



**Facultad de Veterinaria
Universidad Zaragoza**



Trabajo Fin de

Autor/es

Director/es

Facultad de Veterinaria



ÍNDICE

ÍNDICE	1
1. RESUMEN	2
2. INTRODUCCIÓN	4
2.1. Generalidades de <i>Escherichia coli</i>.....	4
2.2. Patotipos de <i>Escherichia coli</i>	4
2.3. Relevancia de la infección por <i>Escherichia coli</i> en el ganado porcino	7
2.4. Control y tratamiento con butirato sódico y β-galactomanano oligosacáridos.....	8
3. JUSTIFICACIÓN Y OBJETIVOS.....	10
4. METODOLOGÍA.....	11
4.1. Toma de muestras	11
4.2. Recuento de colonias de <i>Escherichia coli</i>	11
4.3. Extracción de ADN	12
4.4. Detección de factores de virulencia.....	13
4.5. Análisis estadístico	14
5. RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	15
5.1. Recuento bacteriano	15
5.2. Detección de factores de virulencia.....	17
6. CONCLUSIONES.....	20
7. VALORACIÓN PERSONAL.....	21
8. BIBLIOGRAFÍA	22

1. RESUMEN

Escherichia coli es un microorganismo comensal que forma parte de la microbiota intestinal normal de animales y personas. Existen cepas patógenas que causan enfermedades importantes en la especie porcina, sobre todo en lechones, y están producidas generalmente por cepas de *E.coli* enterotoxigénicas (ETEC). La aparición de resistencias a determinados antibióticos ha llevado a desarrollar medidas alternativas para el control de estas poblaciones, como son los prebióticos, probióticos y ácidos orgánicos.

Los objetivos del presente trabajo son valorar el efecto que tiene la administración de aditivos alimentarios, como butirato sódico (DICOSAN®) y un β -galactomanano oligosacárido (Salmosan®), en el recuento de la población total de *E.coli* en heces procedentes de cerdos y determinar la presencia de factores de virulencia relacionados con el patotipo enterotoxigénico, principalmente fimbrias F4 y enterotoxinas STa, STb y LT. Para ello se administró DICOSAN® a un grupo de cerdos de cebo y se realizaron muestreos de heces en los días 30, 60 y 90 de cebo, y en el sacrificio. Por otro lado, se administró Salmosan® a un grupo de cerdas, realizándose muestreos de heces durante las fases de preparto, parto y destete.

El recuento de la población total de *E.coli* se llevó a cabo en todas las muestras mediante la técnica de las diluciones, utilizando el agar cromogénico Tergitol-7. La presencia de factores de virulencia se determinó en las muestras procedentes de cerdos de cebo mediante la técnica de reacción en cadena de la polimerasa (Multiplex PCR).

Tras realizar el análisis de los datos obtenidos mediante las pruebas t de Student y de Fisher, se observa que los productos utilizados no son efectivos para reducir la carga de *E.coli*, ni para disminuir la presencia de factores de virulencia asociados a las cepas enterotoxigénicas en los cerdos de cebo.

ABSTRACT

Effects of antimicrobial treatments in food additives on the counting of *Escherichia coli* colonies from swine feces and the study of its virulence factors.

Escherichia coli is a component of the normal intestinal flora of both animals and humans. Although most strains are commensal, there are some pathogenic strains that can cause important diseases in swine, mainly piglets, and are usually associated to enterotoxigenic strains of *E.coli* (ETEC). The control of these bacteria used to be with antibiotics but, because of the increase of antimicrobial resistance, other alternatives are being developed by using prebiotics, probiotics and organic acids.

The aims of this study are to assess the administration of food additives, as sodium butyrate (DICOSAN®) and a β -galactomannan oligosaccharide (Salmosan®), on the enumeration of *E.coli* population in feces from pigs and to determine the presence of virulence factors associated with the enterotoxigenic pathotype, mainly F4 fimbriae and STa, STb and LT enterotoxins. To do so, DICOSAN® was administered in a group of fattening pigs and samplings were taken on days 30, 60 and 90 of fattening, and in the slaughter. On the other hand, the diet in a group of sows was supplemented with Salmosan® and feces were sampled on different stages: pre-farrowing, farrowing and weaning.

The counting of *E.coli* total population was carried out in all the samples with the dilution method, using Tergitol-7 as a chromogenic agar. The presence of virulence factors was determined in the samples from fattening pigs through the Multiplex polymerase chain reaction.

The data was analyzed with the Student t-test and Fisher's test, and showed that none of the products were effective to reduce *E.coli* load neither to decrease the presence of virulence factors associated to enterotoxigenic strains in fattening pigs treated with DICOSAN®.

2. INTRODUCCIÓN

Escherichia coli es uno de los microorganismos más habituales que podemos encontrar en el tracto gastrointestinal de muchas especies de mamíferos, incluyendo los humanos, y de aves. Aunque es mayoritariamente inocuo, algunas cepas pueden causar patologías, por lo que se clasifican en categorías (patotipos) según la producción de factores de virulencia y los síntomas que se producen como consecuencia de la infección.

2.1. Generalidades de *Escherichia coli*

Esta bacteria fue descrita en 1885 por el pediatra alemán Theodor Escherich, que la denominó *Bacterium coli commune* y, años más tarde, en 1893, un veterinario danés postuló que esta especie comprendía diversas cepas, siendo algunas patógenas y otras no (Mainil, 2013). Posteriormente, ya en el siglo XX, se le dio el nombre de *Escherichia coli*. Actualmente, está considerado como un microorganismo comensal, ya que se encuentra de manera habitual en la flora intestinal de los animales, aunque también existen cepas patógenas que causan infecciones entéricas y extraintestinales como, por ejemplo, infecciones urinarias, septicemias o meningitis, tanto en animales como en humanos (Kaper *et al.*, 2004).

Se trata de un bacilo Gram negativo perteneciente a la familia *Enterobacteriaceae* y cuyo género comprende distintas especies, entre las que se encuentran: *E.coli*, *E. hermanni*, *E. fergusonii*, *E. vulneris* y *E. blattae*. Es capaz de desarrollarse tanto en presencia como en ausencia de oxígeno, por lo que es considerado como un microorganismo anaerobio facultativo. No forma esporas, fermenta la glucosa y la lactosa, es oxidasa negativo y catalasa positivo. Presenta movilidad gracias a los flagelos peritíricos que rodean el cuerpo del bacilo y está considerada como una bacteria mesófila, ya que puede desarrollarse entre los 35 y los 43°C, aunque su temperatura óptima de crecimiento son los 37°C (Faleiro Naves, 2009).

