 10 ppm de amoníaco o más, presentaban una leve atrofia de los cornetes. Por ello, las concentraciones de amoníaco en 10 ppm o

más contribuyen a agravar las lesiones causadas por *B. bronchiseptica* y/o por *P. multocida* (Hamilton *et al.*, 1996).

### **III.3.2- Efecto del CO<sub>2</sub> ambiental en la patología respiratoria**

Está demostrado que ciertos cambios en los niveles de CO<sub>2</sub> son capaces de afectar a las funciones inmunorreguladoras del pulmón (Schneberger *et al.*, 2015). Un estudio realizado en 2007 concluyó que las células epiteliales alveolares, las cuales son responsables de la eliminación de CO<sub>2</sub> en los mamíferos, son altamente sensibles a la hipercapnia. Los niveles elevados de CO<sub>2</sub> deterioran la función epitelial alveolar, independientemente del pH, lo cual es relevante en cerdos con enfermedades pulmonares e intercambio gaseoso alterado (Briva *et al.*, 2007).

### **III.3.3- Efecto del sulfuro de hidrógeno ambiental en la patología respiratoria**

La presencia de H<sub>2</sub>S se debe a la descomposición del estiércol y es común en las granjas de porcino de cebo. El H<sub>2</sub>S tiene la capacidad de provocar una irritación del tracto respiratorio. Un estudio realizado en 2021 demostró que la presencia de H<sub>2</sub>S ambiental aumenta la gravedad de las infecciones causadas por el virus influenza (Santana *et al.*, 2021). Sin embargo, no siempre tiene porque actuar de manera perjudicial; está demostrado que la administración de H<sub>2</sub>S a modo de agente terapéutico puede tener efecto antiinflamatorio ante una lesión por isquemia-reperfusión, un tipo de isquemia tisular que puede afectar a cualquier órgano (Sodha y Sellke, 2015).

### **III.3.4- Efecto del polvo ambiental en la patología respiratoria**

Una de las consecuencias que tienen las instalaciones de producción intensiva en porcino es la acumulación de polvo, el cual puede contribuir a la aparición y agravamiento de problemas respiratorios en los animales, incluso en trabajadores (McClendon *et al.*, 2015). Urbain *et al.* (1999) demostraron que la inhalación de polvo era capaz de inducir inflamación de las vías respiratorias bronquiales, aunque no provocaba efectos perjudiciales en la mucosa nasal. Por otra parte, Hamilton *et al.* (1999), demostraron que el polvo, al igual que el amoníaco en su forma gaseosa, era capaz de agravar las lesiones de la rinitis atrófica porcina al facilitar que *P. multocida* colonice las vías respiratorias superiores de los cerdos.

### **III.4- Biomarcadores de estrés en porcino**

Existen varias moléculas que se empiezan a secretar por encima de sus valores normales en presencia de estímulos estresantes y que, por tanto, podemos utilizarlas para medir el nivel de estrés que sufren los cerdos. Algunas de éstas son el cortisol (Prims *et al.*, 2019) o la cromogranina A

(CgA) (Escribano, 2014). Se ha demostrado que el efecto de una elevada concentración de cortisol en cerdas en gestación puede tener consecuencias sobre la fisiología de los lechones, pudiendo causar efectos como un menor peso en el nacimiento (Kranendonk *et al.*, 2006). Otro de los efectos que puede tener el estrés en las cerdas gestantes es la repercusión en el sistema inmunológico de los lechones, afectando a su capacidad para hacer frente de manera eficaz a las infecciones que pueden adquirir durante sus primeras semanas de vida (Couret *et al.*, 2009).

Los biomarcadores pueden reflejar el estrés crónico o el estrés agudo, siendo un aspecto muy importante la facilidad en la toma de muestras para su determinación, que evite situaciones estresantes adicionales. Algunos de estos marcadores pueden determinarse en muestras de saliva, evitando el estrés por el manejo en la toma de suero. El cortisol, por ejemplo, es un buen marcador de estrés crónico en lechones y puede medirse fácilmente en saliva (Prims *et al.*, 2019). Por otra parte, la CgA es una molécula que puede ser cuantificada también en la saliva de los cerdos, siendo un marcador de estrés agudo (Escribano, 2014; Huang *et al.*, 2017) o crónico (Casal *et al.*, 2017). No obstante, se ha sugerido que la mejor manera de evaluar el estrés podría ser la medición simultánea de varios biomarcadores salivares, que reflejen los diversos sistemas involucrados en su mecanismo (Escribano *et al.*, 2015).

En 1995 se llevó a cabo un estudio en el cual se observó cómo los niveles de cortisol afectan a la respuesta a un alérgeno. Se conoce que el cortisol aumenta ante un agente estresante. Para la realización del estudio se utilizó un medicamento llamado metirapona, el cual reduce los niveles de cortisol. Tras la realización del modelo experimental, se observó que los cerdos con niveles bajos de cortisol desarrollaron una obstrucción en las vías respiratorias varias horas después de la exposición al alérgeno. Esto sugiere que el cortisol tiene un papel importante en la regulación de la inflamación en las vías respiratorias (Fornhem *et al.*, 1995).

La cromogranina A (CgA) es un marcador importante en tumores neuroendocrinos, como los carcinoides pulmonares. Un estudio realizado en 1999 investigó la inmunorreactividad (IR) a la vasostatina I (VST I), un péptido derivado de CgA, en carcinoides pulmonares. Se observó que la mayoría de los tumores carcinoides pulmonares mostraron inmunorreactividad positiva para VST I, mientras que los carcinoides pulmonares asociados con síntomas de enrojecimiento fueron inmunonegativos para VST I. Estos hallazgos sugieren que la expresión de VST I puede ser relevante para la identificación y caracterización de carcinoides pulmonares, ofreciendo pistas sobre la biología y la respuesta clínica de estos tumores en el sistema respiratorio (Cunningham *et al.*, 1999).

## **II.5 Biomarcador NGAL como indicador de inflamación en porcino**

Además de biomarcadores de estrés, existen marcadores inflamatorios, que pueden evidenciar procesos inflamatorios, como los ocurridos en la patología respiratoria. La molécula NGAL (Lipocalina asociada a gelatinasa de neutrófilos) se utiliza con carácter general como biomarcador renal (Duan *et al.*, 2015). Sin embargo, es una molécula que recientemente ha sido reconocida como un participante clave en cómo el cuerpo responde a la inflamación. Su papel principal parece estar en la regulación del manejo corporal del hierro durante los estados inflamatorios. En otras palabras, NGAL ayuda a controlar cómo se distribuye y se utiliza el hierro en el cuerpo cuando hay inflamación, lo que puede tener implicaciones importantes en la salud y la respuesta del sistema inmunológico a las enfermedades (Xiao *et al.*, 2017).

En 2013 se llevó a cabo un estudio que concluyó que la molécula NGAL desempeña un papel crucial en la respuesta del huésped frente a la infección por *Chlamydia pneumoniae*, un patógeno intracelular que requiere hierro para su replicación, el cual es capaz de causar problemas respiratorios en cerdos. Como ya ha sido mencionado, la NGAL limita la disponibilidad de hierro al unirse a sideróforos bacterianos, lo cual inhibe el crecimiento y la patogenicidad de las bacterias. En el estudio se observó que los macrófagos deficientes en NGAL mostraron un aumento significativo en el crecimiento de *C. pneumoniae*, especialmente cuando se estimuló con hierro adicional. Por otro lado, la adición de NGAL recombinante redujo el crecimiento bacteriano en macrófagos infectados. Además, se observó que los macrófagos expresaron niveles más altos de la citocina antiinflamatoria Interleucina-10, la cual promueve la formación de ferritina, una proteína de almacenamiento de hierro. La mayor ferritina podría limitar aún más el acceso de *C. pneumoniae* al hierro intracelular. Por lo tanto, este estudio sugiere que NGAL no solo limita directamente la disponibilidad de hierro para *C. pneumoniae*, sino que también modula la respuesta inmune del huésped a través de la regulación de IL-10 y ferritina, lo que influye en la capacidad del patógeno para replicarse intracelularmente (Bellmann-Weiler *et al.*, 2013).

## **IV. JUSTIFICACIÓN Y OBJETIVOS**

La cría porcina es una actividad económica importante en muchas regiones del mundo, siendo esencial garantizar tanto la salud de los animales como la rentabilidad de las explotaciones. Sin embargo, el estrés y la contaminación ambiental representan desafíos que pueden impactar negativamente en la salud respiratoria de los cerdos, aumentando la incidencia de ciertas enfermedades, lo que a su vez conlleva pérdidas económicas para los productores.

