



Facultad de Veterinaria
Universidad Zaragoza



Trabajo Fin de Grado en

Veterinaria

Detección y caracterización de bacterias en el genital de la cerda.

Detection and characterization of bacteria in sow genitalia.

Autor/es

Lucía Arza García

Director/es

Raúl Carlos Mainar Jaime
José Ignacio Martí Jimenez

Facultad de Veterinaria

2025

Índice

1. Resumen	2
1.1. Summary	2
2. Introducción	4
2.1. Microbiota uterina	4
2.2. Antibióticos y resistencias	5
2.3. La resistencia como problema de salud pública y veterinaria	6
2.4. Transmisión vertical de microbiota y genes de resistencia	7
2.5. Metagenómica	8
3. Justificación y objetivos	10
4. Material y métodos	11
4.1. Selección de animales y recogida de muestras uterinas	11
4.2. Extracción del ADN	12
4.3. Secuenciación <i>shotgun</i> del metagenoma completo y análisis de las secuencias	12
4.4. Detección de determinantes de resistencia a los antimicrobianos (resistoma)	13
5. Resultados	16
5.1. Calidad de datos de secuenciación	16
5.2. Análisis taxonómico	17
5.2.1. Diversidad alfa.....	17
5.2.2. Diversidad beta	19
5.2.3. Comparación de abundancia diferencial	21
5.3. Análisis del resistoma	22
5.3.1. Diversidad alfa.....	23
5.3.2. Diversidad beta	24
6. Discusión	27
7. Conclusiones	30
7.1. Conclusions	30
8. Valoración personal	31
9. Bibliografía	32

1. Resumen

El descubrimiento y uso de antibióticos supuso uno de los mayores avances de la medicina y de la producción animal. Sin embargo, su empleo intensivo ha favorecido la aparición y propagación mundial de la resistencia a los antimicrobianos (RAM), lo que constituye una amenaza creciente para la salud pública, animal y medioambiental. En el ámbito porcino, la reproducción y, en particular, el uso de antibióticos en la inseminación artificial, suponen una fuente de presión selectiva que podría condicionar la microbiota uterina y su resistoma.

En este trabajo se caracterizó la microbiota bacteriana y el resistoma uterino de cerdas nulíparas y múltiparas mediante técnicas de metagenómica, con el fin de evaluar posibles diferencias asociadas al estado reproductivo. Se detectaron comunidades bacterianas diversas en todos los úteros analizados, lo que confirma que este no es un entorno estéril. Aunque no se observaron diferencias significativas en los índices de diversidad alfa, sí se detectó una separación significativa en la composición microbiana entre nulíparas y múltiparas. En cuanto al resistoma, se identificaron determinantes de resistencia a antimicrobianos en la mayoría de las muestras, con una mayor riqueza en las cerdas múltiparas, posiblemente asociada a una mayor exposición acumulada a antimicrobianos durante su vida productiva.

Estos hallazgos sugieren que el útero porcino podría funcionar como reservorio de resistencias y, así, podría representar una posible vía de transmisión vertical de resistencias hacia la descendencia. La edad y/o el número de partos podrían influir en la estructura de la microbiota uterina y en la diversidad del resistoma. El conocimiento generado puede contribuir a orientar estrategias de uso más responsable de antibióticos en porcino dentro del enfoque One Health.

1.1. Summary

The discovery and use of antibiotics was one of the greatest advances in medicine and animal production. However, their intensive use has led to the emergence and global spread of antimicrobial resistance (AMR), which poses a growing threat to public, animal, and environmental health. In the pig sector, reproduction and, in particular, the use of antibiotics in artificial insemination, are a source of selective pressure that could influence the uterine microbiota and its resistome.

In this study, the bacterial microbiota and uterine resistome of nulliparous and multiparous sows were characterized using metagenomic techniques in order to evaluate possible differences associated with reproductive status. Diverse bacterial communities were detected in all uteri analyzed, confirming that this is not a sterile environment. Although no significant differences in alpha diversity indices were observed, a significant separation in microbial composition was detected between nulliparous and multiparous sows. Regarding the resistome, antimicrobial resistance determinants were identified in most samples, with greater richness in multiparous sows, possibly associated with greater cumulative exposure to antimicrobials during their productive life.

These findings suggest that the porcine uterus could function as a reservoir of resistance and thus represent a possible route of vertical transmission of resistance to offspring. Age and/or number of births could influence the structure of the uterine microbiota and the diversity of the resistome. The knowledge generated may contribute to guiding strategies for more responsible use of antibiotics in pigs within the One Health approach.

2. Introducción

2.1. Microbiota uterina

Tradicionalmente, el útero se consideraba un entorno estéril, donde la presencia de bacterias se asociaba exclusivamente a infecciones (Holyoak, 2021). Sin embargo, en la última década, el desarrollo de técnicas moleculares de secuenciación, como la metagenómica, ha permitido demostrar que incluso en ausencia de enfermedad, en animales sanos, existe en el útero una microbiota estable, diversa y activa (Gil-Miranda et al., 2024).

Estudios en ganado bovino y equino han descrito la presencia de distintos géneros bacterianos en el útero en ausencia de signos clínicos de infección, lo que sugiere un posible rol simbiótico o inmunomodulador. En estudios con equinos, por ejemplo, se han identificado géneros bacterianos como *Lactobacillus*, *Streptococcus* y *Bacteroides* en hembras clínicamente sanas, lo que apoya la existencia de una microbiota residente (Gil-Miranda et al., 2024; Poudel et al., 2024).

En bovino, se ha documentado que la composición microbiana uterina varía entre animales sanos y aquellos con procesos inflamatorios como la metritis. Las vacas afectadas presentaban una menor diversidad bacteriana y un perfil metabólico alterado, lo que indica una relación estrecha entre la microbiota y la fisiopatología uterina (Casaro et al., 2024).

A nivel funcional, se ha propuesto que estas comunidades bacterianas podrían participar en la regulación inmunológica local, favoreciendo un equilibrio que permita la tolerancia frente a microorganismos comensales y la defensa frente a patógenos (Galvão et al., 2019).

Aunque en el caso del porcino los estudios sobre la microbiota uterina son limitados, sí se ha caracterizado el microbioma del semen y de la vagina. Se ha observado que la microbiota seminal y vaginal es diversa y varía en función del estado reproductivo, lo que podría influir potencialmente en el tracto reproductor de la cerda tras la inseminación, especialmente considerando el uso generalizado de esta técnica en la especie porcina (Kiefer et al., 2021). Además, se ha sugerido que la composición microbiana del aparato reproductor puede verse influida por el número de partos, con diferencias entre hembras jóvenes y multíparas que podrían tener implicaciones sobre la salud reproductiva y el equilibrio del ecosistema uterino (Ngo et al., 2025).

Estos hallazgos permiten replantear el concepto de esterilidad uterina y considerar este entorno como un ecosistema funcional. Así, su estudio resulta clave para comprender los factores que condicionan la salud uterina y su posible papel en la transmisión de microorganismos a la descendencia.

2.2. Antibióticos y resistencias

Los antibióticos son un amplio grupo de sustancias antimicrobianas derivadas de bacterias, de sustancias naturales o de productos sintéticos, capaces de eliminar o inhibir el crecimiento de microorganismos. Según su rango de acción pueden clasificarse en antibióticos de amplio o reducido espectro (Gimeno y Ortega, 2005). Por su acción también se pueden clasificar como antibióticos bactericidas, que eliminan directamente a las bacterias, y bacteriostáticos, que inhibe su crecimiento permitiendo al sistema inmune eliminarlas (Gimeno y Ortega, 2005).

En el ámbito veterinario, los antibióticos se utilizan con distintos fines, desde la quimioterapia hasta la quimioprofilaxis. En algunos casos también se han empleado como aditivos para mejorar el rendimiento productivo, aunque este uso ha sido prohibido en la Unión Europea (Tsekouras et al., 2025). Este grupo de compuestos representa una de las herramientas terapéuticas más eficaces en la medicina, si bien su eficiencia se está viendo comprometida por el creciente número de patógenos resistentes a antibióticos (Lin et al., 2015).

La resistencia antimicrobiana es la capacidad que presentan algunas bacterias para sobrevivir a la acción de un antibiótico (Perovic et al., 2018). Este proceso puede ser natural y formar parte de las características propias del microorganismo, o adquirido mediante distintos mecanismos genéticos que pueden verse inducidos por la exposición prolongada a antimicrobianos (Asenjo et al., 2021), y que les permiten sobrevivir, adaptarse o incluso neutralizar el efecto del antibiótico (Lin et al., 2015; Munita y Arias, 2016). Entre los principales mecanismos de resistencia se describen los siguientes (Lin et al., 2015; Munita y Arias, 2016):

- Inactivación o modificación del antibiótico: mediante la producción de enzimas como las beta-lactamasas que destruyen el antibiótico antes de que este actúe;
- Expulsión activa mediante bombas de flujo: las bacterias expulsan el antibiótico fuera de la célula (fuera del interior celular) antes de que alcance su diana.
- Modificación del sitio diana: cambios en las proteínas que sirven de blanco impiden que el antibiótico se una y actúe correctamente.

- Reducción de la permeabilidad de la membrana: alimitando la entrada del antibiótico, reduciendo su concentración intracelular, especialmente en Gram negativas.

Todos estos procesos están codificados por genes propios de la bacteria o adquiridos a partir de otros microorganismos mediante transferencia horizontal, a través de fenómenos de conjugación, transformación o transducción (Munita y Arias, 2016), o también pueden ser consecuencia de fenómenos de mutación genética tras exposición de las bacterias a los antibióticos (Martínez y Baquero, 2014).

2.3. La resistencia como problema de salud pública y veterinaria

La resistencia a los antimicrobianos se ha consolidado como una de las principales amenazas para la salud pública global, reconocida por organismos internacionales como la Organización Mundial de la Salud (WHO, 2015) y la Organización Mundial de Sanidad Animal (WOAH, 2024). Entre los factores clave que contribuyen a dicha resistencia destacan el uso excesivo e inadecuado de antibióticos. Esto se observa tanto en medicina humana como en veterinaria (Ventola, 2015; Byrne et al., 2019). Su progresiva expansión compromete la eficacia de tratamientos clínicos esenciales, aumentando la morbilidad, la mortalidad y los costes sanitarios. Esta situación ha llevado a organismos internacionales a considerarla una emergencia prioritaria, comparable a las enfermedades crónicas más prevalentes. De hecho, se estima que, si no se adoptan medidas urgentes, las infecciones causadas por bacterias multirresistentes podrían causar hasta 10 millones de muertes anuales en 2050, superando incluso al cáncer como causa de mortalidad mundial (O'Neill, 2016).

En el ámbito veterinario, la resistencia antimicrobiana afecta gravemente a la eficacia terapéutica y al bienestar animal. Las infecciones por patógenos resistentes dificultan los tratamientos, prolongan las enfermedades y generan un uso más intensivo de recursos sanitarios. Además, en animales de producción, estas resistencias suponen un problema añadido al comprometer la rentabilidad de las explotaciones, especialmente cuando se requiere el uso frecuente de antimicrobianos para prevenir o tratar brotes infecciosos (Falcón et al., 2010; Ventola, 2015; Mesonero, 2020).