Presenta una morfología típica de la familia de las enterobacterias, con una membrana citoplasmática rodeada por peptidoglicano y una membrana externa formada por fosfolípidos, proteínas y lipopolisacáridos, que le van a dar forma y rigidez a la bacteria. Los antígenos de superficie, que pueden ser: antígeno O (somático), antígeno H (flagelar) o antígeno K (capsular), se utilizan para realizar su serotipado (Nataro *et al.*, 1998).

2.2. Patotipos de *Escherichia coli*

La patogenicidad de las cepas de *E.coli* viene determinada por la presencia de genes que codifican factores de virulencia, que son moléculas producidas por microorganismos patógenos que contribuyen a la entrada, establecimiento y mantenimiento de la enfermedad en el hospedador, y que permiten diferenciar las cepas patógenas de las comensales

(Donnenberg, 2002). Estas cepas patógenas pueden clasificarse en varios patotipos entéricos como son *E.coli* enterotoxigénicos (ETEC), enteropatogénicos (EPEC), enterohemorrágicos o productores de shigatoxinas (STEC/EHEC), enteroinvasivos (EIEC) y enteroagregativos (EAEC).

Las cepas pertenecientes al patotipo enteropatogénico (EPEC) colonizan el intestino delgado y se adhieren al epitelio, donde van a provocar lesiones de adhesión y borrado. Se caracterizan por estar íntimamente adheridas a la membrana de los enterocitos y occasionar una marcada reorganización del citoesqueleto, observándose además, destrucción de microvellosidades (DebRoy *et al.*, 2001). A diferencia de otras cepas, estas no producen toxinas, aunque existe un factor de virulencia que es responsable de la interacción que se produce entre bacterias y células. Se trata de una proteína de la membrana externa denominada intimina, que está codificada por el gen *eae* y que forma parte de la isla de patogenicidad cromosómica denominada “*locus for enterocyte effacement*” (LEE) (Kaper *et al.*, 2004). Según DebRoy y Maddox (2001), se ha demostrado que estas cepas introducen un receptor propio para la adherencia de la intimina a la membrana de los enterocitos, que es el receptor de intimina translocado (Tir). Las lesiones que se producen por la acción de estas cepas sobre el intestino provocan la alteración de la digestión y absorción de los nutrientes, así como de los fluidos y electrolitos, por lo que se producen diarreas por malabsorción.

Las cepas de *E.coli* enterohemorrágica (EHEC), también denominadas productoras de shigatoxinas (STEC) o verotoxinas (VTEC), elaboran shigatoxinas muy potentes y tienden a colonizar el colon, donde provocan la necrosis de las vellosidades pero no invaden la mucosa (DebRoy *et al.*, 2001), provocando lesiones que derivan en diarreas hemorrágicas. Los factores de virulencia que se presentan en este patotipo son la intimina, como principal adhesina, y las shigatoxinas 1 y 2, codificadas por los genes *stx1* y *stx2*. Estas toxinas pueden actuar de manera local en el colon, dando lugar a colitis hemorrágica, y también en el riñón tras su absorción al torrente sanguíneo, donde provocan una inflamación renal (Kaper *et al.*, 2004). El serotipo más conocido de estas cepas es el O157:H7, que afecta principalmente a humanos debido al consumo de productos contaminados, siendo los rumiantes el principal reservorio de cepas EHEC causantes de enfermedad en personas. Además, existen serotipos específicos que producen la enfermedad de los edemas en los cerdos como consecuencia de la acción de la shigatoxina 2e sobre las células endoteliales de los vasos sanguíneos (DebRoy *et al.*, 2001).

La especie porcina se ve afectada con mayor frecuencia por las cepas de *E.coli* enterotoxigénica (ETEC), que producen diarreas por hipersecreción en los lechones tras el destete. Los factores de virulencia implicados en este patotipo son las adhesinas,

principalmente F4 (K88), F5 (K99), F6 (987P), F41 y F18, y las enterotoxinas, que pueden ser termoestables (ST) o termolábiles (LT).

Las adhesinas son proteínas de superficie que median en la adherencia de las bacterias a las células epiteliales del intestino y, en este patotipo, se trata de fimbrias. Las fimbrias son filamentos encargados de unirse a los enterocitos, siendo las más destacadas la F4 y la F18. Las fimbrias F4 son unas proteínas filamentosas que permiten la adhesión a los receptores F4 específicos, presentes en los bordes de los enterocitos, para así poder colonizar el intestino delgado (DebRoy *et al.*, 2001); mientras que las fimbrias F18 presentan unos apéndices con un patrón en zig-zag y se dividen en dos variantes antigenicas, la F18ab y la F18ac (Fairbrother *et al.*, 2005). Las fimbrias F18ab también se encuentran en las cepas productoras de shigatoxina 2e, por lo que intervienen en el desarrollo de la enfermedad de los edemas en los cerdos.

Las toxinas relacionadas con este patotipo son las enterotoxinas, que se dividen en termolábiles (LT) y termoestables (ST).

La enterotoxina termolábil (LT) es una estructura proteica en la que una subunidad enzimática A se asocia, de manera no covalente, con un pentámero de subunidades B que unen la toxina a su receptor. Esta enterotoxina actúa sobre los enterocitos produciendo la activación de la enzima adenilato ciclase, que genera un nivel excesivo de AMP cíclico (Fairbrother *et al.*, 2005), y va a desencadenar un aumento de la secreción de iones de cloro, sodio y bicarbonato, para provocar una diarrea por hipersecreción que causa deshidratación, acidosis y, en muchas ocasiones, la muerte.

Las enterotoxinas termoestables (ST) se dividen en las de tipo A (STa) y las de tipo B (STb), ambos tipos presentes en aislados de origen porcino. Las de tipo A (STa) son unas proteínas producidas en el intestino, que se unen a la enzima guanilato ciclase y provocan su activación, lo que desencadena un incremento en la cantidad de GMP cíclico en los enterocitos. El aumento de los niveles de GMP inhiben el transporte de sodio y cloro, por lo que se reduce la absorción de electrolitos y agua, originando diarreas (Fairbrother *et al.*, 2005). Las enterotoxinas STb estimulan la secreción de fluidos en el intestino y, aunque no se conoce el mecanismo exacto, puede que esté mediado por la elevación de prostaglandinas E2 en el intestino (Kaper *et al.*, 2004).

Además, existen otros dos patotipos que, aunque no son frecuentes en animales (DebRoy *et al.*, 2001), tienen importancia en la especie humana, como son el enteroinvasivo (EIEC) y el enteroagregativo (EAEC).