La literatura científica ha destacado la estrecha relación entre el estrés y la susceptibilidad a enfermedades respiratorias en los cerdos. Por lo tanto, investigar la eficacia de tratamientos alternativos para reducir el estrés, como la implementación de medidas de enriquecimiento ambiental o la aplicación de técnicas de manejo más adecuadas, se presenta como una estrategia prometedora para mejorar el bienestar de los animales y reducir la incidencia de patologías respiratorias.

Además, se ha observado que la implementación de prácticas que promueven el bienestar animal puede tener efectos positivos en la productividad y rentabilidad de las explotaciones porcinas. Si se logra demostrar que la reducción del estrés mediante tratamientos alternativos está asociada a una disminución de las enfermedades respiratorias en los cerdos, esto no solo mejoraría la salud y el bienestar de los animales, sino que también podría traducirse en una reducción de los costos de producción y en un aumento de la eficiencia productiva.

Por lo tanto, este estudio se justifica por su relevancia para mejorar el bienestar animal, reducir la incidencia de patologías respiratorias y promover la sostenibilidad económica de la industria porcina. Se pretende que los resultados obtenidos contribuyan a enriquecer el conocimiento científico en este campo y puedan tener importantes implicaciones prácticas para los productores porcinos y la sociedad en general.

El objetivo general de este trabajo es valorar la relación existente entre el ambiente, el estrés y ciertos patógenos respiratorios en una explotación porcina de cebo. Se valorará a través del estudio de la contaminación bacteriana y fúngica ambiental en dos naves de la explotación y de la medición del grado de estrés en dichas naves a través de biomarcadores en saliva, con la finalidad de comprobar si existe una relación directa entre dichas variables. Las dos naves están distribuidas en forma de nave control y otra con tratamiento. El tratamiento, en fase experimental y suministrado por una empresa externa, busca disminuir la presencia de amoníaco ambiental, lo cual, hipotéticamente, reduciría el estrés de los animales y la incidencia de bacterias, hongos y levaduras en la granja.

En este trabajo de fin de grado se han evaluado los datos y diferencias en función de los dos grupos. Es decir, la empresa externa fue la encargada de asegurar y controlar las diferencias de amoníaco ambiental en ambas naves y, en base a esta premisa, se hicieron las comparaciones.

Los objetivos específicos del trabajo son:

- Identificar y cuantificar las bacterias, levaduras y hongos (ambientales y patógenos) presentes en el ambiente de cada nave.
- Evaluar la presencia de biomarcadores de estrés (cortisol y cromogranina A) e inflamatorios (NGAL) en muestras de saliva.
- Comparar la población microbiana ambiental y los biomarcadores entre ambos grupos.

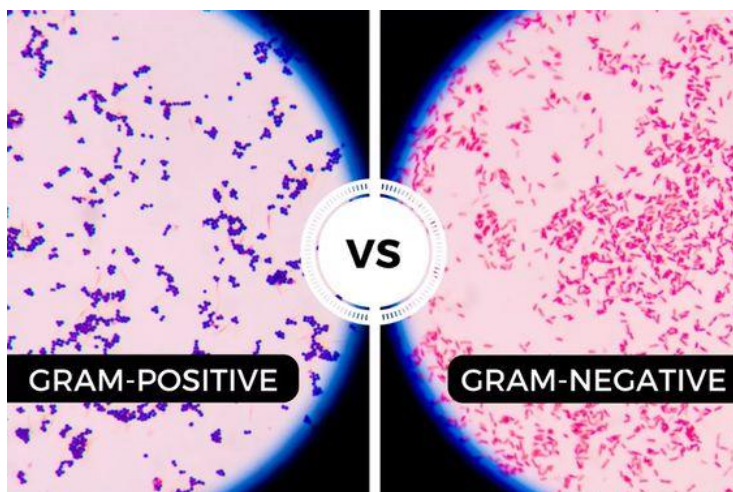
## V. METODOLOGÍA

El estudio realizado en este TFG se enmarca dentro de un proyecto multidisciplinar, una de cuyas actividades pretende relacionar los niveles ambientales de amoníaco con los problemas respiratorios, la carga bacteriana ambiental y el grado de bienestar de los animales, valorando el estrés de los mismos, durante el periodo de cebo. Para la realización del mismo existen dos naves, una experimental y la otra de control. Las naves son rectangulares y acogen, aproximadamente, a unos 1000 lechones, divididos en corrales de unos 15 animales, durante todo el periodo de cebo. En la nave tratamiento, uno de los grupos integrantes del proyecto se encarga de vigilar regularmente el estado de las naves y de tomar las mediciones de amoníaco, tras la aplicación de un tratamiento en el purín, el cual disminuye previsiblemente los niveles ambientales de amoníaco. La otra nave permanece sin tratamiento y se utiliza como control. Para la realización del experimento, se partió ya de una baja concentración de amoníaco en la nave tratamiento, concretamente 0,895 ppm, para posteriormente evaluar las diferencias entre dicha nave y la nave control. En la nave control se partió también de una baja concentración, 0,683 ppm. A mitad del periodo de cebo se realizó el muestreo ambiental y se monitoreó la posible presencia de problemas respiratorios en ambas naves. No obstante, este monitoreo se mantuvo durante todo el periodo de cebo. El estudio fue realizado en invierno, durante el cual, en muchas regiones se observa una mayor incidencia de problemas respiratorios debido a las bajas temperaturas y, además, suele haber mayor concentración ambiental de patógenos y partículas contaminantes.

Para la realización del estudio de patógenos ambientales se tomaron muestras de aire mediante un aerocolelector microbiológico de aire (modelo MAS-100 Eco), en cinco puntos diferentes de ambas naves. Concretamente, en zonas próximas a las cuatro esquinas y en el centro. Cada toma de muestras se realizó durante 30 segundos, durante los cuales se recogieron 30 litros de aire por muestra. Los medios de cultivo que fueron utilizados para tomar estas muestras fueron *Agar-sangre* (BioAgar), *MacConkey* (Panreac Química S.L.U.) y *Sabouraud Dextrosa Agar cloranfenicol* (Panreac Química S.L.U.). Las placas de agar sangre y MacConkey se mantuvieron a 37 °C durante 24 horas antes de realizar la primera lectura, mientras que las de Sabouraud Dextrosa permanecieron siete

días en la estufa a 25 °C antes de la primera lectura. En las placas Sabouraud Dextrosa y MacConkey se anotó la cantidad de colonias aisladas, mientras que para la valoración de la densidad se utilizaron los códigos + de 1 a 30 UFC, ++ de 31 a 300 UFC y +++ para recuentos mayores de 300 UFC entre todas las placas que fueron positivas.

La identificación bacteriana y de levaduras fue realizada a través de varios pasos. En primer lugar, debido a que en cada una de las placas petri habían crecido varios tipos de microorganismos, se realizó una descripción morfológica y una resiembra en TSA (agar triptona-soja) (oxid) de cada tipo diferente de microorganismo crecido en cada placa. En segundo lugar, se realizó una suspensión de cada una de las colonias purificadas en medio TSA, en un portaobjetos y fijándose a la llama con la finalidad de realizar una tinción Gram. El protocolo a seguir para la tinción fue: bañado del portaobjetos en cristal violeta, 30 segundos de descanso y aclarado con agua, bañado en lugol, 30 segundos de descanso y aclarado con agua, bañado en alcohol acetona y lavado rápido con agua y bañado en fucsina diluida, 30 segundos de descanso y aclarado con agua. Tras la tinción Gram se realizó una valoración de la morfología al microscopio óptico para determinar si se trataba de cocos, bacilos o levaduras y una valoración del color para clasificarlos en Gram + (color morado) o Gram- (color rosa) (*Figura 1*). El último paso fue la identificación de bacterias y levaduras mediante el sistema VITEK utilizando las mismas placas TSA que para la tinción Gram. La identificación de los hongos se realizó a través de su morfología macroscópica siempre que fuese posible.



**Figura 1:** ejemplo de diferenciación entre bacterias Gram + y Gram + observadas en microscopio.

**Fuente:** (This One vs That One., s.f.)

Por último, una vez obtenidos los resultados del VITEK se procedió a clasificarlas en función de si pertenecían a la granja control o experimental, al lugar donde habían sido tomadas las muestras, al medio de crecimiento utilizado y al tipo de bacterias y hongos identificados.

Para cuantificar el nivel de estrés y el posible efecto inflamatorio, se tomaron muestras de saliva en 30 animales de cada nave, en diferentes zonas de las mismas. Posteriormente, fueron utilizados para obtener los valores de cortisol, de NGAL y de cromogranina A. La toma de muestras de saliva se realizó utilizando Salivette (Sarstedt). El material absorbente fue colocado en la boca de los cerdos durante un tiempo aproximado de un minuto y medio o dos. Los Salivette, cerrados herméticamente, fueron trasladados al laboratorio inmediatamente, donde se centrifugaron a 40.000g, durante 10 minutos. El sobrenadante obtenido se trasladó a un tubo de 1.5 mL que se mantuvo en congelación a -80 °C hasta el análisis de los biomarcadores. La determinación de los mismos se realizó mediante reactivos comerciales, utilizando un ELISA para NGAL (My BioSource), un ELISA para cromogranina A (My BioSource) y un analizador de inmunoensayo automático frente al cortisol (IMMULITE® 1000).