El uso de antibióticos en ganadería, particularmente en especies como el cerdo, se ha relacionado con la selección y propagación de cepas resistentes. Esta práctica, aunque regulada, continúa siendo una vía de presión selectiva, especialmente cuando los antimicrobianos se emplean de forma profiláctica o como aditivos tecnológicos, aumentando la abundancia de

genes de resistencia (GRA) (Van Gompel et al., 2019).

En la práctica veterinaria, la reproducción animal es una de las áreas con mayor uso de los antibióticos con fines no terapéuticos, especialmente en el sector porcino, donde la inseminación artificial (IA) es la técnica reproductiva más utilizada debido a sus numerosas ventajas, entre las que destacan la mejora genética, la eliminación de semen de baja calidad y una mayor higiene durante el proceso (Gonçalves, 2012). Para evitar el desarrollo bacteriano durante el almacenamiento de las dosis seminales, se requiere la adición de antibióticos en los diluyentes, fundamentalmente porque la temperatura de conservación para el semen porcino es cercana a los 17 °C (Luther et al., 2021; Luther et al., 2023), exponiendo así a las bacterias presentes en el semen porcino a dosis subterapéuticas de antibióticos.

La transmisión de bacterias resistentes entre animales y humanos, así como la diseminación de genes de resistencia en el entorno, refuerza la necesidad de abordar el problema desde una perspectiva integradora que contemple la colaboración entre sectores sanitarios, veterinarios y ambientales (Falcón et al., 2010). Este problema, aunque ampliamente documentado en la literatura médica desde hace décadas, se ha visto agravado por prácticas inadecuadas y por la falta de medidas de contención eficaces en muchos sectores. La evolución de resistencias desde un fenómeno puntual hasta una amenaza global refleja la necesidad de revisar los protocolos de uso de antibióticos tanto en medicina humana como veterinaria, y de fomentar políticas responsables en todos los niveles (Oromí, 2000).

La estrategia *One Health* se presenta como un enfoque clave para afrontar este reto, al reconocer la interconexión entre la salud humana, animal y ambiental. La colaboración entre sectores, junto con la implementación de medidas como la mejora en bioseguridad, la vacunación y la formación del personal, se ha propuesto como vía para reducir el uso de antimicrobianos en granjas sin comprometer la productividad (Mesonero, 2020; OHHLEP, 2021).

2.4. Transmisión vertical de microbiota y genes de resistencia

Desde el nacimiento, los lechones comienzan a desarrollar su microbiota intestinal en gran parte influenciada por la microbiota materna, tanto intestinal como vaginal (Tancredi et al., 2025). Esta colonización temprana podría tener un papel determinante en la configuración del resistoma inicial, ya que los GRA presentes en la madre podrían transferirse verticalmente a la descendencia incluso en ausencia de exposición directa a antibióticos (Munk et al., 2018). De hecho, estudios recientes han demostrado que los lechones nacen ya portando GRA, lo que

sugiere una transferencia perinatal o inmediata posnatal que involucraría tanto factores genéticos como ambientales (Tams et al., 2023).

Durante las primeras semanas de vida, especialmente en el periodo de lactancia y destete, se produce una evolución notable del resistoma, con cambios que reflejan tanto la exposición ambiental como la influencia de tratamientos antimicrobianos aplicados en la madre o en el entorno de cría. Se ha observado que GRA frente a las tetraciclinas, macrólidos y aminoglucósidos, como *tet(W)*, *erm(B)* y *aph(3')-IIIa*, aparecen de forma temprana en las heces de los lechones, lo cual refuerza la hipótesis de transmisión vertical microbiana y génica (Suriyaphol et al., 2021).

Estos hallazgos muestran la importancia de estudiar no solo la microbiota intestinal adulta, sino también las fases iniciales de la vida, donde ya se establecen relaciones clave entre huésped y bacterias comensales, muchas de las cuales actúan como reservorios de resistencia (Ma et al., 2023). Por ello, la transmisión vertical de microbiota y resistoma debe considerarse un punto crítico dentro del enfoque *One Health*, dado su impacto potencial en la diseminación de resistencias en la cadena productiva porcina.

2.5. Metagenómica

La metagenómica es una técnica que permite el análisis del material genético presente en muestras ambientales sin necesidad de cultivo previo. A diferencia de las técnicas microbiológicas clásicas, que se basan en el aislamiento y crecimiento de microorganismos, la metagenómica emplea secuenciación del ADN extraído directamente a partir de las muestras, lo que permite detectar tanto bacterias viables como no viables, y obtener una visión más completa de la comunidad microbiana (Forbes et al., 2017). Mediante el análisis del gen 16S rRNA, una región altamente conservada del ADN bacteriano, es posible identificar con alta precisión la mayoría de los géneros bacterianos presentes en una muestra.

Técnicas más avanzadas como la metagenómica *shotgun*, una técnica de secuenciación no dirigida que fragmenta aleatoria y masivamente el ADN total de la muestra para explorar la diversidad microbiana y funcional (Usyk et al., 2023), permiten además identificar especies e incluso cepas, así como genes y elementos genéticos móviles como plásmidos y transposones, implicados en la diseminación de genes de resistencia antimicrobiana (Lin et al., 2015).

La metagenómica se ha consolidado como una herramienta clave para entender las interacciones microbianas en entornos complejos, permitiendo avanzar hacia un enfoque más

preventivo y preciso en salud pública y veterinaria, en línea con los principios de *One Health* (Quince et al., 2017; Munk et al., 2017).

En el caso concreto de estudios microbiológicos del aparato reproductor, esta técnica es especialmente útil, ya que muchas bacterias presentes en útero o vagina no pueden cultivarse fácilmente en laboratorio. Además, el análisis metagenómico permite conocer no solo la composición taxonómica de la microbiota (qué bacterias hay), sino también su funcionalidad potencial, incluyendo genes relacionados con virulencia o metabolismo, así como el conjunto de determinantes que confieren resistencia a los antimicrobianos conocido como resistoma (Wright, 2010; Forbes et al., 2017; Sanglard et al., 2020).

Los estudios disponibles indican que el útero porcino no debe considerarse como un entorno estéril, si no como un ecosistema variable cuya microbiota puede verse modulada por factores como la inseminación artificial y el uso de antibióticos. Estas prácticas, necesarias en la producción porcina actual, constituyen al mismo tiempo una fuente de presión selectiva que puede favorecer la aparición y diseminación de resistencias. El análisis mediante metagenómica es la única técnica eficaz que proporciona una visión completa tanto de la composición microbiana como los determinantes genéticos asociados a resistencia. Además, la posible transmisión vertical de microbiota y resistoma de la madre a la descendencia refuerza la importancia de este enfoque en el contexto de *One Health*. Todo ello justifica la necesidad de profundizar en el estudio de la microbiota uterina porcina y su resistoma, lo que constituye la base de este trabajo.

3. Justificación y objetivos

El estudio de la microbiota uterina porcina ha cobrado relevancia en los últimos años, sobre todo desde que se ha demostrado que el útero no es un ambiente estéril, como se creía antes. La caracterización de estas comunidades microbianas en cerdas de distinta edad y actividad reproductiva puede aportar información significativa sobre su papel en la salud del animal y en la de su descendencia.

El uso de la metagenómica permite evaluar la composición de la microbiota uterina porcina y compararla entre grupos de cerdas (por ejemplo entre primíparas y múltiparas), alcanzando un nivel de resolución que no es posible mediante métodos de cultivo tradicionales. Esta aproximación también posibilita el análisis de genes de resistencia a antibióticos presentes en las muestras uterinas, un aspecto de especial relevancia por el riesgo potencial de transmisión vertical a los lechones.

El estudio de la comunidad microbiana uterina y de su resistoma se enmarca en la creciente preocupación por la resistencia antimicrobiana, desde la perspectiva *One Health*, que integra la salud animal, humana y ambiental. La obtención de información detallada sobre estos aspectos contribuye al conocimiento científico y puede servir de base para diseñar estrategias de manejo reproductivo y uso responsable de antibióticos en la producción porcina.

Por lo tanto, el objetivo general de este trabajo es estudiar la composición de la microbiota bacteriana uterina y la presencia de determinantes de resistencia a los antimicrobianos de un grupo de cerdas mediante técnicas de secuenciación metagenómica.

Para alcanzar este objetivo general, se consideran los siguientes objetivos específicos:

1. Describir la composición taxonómica de las comunidades bacterianas (principales familias bacterianas) a partir de la extracción de ADN bacteriano obtenido del útero de un grupo de cerdas nulíparas y otro de cerdas múltiparas, es decir, inseminadas en varias ocasiones.
2. Determinar a partir de las mismas muestras la presencia de determinantes de resistencia.
3. Comparar la diversidad microbiana y el resistoma entre cerdas nulíparas y múltiparas.

4. Material y métodos

4.1. Selección de animales y recogida de muestras uterinas

Para este estudio se utilizaron úteros procedentes de cerdas sacrificadas en un matadero comercial en dos días distintos. El primer día se recogieron aparatos reproductores de hembras nulíparas y, el segundo, de hembras múltiparas, todas ellas aparentemente sanas y con destino al consumo humano. Las hembras nulíparas procedían de una explotación de recría, y se trataba de animales que acabaron como animales de cebo. Las cerdas múltiparas habían sido descartadas en la explotación por diversas razones (cojeras, baja tasa de fertilidad, prolapso uterino, hernias o desvieje).

Tras el sacrificio, se extrajo el aparato reproductor completo de cada cerda, descartándose los de cerdas que presentaron signos asociados con posible infección del aparato genital (morfologías anormales, presencia de pus o líquido abundante, etc.). Se realizaron cortes limpios en la región perianal para separar el tracto reproductor completo (ovarios, cuernos uterinos, cuerpo y cuello uterino y vagina), y fue depositado en bolsas de plástico individuales previamente identificadas utilizando el número de crotal que llevaba el animal en la explotación, de esta manera se tenía acceso a la información básica de cada animal (número de partos o veces inseminada). Las muestras fueron transportadas al laboratorio y procesadas dentro de las primeras 24 h tras su extracción.

Una vez en el laboratorio, se procedió a la desinfección externa de cada útero mediante aplicación de etanol al 70 % y posterior flameado. A continuación, con una hoja de bisturí estéril se realizaba una pequeña incisión en la intersección entre el cuerpo y los cuernos uterinos (Figura 1). Para la obtención del contenido uterino se introducía por dicha incisión un hisopo estéril (*Real microbiome vaginal DNA kit*, Durviz S.L., Valencia, España; <https://reallaboratory.com/product/real-microbiome-vaginal-dna-kit/>) alcanzando el inicio de ambos cuernos. El hisopo se conservaba a temperatura ambiente hasta el momento de su procesamiento para la extracción del ADN.

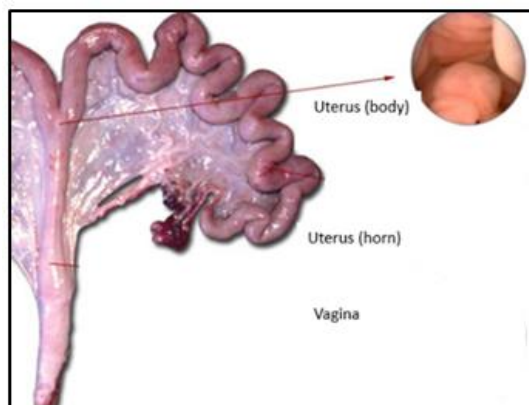


Figura 1. Localización de la recogida de muestras en el aparato genital de la cerda tras el sacrificio (cuerpo y cuerno del útero).