La infección por cepas de *E.coli* enteroagregativa se produce por la colonización de la mucosa intestinal, que provoca daño e inflamación en la superficie debido a la secreción de

enterotoxinas y citotoxinas, derivando en diarreas tanto en niños como en adultos. Existe una enterotoxina presente en estas cepas denominada *enteroaggregative Escherichia coli heat-stable enterotoxin 1* (EAST1) que contribuye a la aparición de diarrea acuosa. El patotipo enteroinvasivo (EIEC) está muy relacionado a nivel bioquímico, genético y patogénico con *Shigella* spp., lo que las hace prácticamente indistinguibles (Kaper *et al.*, 2004).

2.3. Relevancia de la infección por *Escherichia coli* en el ganado porcino

El ganado porcino es una especie que puede verse afectada por varios de los patotipos de *E.coli*, produciéndose diferentes patologías en función de la fase productiva en la que se encuentren los animales. Normalmente, son las cepas de *E.coli* enterotoxigénica las que afectan con mayor frecuencia a los cerdos.

La colibacilosis neonatal se produce durante la primera semana de vida de los lechones en lactación y está asociada a camadas de cerdas primerizas con niveles insuficientes de anticuerpos maternales (McOrist, 2015), lo que permite que los microorganismos patógenos se multipliquen en la pared intestinal de los lechones y se generen diarreas.

En la semana siguiente de ser destetados, los lechones pueden verse afectados por la diarrea postdestete asociada, mayoritariamente, a las cepas de *E.coli* enterotoxigénica. Las enterotoxinas producidas por este patotipo y las fimbrias, siendo F4 (K88) y F18 las más frecuentes en las cepas de origen porcino, actúan sobre las células intestinales causando una diarrea por hipersecreción, lo que supone una causa importante de muerte en lechones destetados (Fairbrother *et al.*, 2005). Aunque ETEC es uno de los principales agentes causantes de diarrea en lechones, también puede afectar a cerdos de mayor edad, que podrían contribuir además a su diseminación.

La diarrea postdestete también se puede asociar, aunque con menor frecuencia, a cepas de *E.coli* enteropatogénicas, caracterizadas por la presencia del locus de patogenicidad LEE. Además, hay que tener en cuenta que existen una serie de factores que contribuyen a sufrir la enfermedad como son el estrés del destete, la falta de anticuerpos en la leche de la cerda o los cambios en la dieta, y que van a producir una disminución de la ganancia de peso de estos animales (Fairbrother, 2015). Esta situación implica que se generen grandes pérdidas económicas en la industria porcina, ya que la presencia de esta enfermedad en las granjas repercute en las tasas de crecimiento y mortalidad de los animales (Tsiliyiannis *et al.*, 2001).

Los cerdos que se encuentran en transición pueden sufrir la enfermedad de los edemas, originada por cepas productoras de shigatoxina 2e, las cuales se unen a la mucosa intestinal a través de las adhesinas fimbriales como F18ab (Piñeyro, 2016). Esta patología daña los vasos

sanguíneos produciendo problemas neurológicos y edemas en distintas zonas del organismo como la cabeza, los párpados, la laringe, el estómago y el mesocolon (McOrist, 2015).

2.4. Control y tratamiento con butirato sódico y β -galactomanano oligosacáridos

El uso de antibióticos como promotores del crecimiento ha conseguido durante muchos años controlar las enfermedades intestinales provocadas por bacterias como *Salmonella* spp. o *E.coli*, pero su uso de forma continuada ha dado lugar al desarrollo de resistencias antibióticas, motivo por el cual, a partir de 2006, su administración fue prohibida por la Unión Europea (Reglamento (CE) 1831/2003). Debido a esta situación, se han tenido que buscar alternativas que ayuden a mejorar la salud intestinal de los animales, así como los rendimientos productivos. Estas alternativas incluyen aditivos alimentarios que se añaden a los piensos, como los probióticos, prebióticos, extractos vegetales o ácidos orgánicos (Badia *et al.*, 2012).

Los ácidos orgánicos son componentes que se originan, principalmente, en los procesos de fermentación bacteriana del intestino y entre los que se encuentran los ácidos fórmico, acético, propiónico, butírico, láctico, cítrico y benzoico (NutriNews, 2015). Suelen ser ácidos grasos de cadena corta y su uso está muy extendido en la nutrición porcina por sus propiedades antimicrobianas, que son debidas a que su adición en la dieta provoca una reducción del pH que afecta a la actividad de algunos sistemas enzimáticos de las células y al transporte de nutrientes, por lo que el crecimiento y la multiplicación de los microorganismos se ven limitados (Roth, 2000). Además, la suplementación con estos productos ha demostrado mejoras en las tasas de crecimiento y en los rendimientos productivos de los animales (Fairbrother *et al.*, 2005).

En un estudio realizado por Tsiloyiannis *et al.* (2001) en una granja con problemas de diarreas postdestete, se administró a los animales una dieta suplementada con ácidos orgánicos y el resultado supuso una reducción en la incidencia y severidad de la diarrea, y al final del experimento, las cepas enterotoxigénicas (ETEC) sólo fueron detectadas en los grupos control.

Dentro de los ácidos orgánicos se encuentra el ácido butírico, producido de manera natural en el tracto gastrointestinal, donde previene la infección por *E.coli*, *Enterococcus* y *Salmonella* spp. (Jang *et al.*, 2017) y está disponible en forma de sales de sodio, potasio, magnesio o calcio. En este caso, el butirato sódico es absorbido rápidamente por las células epiteliales intestinales y promueve la absorción de sodio y agua, lo que favorece el crecimiento y diferenciación de las vellosidades intestinales, mejorando el rendimiento de los lechones, su desarrollo intestinal y su sistema inmune (Kotunia *et al.*, 2004).

Por otra parte, existen prebióticos que se utilizan como alternativa a los antibióticos promotores del crecimiento, ya que presentan efecto antimicrobiano y favorecen la proliferación de microorganismos beneficiosos para la flora intestinal. Algunos de estos son los oligosacáridos no digestibles como los fructooligosacáridos, galactooligosacáridos, transgalactooligosacáridos y la lactulosa (Blanch, 2015). Los mananoooligosacáridos, aunque no son considerados prebióticos ya que no favorecen las poblaciones bacterianas beneficiosas, bloquean la adhesión de las bacterias patógenas a los enterocitos previniendo, así, la colonización del intestino y evitando que se presenten patologías entéricas. Este efecto antimicrobiano se produce gracias a que los mananoooligosacáridos se unen a una lectina específica de manosa de los agentes patógenos Gram negativos que expresan fimbrias de tipo 1. Este tipo de fimbrias presenta múltiples subunidades de lectinas que se unen a unidades de mananos de las glicoproteínas presentes en la superficie de las células del hospedador (Andrés-Barranco *et al.*, 2014). La mayoría (>75%) de las cepas de *E.coli*, patógenas y comensales, presentan fimbrias tipo 1 (Vadillo *et al.*, 2002).