Para realizar el ajuste de la curva de NGAL y de cromogranina A, se utilizó el programa CurveExpert 1.4 para calcular y generar la fórmula del ajuste a partir de los estándares. Con dicha fórmula y con las absorbancias observadas se calculó la concentración final de cada muestra.

Una vez obtenidos los resultados de los ELISA y los del test de cortisol se procedió a comparar la media de la nave que recibió el tratamiento con la media de la nave control utilizando la prueba t de Student para ver si las dos poblaciones independientes mostraron diferencias significativas. Los valores fuera del rango de los test fueron eliminados.

## **VI. RESULTADOS**

Los resultados acerca del número total de bacterias, levaduras y hongos (que pueden ser tanto patógenos como ambientales) totales en función del lugar de la toma de muestras y del medio en el que cultivaron obtenidos en el muestreo de aire en ambas naves de la granja están descritos en las Tablas 1 y 2.

**Tabla 1:** Recuento del número total de bacterias, levaduras y hongos en función de la zona de recolección y del tipo de nave en la que fueron recogidas.

<b>Etiquetas de fila</b>	<b>Cantidad control</b>	<b>Cantidad experimental</b>
Centro	35	17
Entrada derecha	58	33
Entrada izquierda	42	140
Salida derecha	58	72
Salida izquierda	52	54
<b>Total general</b>	<b>245</b>	<b>316</b>

Estas cantidades pertenecen únicamente a los patógenos aislados en los agares *Macconkey* y *Sabouraud* (figura 2), ya que el *Agar-sangre* presentó una concentración demasiado elevada en ambas naves como para poder realizar un recuento.

**Tabla 2:** Recuento del número total de bacterias, levaduras y hongos en función del medio de cultivo y del tipo de nave en que fueron recogidas.

<b>Etiquetas de fila</b>	<b>Suma de cantidad</b>
<b><i>Macconkey</i></b>	<b>69</b>
Nave control	18
Nave experimental	51
<b><i>Sabouraud</i></b>	<b>492</b>
Nave control	227
Nave experimental	265
<b>Total general</b>	<b>561</b>

La mayor contribución al total, sin tener en cuenta el *Agar-sangre*, se encuentra en las placas de *Sabouraud*. En ambos casos, el recuento fue mayor en la nave control.

Por último, en la tabla 3 se encuentran detallados los agentes identificados en ambas naves. Como se puede observar, no existen diferencias aparentes entre la nave control y la nave experimental.

**Tabla 3:** Bacterias, levaduras y hongos identificados con el VITEK en las naves control y experimental. En negrita aparecen aquellas especies que se encuentran en ambas naves y en color gris los hongos y levaduras.

	Nave control		Nave experimental
+	<i>Acinetobacter lwoffii</i>	+	<i>Alternaria spp</i>
+	<i>Aspergillus fumigatus</i>	+	<i>Aspergillus flavus</i>
+	<i>Citrobacter freundii</i>	++	<i>Candida rugosa</i>
++	<b><i>Cryptococcus albidus</i></b>	++	<b><i>Cryptococcus albidus</i></b>
+	<i>E. coli</i>	+	<i>Mucor spp</i>
+++	<b><i>Kocuria Rosea</i></b>	+++	<b><i>Kocuria Rosea</i></b>
+	<i>Pseudomonas luteola</i>	+	<i>Pseudomonas oryzihabitans</i>
+++	<b><i>Staphylococcus hyicus</i></b>	+++	<b><i>Staphylococcus hyicus</i></b>
+++	<b><i>Staphylococcus lentus</i></b>	+++	<b><i>Staphylococcus lentus</i></b>
+++	<i>Staphylococcus sciuri</i>		
+++	<b><i>Staphylococcus pseudintermedius</i></b>	+++	<b><i>Staphylococcus pseudintermedius</i></b>



**Figura 2:** ejemplo de una de las placas de medio *Sabouraud* de la nave control en la que crecieron hongos y levaduras y en una densidad que permitía el recuento. El semicírculo negrozco, en función

de su identificación morfológica, es probable que sea el hongo *Aspergillus* spp. **Fuente:** Elaboración propia.

Los resultados acerca de los marcadores de estrés (cortisol y cromogranina A) y de inflamación crónica (NGAL) obtenidos a partir de muestras salivares en ambas naves fueron los mencionados en la tabla 4.

**Tabla 4:** Media (nanogramos (ng) / mililitro (ml)) de los biomarcadores de estrés (cortisol y cromogranina A) y de inflamación (NGAL) obtenidos de las muestras de saliva tomadas en ambas naves.

Media	Nave control	Mayor/ menor	Nave experimental
Cortisol	9,72285714285714	<	11,6382142857143
Cromogranina A	291,980138583957	>	242,180773249364
NGAL	0,663354932207514	<	0,945759110509302

Como se puede observar en la tabla, la media de cortisol y de NGAL es mayor en la nave experimental que en la nave control, al contrario de lo que ocurre con la cromogranina A.

**Tabla 5:** Media esperada (ng/ml) de los biomarcadores de estrés en una explotación estándar de cebo.

Biomarcadores	Cortisol	Cromogranina A	NGAL
Media esperada	2.15	47.11	3.16

Como podemos observar en las Tablas 4 y 5, las concentraciones esperadas en una explotación estándar de cebo de cortisol y cromogranina A son menores a las obtenidas en las naves experimental y control. Respecto a la media de concentración de NGAL, se puede observar que la esperada es superior a la obtenida en ambas naves.

En base a los datos obtenidos de las diferentes moléculas se procedió a la realización de la prueba t de Student para ver si las medias de cada nave mostraban diferencias significativas, detalladas en la tabla 6

**Tabla 6:** Prueba t de Student para el cortisol, decisión de rechazo o aceptación de hipótesis para prueba t de Student en niveles de cortisol.

Parámetro	Valor	
Valor estadístico t	-1,01825434626907	
P(T≤t) (de dos colas)	0,313097639417508	
-Valor crítico de t (dos colas):	2,00487928818806	
Límite establecido	Mayor/menor	Valor obtenido
0.05	>	0,313097639417508
2,00487928818806	<	-1,01825434626907

El color rojo indica que no se cumplen las condiciones, por lo tanto, como el valor p(T≤t) (de dos colas) no es menor a 0.05 ni el valor crítico de t (dos colas) es menor al valor estadístico t, no se rechaza la hipótesis nula de que las medias son iguales, esto quiere decir que no hay evidencia suficiente para afirmar que existe una diferencia significativa en los niveles de cortisol en las dos poblaciones.

**Tabla 7:** Prueba t de Student para la cromogranina A, decisión de rechazo o aceptación de hipótesis para prueba t de Student en niveles de cromogranina A.

Parámetro	Valor
Valor estadístico t	1,57224880354512
P(T≤t) (de dos colas)	0,121332621441695
-Valor crítico de t (dos colas):	2,00171748414524

Límite establecido	Mayor/menor	Valor obtenido
0.05	>	0,121332621441695
2,00487928818806	<	1,57224880354512

El color rojo indica que no se cumplen las condiciones, por lo tanto, como el valor  $p(T \leq t)$  (de dos colas) no es menor a 0.05 ni el valor crítico de  $t$  (dos colas) es menor al valor estadístico  $t$ , no se rechaza la hipótesis nula de que las medias son iguales, esto quiere decir que no hay evidencia suficiente para afirmar que existe una diferencia significativa en los niveles de cromogranina A en las dos poblaciones.

**Tabla 8:** Prueba  $t$  de Student para la cromogranina A, decisión de rechazo o aceptación de hipótesis para prueba  $t$  de Student en niveles de cromogranina A.

Parámetro	Valor	
Valor estadístico $t$	-1,33860439554914	
$P(T \leq t)$ (de dos colas)	0,188450960541399	
-Valor crítico de $t$ (dos colas):	2,02269092003676	
Límite establecido	Mayor/menor	Valor obtenido
0.05	>	0,188450960541399
2,02269092003676	<	-1,33860439554914

El color rojo indica que no se cumplen las condiciones, por lo tanto, como el valor  $p(T \leq t)$  (de dos colas) no es menor a 0.05 ni el valor crítico de  $t$  (dos colas) es menor al valor estadístico  $t$ , no se rechaza la hipótesis nula de que las medias son iguales, esto quiere decir que no hay evidencia suficiente para afirmar que existe una diferencia significativa en los niveles de NGAL en las dos poblaciones.