4.2. Extracción del ADN

Para la extracción del ADN a partir de los hisopos, se utilizó el kit de extracción Real Microbiome Vaginal DNA Kit® (Durviz S.L., Valencia, España). Este protocolo combina la lisis celular por agitación con perlas, calor y detergentes. Tras la lisis, se adicionaba al lisado una serie de sales caotrópicas contenidas en una solución de fijación que permitían la unión del ADN a la matriz de las columnas. A continuación, se eliminaron las sustancias contaminantes mediante dos etapas de lavado y el ADN resultante se recuperó mediante un tampón Tris libre de ADN.

4.3. Secuenciación *shotgun* del metagenoma completo y análisis de las secuencias.

Para la secuenciación del ADN se utilizó la secuenciación *shotgun* de extremos pareados (*paired-end*) mediante la plataforma NovaSeq X Plus Series (PE150) de Illumina. La secuenciación *shotgun* del metagenoma completo se llevó a cabo en los laboratorios de Novogene (Cambridge, Reino Unido). De cada muestra se obtuvo una media de 12 gigabases (Gb) de información.

Análisis taxonómico

Los datos de secuencia brutos obtenidos en formato FASTQ se importaron a Galaxy Europe (<https://usegalaxy.eu/user>) donde se realizaron los análisis bioinformáticos para la identificación de poblaciones bacterianas.

En un primer paso, se realizó un análisis de calidad de las secuencias brutas mediante la herramienta FastQC v.0.12.1 (Andrews, 2023). Tras comprobar la calidad general de las mismas se realizó un filtrado y mejora de su calidad mediante la herramienta Fastp v.0.26.0 (Chen et al. 2018). Este segundo paso permitió la eliminación de lecturas de baja calidad, el filtrado de lecturas por longitud mínima, el recorte de adaptadores y de bases de baja calidad en los extremos de las lecturas, y la eliminación de nucleótidos no identificados, mejorando la calidad general de las secuencias.

Posteriormente se procedió a la realización del análisis taxonómico mediante las herramientas Kraken2 v.2.1.3. (Wood y Salzberg, 2014) y Bracken v.3.1. (Lu et al., 2017), que permiten realizar una clasificación taxonómica rápida (Kraken2) seguida de una mejora de la precisión de la abundancia relativa (Bracken). Se analizó a nivel del taxón Familia para facilitar el manejo de resultados. Con ello, se obtuvo una tabla de abundancias relativas de Familias de la cual se eliminaron todos los taxones relativos a organismos eucariotas, arqueas y virus. Esta tabla se utilizó para el análisis posterior de la diversidad bacteriana.

4.4. Detección de determinantes de resistencia a los antimicrobianos (resistoma)

Para la identificación de determinantes de resistencia , primero se realizó el ensamblado de las lecturas FASTQ mediante la herramienta MEGAHIT v.1.2.9, que utiliza un algoritmo basado en grafos de Bruijn comprimidos para ensamblar de manera eficiente secuencias complejas de ADN a partir de grandes volúmenes de datos metagenómicos (Li et al., 2015).

El resultado del ensamblaje se obtuvo en formato FASTA, que contiene secuencias largas denominadas *contigs*, es decir, secuencias de ADN continuas generadas a partir de la unión de múltiples lecturas cortas solapadas, lo que permite reconstruir fragmentos genómicos más grandes para su análisis taxonómico y funcional en metagenómica (Deng y Delwart, 2021).

Estos archivos FASTA obtenidos tras el ensamblado, se utilizaron para identificar la presencia de determinantes de resistencia mediante la herramienta ABRICATE (<https://github.com/tseemann/abricate>), una aplicación bioinformática de cribado masivo que permite la detección rápida de genes en secuencias ensambladas mediante comparaciones por alineamiento con bases de datos específicas (Seemann, 2020). En este caso, los *contigs* obtenidos tras el ensamblaje metagenómico fueron analizados frente a la base de datos CARD (*Comprehensive Antibiotic Resistance Database*) (Alcock et al., 2020), que contiene información actualizada sobre genes de resistencia, mutaciones cromosómicas y mecanismos de acción

conocidos, aplicando como criterios de filtrado una cobertura mínima del 90 % y una identidad del 95 % para asegurar la precisión. Solo se consideraron aquellos genes que cumplieran simultáneamente ambos umbrales para su inclusión en el análisis posterior.

Análisis de diversidad microbiana y de genes de resistencia antimicrobiana

Los análisis de diversidad taxonómica microbiana y de diversidad de genes de resistencia a antimicrobianos se realizaron en R (R Core Team, 2024) dentro de RStudio (RStudio 2025.05.0+496 "Mariposa Orchid" Release for Windows), utilizando los paquetes *phyloseq* (McMurdie y Holmes, 2013), *vegan* (Oksanen et al., 2020) y *ggplot2* (Wickam, 2016). Se evaluó la diversidad alfa y beta.

La diversidad alfa hace referencia a la riqueza y uniformidad de especies presentes dentro de una misma comunidad microbiana (Hugerth y Andersson, 2017), y para ello utiliza diferentes índices, Shannon, Simpson y de Riqueza, que pueden ser comparados entre grupos mediante el test de Wilcoxon. El índice de Shannon considera tanto la riqueza de familias (número de familias diferentes) como su equitatividad (distribución proporcional de individuos entre las familias). Un valor alto de Shannon indica una comunidad más diversa y equilibrada, mientras que un valor bajo sugiere que algunas familias son dominantes sobre las demás. El índice de Simpson es una medida de la diversidad biológica que indica la probabilidad de que dos individuos, seleccionados aleatoriamente de una comunidad, pertenezcan a la misma familia. Un valor más bajo del índice de Simpson sugiere una mayor diversidad, ya que implica una menor probabilidad de encontrar dos individuos de la misma familia. El índice de Riqueza cuantifica el número de familias diferentes en una población

La diversidad beta refleja las diferencias en la composición microbiana entre comunidades (Calle, 2019), y para ello se analizó el índice de disimilitud (o distancia) de Bray-Curtis. Las distancias de Bray-Curtis consideran tanto las familias que están presentes como su abundancia, y pueden visualizarse mediante análisis de coordenadas principales (PCoA). La posible diferencia en la composición microbiana entre grupos se evaluó posteriormente mediante análisis PERMANOVA (función *adonis*, incluida en el paquete *vegan*), previa comprobación de la variabilidad dentro de cada grupo mediante la prueba de dispersión beta (Anderson, 2006).

Finalmente se realizó una comparación de la abundancia relativa de familias entre los dos grupos para detectar familias más predominantes en uno u otro grupo mediante la prueba estadística ALDEx2 (ANOVA-Like Differential Expression). ALDEx2 es un método estadístico desarrollado

específicamente para datos composicionales (como los de microbiota), y se basa en la aplicación de diferentes pruebas estadísticas (una paramétrica y otra no) tras transformar los datos relativos (proporciones) para hacerlos comparables y realizar una simulación Monte Carlo para modelar la incertidumbre (Fernandes et al., 2014). Este análisis se realizó únicamente a aquellas familias taxonómicas más abundantes, es decir, las que presentaron al menos el 1% de abundancia en alguna de las muestras analizadas. Los análisis de diversidad se aplicaron así mismo a la matriz binaria de presencia/ausencia de genes de resistencia antimicrobiana para estudiar su distribución en los dos grupos de animales.

5. Resultados

5.1. Calidad de datos de secuenciación

Se evaluó la calidad de los datos obtenidos para cada una de las muestras analizadas. En la Tabla 1 se muestran los parámetros principales: número de lecturas generadas, cantidad de datos en pares de bases, porcentaje de datos efectivos, tasa de error, así como los valores de Q20 y Q30.

Tabla 1. Resultados de calidad de secuenciación de las muestras uterinas analizadas.

Muestra	Lecturas brutas	Datos brutos (en pares de bases)	Lecturas válidas (%)	Errores de lectura (%)	Bases con calidad \geq Q20 (%)	Bases con calidad \geq Q30 (%)
UT_J8	113960102	17094015300	99,29	0,01	96,93	91,48
UT_J7	120320650	18048097500	99,29	0,01	97,40	92,49
UT_J6	115483986	17322597900	99,31	0,01	96,91	91,48
UT_2112	120800322	18120048300	99,71	0,01	97,64	92,78
UT_8803	109740934	16461140100	99,66	0,01	97,50	92,38
UT_J4	79862896	11979434400	99,21	0,01	97,72	93,66
UT_8280	85204166	12780624900	99,35	0,01	97,55	93,23
UT_2958	86155782	12923367300	99,64	0,01	97,97	93,82
UT_1469p	91481486	13722222900	99,32	0,01	97,64	93,55

Datos brutos: número total de lecturas obtenidas directamente del secuenciador antes del filtrado o limpieza; Q20: porcentaje de bases con una calidad superior a 20 (probabilidad de error <1 %); Q30: porcentaje de bases con una calidad superior a 30 (probabilidad de error $<0,1$ %). Valores altos de Q20 y Q30 reflejan una alta fiabilidad de las lecturas y, por tanto, una buena calidad de secuenciación.

En términos generales, todas las muestras presentaron una calidad excelente:

- Más del 99 % de las lecturas fueron efectivas, con una tasa de error mínima (0,01 %).
- Los valores de Q20 y Q30 fueron superiores al 96 % y 91 % respectivamente, lo que confirma la calidad y precisión de la secuenciación.
- La cantidad de datos crudos osciló entre 11 y 18 millones de pares de bases, rango adecuado para los análisis posteriores.

Estos resultados confirmaban que la calidad general de los datos era óptima y que las muestras eran aptas para los análisis que se realizaron posteriormente.

5.2. Análisis taxonómico

A partir de los datos de secuenciación, se identificaron un total de 254 familias bacterianas. En el grupo de cerdas nulíparas se detectaron un total de 218 familias (aparecen al menos en una muestra de cerdas nulíparas), mientras que en las múltiparas este número fue ligeramente inferior (203 familias). Un total de 167 familias estaban presentes en ambos grupos, mientras que 51 familias sólo aparecían en las muestras de nulíparas y 36 en las de múltiparas (Figura 2).

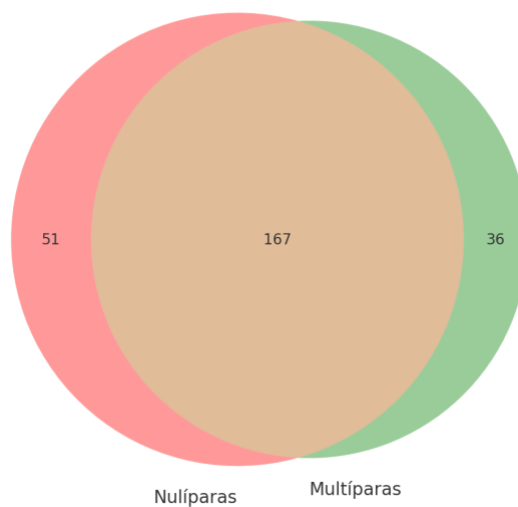


Figura 2. Diagrama de Venn de las familias bacterianas detectadas en cerdas nulíparas y múltiparas

En general, el análisis de la composición bacteriana reflejaba una elevada diversidad compartida entre ambos grupos. Sin embargo, se detectaron diferencias específicas, con mayor número de familias exclusivas en nulíparas que en múltiparas.