Dentro de este grupo se encuentran los β -galactomanano oligosacáridos, que tienen una estructura β -(1-4)-manosa con moléculas de galactosa ramificadas (ratio 1:4). Un estudio realizado por Badia *et al.* (2012) confirma que los β -galactomanano oligosacáridos reducen la adhesión de cepas ETEC con fimbrias F4 (K88) a las células epiteliales intestinales porcinas. Parece ser que los residuos de β -galactosa son esenciales en la adhesión de fimbrias F4 (K88) a los receptores de la mucosa intestinal, por lo que los productos ricos en residuos de galactosa como los β -galactomanano oligosacáridos podrían unirse a la adhesina K88 y actuar como un agente profiláctico en las infecciones gastrointestinales de los cerdos.

3. JUSTIFICACIÓN Y OBJETIVOS

Los antibióticos utilizados como promotores del crecimiento, además de estimular el crecimiento de los animales, también ayudaban en el control de microorganismos patógenos, pero ante su prohibición se están desarrollando nuevas estrategias para conseguir efectos similares en cuanto a rendimiento y sanidad animal. Algunos de estos productos son los aditivos alimentarios, que ayudan a modular la flora intestinal, como los ácidos orgánicos y mananooligosacáridos.

Las cepas comensales de *E.coli*, así como algunas patógenas (STEC), están descritas como bacterias ácido-resistentes. Sin embargo, se desconoce si otros patotipos de *E.coli*, como ETEC, pueden ser más susceptibles al tratamiento con butirato sódico. Por otro lado, los mananooligosacáridos, actúan frente a las fimbrias tipo 1, presentes en la mayoría de cepas comensales y patógenas de *E.coli*.

El objetivo de este trabajo fue valorar el efecto de tratamientos con aditivos alimentarios, tales como butirato sódico (DICOSAN®) y β -galactomanano oligosacáridos (Salmosan®), en el recuento de la población total de *E.coli* en muestras fecales procedentes de cerdos de cebo y madres, mediante la técnica de las diluciones. De esta manera, se ha podido realizar un seguimiento de los resultados obtenidos en las líneas de producción de madres y de cebo, comparando los grupos control y tratamiento, y viendo qué modificaciones se han producido durante el estudio, para comprobar la efectividad de los aditivos alimentarios utilizados.

El patotipo de *E.coli* que afecta con mayor frecuencia a la especie porcina es el enterotoxigénico y su capacidad de producir enfermedad en los animales viene determinada por la presencia de determinados factores de virulencia, en concreto adhesinas y enterotoxinas. Si bien este patotipo es una de las principales causas de diarrea neonatal y postdestete, algunas cepas de *E.coli* enterotoxigénico pueden afectar también a cerdos de todas las edades.

Otro objetivo de este proyecto fue determinar el efecto del tratamiento con butirato sódico en la presencia de factores de virulencia relacionados con el patotipo enterotoxigénico, principalmente F4, STa, STb y LT, mediante la técnica de PCR múltiple. Así se ha podido observar la efectividad de este tratamiento en la infección por ETEC durante la fase de cebo.

4. METODOLOGÍA

4.1. Toma de muestras

Cerdos de cebo. El estudio se realizó en una pequeña granja de cebo cerca de Binéfar (Huesca), que dispone de 8 corrales con una capacidad total aproximada de 110 cerdos. Se administró una dieta con butirato sódico (DICOSAN®) en 4 corrales (grupo tratamiento – T), mientras que en los corrales restantes la dieta administrada fue la misma, pero sin la adición del butirato sódico (grupo control – C). El tratamiento con este aditivo alimentario empezó a los 20 días de la entrada de los animales en el cebadero, tras realizar un tratamiento con amoxicilina y óxido de zinc. Se efectuaron 4 muestreos para el estudio de *E.coli* a partir de heces de 10 cerdos por grupo control y 10 por tratamiento, realizados los días 30, 60 y 90 de cebo y, el último, en el sacrificio.

Madres. Este estudio se realizó por duplicado. En primer lugar se llevaron a cabo muestreos en las fases de preparto (un mes antes del parto) y destete, y en la segunda ocasión en el preparto, parto y destete. En este caso se recogieron muestras fecales de cerdas en grupos control (C) y tratamiento (T). En el grupo tratado, se suplementaba el pienso tres semanas antes del parto con un β -galactomanano oligosacárido (Salmosan®), un producto típicamente utilizado para prevenir la infección de *Salmonella* spp. y promover la salud intestinal. Se obtuvieron, aproximadamente, 8 muestras de heces de cada grupo y en las distintas fases de producción.

4.2. Recuento de colonias de *Escherichia coli*

Para el recuento de las colonias de *E.coli* se utilizó el método de las diluciones, cuyo objetivo es la reducción progresiva de la concentración de una sustancia en disolución, siendo en este caso, las heces muestreadas de cerdos de cebo y madres.

De cada muestra de heces se pesaron 5 gramos y se añadieron a 45 mL de solución salina estéril, creando un volumen final de 50 mL, correspondiente a la primera dilución, 1:10 (10^{-1}). Se transfirió 1 mL de esta preparación a otro tubo de ensayo, que contenía 9 mL de solución salina estéril, para crear una dilución 1:100 (10^{-2}), y así sucesivamente hasta llegar a la dilución 1:100000 (10^{-5}). De cada muestra se guardaron 5 mL de la primera dilución (10^{-1}).

Se transfirieron 100 μ L de cada una de las diluciones, desde la 1:100, a placas con medio Agar Tergitol-7 (Chapman-TTC/Tergitol-7 Agar), un medio cromogénico utilizado para la detección rápida de *E.coli*, y fueron incubadas durante 24 horas a 37°C en aerobiosis. Tras esta incubación, se realizó el recuento de las colonias en una de las placas por muestra, considerando aquella en las que hubiera entre 30 y 300 colonias. El aspecto típico de las

colonias de *E.coli* en este tipo de medio es de color amarillo con el centro naranja y con el medio amarillento.

El número total de UFC/gramo de heces se calculó a partir de la siguiente fórmula:

$$\frac{\text{UFC}}{\text{g}} = \text{nº UFC} \times \frac{1}{0,1 \text{ mL}} \times \frac{1}{\text{dilución seleccionada}}$$

4.3. Extracción de ADN

Paralelamente, se centrifugaron 5 mL de la primera dilución (10^{-1}) a 2250g durante 15 minutos, se eliminó el sobrenadante y se añadieron 4'5 mL de Agua Peptonada (Cultimed) al *pellet* originado, creando una dilución 1:10. Tras incubarse durante 24 horas a 37°C en condiciones de aerobiosis, se transfirió un volumen de 500 μ L de esta solución a 4'5 mL de medio Luria Bertani (LB), usado para el mantenimiento y cultivo de cepas de *E.coli* y cuyo crecimiento se evidencia por la aparición de turbidez en las preparaciones, y se incubó a 37°C durante 24 horas en aerobiosis. Posteriormente, se guardó a -30°C un volumen de 1 mL por duplicado de cada muestra obtenida a partir de la incubación en LB.