## VII. DISCUSIÓN

Se ha demostrado previamente que los niveles elevados de amoníaco ambiental disminuyen el bienestar animal y contribuyen a la aparición de problemas respiratorios (Hamilton *et al.*, 1996). Una de las hipótesis planteadas en este trabajo es que la nave experimental, al tener menor nivel de amoníaco ambiental que en la nave control, presentaría una menor casuística de problemas respiratorios y, con ello, menor estrés en los animales y una menor carga microbiana ambiental de bacterias, hongos y levaduras. Sin embargo, el monitoreo de problemas respiratorios no evidenció diferencias entre ambas naves, no existiendo problema alguno en ninguna de las dos naves durante el periodo de estudio. Además, los resultados han mostrado un mayor número de microorganismos, tanto patógenos como ambientales, en la nave experimental (Tabla 1), aunque el estudio estadístico no evidenció diferencias significativas (Tabla 3). Aparentemente, en el periodo en el que se hizo el muestreo, los niveles de amoníaco entre ambas naves no fueron muy diferentes y generalmente bajos, en ambas naves fueron < 5 ppm, lo cual podría justificar la ausencia de problemas respiratorios y la ausencia de diferencias en los muestreos ambientales. En comparación con otros estudios, los niveles deben ser más elevados para asociarse con patología respiratoria (Hamilton *et al.*, 1996).

Las razones de estos hallazgos son difíciles de explicar. Teniendo en cuenta que los microorganismos ambientales pueden proceder de la actividad de los animales, durante la toma de muestras se apreció una cierta mayor actividad de los lechones en la nave experimental, pudiendo ser una posible causa. No obstante, la sensación de ambiente cargado fue semejante en ambas naves. Otras posibles causas podrían deberse a los efectos secundarios del tratamiento, promoviendo el crecimiento de ciertos microorganismos o reduciendo la competencia entre microorganismos, facilitando así la proliferación de algunos de ellos. No se puede descartar, tampoco, la posibilidad de contaminación cruzada entre naves, al encontrarse en la misma explotación, o la introducción accidental de microorganismos. Otra posible causa es que los animales de la granja experimental hayan podido sufrir un estrés inesperado favoreciendo una mayor diseminación de patógenos, aunque esto tampoco se evidenció en el estudio de biomarcadores de estrés. No obstante, el evento pudo haber ocurrido previamente.

Un hallazgo preocupante de este estudio es la gran cantidad de microorganismos ambientales, lo cual puede ser un problema no sólo para los animales sino también para los cuidadores. Esto se evidenció especialmente tras el uso del *Agar-sangre*, cuya concentración bacteriana fue tan elevada en ambas naves que impidió el recuento de los mismos (Tabla 2). Debido a esto, la cuantificación de

los microorganismos pertenece únicamente a aquellos aislados en los agares *Macconkey* y *Sabouraud*.

La identificación de los tipos de microorganismos en una carga bacteriana tan elevada es importante, ya que la patogenicidad de los mismos puede ser muy variable, siendo esto también uno de los objetivos específicos del estudio. Para ello, se utilizó el sistema VITEK (Tabla 3), que fue muy efectivo en la identificación de la mayoría de los patógenos. Sin embargo, hubo un pequeño porcentaje de estos que el VITEK no consiguió identificar. La explicación más plausible es que la base de datos de VITEK no incluya todas las posibles especies de microorganismos, no obstante, no deben descartarse problemas metodológicos, que incluyan muestras contaminadas, diluidas o en cantidades insuficientes o que las muestras hayan sido preparadas incorrectamente, por ejemplo, por errores en la incubación.

Respecto a las diferencias existentes en patógenos específicos, cabe comentar que en la nave experimental había presencia de más hongos que en la nave control. Estos son *Aspergillus flavus*, *Alternaria* spp. y *Mucor* spp., mientras que en la nave control predominaba *Aspergillus fumigatus*. Algunos hongos como *A. fumigatus* tienen la capacidad de actuar como oportunistas en el pulmón de los suidos (Schmidt *et al.*, 2020). Una posible causa de estas diferencias puede ser la presencia de mayores condiciones de humedad en la nave experimental, aunque para abordar esta diferencia sería necesario hacer un análisis detallado de las condiciones ambientales. En relación a las diferencias entre levaduras, en la nave experimental podemos encontrar a *Candida rugosa*, sin embargo, en la nave control no se ha aislado dicha levadura. En ambas naves encontramos a *C. albidus*. Hay un tipo más de levadura en la nave experimental lo cual también se encuentra fuera de lo esperado. La explicación podría ser la misma que la referida para los hongos.

En relación a las diferencias entre bacterias, cabe destacar que la nave experimental presentaba una menor diversidad bacteriana, donde podemos destacar a *Pseudomonas oryzihabitans*, la cual no está presente en la nave control. Entre las diferencias en la nave control encontramos bacterias como *Acinetobacter lwoffii*, *Citrobacter freundii*, *E. coli* y *Pseudomonas luteola*. Los microorganismos comunes en ambas naves (Tabla 3) son *Kocuria rosea*, *Cryptococcus albidus*, *Staphylococcus hyicus*, *Staphylococcus lentus* y *Staphylococcus pseudointermedius*. Estas diferencias entre ambas naves pueden ser debidas a la presencia de condiciones ambientales similares, como la temperatura. Otra opción es que se deban a las prácticas de manejo similares en ambas naves. También pueden deberse a una posible contaminación cruzada por parte de los trabajadores. Algunos de estos

microorganismos, como *St. hyicus*, son claramente patógenos para los lechones (Pickering *et al.*, 2021). Sin embargo, la ausencia de patologías específicas sugiere que la cantidad de los mismos no era suficiente para producir tales patologías o que el estado inmune de los cerdos era suficiente para controlar los efectos nocivos de estas bacterias.

En lo que respecta a los resultados acerca de los marcadores de estrés (cortisol y cromogranina A) y de inflamación crónica (NGAL) (Tabla 4) se puede observar que la media de cortisol y de NGAL es mayor en la nave experimental que en la nave control, al contrario de lo que ocurre con la cromogranina A. Teniendo en cuenta la hipótesis planteada, que al haber aplicado el tratamiento en la nave experimental disminuirían los niveles de estrés respecto a la nave control, se puede ver que los resultados muestran que las medias de NGAL y de cortisol no reflejan lo esperado, aunque sí la media de la cromogranina A. Algunas de las posibles causas pueden ser que al no haber sido efectivo el tratamiento frente a los niveles de microorganismos tampoco lo ha sido frente al estrés o que como el estrés es multifactorial pueden estar aumentados por causas de manejo. La mayor actividad de los cerdos observada en la nave experimental podría conducir a un mayor estrés de los animales, sin embargo, esto no se reflejó en la presencia de patología respiratoria.

Alguno de los valores de los diferentes marcadores no se ha podido utilizar para hacer la media porque el ELISA (para NGAL y Cromogranina A) y el analizador de inmunoensayo automático (frente al cortisol) no han detectado alguna de las muestras. No obstante, el número de muestras no detectadas no ha sido un número significativo. En estos casos, la causa más probable fue que dichas muestras se encontraran por debajo de los límites de detección, bien porque la calidad de la muestra no hubiese sido la esperada o porque no hubiera habido la suficiente cantidad de saliva.

Según un estudio llevado a cabo en el año 2000, la concentración media de cortisol esperada en saliva en cerdos de cebo en fase de crecimiento, sin haberlos sometido a ningún tipo de enriquecimiento ambiental adicional, es de 2,15 (Tabla 5) (de Jong *et al.*, 2000). Los valores medios de cortisol obtenidos en este estudio son de 9,7 (nave control) y 11,6 (nave experimental) (Tabla 4). Como se puede ver, son mayores de lo esperado en una granja de cebo con condiciones similares. Una posible causa puede ser que los cerdos hayan sido sometidos a un estrés adicional, por ejemplo, durante la toma de muestras.

En 2022 se llevó a cabo un estudio en el cual se evalúa cómo diferentes niveles de bioseguridad en granjas porcinas afectan los biomarcadores de estrés e inflamación en suero sanguíneo, así como los

rasgos de calidad de la carne de cerdo. Se muestreó la cromogranina A en cuatro granjas diferentes y las medias fueron 55,83 ng/ml, 47,11 ng/ml, 49,63 ng/ml y 45,95 ng/ml (Nastasijevic *et al.*, 2022). Como Nastasijevic *et al.*, no especifican exactamente las medidas de bioseguridad de cada granja no sabemos cuál se parece más a la granja utilizada en este estudio, por ello, se ha escogido de media el valor 47,11 ng/ml (Tabla 5). Los valores medios de cromogranina A obtenidos en la nave control y experimental fueron de 291,98 ng/ml y de 242,18 ng/ml respectivamente. Por lo tanto, los niveles obtenidos de este biomarcador son superiores a lo que se puede observar en la bibliografía. Una posible razón es que los autores del estudio realizaron la medición de cromogranina A en suero sanguíneo, al contrario que en este estudio. Tampoco se puede descartar que durante la toma de muestras los animales hayan sido sometidos a un estrés adicional que haya elevado los niveles del marcador.