5.2.1. Diversidad alfa

La diversidad alfa se evaluó mediante los índices de riqueza, de Shannon y de Simpson, con el objetivo de comparar la diversidad bacteriana intraindividual en nulíparas y múltiparas.

5.2.1.1. Índice de riqueza

Las nulíparas presentaron, en promedio, un mayor índice de riqueza (mayor número de familias bacterianas) comparado con las múltiparas (media de 122,5 vs. 111,6; respectivamente) (Figura 3), aunque no se observaron diferencias significativas entre los grupos (test de Wilcoxon, $W = 9$,

$p = 0,902$), probablemente debido a la gran variabilidad observada en el grupo de las multíparas (Figura 3).

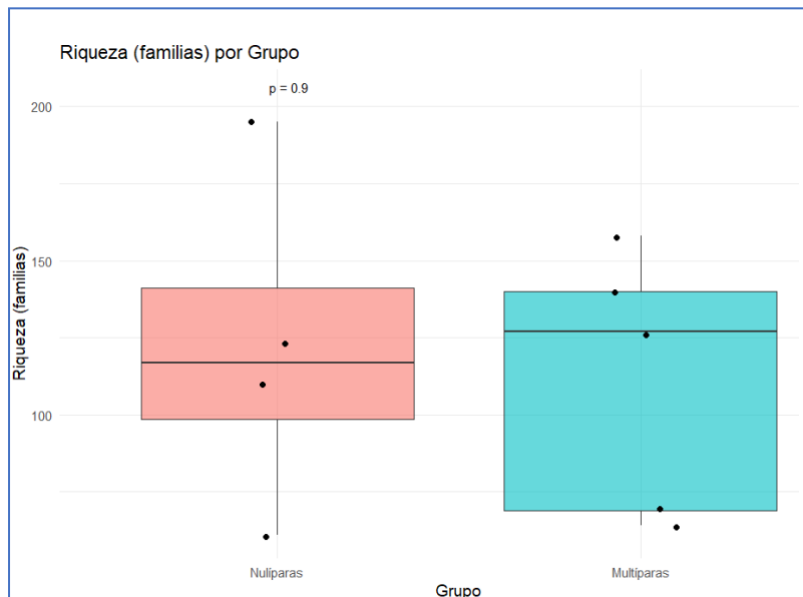


Figura 3. Índice de riqueza por grupo.

5.2.1.2. Índice de Shannon

El índice de Shannon fue superior en nulíparas comparado con las multíparas (1,40 vs. 0,99, respectivamente) sugiriendo una mayor diversidad (más familias) distribuidas de forma más equitativa (equitatividad). Sin embargo, las diferencias tampoco no fueron significativas entre los dos grupos ($W = 15$, $p = 0,29$) (Figura 4).

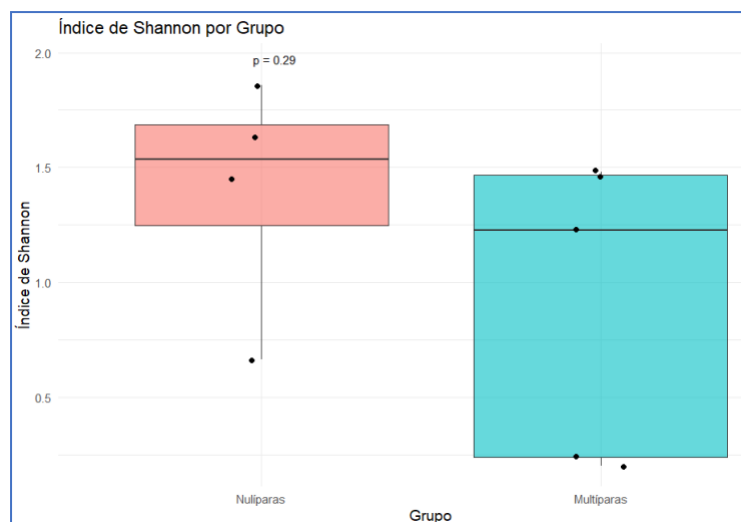


Figura 4. Índice de Shannon por grupo.

5.2.1.3. Índice de Simpson

El valor medio del índice “D” de Simpson fue más bajo en el grupo de nulíparas (0,175) que en el de las múltiparas (0,44), sugiriendo una menor dominancia y reflejando, por lo tanto, comunidades más equitativas, tal y como sugería también el índice de Shannon. Pero tampoco se observaron diferencias significativas ($W = 14$, $p = 0,41$) (Figura 5). En conjunto, aunque las nulíparas mostraron una tendencia a mayor diversidad y comunidades más equilibradas, ninguna de las diferencias entre grupos resultó estadísticamente significativa.

5.2.2. Diversidad beta

El análisis de coordenadas principales (PCoA) basado en la distancia de Bray-Curtis permitió visualizar las diferencias en la composición de la microbiota bacteriana uterina entre cerdas nulíparas y múltiparas a partir de las abundancias relativas (Figura 6). Las muestras de ambos grupos se agruparon de forma diferenciada, evidenciando una clara separación en la composición bacteriana entre cerdas nulíparas (en azul) y múltiparas (en rojo). Además, se observó una mayor dispersión en las muestras de nulíparas, reflejada por el área más amplia del intervalo de confianza (elipse de color azul), en comparación con las múltiparas, cuya variabilidad interna fue más reducida.

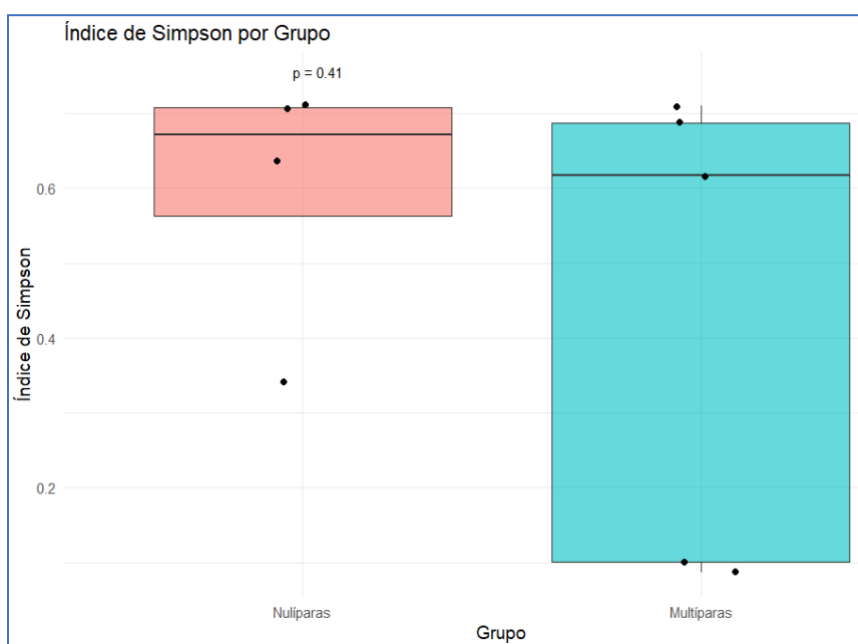


Figura 5. Índice de Simpson por grupo.

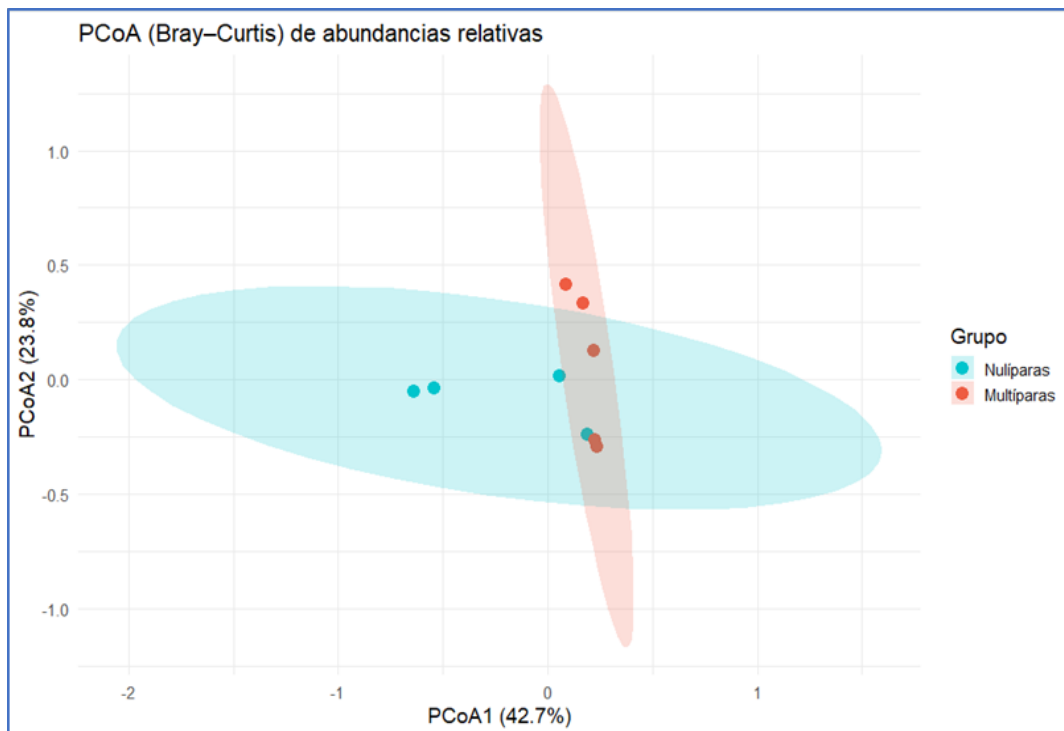


Figura 6. Análisis de coordenadas principales (PCoA) basado en la distancia de Bray-Curtis de las abundancias relativas de la microbiota bacteriana uterina.

Para evaluar la significación estadística de esta separación, se realizó un análisis PERMANOVA (adonis2, 999 permutaciones), que mostró un efecto significativo del grupo sobre la estructura bacteriana uterina ($F = 2,16$, $R^2 = 0,236$, $p = 0,042$; Tabla 2). Este resultado sugería que aproximadamente el 23,6% de la variabilidad en la composición bacteriana podía atribuirse al grupo (nulíparas vs. multíparas).

Tabla 2. Resultados del análisis PERMANOVA*.

Fuente	Df	Suma de cuadrados	R^2	Estadístico F	p
Grupo	1	0,51319	0,23578	2,16	0,042
Residual	7	1,66340	0,76422	—	—
Total	8	2,17659	1,00000	—	—

*PERMANOVA realizado con 999 permutaciones. Se utilizó la distancia de Bray-Curtis sobre la matriz de disimilitud.