La extracción del ADN (**figura 1**) fue llevada a cabo según el protocolo descrito por Rhouma *et al.* (2017). Las muestras obtenidas a partir de la incubación en LB fueron centrifugadas a 11750g durante 5 minutos y se añadió 1 mL de tampón fosfato salino (PBS) al *pellet* obtenido. La mezcla se volvió a centrifugar a 11750g durante 2 minutos y se eliminó el sobrenadante para añadir 1 mL de agua Milli-Q. Esta preparación se llevó a ebullición durante 10 minutos a 100°C e inmediatamente se puso en la cámara de refrigeración para detener la cocción. Se centrifugó de nuevo durante 2 minutos a 11750g y se obtuvo el sobrenadante, que es la fracción que contiene el ADN, que fue congelado a -30°C.

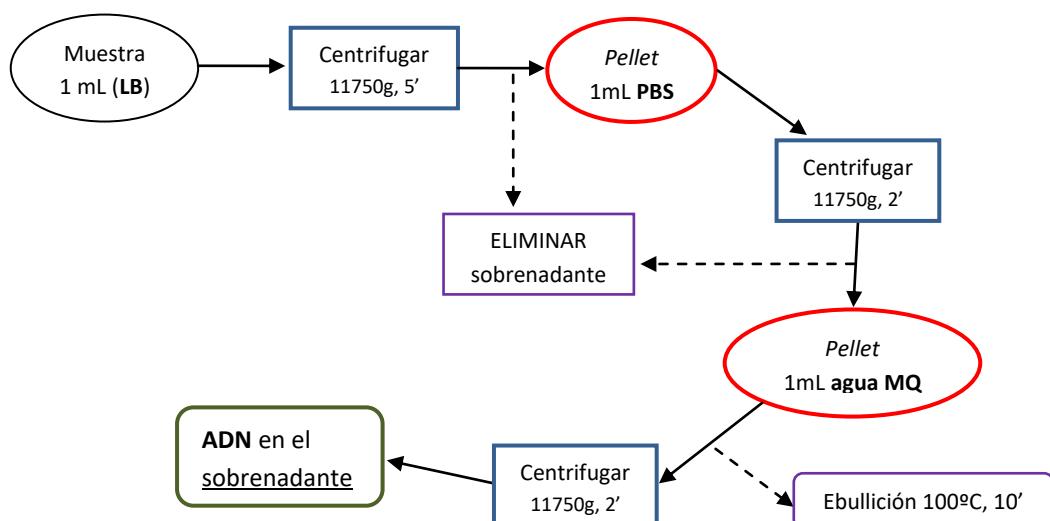


Figura 1. Esquema del procedimiento seguido para realizar la extracción de ADN.

4.4. Detección de factores de virulencia

Tras la extracción de ADN, las muestras fueron llevadas al Centro de Investigación de Encefalopatías y Enfermedades Emergentes, donde se realizaron los procedimientos necesarios para la detección de los genes encargados de codificar los factores de virulencia de interés, como son F4, STa, STb y LT. La técnica utilizada fue la reacción en cadena de la polimerasa múltiple (Multiplex PCR), que permite amplificar varios fragmentos de ADN específicos a través de la enzima ADN polimerasa, siguiendo el procedimiento descrito en el protocolo de “The *Escherichia coli* Laboratory” de la Universidad de Montréal (2013) (http://www.apzec.ca/en/APZEC/Protocols/APZEC_PCR_en.aspx). La combinación de los diferentes reactivos (**tabla 1**) se realizó en una cabina de bioseguridad (Class II Cabinet Telstar BioUltra), y el volumen final obtenido en cada tubo de PCR fue de 25 µL.

Tabla 1. Combinación de reactivos usados para las PCR

Componente	Volumen	Concentración
Muestra de ADN	3 µL	
Agua Milli-Q	3'8 µL	
Buffer PCR (10x)	2'5 µL	
Cloruro de magnesio ($MgCl_2$)	0'35 µL	100 mM
Nucleótidos dNTPs	4 µL	1'25 mM
Taq Polimerasa	0'35 µL	5 U/µL
Cebadores (sentido y antisentido)	STa	5 µM
	LT	10 µM
	STb	10 µM
	F4	10 µM

Aparte de las muestras que se habían procesado, también se añadió en cada PCR un control positivo y otro negativo. En el positivo, la muestra de ADN correspondía a la cepa de *E.coli* ECL 8559, positiva a los cuatro factores de virulencia estudiados; mientras que en el grupo de control negativo, los 3 µL añadidos fueron agua Milli-Q.

Una vez preparados los tubos de PCR, se llevaron al termociclador (2720 Thermal Cycler Applied Biosystems), siguiendo el siguiente protocolo: 95°C durante 2 minutos para la desnaturalización inicial, seguido de 25 ciclos para la desnaturalización a 94°C durante 30 segundos, 58°C durante 30 segundos para la hibridación de los cebadores y 72°C durante 30 segundos para la extensión, finalizando con 72°C durante 7 minutos para que se produjera la elongación final y mantenimiento a 4°C hasta su posterior procesado.

Tras la amplificación, el producto obtenido se visualizó mediante electroforesis en gel de agarosa al 1'8%. El gel de agarosa se preparó disolviendo 1'17 g de agarosa (UltraPure Agarose, Invitrogen) en 65 mL de buffer TBE 1x (Tris, borato y EDTA), y utilizando GelGreen (GelGreen Nucleic Acid Stain 10000x in water, Biotium) como fluorocromo para la tinción del ADN. En cada pocillo del gel se incluyeron 8 μ L de cada producto PCR junto con un 1 μ L de azul de bromofenol, actuando como buffer de carga, y se utilizó un marcador de peso molecular de 100 pb (Gene Ruler 100bp Plus DNA Ladder, Thermo Scientific).

En la siguiente imagen (**Figura 2**) se puede observar la distribución final de las muestras en los pocillos del gel de agarosa.