La media de los valores de NGAL, tanto en la nave control como en la nave experimental, fue <1 (Tabla 4). Un estudio en el que se llevó a cabo un modelo experimental, en 2015, midió los niveles de NGAL en suero sanguíneo en cerdos sometidos a un paro cardíaco y a una posterior reanimación. Los valores obtenidos cuando los cerdos ya se habían recuperado fueron de una media de 3,16 ng/ml (Tabla 5) (Mei *et al.*, 2015). La diferencia entre la media obtenida en las naves experimental y tratamiento con la del estudio puede deberse a que en dicho estudio fueron tomadas en suero sanguíneo, sin embargo, en este estudio las muestras fueron obtenidas en saliva. Otra posible causa es que Mei *et al.*, realizaron un modelo experimental en el cual los animales sufrieron un paro cardíaco, lo cual no ha sido llevado a cabo en este estudio. Tampoco pueden descartarse otro tipo de explicaciones como que se haya utilizado una cantidad de muestra insuficiente, que haya habido un inadecuado manejo o almacenamiento de las muestras o que la presencia de otras sustancias en la saliva interfiera con el ensayo y afecten a la detección de NGAL.

Tras la realización de la prueba t de Student se han rechazado las tres hipótesis nulas, lo cual significa que no hay evidencia suficiente para afirmar que existe una diferencia significativa en los niveles de marcadores de estrés entre la nave experimental y la nave control (Tablas 6, 7 y 8). Una de las razones por las que ha podido fallar la hipótesis de que las diferencias de estrés serían significativamente menores en la nave tratamiento puede ser por la respuesta individual, ya que el estrés es multifactorial. Otro motivo es que puede haber sucedido por no haber tenido en cuenta ciertas variables como posibles tratamientos que hayan recibido los animales y que puedan haber interferido con la medición de las moléculas. No se puede descartar tampoco que se hayan cometido errores experimentales como por ejemplo en la recolección, manipulación o análisis de las muestras.

También podría deberse a la existencia de más marcadores de estrés que no han sido tenidos en cuenta en el estudio.

En conclusión, en este estudio no se han encontrado evidencias de que un descenso moderado de amoníaco ambiental en ciertas condiciones de manejo de explotaciones porcinas suponga un descenso del estrés en los animales, no condicionando tampoco la incidencia de la patología respiratoria. No obstante, este estudio adolece de ciertos puntos débiles, tales como la imposibilidad de una identificación bacteriana más completa, la determinación de más biomarcadores o de la coincidencia de una baja prevalencia de patología respiratoria en la nave control durante el periodo de muestreo.

## **VIII. CONCLUSIONES/CONCLUSIONS**

### **CONCLUSIONES:**

1. No se han observado problemas respiratorios significativos en ninguna de las naves durante todo el periodo de cebo, lo cual puede explicar los resultados obtenidos en los muestreos ambientales.
2. A pesar de las diferencias observadas en el recuento de microorganismos entre la nave control y experimental, no se encontraron diferencias en la carga microbiana ni en los niveles de los biomarcadores de estrés evaluados (cortisol, cromogranina A y NGAL).
3. La nave experimental mostró una mayor diversidad de microorganismos, incluyendo hongos y levaduras, comparada con la nave control, aunque la significancia estadística no fue alcanzada.
4. Los niveles medios de cortisol y NGAL fueron superiores en la nave experimental en comparación con la nave control, mientras que los niveles de cromogranina A fueron más altos en la nave control, aunque estas diferencias no fueron estadísticamente significativas.
5. No se encontró evidencia de que la reducción del amoníaco ambiental mejore el bienestar animal ni reduzca el estrés, contrarrestando la hipótesis inicial del estudio.

6. La metodología utilizada limitó la identificación exhaustiva de microorganismos y la medición completa de todos los biomarcadores pertinentes, afectando la interpretación de los resultados.
7. Este estudio subraya la complejidad del manejo ambiental en granjas porcinas y sugiere la necesidad de investigaciones adicionales con niveles más elevados de amoníaco para entender mejor los factores que influyen en el bienestar y la salud de los animales.
8. En resumen, los hallazgos de este estudio indican que la manipulación del amoníaco ambiental no garantiza mejoras significativas en la salud o el estrés de los cerdos en condiciones de explotación específicas, señalando la importancia de abordajes más integrales y estudios más detallados para comprender completamente estos efectos.

#### **CONCLUSIONS:**

1. No respiratory pathology was observed in any of the barns during the feedlot period and this could explain the environmental sampling results.
2. Despite the differences observed in the microorganism counts between the control and experimental barns, no differences were found in the microbial load or in the levels of stress biomarkers evaluated (cortisol, chromogranin A and NGAL).
3. The experimental barn showed a higher diversity of microorganisms, including fungi and yeasts, compared to the control barn, although statistical significance was not reached.
4. Mean cortisol and NGAL levels were higher in the experimental barn compared to the control barn, while chromogranin A levels were higher in the control barn, although these differences were not statistically significant.
5. No evidence was found that reducing environmental ammonia improves animal welfare or reduces stress, countering the initial hypothesis of the study.
6. The methodology used limited the comprehensive identification of microorganisms and the complete measurement of all relevant biomarkers, affecting the interpretation of the results.

7. This study underscores the complexity of environmental management on swine farms and suggests the need for additional research with higher levels of ammonia to better understand the factors that influence animal welfare and health.
8. In summary, the findings of this study indicate that manipulation of environmental ammonia does not guarantee significant improvements in pig health or stress under specific farm conditions, pointing to the importance of more comprehensive approaches and more detailed studies to fully understand these effects.

## **IX. VALORACIÓN PERSONAL**

Como estudiante, este estudio me ha proporcionado una visión detallada y multifacética de los desafíos y complejidades asociados con la gestión del ambiente en explotaciones porcinas. A través del análisis de datos microbiológicos y biomarcadores de estrés, he aprendido que las intervenciones destinadas a reducir el amoníaco ambiental pueden no tener el impacto esperado en el bienestar animal y la carga microbiana. Esta lección es crucial para mi desarrollo profesional, ya que subraya la necesidad de evaluar cuidadosamente los resultados de cualquier intervención en el manejo de la salud animal.

Además, este trabajo me ha proporcionado habilidades valiosas en la interpretación de datos científicos, la realización de pruebas estadísticas y la redacción de informes técnicos. Estas competencias son fundamentales para mi carrera en veterinaria, donde la capacidad de analizar críticamente la información y comunicar resultados claros es esencial para tomar decisiones informadas en la práctica clínica y en la gestión de explotaciones.

Quiero expresar mi agradecimiento a POR+COP por permitirme realizar este estudio en su granja y por facilitarme acceso a los recursos necesarios. También quiero agradecer a mis tutores por su guía experta y apoyo constante a lo largo de este proyecto.

En términos generales, este trabajo no sólo ha enriquecido mi comprensión de la microbiología ambiental y el estrés animal, sino que también ha reforzado mi compromiso con la investigación científica aplicada a la mejora de la salud y el bienestar de los animales en la industria porcina. Estoy entusiasmada por seguir contribuyendo al avance de la medicina veterinaria a través de estudios rigurosos y colaboraciones fructíferas en el futuro.

## X. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Accensi, F., Velarde, R., García-Morante, B., Gómez, Y., Llonch, P., Velarde, A., Segalés, J., Migura-García, L., Lizardo, R., Fraile, L., Baliellas, J., Font, P. y Vilalta, C. (2023). Retos y transformación en la producción porcina española en 2022. *Anuario Anaporc 2022*, 26-45. Recuperado de [https://repositori.irta.cat/bitstream/handle/20.500.12327/2592/Accensi\\_Retos\\_2023.pdf?sequence=1&isAllowed=y](https://repositori.irta.cat/bitstream/handle/20.500.12327/2592/Accensi_Retos_2023.pdf?sequence=1&isAllowed=y)

Bellmann-Weiler, R., Schroll, A. , Engl, S. , Nairz, M. , Talasz, H., Talasz, H., Seifert, M. y Weiss, G. (2013). Neutrophil gelatinase-associated lipocalin and interleukin-10 regulate intramacrophage *Chlamydia pneumoniae* replication by modulating intracellular iron homeostasis. *Immunobiology*, 218(9), 969-978. Recuperado de <https://doi.org/10.1016/j.imbio.2012.11.004>