Sin embargo, esta diferencia también podría atribuirse a diferencias en la variabilidad interna de cada grupo y no a su composición bacteriana. Con el fin de evaluar si la variabilidad interna (dispersión) dentro de cada grupo era similar o no se realizó el test permutacional de dispersión beta. No se observaron diferencias significativas (Tabla 3) apoyando los resultados del análisis PERMANOVA.

Tabla 3. Resultados del test permutacional sobre la dispersión de las muestras entre grupos (nulíparas vs. múltiparas).

Fuente	Df	Suma de cuadrados	Media de cuadrados	Estadístico F	Permutaciones	<i>p</i>
Grupo	1	0,095388	0,095388	3,6064	999	0,097
Residuales	7	0,185147	0,026450	—	—	—
Total	8	—	—	—	—	—

5.2.3. Comparación de abundancia diferencial

El análisis de diferencias en abundancia relativa mediante ALDEx2 se realizó sobre las familias más abundantes, es decir, que presentaron al menos el 1% de abundancia en alguna de las muestras analizadas. Se detectaron un total de 24 familias. La presencia de estas familias según tipo de muestra se describe en la Figura 7.

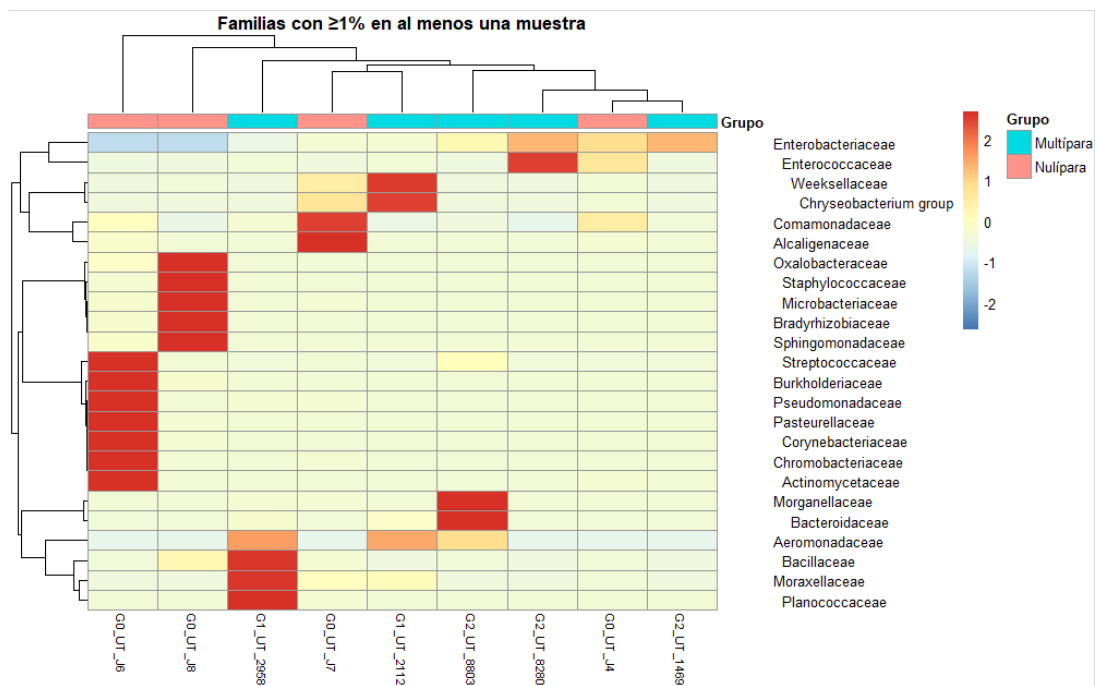


Figura 7. Heatmap que muestra la presencia de familias bacterianas con $\geq 1\%$ de abundancia relativa en al menos una muestra.

Se identificaron varios taxones que diferían en su abundancia entre grupos, aunque ninguno alcanzó significación tras ajustar por el número de comparaciones realizado (Tabla 4). No obstante, se observaron efectos marcados y bajo solapamiento para *Corynebacteriaceae* (mucho más presente en nulíparas), *Yersiniaceae* y *Enterobacteriaceae* (más comunes en múltiparas), lo que sugiere diferencias biológicamente relevantes entre grupos, probablemente no detectadas por métodos clásicos debido al reducido tamaño muestral. Estos hallazgos apoyarían la hipótesis de una alteración en la composición bacteriana uterina asociada al estado reproductivo.

Tabla 4. Resultados del análisis de abundancia diferencial con ALDEx2 entre cerdas nulíparas y múltiparas*.

Familia	Abundancia nulíparas		Abundancia múltiparas		Efecto	Solapamiento
	<i>p</i> (Wilcoxon)	<i>p</i> ajustado (Wilcoxon)	<i>p</i> (tTest)	<i>p</i> ajustado (tTest)		
<i>Bacteroidaceae</i>	0,0292	0,9774	0,0293	0,5018	1,49	0,0781
<i>Corynebacteriaceae</i>	0,0462	0,9999	0,0159	0,9903	-1,49	0,0003
<i>Yersiniaceae</i>	0,0673	1,0	0,0141	0,4407	1,4	0,0428
<i>Hafniaceae</i>	0,0331	0,9859	0,0229	0,359	1,34	0,0469
<i>Erythrobacteraceae</i>	0,0391	0,9886	0,0325	0,6897	1,26	0,0859
<i>Enterobacteriaceae</i>	0,1057	1,0	0,0068	0,1902	1,23	0,0195

*Valores de *p* (Wilcoxon y t-test), correcciones por FDR (Benjamini–Hochberg), abundancias medias por grupo (transformadas CLR), tamaño del efecto (effect) y solapamiento bayesiano (overlap) para las familias bacterianas más relevantes. En ALDEx2, el tamaño del efecto refleja la magnitud de la diferencia entre grupos y el solapamiento indica el grado de coincidencia entre las distribuciones del efecto. Valores de solapamiento bajos y efectos elevados (>1) pueden considerarse indicativos de diferencias biológicamente relevantes, incluso si el valor de *p* ajustado no alcanza significación estadística (Gloor et al., 2016).

5.3. Análisis del resistoma

El análisis global del resistoma puso de manifiesto que casi todas las muestras analizadas contenían determinantes de resistencia a antibióticos (Tabla 5). Estos se detectaron en 3 de las 4 cerdas jóvenes (75 %) y en todas las cerdas adultas. Las cerdas adultas presentaron un número mayor de determinantes que las cerdas jóvenes (mediana = 59 vs. mediana = 31, respectivamente), aunque esta diferencia no fue estadísticamente significativa (*p*=0,19).

Tabla 5. Número de determinantes de resistencia antimicrobiana (genes y mecanismos relacionados) detectados por muestra, clasificados según grupo de cerdas (nulíparas vs. multíparas).

Muestra	Grupo	Nº de anotaciones
G0_UT_J4	Nulípara	63
G0_UT_J6	Nulípara	7
G0_UT_J7	Nulípara	55
G0_UT_J8	Nulípara	0
G1_UT_2112	Multípara	59
G1_UT_2958	Multípara	121
G2_UT_1469	Multípara	50
G2_UT_8280	Multípara	57
G2_UT_8803	Multípara	87

En total se detectaron 168 determinantes de resistencia antimicrobiana, de los cuales 67 fueron comunes a nulíparas y multíparas. Además, las cerdas multíparas presentaron un mayor número de determinantes exclusivos (93 frente a 8 en nulíparas). Estos ocho estaban relacionados principalmente con la resistencia a los aminoglucósidos, macrólidos, lincosamidas, estreptomicina y trimetoprim, eran exclusivos de las cerdas jóvenes (Figura 8).

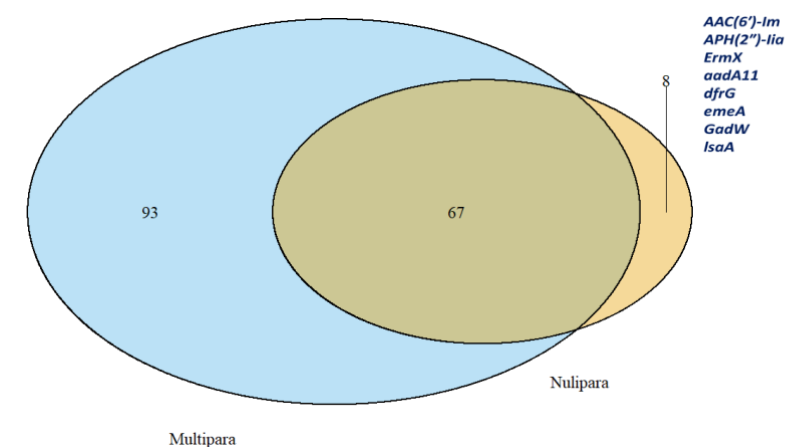


Figura 8. Diagrama de Venn mostrando el número de genes de resistencia exclusivos y compartidos entre cerdas nulíparas y multíparas.

5.3.1. Diversidad alfa

La diversidad alfa del resistoma se evaluó mediante los índices de Riqueza, Shannon y Simpson, con el objetivo de comparar el número y la distribución de determinantes de resistencia en

cerdas nulíparas y múltiparas.

En promedio, las múltiparas presentaron una mayor riqueza de determinantes de resistencia ($74,8 \pm 29,4$) en comparación con las nulíparas ($41,7 \pm 30,3$), aunque la diferencia no fue significativa (test de Wilcoxon, $p = 0,393$). El índice de Shannon fue también superior en múltiparas ($4,26 \pm 0,36$) respecto a nulíparas ($3,37 \pm 1,23$), lo que sugiere un resistoma algo más equilibrado en este grupo, pero sin diferencias significativas ($p = 0,393$). Por su parte, el índice de Simpson mostró valores muy similares entre los grupos ($0,01 \pm 0,00$ en múltiparas vs. $0,06 \pm 0,07$ en nulíparas). En general, se aprecia una tendencia hacia una mayor diversidad y riqueza en las cerdas múltiparas, aunque las diferencias no fueron estadísticamente significativas.

5.3.2. Diversidad beta

El análisis de coordenadas principales (PCoA) basado en la distancia de Bray-Curtis mostró una ligera separación entre nulíparas y múltiparas, aunque con solapamiento entre grupos (Figura 10). El análisis PERMANOVA no detectó diferencias significativas en la composición global del resistoma entre los grupos ($F = 1,54$; $R^2 = 0,205$; $p = 0,171$). La prueba de dispersión beta tampoco reveló diferencias significativas en la variabilidad interna de cada grupo ($p > 0,05$).