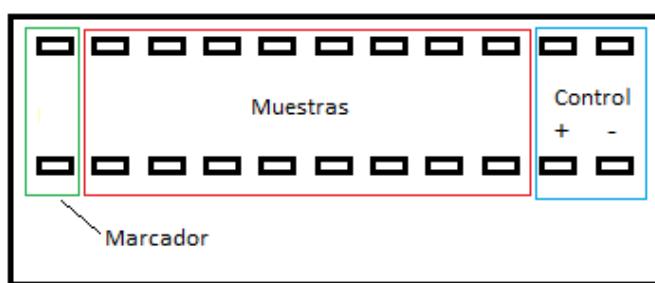


Figura 2. Distribución de las muestras en el gel de agarosa

Los geles se colocaron en una cubeta de electroforesis con buffer TBE 1x conectada a una fuente de alimentación (Electrophoresis Power Supply PS 304 minipac II Apelex), en la que se aplicó un potencial eléctrico de 120V y 50mA durante 50 minutos. Los fragmentos obtenidos tras la migración del ADN amplificado se visualizaron con un analizador de imagen (BioSpectrum 815 Imaging System, Ultra-Violet Products Ltd., Cambridge UK) mediante luz ultravioleta.

4.5. Análisis estadístico

Los datos del recuento bacteriano se expresaron como el logaritmo del número de UFC/g calculado, y se realizó una comparación de las medias logarítmicas entre los valores obtenidos de los grupos control y tratamiento mediante la prueba t de Student.

La comparación de la presencia de cada factor de virulencia entre los grupos control y tratamiento se realizó a través de la prueba de Fisher.

5. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

5.1. Recuento bacteriano

Los resultados de los muestreos microbiológicos realizados a partir de heces de cerdos que se encontraban en la fase de cebo se presentan en la **tabla 2**, en la que se expone la media logarítmica de las UFC/g en el grupo control y tratamiento con DICOSAN® a lo largo de los distintos muestreos.

Tabla 2. Valores de las medias log(UFC/g) de los grupos control y tratamiento de cebo.

Muestreo	Día 30		Día 60		Día 90		Sacrificio	
Grupo	C	T	C	T	C	T	C	T
Media logarítmica	6.10	6.42	6.60	5.95	7.01	6.68	7.79	7.47
<i>p</i> *	0.53		0.0037		0.32		0.25	

Se puede observar (**figura 3**) que existe una ligera disminución de las UFC en el grupo tratamiento con respecto al grupo control, pero no son diferencias significativas, excepto en el muestreo realizado el día 60 de cebo. Durante todo el proceso se produjo un incremento gradual del número de *E.coli* en ambos grupos, aunque más en el grupo control, obteniendo medias mayores a medida que se acercaba el sacrificio.

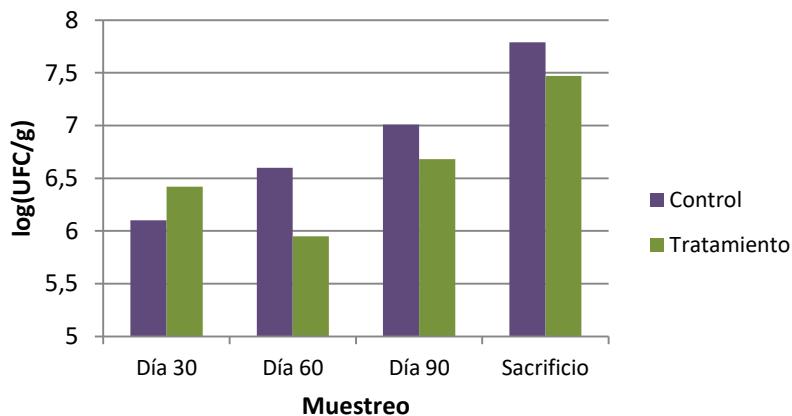


Figura 3. Gráfico de resultados de análisis microbiológicos en cerdos de cebo en distintos períodos para los grupos control y tratamiento con DICOSAN+

Varios estudios han demostrado que la incorporación de ácidos orgánicos en la dieta, como el butirato sódico, disminuyen el pH gástrico y el número de bacterias en el tracto gastrointestinal (Tsiloyiannis *et al.*, 2001) debido a la susceptibilidad que presentan la mayoría de bacterias en medios ácidos. Sin embargo, en este trabajo se produce un aumento progresivo en el recuento de bacterias, y la falta de diferencias en los resultados entre los grupos control y tratamiento podría explicarse por la resistencia que presentan las cepas de *E.coli* a los medios ácidos que, aunque prefieren pH neutros, pueden sobrevivir a pH=2 durante horas (Foster, 2004). Investigaciones realizadas en algunos laboratorios han demostrado que

en la fase estacionaria de la curva de crecimiento de *E.coli* pueden activarse tres sistemas de resistencia a los ácidos que confieren diferentes niveles de protección celular (Richard *et al.*, 2003). El mecanismo del primer sistema de resistencia (AR1) es el menos conocido, pero su funcionamiento está relacionado con los sistemas oxidativos. El segundo sistema (AR2) requiere la enzima glutamato descarboxilasa y proporciona el mayor nivel de protección, ya que funciona a pH inferiores a 2. El tercero (AR3) es dependiente de arginina y funciona a pH superiores a 2'5 (Richard *et al.*, 2003).

En la **tabla 3** se presentan los resultados de los muestreos microbiológicos de las heces procedentes de madres, donde están diferenciados los grupos de muestreo, la fase de producción, y el grupo control y tratamiento con Salmosan®.

Tabla 3. Valores de las medias log(UFC/g) de los grupos control y tratamiento de madres.

Fase	Muestreo 1				Muestreo 2					
	Preparto		Destete		Preparto		Parto		Destete	
Grupo	C	T	C	T	C	T	C	T	C	T
Media logarítmica	6,84	6,40	6,19	6,64	5,96	5,36	5,80	6,97	4,49	5,65
<i>p</i> *	0,5		0,15		0,009		0,07		0,01	

En la **figura 4** se puede observar que en las fases de preparto de ambos muestreos (un mes antes del parto), la cantidad de UFC/g es menor en los grupos tratados con Salmosan®, si bien el tratamiento no comenzó hasta tres semanas antes del parto; en el parto del segundo muestreo se produce una inversión de los resultados, ya que el grupo tratamiento presenta mayor número de UFC/g, aunque la diferencia no es significativa; y en las fases de destete, el grupo tratado mantiene un mayor valor de UFC/g con respecto al grupo control.

En el primer muestreo se produce un ligero aumento de las UFC/g en el grupo tratamiento con respecto al grupo control. Mientras que en el segundo muestreo se produce una disminución progresiva de las colonias en el grupo control, y hay un incremento de las UFC/g en el grupo tratamiento, siendo las diferencias significativas en las fases de preparto y destete.