Blanco-Fuertes, M., Correa-Fiz, F., López-Serrano, S., Sibila, M. y Aragon, V. (2022). Sow vaccination against virulent *Glaesserella parasuis* shapes the nasal microbiota of their offspring. *Scientific Reports*, 12(3357). Recuperado de [10.1038/s41598-022-07382-2](https://doi.org/10.1038/s41598-022-07382-2)

Boehme, S., Hartmann, E.K., Tripp, T., Thal, S.C., David, M., Abraham, D., Baumgardner, J.E., Markstaller, K. Y Klein, K.U. (2019). PO<sub>2</sub> oscillations induce lung injury and inflammation. *Critical Care*, 23(102). Recuperado de [10.1186/s13054-019-2401-1](https://doi.org/10.1186/s13054-019-2401-1)

Briva, A., Vadász, I., Lecuona, E., Welch, L.C., Chen, J., Dada, L.A., Trejo, H.E., Dumasius, V., Azzam, Z.S., Myrianthefs, P.M., Batlle, D., Gruenbaum, Y. y Sznajder, J.I. (2007). High CO<sub>2</sub> levels impair alveolar epithelial function independently of pH. *PLoS One*, 2(11), 1-12. Recuperado de <https://ccforum.biomedcentral.com/articles/10.1186/s13054-019-2401-1>

Brockmeier, S.L., Loving, C.L., Nicholson, T.L. y Palmer, M.V. (2007). Coinfection of pigs with porcine respiratory coronavirus and *Bordetella bronchiseptica*. *Veterinary Microbiology*, 128(1-2), 36-47. Recuperado de [10.1016/j.vetmic.2007.09.025](https://doi.org/10.1016/j.vetmic.2007.09.025)

Casal, N., Manteca, X., Escribano, D., Cerón, J.J. y Fàbrega, E. (2017). Effect of environmental enrichment and herbal compound supplementation on physiological stress indicators (chromogranin A, cortisol and tumour necrosis factor- $\alpha$ ) in growing pigs. *Animal*, 11(7), 1228-1236. Recuperado de [10.1017/S1751731116002561](https://doi.org/10.1017/S1751731116002561)

Couret, D., Jamin, A., Kuntz-Simon, G., Prunier, A. y Merlot, E. (2009). Maternal stress during late gestation has moderate but long-lasting effects on the immune system of the piglets. *Veterinary Immunology and Immunopathology*, 131(1-2), 17-24. Recuperado de [10.1016/j.vetimm.2009.03.003](https://doi.org/10.1016/j.vetimm.2009.03.003)

Cunningham, R.T., Pogue, K.M., Curry, W.J., Johnston, C.F., Sloan, J.M. y Buchanan, K.D. (1999). Immunostaining for vasostatin I distinguishes between ileal and lung carcinoids. *Pathological Society*, 187(3), 321-5. Recuperado de <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/10398086/>

D'Eath, R.B., Arnott, G., Turner, S.P., Jensen, T., Lahrmann, H.P., Busch, M.E., Niemi, J.K., Lawrence, A.B. y Sandøe, P. (2014). Injurious tail biting in pigs: how can it be controlled in existing systems without tail docking? *Animal*, 8(9), 1479-1497. Recuperado de [10.1017/S1751731114001359](https://doi.org/10.1017/S1751731114001359)

de Jong, I.C., Prella, I.T., van de Burgwal, J.A., Lambooji, E., Mechiel-Corte, S., Blokhuis, H.J. y Koolhaas, J.M. (2000). Effects of environmental enrichment on behavioral responses to novelty, learning, and memory, and the circadian rhythm in cortisol in growing pigs. *Physiology and Behaviour*, 68(4), 571-578. Recuperado de <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S0031938499002127>

Dold, C. y Holland, C.V. (2011). Ascaris and ascariasis. *Microbes and Infection*, 13(7), 632-637. Resuperado de [10.1016/j.micinf.2010.09.012](https://doi.org/10.1016/j.micinf.2010.09.012)

Donham, K.J. (1991). Association of environmental air contaminants with disease and productivity in swine. *American Journal of Veterinary Research*, 52(10), 1723-1730. Recuperado de <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/1767997/>

Duan, S.Y., Xing, C.Y., Zhang, B. y Chen, Y. (2015). Detection and evaluation of renal biomarkers in a swine model of acute myocardial infarction and reperfusion. *International Journal of Clinical and Experimental Pathology*, 8(7), 8336-8347. Recuperado de <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/26339403/>

Elbers, A.R., Tielen, M.J., Cromwijk, W.A. y Hunneman, W.A. (1992). Variation in seropositivity for some respiratory disease agents in finishing pigs: epidemiological studies on some health

parameters and farm and management conditions in the herds. *Veterinary Quarterly*, 14(1), 8-13. Recuperado de [10.1080/01652176.1992.9694318](https://doi.org/10.1080/01652176.1992.9694318)

Escribano, D. (2014). Avances en el conocimiento de la cromogranina A y otros biomarcadores salivares de estrés en cerdos. Tesis doctoral. Universidad de Murcia.

Escribano, D., Gutiérrez, A.M., Tecles, F. y Cerón, J.J. (2015). Changes in saliva biomarkers of stress and immunity in domestic pigs exposed to a psychosocial stressor. *Research in Veterinary Science*, 102, 38-44. Recuperado de [10.1016/j.rvsc.2015.07.013](https://doi.org/10.1016/j.rvsc.2015.07.013)

Fornhem, C., Lundberg, J.M. y Alving, K. (1995). Allergen-induced late-phase airways obstruction in the pig: the role of endogenous cortisol. *European Respiratory Journal*, 8(6), 928-937. Recuperado de <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/7589379/>

García-Morante, B., Segalés, J., Fraile, L., Pérez de Rozas, A., Maiti, H., Coll, T. y Sibila, M. (2015). Assessment of *Mycoplasma hyopneumoniae*-induced Pneumonia using Different Lung Lesion Scoring Systems: a Comparative Review. *Journal of Comparative Pathology*, 154(2-3), 125-134. Recuperado de [10.1016/j.jcpa.2015.11.003](https://doi.org/10.1016/j.jcpa.2015.11.003)

Garza-Moreno, L., Segalés, J., Pieters, M., Romagosa, A. y Sibila, M. (2018). Acclimation strategies in gilts to control *Mycoplasma hyopneumoniae* infection. *Veterinary Microbiology*, 219, 23-29. Recuperado de [10.1016/j.vetmic.2018.04.005](https://doi.org/10.1016/j.vetmic.2018.04.005)

Gutiérrez Hernández, R., Mendoza Falcón, Y.J. y Borges Magaña, R.O. (2013). Rinitis Atrófica del Cerdo. *Revista Electrónica de Veterinaria*, 14(4), 1-3. Recuperado de <https://www.redalyc.org/pdf/636/63626164002.pdf>

Gutiérrez, M. y Alonso, R. (2004). Presentación de enfermedades respiratorias en cerdos de la categoría preceba. *Revista Computadorizada de Producción Porcina*, 11(1), 126-128. Recuperado de <https://agris.fao.org/search/en/providers/122589/records/64725154e17b74d2224fce26>

Haas, B. y Grenier, D. (2018). Understanding the virulence of *Streptococcus suis*: A veterinary, medical, and economic challenge. *Médecine et Maladies Infectieuses*, 48(3), 159-166. Rescuperado de [10.1016/j.medmal.2017.10.001](https://doi.org/10.1016/j.medmal.2017.10.001)

Hamilton, T.D., Roe, J.M., Hayes, C.M., Jones, P., Pearson, G.R. y Webster, A.J. (1999). Contributory and exacerbating roles of gaseous ammonia and organic dust in the etiology of atrophic rhinitis. *Clinical Diagnostic Laboratory Immunology*, 6(2), 199-203. Recuperado de [10.1128/CDLI.6.2.199-203.1999](https://doi.org/10.1128/CDLI.6.2.199-203.1999)

Hamilton, T.D., Roe, J.M. y Webster, A.J. (1996). Synergistic role of gaseous ammonia in etiology of Pasteurella multocida-induced atrophic rhinitis in swine. *Journal of Clinical Microbiology*, 34(9), 2185-2190. Recuperado de [10.1128/jcm.34.9.2185-2190.1996](https://doi.org/10.1128/jcm.34.9.2185-2190.1996)

Hlebowicz, M., Jakubowski, P. y Smiatacz, T. (2019). *Streptococcus suis* Meningitis: Epidemiology, Clinical Presentation and Treatment. *Vector Borne and Zoonotic Diseases*, 19(8), 557-562. Recuperado de [10.1089/vbz.2018.2399](https://doi.org/10.1089/vbz.2018.2399)

Horiguchi, Y. (2012). Swine atrophic rhinitis caused by pasteurella multocida toxin and bordetella dermonecrotic toxin. *Current Topics in Microbiology and Immunology*, 361, 113-129. Recuperado de [10.1007/82\\_2012\\_206](https://doi.org/10.1007/82_2012_206)

Huang, Y., Liu, Z., Liu, W., Yin, C., Ci, L., Zhao, R. y Yang, X. (2017). Short communication: Salivary haptoglobin and chromogranin A as non-invasive markers during restraint stress in pigs. *Research in Veterinary Science*, 114, 27-30. Recuperado de [10.1016/j.rvsc.2017.02.023](https://doi.org/10.1016/j.rvsc.2017.02.023)

Hutchinson, E.C. (2018). Influenza Virus. *Trends in Microbiology*, 26(9), 809-810. Recuperado de [10.1016/j.tim.2018.05.013](https://doi.org/10.1016/j.tim.2018.05.013)

Influenza - swine diseases manual - pig333, pig to pork community, \$this->url\_servidor. Available at: [https://www.pig333.com/pig-diseases/influenza\\_118](https://www.pig333.com/pig-diseases/influenza_118) (Accessed: 01 July 2024).