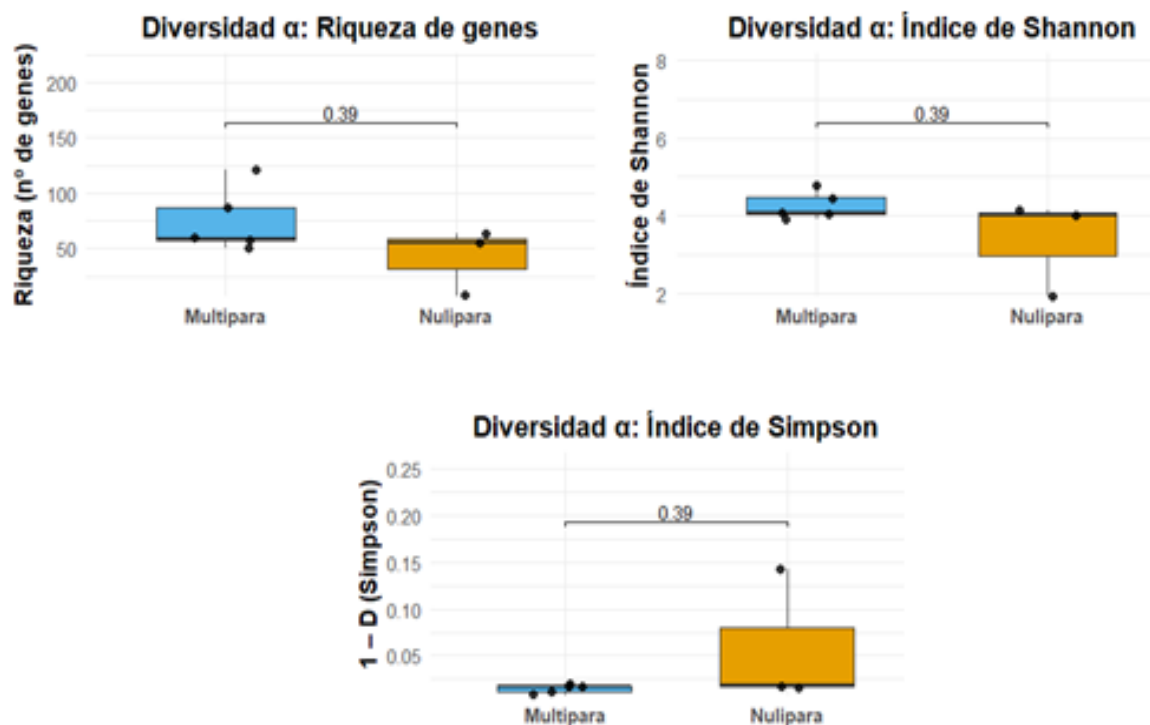


Figura 9. Diversidad alfa del resistoma en cerdas nulíparas y múltiparas, evaluada mediante los índices de Riqueza, Shannon y Simpson.

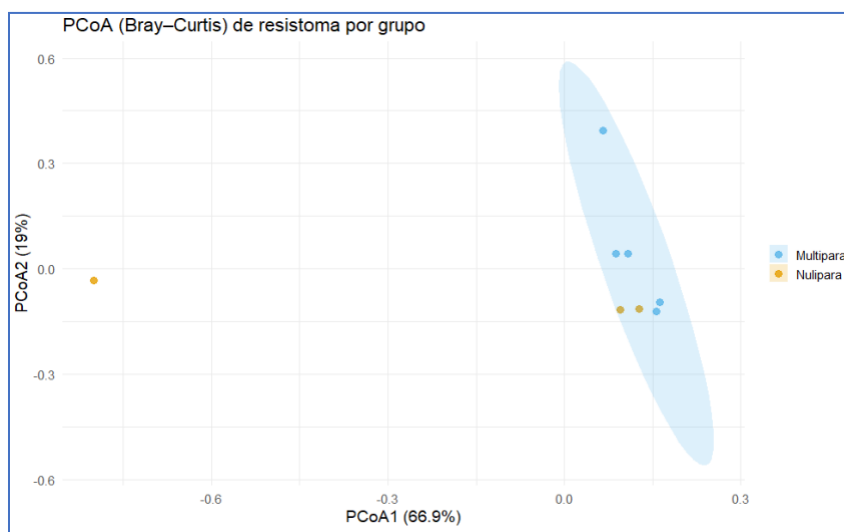


Figura 10. Análisis de coordenadas principales (PCoA) del resistoma uterino en cerdas núlparas y múltiparas, basado en la distancia de Bray-Curtis.

5.3.3. Comparación de la frecuencia relativa de GRA entre grupos

Los 168 determinantes de RA identificados en las muestras analizadas se presentaban de forma variable entre los grupos de cerdas núlparas y múltiparas. Ninguno de los genes de resistencia detectados presentó una significativa mayor abundancia en uno u otro grupo tras la corrección por comparaciones múltiples ($p > 0,05$), sin embargo, algunos mostraron tendencias diferenciales relevantes.

Entre los genes que mostraron una tendencia a presentar una mayor frecuencia en las cerdas múltiparas se identificaron los siguientes (Figura 11):

- *APH(6)-Id*, *aadA2* y *SAT-4*, responsables de la inactivación de aminoglucósidos.
- *TEM-1*, *ampC*, *ampC1 beta-lactamase* y *ampH*, β -lactámicos implicados en la resistencia a penicilinas y cefalosporinas.
- *QnrB5*, que impide la acción de fluoroquinolonas.
- *mphG* (macrólidos) y *linG* (lincosamidas).
- *dfrA12*, asociado con la resistencia a trimetoprim.
- *eptA*, que reduce la afinidad por la colistina.
- *acrA*, *acrE*, *acrS*, *mdfA*, *baeR*, *baeS*, *CRP*, *H-NS*, *gadX* y *kdpE*, implicados en mecanismos de eflujo activo, contribuyendo a fenómenos de multirresistencia.

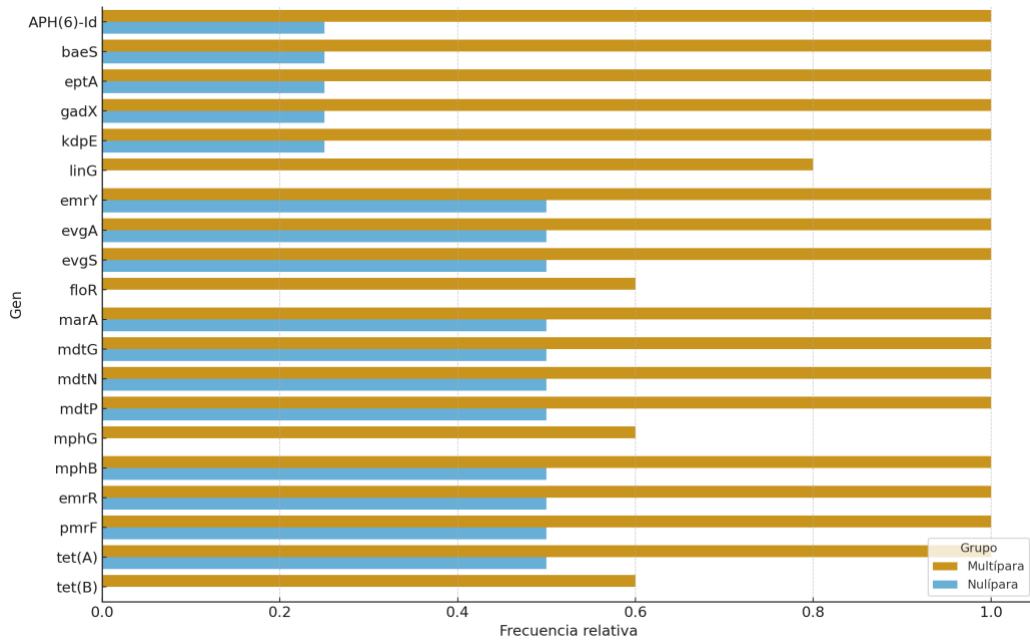


Figura 11. Frecuencia de los 20 genes de resistencia antimicrobiana más diferenciales entre cerdas multíparas y nulíparas

6. Discusión

Los resultados de este estudio confirman que el útero de la cerda no es un entorno estéril, sino que alberga comunidades bacterianas diversas incluso en animales clínicamente sanos (Gil-Miranda et al., 2024; Poudel et al., 2024). Este hallazgo coincide con lo descrito en otras especies domésticas, donde la microbiota bacteriana uterina parece desempeñar un papel relevante en el equilibrio inmunológico y en la protección frente a patógenos (Galvão et al., 2019; Gil-Miranda et al., 2024; Casaro et al., 2024).

En cuanto a la diversidad, las cerdas nulíparas mostraron en promedio valores más altos de diversidad alfa (índice de Shannon) y mayor riqueza observada, mientras que las multíparas presentaron comunidades más dominadas por pocos taxones, reflejado en un índice de Simpson más elevado. Aunque estas diferencias no alcanzaron significación estadística, probablemente por el tamaño reducido de la muestra, el análisis de diversidad beta sí reveló diferencias significativas en la composición taxonómica entre grupos. Esto sugiere que el número de partos podría influir en la organización de la comunidad bacteriana del útero, en concordancia con estudios realizados en microbiota vaginal de nulíparas y multíparas (Kellerman et al., 2022), aunque existen otros factores que también podrían influir.

La menor riqueza bacteriana observada en multíparas podría deberse a una mayor especialización de la microbiota bacteriana uterina asociada a la madurez reproductiva. En hembras adultas, la exposición a múltiples ciclos estrales y partos, junto con cambios en el pH y las secreciones, podría favorecer la dominancia de ciertos taxones y, en consecuencia, una menor diversidad alfa (Torres Luque et al., 2021). En mujeres se ha descrito un fenómeno comparable, donde la dominancia de *Lactobacillus* en edad fértil reduce la diversidad respecto a niñas prepúberes o mujeres postmenopáusicas (Dubé-Zinatella et al., 2024).

El manejo reproductivo también podría estar influyendo en estos patrones. La inseminación artificial introduce tanto antimicrobianos como microorganismos externos, lo que puede favorecer la selección de comunidades menos diversas pero más estables (Torres Luque et al., 2021). Además, los partos suponen cambios inmunológicos relevantes y posibles transferencias microbianas desde la microbiota vaginal, intestinal o perineal, lo que podría contribuir a reorganizaciones que reduzcan la diversidad uterina (Sanglard et al., 2020). Este patrón de una comunidad bacteriana menos diversa pero más estable, podría correlacionarse con mayor longevidad y calidad reproductiva (Liu et al., 2025).

A nivel taxonómico, se observó que las cerdas nulíparas podrían presentar una mayor abundancia relativa de *Corynebacteriaceae*, mientras que en las multíparas destacarían familias como *Yersiniaceae* y *Enterobacteriaceae*. No obstante, se desconoce aún qué papel podrían desempeñar estos grupos en la salud reproductiva de las cerdas. Una posible explicación para la mayor presencia de enterobacterias en las multíparas podría estar relacionada con las diferencias en el manejo y las instalaciones según el tipo de animal. Las nulíparas nunca permanecieron en jaulas, sino únicamente en parques o cuadras; en cambio, las multíparas, tras el parto, pasaban casi un mes en jaulas con movilidad muy reducida, lo que aumentaba la probabilidad de que la vagina entrara en contacto con las heces con mayor frecuencia. Serán necesarios estudios funcionales que analicen el papel de estas familias supuestamente dominantes.

En relación con el resistoma, se detectaron GRA en casi todas las muestras, lo que sugiere que el útero podría funcionar como reservorio de resistencias. Aunque no se encontraron diferencias significativas entre nulíparas y multíparas, se observó una tendencia a una mayor diversidad y riqueza en las cerdas multíparas, posiblemente como resultado de la exposición acumulada a antimicrobianos durante su mayor periodo de vida y posiblemente mayor número de inseminaciones artificiales y partos. Este hallazgo coincidiría con lo descrito por Kellerman et al. (2022), quienes, comparando patrones de resistencia antimicrobiana en bacterias del cérvix de cerdas nulíparas y multíparas previamente inseminadas, observaron una relación positiva entre un incremento de la resistencia a los antimicrobianos y el número de partos.