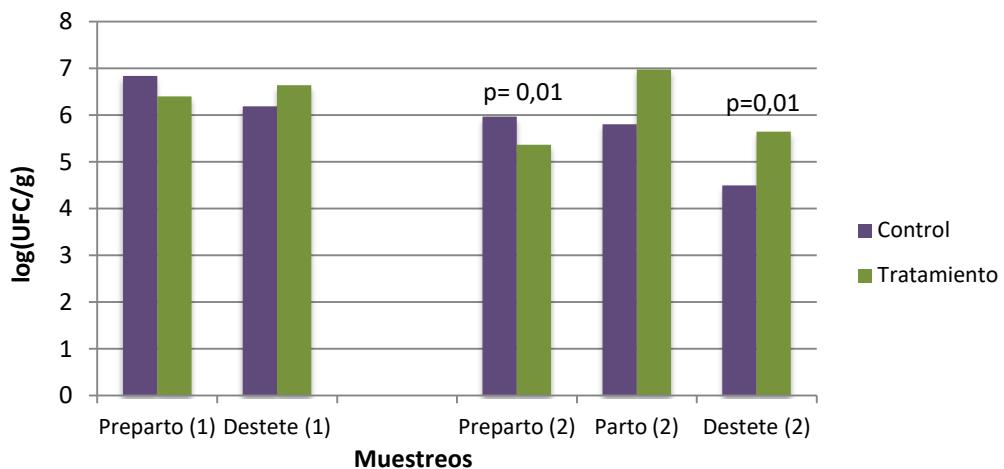


Figura 4. Gráfico de resultados de los análisis microbiológicos de heces de madres en distintas fases para los grupos control y tratamiento con Salmosan®

Como se ha explicado en el apartado 2.4., los mananoooligosacáridos actúan sobre las fimbrias tipo 1 de agentes patógenos Gram negativos y las fimbrias F4 de cepas ETEC. Aparte de *E.coli* existen otros microorganismos, como *Salmonella* spp., que presentan las fimbrias tipo 1, por lo que los productos a base de mananoooligosacáridos también tendrán efectos sobre el control de la población de estas bacterias en el intestino. La explicación de la falta de diferencias entre los grupos control y los grupos tratamiento con Salmosan®, podría ser que los β -galactomanano oligosacáridos tengan mayor efecto sobre las poblaciones de *Salmonella* spp. que las de *E.coli* permitiendo, así, una mayor multiplicación de estos microorganismos. Otra opción podría ser que las cepas ETEC presenten fimbrias distintas a las F4 sobre las que no puedan actuar este tipo de oligosacáridos, por lo que las bacterias podrán seguir uniéndose a las células intestinales y provocar infecciones en los cerdos.

Aunque los recuentos de *E.coli* no se han visto modificados entre los grupos control y tratamiento con Salmosan®, estos productos han demostrado tener efectos beneficiosos en diversos estudios en los que las cerdas suplementadas con mananoooligosacáridos tienen más disponibles las inmunoglobulinas en el calostro, por lo que van a tener un efecto sobre las inmunoglobulinas de los lechones. De esta manera, los lechones consiguen unos pesos más uniformes y sobreviven mejor tras el destete que los lechones de madres no suplementadas (Funderburke, 2006). Así, la adición de estos aditivos alimentarios a la dieta de las cerdas podría ser una buena opción para prevenir la colibacilosis neonatal, que está asociada a cerdas primerizas con un nivel insuficiente de inmunoglobulinas.

5.2. Detección de factores de virulencia

Los resultados obtenidos (**figura 5**) tras la detección de factores de virulencia mediante PCR en las muestras procedentes de cerdos de cebo indican que no hubo muestras positivas al factor

de virulencia F4 entre las analizadas. La enterotoxina STa se encontró en 19 muestras (23'75%), la STb en 12 (15%), y la LT sólo se encontró en 2 muestras (2'5%). La enterotoxina termoestable (ST) apareció de manera más frecuente en el día 60 de cebo, mientras que la termolábil (LT) se encontró en el sacrificio. A pesar de esto, no se observaron diferencias significativas en cuanto a la proporción de los factores de virulencia presentes entre los grupos control y tratamiento en los cuatro muestreos realizados. Aunque en el grupo control se encontró una proporción global de muestras positivas a STa y STb ligeramente superior, esto podría estar relacionado con una mayor cantidad de *E.coli* encontrada en el recuento de las muestras procedentes de este grupo.

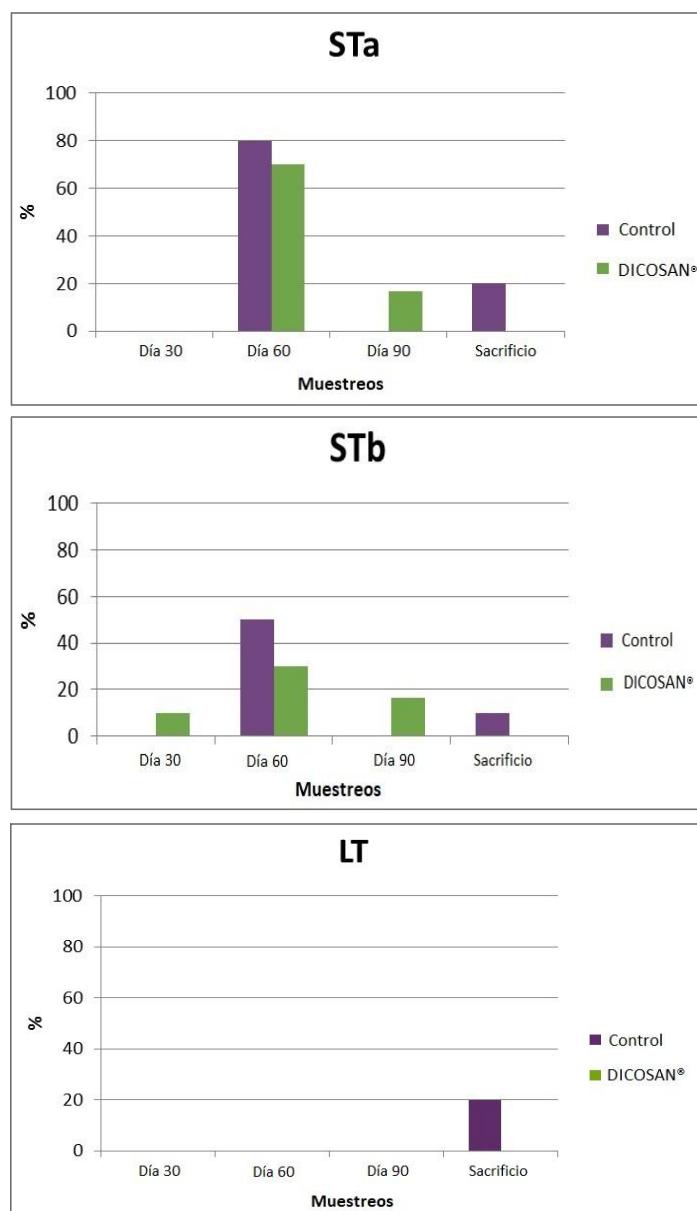


Figura 5. Gráficos sobre la proporción de muestras fecales de cerdo positivas a la presencia de genes STa, STb y LT de ETEC.