Jara, M., Rasmussen, D.A., Corzo, C.A. y Machado, G. (2021). Porcine reproductive and respiratory syndrome virus dissemination across pig production systems in the United States. *Transboundary and Emerging Diseases*, 68(2), 667-683. Recuperado de [10.1111/tbed.13728](https://doi.org/10.1111/tbed.13728)

Joachim, A. y Dauschies, A. (2000). Endoparasites in swine in different age groups and management systems. *Berliner and Munchener Tierarztliche Wochenschrift*, 113(4), 129-133. Recuperado de <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/10816911/>

Kranendonk, G., Hopster, H., Fillerup, M., Ekkel, E.D., Mulder, E.J., Wiegant, V.M. y Taverne, M.A. (2006). Lower birth weight and attenuated adrenocortical response to ACTH in offspring from sows that orally received cortisol during gestation. *Domestic Animal Endocrinology*, 30(3), 218-238. Recuperado de [10.1016/j.domaniend.2005.07.001](https://doi.org/10.1016/j.domaniend.2005.07.001)

Laude, H., Van Reeth, K. y Pensaert, M. (1993). Porcine respiratory coronavirus: molecular features and virus-host interactions. *Veterinary Research*, 24(2), 125-50. Recuperado de <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/8393722/>

Leal Zimmer, F.M.A., Paes, J.A., Zaha, A. y Ferreira, H.B. (2020). Pathogenicity & virulence of *Mycoplasma hyopneumoniae*. *Virulence*, 11(1), 1600-1622. Recuperado de [10.1080/21505594.2020.1842659](https://doi.org/10.1080/21505594.2020.1842659)

Li, D., Shen, L., Zhang, D., Wang, X., Wang, Q., Qin, W., Gao, Y. y Li, X. (2023). Ammonia-induced oxidative stress triggered proinflammatory response and apoptosis in pig lungs. *Journal of Environmental Sciences*, 126, 683-696. Recuperado de [10.1016/j.jes.2022.05.005](https://doi.org/10.1016/j.jes.2022.05.005)

Liu, S., Li, W., Wang, Y., Gu, C., Liu, X., Charreyre, C., Fanático, S. y Él, Q. (2017). Coinfection with *Haemophilus parasuis* serovar 4 increases the virulence of porcine circovirus type 2 in piglets. *Virology Journal*, 14(1), 1–9. Recuperado de [10.1186/s12985-017-0890-6](https://doi.org/10.1186/s12985-017-0890-6)

Macedo, N., Rovira, A. y Torremorell, M. (2015). *Haemophilus parasuis*: infection, immunity and enrofloxacin. *Veterinary Research*, 46(128), 1–6. Recuperado de [10.1186/s13567-015-0263-3](https://doi.org/10.1186/s13567-015-0263-3)

Madson, D.M. y Opriessnig, T. (2011). Effect of porcine circovirus type 2 (PCV2) infection on reproduction: disease, vertical transmission, diagnostics and vaccination. *Animal Health Research Reviews*, 12(1), 47-65. Recuperado de [10.1017/S1466252311000053](https://doi.org/10.1017/S1466252311000053)

Mahmmod, Y.S., Correa-Fiz, F. y Aragon, V. (2020). Variations in association of nasal microbiota with virulent and non-virulent strains of *Glaesserella (Haemophilus) parasuis* in weaning piglets. *Veterinary Research*, 51(1). Recuperado de [10.1186/s13567-020-0738-8](https://doi.org/10.1186/s13567-020-0738-8)

Ma, W. (2020). Swine influenza virus: Current status and challenge. *Virus Research*, 288. Recuperado de [10.1016/j.virusres.2020.198118](https://doi.org/10.1016/j.virusres.2020.198118)

McClendon, C.J., Gerald, C.L. y Waterman, J.T. (2015). Farm animal models of organic dust exposure and toxicity: insights and implications for respiratory health. *Current Opinion in Allergy and Clinical Immunology*, 15(2), 137-144. Recuperado de [10.1097/ACI.0000000000000143](https://doi.org/10.1097/ACI.0000000000000143)

Mei, X., Hang, C.C., Wang, S., Li, C.S. y Yu, Z.X. (2015). Renal Doppler and Novel Biomarkers to Assess Acute Kidney Injury in a Swine Model of Ventricular Fibrillation Cardiac Arrest. *Chinese Medical Journal*, 128(22), 3069-3075. Recuperado de [10.4103/0366-6999.169094](https://doi.org/10.4103/0366-6999.169094)

Meng, X.J. (2013). Porcine circovirus type 2 (PCV2): pathogenesis and interaction with the immune system. *Annual Review of Animal Biosciences*, 1, 43-64. Recuperado de [10.1146/annurev-animal-031412-103720](https://doi.org/10.1146/annurev-animal-031412-103720)

Meulenbergh, J.J. (2000). PRRSV, the virus. *Veterinary Research*, 31(1), 11-21. Recuperado de <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/10726635/>

Morgan, L. y Raz, T. (2019). Providing Meaningful Environmental Enrichment and Measuring Saliva Cortisol in Pigs Housed on Slatted Flooring. *Journal of Visualized Experiments*, 151. Recuperado de [10.3791/60070](https://doi.org/10.3791/60070)

Nastasijevic, I., Glisic, M., Milijasevic, M., Jankovic, S., Mitrovic, R., Milijasevic, J.B. y Boskovic-Cabrol, M. (2022). Biosecurity and Lairage Time versus Pork Meat Quality Traits in a Farm-Abattoir Continuum. *Animals (Basel)*, 12(23). Recuperado de [10.3390/ani12233382](https://doi.org/10.3390/ani12233382)

Obradovic, M.R., Segura, M., Segalés, J. y Gottschalk, M. (2021). Review of the speculative role of co-infections in *Streptococcus suis*-associated diseases in pigs. *Veterinary Research*, 52(1). Recuperado de [10.1186/s13567-021-00918-w](https://doi.org/10.1186/s13567-021-00918-w)

Oliveira, S. y Pijoan, C. (2004). *Haemophilus parasuis*: new trends on diagnosis, epidemiology and control. *Veterinary Microbiology*, 99(1), 1-12. Recuperado de [10.1016/j.vetmic.2003.12.001](https://doi.org/10.1016/j.vetmic.2003.12.001)

Olvera, A., Segalés, J. y Aragón, V. (2006). Update on the diagnosis of *Haemophilus parasuis* infection in pigs and novel genotyping methods. *The Veterinary Journal*, 174(3), 522-529. Recuperado de [10.1016/j.tvjl.2006.10.017](https://doi.org/10.1016/j.tvjl.2006.10.017)

Opriessnig, T., Giménez-Lirola, L.G. y Halbur, P.G. (2011). Polymicrobial respiratory disease in pigs. *Animal Health Research Reviews*, 12(2), 133-148. Recuperado de [10.1017/S1466252311000120](https://doi.org/10.1017/S1466252311000120)

Panyasing, Y., Goodell, C., Kittawornrat, A., Wang, C., Levis, I., Desfresne, L., Rauh, R., Gauger, P.C., Zhang, J., Lin, X., Azeem, S., Ghorbani-Nezami, S., Yoon, K.J. y Zimmerman, J. (2014). Influenza A Virus Surveillance Based on Pre-Weaning Piglet Oral Fluid Samples. *Transboundary and Emerging Diseases*, 63(5), 328-338. Recuperado de [10.1111/tbed.12307](https://doi.org/10.1111/tbed.12307)

Papatsiros, V.G., Stylianaki, I., Tsokana, C.N., Papakonstantinou, G., Christophorou, M., Papaioannou, N. y Athanasiou, L.V. (2023). Histopathological lesions of *Actinobacillus pleuropneumoniae* serotype 8 in infected pigs. *Veterinary Research Forum*, 14(7), 401-404. Recuperado de [10.30466/vrf.2022.556971.3539](https://doi.org/10.30466/vrf.2022.556971.3539)