La detección simultánea de familias con potencial patógeno y GRA en casi todas las muestras sugería un riesgo de transmisión vertical hacia los lechones, lo que podría contribuir a la persistencia de resistencias en el ciclo productivo (Munk et al., 2018; Suriyaphol et al., 2021; Tams et al., 2023). Este aspecto adquiere relevancia en el marco del enfoque *One Health*, pues vincula el manejo reproductivo en porcino con la salud animal y pública.

En resumen, la edad, el manejo reproductivo y/o el número de partos de las cerdas parecen influir en la diversidad bacteriana y el resistoma uterino. Aunque las nulíparas mostraron comunidades más diversas y variables, las multíparas tendieron a albergar un resistoma más amplio y estable. De hecho, se detectó un elevado número de determinantes de RA en las muestras uterinas, con una mayor abundancia en cerdas multíparas en comparación con las cerdas jóvenes. Esto podría reflejar la exposición acumulativa a antimicrobianos, incluyendo los asociados con las inseminaciones artificiales repetidas. La presencia de GRA en el útero podría conducir potencialmente a su transmisión a los lechones, una nueva vía para la diseminación de

la resistencia a los antimicrobianos. La presencia de GRA en cerdas jóvenes nulíparas merece una investigación más detallada.

Estudios futuros con un mayor número de animales y un registro detallado de los tratamientos antimicrobianos permitirán comprender mejor las interacciones entre microbiota, resistoma, el número de partos y manejo, proporcionando información valiosa para el desarrollo de prácticas reproductivas más responsables en porcino.

7. Conclusiones

1. El útero de las cerdas en producción alberga una microbiota diversa, incluso en ausencia de signos clínicos de enfermedad, lo que confirma que no es un entorno estéril.
2. Aunque no se encontraron diferencias significativas, probablemente debido al limitado número de animales analizados, las cerdas nulíparas tendieron a presentar una mayor riqueza y diversidad microbiana, posiblemente asociada con una microbiota menos estable.
3. Las cerdas multíparas parecían presentar un resistoma más amplio que las nulíparas, lo que sugiere la posible influencia del número de partos y/o la exposición acumulada a antibióticos (vía inseminación artificial o por otras vías).
4. La detección de genes de resistencia antimicrobiana en el contenido uterino de cerdas sanas sugiere que el útero podría actuar como reservorio de resistencias y potencial vía de transmisión vertical hacia los lechones.

7.1. Conclusions

1. The uterus of sows in production harbours a diverse microbiota, even in the absence of clinical signs of disease, confirming that it is not a sterile environment.
2. Although no significant differences were found, likely due to the limited number of animals analysed, nulliparous sows tended to show higher microbial richness and diversity, possibly associated with a less stable microbiota.
3. Multiparous sows appeared to exhibit a broader resistome than nulliparous sows, suggesting a potential influence of the number of parities and/or cumulative exposure to antibiotics (via artificial insemination or other routes).
4. The detection of antimicrobial resistance genes in the uterine content of healthy sows suggests that the uterus may act as a reservoir of resistance and a potential route for vertical transmission to piglets.

8. Valoración personal

La realización de este trabajo me ha permitido conocer de primera mano cómo se desarrolla realmente un proceso de investigación, desde la recogida de muestras en matadero hasta el análisis final de los datos. Ha sido una experiencia que me ha ayudado a entender mejor cómo funcionan las técnicas moleculares y el análisis bioinformático, algo que antes me resultaba mucho más abstracto.

Elegí este tema porque me parecía interesante comprender mejor la microbiota y la resistencia a los antimicrobianos, cuestiones de gran importancia a día de hoy.

Gracias a este proyecto he aprendido a manejar bibliografía científica, comparar información de diferentes fuentes y organizarla de manera clara, además de familiarizarme con conceptos y técnicas que antes solo había visto en clase.

Por último, quiero agradecer a mis tutores el apoyo y la ayuda que me han dado durante todo el proceso, así como su disponibilidad y confianza.

Este trabajo ha supuesto un buen aprendizaje y me ha aportado habilidades que sé que me servirán en mi carrera como veterinaria.

9. Bibliografía

Alcock, B. P., Raphenya, A. R., Lau, T. T. Y., Tsang, K. K., Bouchard, M., Edalatmand, A., Huynh, W., Nguyen, A.-L. V., Cheng, A. A., Liu, S., Min, S. Y., Miroshnichenko, A., Tran, H.-K., Werfalli, R. E., Nasir, J. A., Oloni, M., Speicher, D. J., Florescu, A., Singh, B., & McArthur, A. G. (2020). CARD 2020: antibiotic resistance surveillance with the comprehensive antibiotic resistance database. *Nucleic Acids Research*, 48(D1), D517–D525. <https://doi.org/10.1093/nar/gkz935>

Anderson, M. J. (2006). Distance-based tests for homogeneity of multivariate dispersions. *Biometrics*, 62(1), 245–253. <https://doi.org/10.1111/j.1541-0420.2005.00440.x>

Andrews, S. (2023). FastQC: A quality control tool for high throughput sequence data (Version 0.12.1) [Computer software]. Babraham Bioinformatics. <https://www.bioinformatics.babraham.ac.uk/projects/fastqc/>

Asenjo, A., Oteo-Iglesias, J., & Alós, J.I. (2021). What's new in mechanisms of antibiotic resistance in bacteria of clinical origin? *Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica (English Ed)*, 39(6), 291–299. <https://doi.org/10.1016/j.eimce.2020.02.017>

Byrne, M. K., Mielliet, S., McGlenn, A., Fish, J., Meedy, S., Reynolds, N., & van Oijen, A. M. (2019). The drivers of antibiotic use and misuse: the development and investigation of a theory driven community measure. *BMC Public Health*, 19(1), 1425. <https://doi.org/10.1186/s12889-019-7796-8>

Calle, M. L. (2019). Statistical analysis of metagenomics data. *Genomics & Informatics*, 17(1), e6. <https://doi.org/10.5808/GI.2019.17.1.e6>

Casaro, S., Prim, J. G., Gonzalez, T. D., Cunha, F., Bisinotto, R. S., Chebel, R. C., Santos, J. E. P., Nelson, C. D., Jeon, S. J., Bicalho, R. C., Driver, J. P., & Galvão, K. N. (2024). Integrating uterine microbiome and metabolome to advance the understanding of the uterine environment in dairy cows with metritis. En *Research Square*. <https://doi.org/10.21203/rs.3.rs-3897972/v1>

Chen, S., Zhou, Y., Chen, Y., & Gu, J. (2018). Fastp: an ultra-fast all-in-one FASTQ preprocessor. En *bioRxiv*. <https://doi.org/10.1101/274100>

- Deng, Z., & Delwart, E. (2021). ContigExtender: a new approach to improving de novo sequence assembly for viral metagenomics data. *BMC Bioinformatics*, 22(1), 119. <https://doi.org/10.1186/s12859-021-04038-2>
- Dubé-Zinatelli, E., Cappelletti, L., & Ismail, N. (2024). Vaginal microbiome: Environmental, biological, and racial influences on gynecological health across the lifespan. *American Journal of Reproductive Immunology*, 92(6) e70026. <https://doi.org/10.1111/aji.70026>
- Falcón, N., Ortega, C., Gorniak, S., Villamil, L. C., Ríos, C., & Simón, M. (2010). El problema de la resistencia a antibióticos en salud pública. Una Salud. *Revista Sapuvet de Salud Pública*, 1(1), 75-88. <https://revistas.lasalle.edu.co/index.php/us/article/view/5107>
- Fernandes, A. D., Reid, J. N., Macklaim, J. M., McMurrough, T. A., Edgell, D. R., & Gloor, G. B. (2014). Unifying the analysis of high-throughput sequencing datasets: characterizing RNA-seq, 16S rRNA gene sequencing and selective growth experiments by compositional data analysis. *Microbiome*, 2(1), 15. <https://doi.org/10.1186/2049-2618-2-15>
- Forbes, J. D., Knox, N. C., Ronholm, J., Pagotto, F., & Reimer, A. (2017). Metagenomics: The next culture-independent game changer. *Frontiers in Microbiology*, 8, 1069. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2017.01069>
- Galvão, K. N., Bicalho, R. C., & Jeon, S. J. (2019). Symposium review: The uterine microbiome associated with the development of uterine disease in dairy cows. *Journal of Dairy Science*, 102(12), 11786–11797. <https://doi.org/10.3168/jds.2019-17106>
- Gil-Miranda, A., Macnicol, J., Orellana-Guerrero, D., Samper, J. C., & Gomez, D. E. (2024). Reproductive tract Microbiota of mares. *Veterinary Sciences*, 11(7), 324. <https://doi.org/10.3390/vetsci11070324>
- Gimeno, O., & Ortega, C. (2005). *Antibióterapia y salud pública veterinaria; desarrollo de microorganismos resistentes, mecanismos de resistencia y estrategias para el uso prudente de antibióticos*. Universidad de Zaragoza. Seminario “A problemática dos resíduos medicamentosos e contaminantes em produção animal e Saúde Pública”, Universidad de Évora, Polo de Mitra, Évora, (Portugal), 4 de noviembre, 2005
- Gloor, G. B., & Reid, G. (2016). Compositional analysis: a valid approach to analyze microbiome high-throughput sequencing data. *Canadian Journal of Microbiology*, 62(8), 692–703. <https://doi.org/10.1139/cjm-2015-0821>

Gonçalves, A.P. (2012). Factores de riesgo de contaminación de las dosis seminales: cómo optimizar la higiene en la recogida y procesamiento del eyaculado. *Avances en Tecnología Porcina*, 9 (90), 26-32.