Pedersen, K.B. y Barfod, K. (1981). The aetiological significance of *Bordetella bronchiseptica* and *Pasteurella multocida* in atrophic rhinitis of swine. *Nordish Veterinarian Medicine*, 33(12), 513-522. Recuperado de <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/7335484/>

Pickering, A.C., Yebra, G., Gong, X., Goncheva, M.I., Wee, B.A., MacFadyen, A.C., Muehlbauer, L.F., Alves, J., Cartwright, R.A., Paterson, G.K. y Fitzgerald, J.R. (2021). Evolutionary and Functional Analysis of Coagulase Positivity among the Staphylococci. *mSphere*, 6(4). Recuperado de [10.1128/mSphere.00381-21](https://doi.org/10.1128/mSphere.00381-21)

Prims, S., Vanden Hole, C., Van Cruchten, S., Van Ginneken, C., Van Ostade, X y Casteleyn, C. (2019). Hair or salivary cortisol analysis to identify chronic stress in piglets?. *The Veterinary Journal*, 252. Recuperado de [10.1016/j.tvjl.2019.105357](https://doi.org/10.1016/j.tvjl.2019.105357)

Ruedas-Torres, I., Rodríguez-Gómez, I.M., Sánchez-Carvajal, J.M., Larenas-Muñoz, F., Pallarés, F.J., Carrasco, L. y Gómez-Laguna, J. (2021). The jigsaw of PRRSV virulence. *Veterinary Microbiology*, 260. Recuperado de [10.1016/j.vetmic.2021.109168](https://doi.org/10.1016/j.vetmic.2021.109168)

Saade, G., Deblanc, C., Bougon, J., Marois-Créhan, C., Fablet, C., Auray, G., Belloc, C., Leblanc-Maridor, M., Gagnon, C.A., Zhu, J., Gottschalk, M., Summerfield, A., Simon, G., Bertho, N. y Meurens, F. (2020). Coinfections and their molecular consequences in the porcine respiratory tract. *Veterinary Research*, 51(1), 1–19. Recuperado de [10.1186/s13567-020-00807-8](https://doi.org/10.1186/s13567-020-00807-8)

Sanches, E.M., Pescador, C., Rozza, D., Spanamberg, A., Borba, M.R., Ravazzolo, A.P., Driemeier, D., Guillot, J. y Ferreiro, L. (2007). Detection of Pneumocystis spp. in lung samples from pigs in Brazil. *Medical Microbiology*, 45(5), 395-399. Recuperado de [10.1080/13693780701385876](https://doi.org/10.1080/13693780701385876)

Santana, C.M., Gauger, P., Vetger, A., Magstadt, D., Kim, D.S., Shrestha, D., Charavaryamath, C. Y Rumbelha, W.K. (2021). Ambient hydrogen sulfide exposure increases the severity of influenza A virus infection in swine. *Archives of Environmental & Occupational Health*, 76(8), 526-538. Recuperado de [10.1080/19338244.2021.1896986](https://doi.org/10.1080/19338244.2021.1896986)

Sassu, E.L., Bossé, J.T., Tobias, T.J., Gottschalk, M., Langford, P.R. y Hennig-Pauka, I. (2018). Update on Actinobacillus pleuropneumoniae-knowledge, gaps and challenges. *Transboundary and Emerging Diseases*, 65, 72-90. Recuperado de [10.1111/tbed.12739](https://doi.org/10.1111/tbed.12739)

Schmidt, S., Ebner, F., Rosen, K., Kniemeyer, O., Brakhage, A.A., Löffler, J., Seif, M., Springer, J., Schlosser, J., Scharek-Tedin, L., Scheffold, A., Bacher, P., Kühl, A.A., Rösler, U. y Hartmann, S. (2020). The domestic pig as human-relevant large animal model to study adaptive antifungal immune responses against airborne Aspergillus fumigatus. *European Journal of Immunology*, 50(11), 1712-1728. Recuperado de [10.1002/eji.201948524](https://doi.org/10.1002/eji.201948524)

Schneberger, D., Cloonan, D., DeVasure, J.M., Bailey, K.L., Romberger, D.J. Y Wyatt, T.A. (2015). Effect of elevated carbon dioxide on bronchial epithelial innate immune receptor response to organic dust from swine confinement barns. *International immunopharmacology*, 27(1), 76-84. Recuperado de [10.1016/j.intimp.2015.04.031](https://doi.org/10.1016/j.intimp.2015.04.031)

Segalés, J. (2012). Porcine circovirus type 2 (PCV2) infections: clinical signs, pathology and laboratory diagnosis. *Virus Research*, 164(1-2), 10-9. Recuperado de [10.1016/j.virusres.2011.10.007](https://doi.org/10.1016/j.virusres.2011.10.007)

Sodha, N.R. y Sellke, F.W. (2015). Attenuation of inflammatory responses by hydrogen sulfide (H<sub>2</sub>S) in ischemia/reperfusion injury. *Methods in Enzymology*, 555, 127-144. Recuperado de [10.1016/bs.mie.2014.11.041](https://doi.org/10.1016/bs.mie.2014.11.041)

Sonoda, L.T., Fels, M., Oczak, M., Vranken, E., Ismayilova, G., Guarino, M., Viazzi, S., Bahr, C., Berckmans, D. y Hartung, J. (2013). Tail biting in pigs--causes and management intervention strategies to reduce the behavioural disorder. A review. *Berliner Münchener Tierärztliche Wochenschrift*, 126(3-4), 104-112. Recuperado de <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/23540192/>

Szalka, A. y Prinz, G. (1991). Opportunista szisztémás mycosisok [Opportunistic systemic mycoses]. *Orvosi Hetilap* 132(34), 1851-1856. Recuperado de <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/1881662/>

Szeredi, L., Dán, A., Solymosi, N., Cságola, A. y Tuboly, T. (2012). Association of porcine circovirus type 2 with vascular lesions in porcine pneumonia. *Veterinary Pathology*, 49(2), 264-270. Recuperado de [10.1177/0300985811406888](https://doi.org/10.1177/0300985811406888)

This One vs That One. (s.f.). Gram-positivos vs Gram-negativos [Fotografía]. Recuperado de <https://thisonevsthatone.com/gram-positive-vs-gram-negative/>

Turlewicz-Podbielska, H. y Pomorska-Mól, M. (2021). Porcine Coronaviruses: Overview of the State of the Art. *Virologica Sinica*, 36(5), 833-851. Recuperado de [10.1007/s12250-021-00364-0](https://doi.org/10.1007/s12250-021-00364-0)

Urbain, B., Mast, J., Beerens, D., N'Guyen, T.Q., Goddeeris, B., Ansay, M. y Gustin, P. (1999). Effects of inhalation of dust and endotoxin on respiratory tracts of pigs. *American Journal of Veterinary Research*, 60(9), 1055-1060. Recuperado de <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/10490071/>

van Dixhoorn, I.D., Reimert, I., Middelkoop, J., Bolhuis, J.E., Wisselink, H.J., Groot Koerkamp, P.W., Kemp, B. y Stockhofe-Zurwieden, N. (2016). Enriched Housing Reduces Disease Susceptibility to Co-Infection with Porcine Reproductive and Respiratory Virus (PRRSV) and *Actinobacillus pleuropneumoniae* (A. pleuropneumoniae) in Young Pigs. *PLoS ONE*, 11(9), 1-24. Recuperado de [10.1371/journal.pone.0161832](https://doi.org/10.1371/journal.pone.0161832)

Villalvilla, E. (2024, 7 de febrero). Confirmado un caso de gripe porcina en un trabajador de una granja de Lleida, *infobae*. Recuperado de <https://www.infobae.com/espana/2024/02/07/confirmado-un-caso-de-gripe-porcina-en-un-trabajador-de-una-granja-de-lleida/#:~:text=El%20paciente%20ya%20se%20ha%20recuperado%20completamente%20y,una%20transmisi%C3%B3n%20de%20animal%20a%20humano%20poco%20habitual.>

Williamson, S.M., Tucker, A.W., McCrone, I.S., Bidewell, C.A., Brons, N., Habernoll, H., Essen, S.C., Brown, I.H., C.O.S.I. y Wood, J.L. (2012). Descriptive clinical and epidemiological characteristics of influenza A H1N1 2009 virus infections in pigs in England. *Veterinary Record*, 171(11), 271-271. Recuperado de [10.1136/vr.100673](https://doi.org/10.1136/vr.100673)

Xiao, X., Yeoh, B.S. y Vijay-Kumar, M. (2017). Lipocalin 2: An Emerging Player in Iron Homeostasis and Inflammation. *Annual Review of Nutrition*, 37, 103-130. Recuperado de [10.1146/annurev-nutr-071816-064559](https://doi.org/10.1146/annurev-nutr-071816-064559)