Holyoak, G. R. (2021). The Equine Endometrial Microbiome: A Brief Review. *American journal of biomedical science & research*, 11(6), 532–534. <https://doi.org/10.34297/ajbsr.2021.11.001689>

Hugerth, L. W., & Andersson, A. F. (2017). Analysing microbial community composition through amplicon sequencing: From sampling to hypothesis testing. *Frontiers in Microbiology*, 8, 1561. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2017.01561>

Kellerman, C., Malaluang, P., Hansson, I., Eliasson Selling, L., & Morrell, J.M. (2022). Antibiotic Resistance Patterns in Cervical Microbes of Gilts and Sows. *Animals: An Open Access Journal from MDPI*, 12(1): 117. <https://doi.org/10.3390/ani12010117>

Kiefer, Z. E., Koester, L. R., Studer, J. M., Chipman, A. L., Mainquist-Whigham, C., Keating, A. F., Schmitz-Esser, S., & Ross, J. W. (2021). Vaginal microbiota differences associated with pelvic organ prolapse risk during late gestation in commercial sows. *Biology of Reproduction*, 105(6), 1545–1561. <https://doi.org/10.1093/biolre/ioab178>

Li, D., Liu, C.-M., Luo, R., Sadakane, K., & Lam, T.-W. (2015). MEGAHIT: an ultra-fast single-node solution for large and complex metagenomics assembly via succinct de Bruijn graph. *Bioinformatics* (Oxford, England), 31(10), 1674–1676. <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btv033>

Lin, J., Nishino, K., Roberts, M. C., Tolmasky, M., Aminov, R. I., & Zhang, L. (2015). Mechanisms of antibiotic resistance. *Frontiers in Microbiology*, 6, 34. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2015.00034>

Liu, Z., Tsai, T., Zuo, B., Howe, S., Farrar, J. E., Randolph, C. E., Maxwell, C. V., & Zhao, J. (2025). The sow vaginal and gut microbiota associated with longevity and reproductive performance. *Journal of Animal Science and Biotechnology*, 16(1), 6. <https://doi.org/10.1186/s40104-024-01140-2>

Lu, J., Breitwieser, F. P., Thielen, P., & Salzberg, S. L. (2017). Bracken: estimating species abundance in metagenomics data. *PeerJ. Computer Science*, 3, e104. <https://doi.org/10.7717/peerj-cs.104>

Luther, A. M., Nguyen, T. Q., Verspohl, J., & Waberski, D. (2021). Antimicrobially active semen extenders allow the reduction of antibiotic use in pig insemination. *Antibiotics (Basel, Switzerland)*, *10*(11), 1319. <https://doi.org/10.3390/antibiotics10111319>

Luther, A. M., Nguyen, T. Q., Verspohl, J., & Waberski, D. (2023). Storage of boar semen at 17°C without conventional antibiotics in an extender containing an organic bactericidal substance. *Frontiers in Veterinary Science*, *10*, 1294903. <https://doi.org/10.3389/fvets.2023.1294903>

Ma, L., Song, Y., Lyu, W., Chen, Q., Xiao, X., Jin, Y., Yang, H., Wang, W., & Xiao, Y. (2023). Longitudinal metagenomic study reveals the dynamics of fecal antibiotic resistome in pigs throughout the lifetime. *Animal Microbiome*, *5*(1), 55. <https://doi.org/10.1186/s42523-023-00279-z>

Martínez, J. L., & Baquero, F. (2014). Emergence and spread of antibiotic resistance: setting a parameter space. *Upsala Journal of Medical Sciences*, *119*(2), 68–77. <https://doi.org/10.3109/03009734.2014.901444>

McMurdie, P. J., & Holmes, S. (2013). Phyloseq: An R package for reproducible interactive analysis and graphics of microbiome census data. *PLoS ONE*, *8*(4), e61217. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0061217>

Mesonero, S. (2020). Reducción de antibióticos desde una perspectiva ONE HEALTH. *PorciNews, la revista global del porcino*. <https://porcinews.com/reduccion-antibioticos-desde-perspectiva-one-health/>

Munita, J. M. & Arias, C. A. (2016). Mechanisms of antibiotic resistance. *Microbiology spectrum*, *4*(2), 125-130. <https://doi.org/10.1128/microbiolspec.vmbf-0016-2015>

Munk, P., Andersen, V. D., de Knecht, L., Jensen, M. S., Knudsen, B. E., Lukjancenko, O., Mordhorst, H., Clasen, J., Agersø, Y., Folkesson, A., Pamp, S. J., Vigre, H., & Aarestrup, F. M. (2017). A sampling and metagenomic sequencing-based methodology for monitoring antimicrobial resistance in swine herds. *The Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, *72*(2), 385–392. <https://doi.org/10.1093/jac/dkw415>

Munk, P., Knudsen, B. E., Lukjancenko, O., Duarte, A. S. R., Van Gompel, L., Luiken, R. E. C., Smit, L. A. M., Schmitt, H., Garcia, A. D., Hansen, R. B., Petersen, T. N., Bossers, A., Ruppé, E., & Aarestrup, F. M. (2018). Abundance and diversity of the faecal resistome in slaughter pigs and broilers in nine European countries. *Nature Microbiology*, 3(8), 898–908. <https://doi.org/10.1038/s41564-018-0192-9>

Ngo, C., Morrell, J. M., & Tummaruk, P. (2025). Boar semen microbiome: Insights and potential implications. *Animal Reproduction Science*, 272, 107647. <https://doi.org/10.1016/j.anireprosci.2024.107647>

Oksanen, J., Simpson, G. L., Blanchet, F. G., Kindt, R., Legendre, P., Minchin, P. R., O’Hara, R. B., Solymos, P., Stevens, M. H. H., Szoecs, E., & Wagner, H. (2020). Vegan: Community ecology package (R package version 2.7-2) [Computer software]. The R Foundation for Statistical Computing. <https://CRAN.R-project.org/package=vegan>

One Health High-Level Expert Panel (OHHLEP). (2021). One Health: A new definition for a sustainable and healthy future. World Health Organization. [Informe OHHLEP] [versión consultada en WHO website].

O’Neill, J. (2016). Tackling drug-resistant infections globally: final report and recommendations. *Review on Antimicrobial Resistance*, 25, 1-84. <https://apo.org.au/node/63983>

Oromí, J. (2000). Resistencia bacteriana a los antibióticos. *Medicina Integral*, 36(10), 367–370. <https://www.elsevier.es/es-revista-medicina-integral-63-articulo-resistencia-bacteriana-antibioticos-10022180>

Perovic, S., Veinovic, G. & Antic-Stankovic, J. (2018). A review on antibiotic resistance: Origin and mechanisms of bacterial resistance as biological phenomenon. *Genetika*, 50(3), 1123–1135. <https://doi.org/10.2298/gensr1803123p>

Poudel, A., Sharma, S., Dhital, K., Bhandari, S., Rajbhandari, P.G., Napit, R., Puri, D., & Karmacharya, D. B. (2024). Antimicrobial stewardship hindered by inadequate biosecurity and biosafety practices, and inappropriate antibiotics usage in poultry farms of Nepal-A pilot study. *PLoS One*. 19(3), e0296911. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0296911>

Quince, C., Walker, A. W., Simpson, J. T., Loman, N. J., & Segata, N. (2017). Shotgun metagenomics, from sampling to analysis. *Nature Biotechnology*, 35(9), 833–844. <https://doi.org/10.1038/nbt.3935>

R Core Team. (2024). R: A language and environment for statistical computing [Computer software]. R Foundation for Statistical Computing. <http://www.r-project.org/>

RStudio Team. (2025). RStudio: Integrated Development Environment for R (Version 2025.05.0+496) [Computer software]. <https://posit.co/>

Sanglard, L. P., Schmitz-Esser, S., Gray, K. A., Linhares, D. C. L., Yeoman, C. J., Dekkers, J. C. M., Niederwerder, M. C., & Serão, N. V. L. (2020). Vaginal microbiota diverges in sows with low and high reproductive performance after porcine reproductive and respiratory syndrome vaccination. *Scientific Reports*, *10*(1), 3046. <https://doi.org/10.1038/s41598-020-59955-8>

Seemann, T. (2020). ABRICATE: Mass screening of contigs for antimicrobial and virulence genes [Computer software]. <https://github.com/tseemann/abricate>

Suriyaphol, P., Chiu, J. K. H., Yimpring, N., Tunsagool, P., Mhuantong, W., Chuanchuen, R., Bessarab, I., Williams, R. B. H., Ong, R. T.-H., & Suriyaphol, G. (2021). Dynamics of the fecal microbiome and antimicrobial resistome in commercial piglets during the weaning period. *Scientific Reports*, *11*(1), 18091. <https://doi.org/10.1038/s41598-021-97586-9>

Tams, K. W., Larsen, I., Hansen, J. E., Spiegelhauer, H., Strøm-Hansen, A. D., Rasmussen, S., Ingham, A. C., Kalmar, L., Kean, I. R. L., Angen, Ø., Holmes, M. A., Pedersen, K., Jelsbak, L., Folkesson, A., Larsen, A. R., & Strube, M. L. (2023). The effects of antibiotic use on the dynamics of the microbiome and resistome in pigs. *Animal Microbiome*, *5*(1), 39. <https://doi.org/10.1186/s42523-023-00258-4>

Tancredi, A., Matthijs, T., Cox, E., Van Immerseel, F., & Goossens, E. (2025). From mother to piglet: the lasting influence of the maternal microbiome. *Animal Microbiome*, *7*(1), 52. <https://doi.org/10.1186/s42523-025-00420-0>

Torres Luque, A., Fontana, C., Pasteris, S.E., Bassi, D., Cocconcelli, P.S., & Otero, M.C. (2021) Vaginal bacterial diversity from healthy gilts and pregnant sows subjected to natural mating or artificial insemination. *Research in Veterinary Science*, *140*, 26–37. <https://doi.org/10.1016/j.rvsc.2021.07.023>

Tsekouras, N., Athanasiou, L., Gougoulis, D., Christodoulopoulos, G., Billinis, C., & Papatsiros, V. (2025). Current challenges in porcine medicine: gut health, aspects of neonatal diarrhea, and antibiotic resistance. *Journal of the Hellenic Veterinary Medical Society*, *76*(2), 8967–8978. <https://doi.org/10.12681/jhvms.38793>

Usyk, M., Peters, B. A., Karthikeyan, S., McDonald, D., Sollecito, C. C., Vazquez-Baeza, Y., Shaffer, J. P., Gellman, M. D., Talavera, G. A., Daviglius, M. L., Thyagarajan, B., Knight, R., Qi, Q., Kaplan, R., & Burk, R. D. (2023). Comprehensive evaluation of shotgun metagenomics, amplicon sequencing, and harmonization of these platforms for epidemiological studies. *Cell Reports Methods*, 3(1), 100391. <https://doi.org/10.1016/j.crmeth.2022.100391>

Van Gompel, L., Luiken, R. E. C., Sarrazin, S., Munk, P., Knudsen, B. E., Hansen, R. B., Bossers, A., Aarestrup, F. M., Dewulf, J., Wagenaar, J. A., Mevius, D. J., Schmitt, H., Heederik, D. J. J., Dorado-García, A., Smit, L. A. M., Graveland, H., van Essen, A., Gonzalez-Zorn, B., Moyano, G., & EFFORT consortium. (2019). The antimicrobial resistome in relation to antimicrobial use and biosecurity in pig farming, a metagenome-wide association study in nine European countries. *The Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 74(4), 865–876. <https://doi.org/10.1093/jac/dky518>

Ventola C. L. (2015). The antibiotic resistance crisis: part 1: causes and threats. *P & T: A peer-reviewed journal for formulary management*, 40(4), 277–283.

Wickham, H. (2016). *Ggplot2: Elegant graphics for data analysis*. Springer. <https://ggplot2.tidyverse.org>

Wood D.E., & Salzberg, S. L. (2014). Kraken: ultrafast metagenomic sequence classification using exact alignments. *Genome Biology*, 15(3), R46. <https://doi.org/10.1186/gb-2014-15-3-r46>

World Health Organization (WHO). (2015). Global action plan on antimicrobial resistance. <https://www.who.int/publications/i/item/9789241509763>

World Organisation for Animal Health. (WOAH). (2024). Antimicrobial resistance. <https://www.woah.org/en/what-we-do/global-initiatives/antimicrobial-resistance/>

Wright, G.D. (2010). The antibiotic resistome. *Expert opinion on drug discovery*, 5(8), 779–788. <https://doi.org/10.1517/17460441.2010.497535>