Las fimbrias F4 no han sido detectadas en este estudio y esto podría ser debido a que las cepas ETEC portan otras fimbrias como las F18, que también actúan en la adhesión y colonización de *E.coli* a las células epiteliales del intestino.

Las cepas comensales de *E.coli* y algunas cepas patógenas, como STEC, son resistentes a los ácidos. Sin embargo, se desconoce si otros patotipos, como ETEC o EHEC, pueden ser más susceptibles al tratamiento con ácidos orgánicos. Por este motivo, la falta de diferencias entre el grupo tratado con DICOSAN® y el grupo control, en cuanto a la presencia de los factores de virulencia asociados a las cepas ETEC, podría explicarse porque estas cepas sean ácido-resistentes.

6. CONCLUSIONES

Teniendo en cuenta los resultados que se han obtenido a lo largo de este proyecto, podemos concluir:

1. La adición de butirato sódico (DICOSAN®) en el pienso de cerdos de cebo no ha tenido efectos sobre la carga de *E.coli*, produciéndose un incremento progresivo de las UFC/g tanto en el grupo control como en el grupo tratamiento.
2. La administración de un β -galactomanano oligosacárido (Salmosan®) no ha tenido efectos sobre la carga de *E.coli*, siendo los recuentos mayores en los grupos tratamiento del parto y destete.
3. Las muestras procedentes de cerdos tratados con DICOSAN® no han mostrado diferencias con respecto a las del grupo control en la detección de factores de virulencia relacionados con las cepas enterotoxigénicas, por lo que su uso no puede considerarse eficaz para disminuir la presencia de este tipo de cepas patógenas.

CONCLUSIONS

As shown in the results obtained during this project, we can conclude:

1. The addition of sodium butyrate (DICOSAN®) in the feed of fattening pigs had no effect on *E.coli* load, resulting in a gradual increase of CFU/g in both the control and treatment group.
2. The administration of a β -galactomannan oligosaccharide (Salmosan®) to farrowing sows had no effect on *E.coli* load, being the counts in the treatment group higher on farrowing and weaning stages.
3. The samples obtained from fattening pigs treated with DICOSAN® have not shown differences from those in the control group in the detection of virulence factors associated with enterotoxigenic strains. Therefore, the use of this product cannot be considered effective to reduce these pathogenic strains.

7. VALORACIÓN PERSONAL

La realización de este Trabajo de Fin de Grado me ha servido para conocer una pequeña parte de lo que es el mundo de la investigación en veterinaria. Esto me ha permitido poder trabajar en diferentes ámbitos, sobre todo en microbiología, pero pasando también por la genética y la biología molecular. De esta manera, he tenido la oportunidad de poder aplicar algunos de los conocimientos adquiridos a lo largo de la carrera, mejorar mis técnicas de laboratorio y trabajar de una manera ordenada. El trabajo práctico se ha desarrollado a lo largo del curso, por lo que he tenido que compaginarlo con otras actividades docentes, lo que me ha servido para ser más constante con mi trabajo y para aprender a organizar mejor mi tiempo. También he podido conocer de primera mano lo que implica entrar y trabajar en un laboratorio con un nivel de bioseguridad 3, donde se han realizado las PCR, las electroforesis y la lectura de los resultados.

Además, he utilizado distintas herramientas de búsqueda de información para encontrar textos científicos fiables para la redacción del trabajo, que me podrán ser útiles en un futuro. Con la recopilación de los artículos que se han utilizado, he podido conocer mejor cómo actúan *E.coli* y sus diferentes patotipos en el organismo de muchas especies animales.

Por último, me gustaría agradecer a la Dra. Rosa Bolea Bailo la dirección de este proyecto y que me haya permitido realizarlo, y a Eloisa Sevilla Romeo por enseñarme a trabajar en el laboratorio, por su paciencia y dedicación en todo momento.

8. BIBLIOGRAFÍA

- Andrés-Barranco, S., Vico, J.P., Grilló, M.J., y Mainar-Jaime, R.C. (2014).** Reduction of subclinical *Salmonella* infection in fattening pigs after dietary supplementation with a β -galactomannan oligosaccharide. *Journal of Applied Microbiology* 118, 284-294. The Society for Applied Microbiology. DOI: 10.1111/jam.12713
- Badia, R., Zanello, G., Chevaleyre, R., Lizaro, R., Meurens, F., Martínez, P., Brufau, J., y Salmon, H. (2012).** Effect of *Saccharomyces cerevisiae* var. Boulardii and β -galactomannan oligosaccharide on porcine intestinal epithelial and dendritic cells challenged in vitro with *Escherichia coli* F4 (K88). *Veterinary Research*, 43:4. DOI: 10.1186/1297-9716-43-4.
- Blanch, A. (2015).** Probióticos, prebióticos y simbióticos en nutrición y salud animal. *NutriNews* Junio-Julio 2015, Aditivos, 1-6. Disponible en: <http://nutricionanimal.info>
- Blanco, J. (2011).** *Escherichia coli* enteroagregativa O104:H4-ST678 productora de Stx2a. *Enfermedades infecciosas y Microbiología Clínica*, Elsevier, 2012; 30(2):84-89.
- Castillo, J., Martín-Orúe, S.M., Taylor-Pickard, J.A., Pérez, J.F., y Gasa, J. (2007).** Use of mannanoligosaccharides and zinc chelate as growth promoters and diarrhea preventative in weaning pigs: Effects on microbiota and gut function. *Journal of Animal Science*, 2008, 86:94-101. DOI: 10.2527/jas.2005-686
- Cross, A.S. (2008).** What is a virulence factor? *Critical Care* 2008, 12:196. DOI: 10.1186/cc7127
- DebRoy, C., y Maddox, C.W. (2001).** Identification of virulence attributes of gastrointestinal *Escherichia coli* isolates of veterinary significance. *Animal Health Research Reviews* 1(2); 129-140. DOI: 10.1079/AHRR200131
- Dohmann, K., y Strutzberg-Minder, K. (2015).** Diagnóstico de identificación por *Escherichia coli* en cerdos: tipificando aislados de *E.coli*. Disponible en: <http://www.3tres3.com>
- Donnenberg, M. (2002).** *Escherichia coli*. Virulence mechanisms of a versatile pathogen. Elsevier Science (USA).
- Estévez, J., y Carné, S. (2016).** Efectos protectores de los β -galactomananos vegetales sobre la función barrera intestinal. *Industrial Técnica Pecuaria, S.A. (ITPSA)*. *NutriNews* Mayo-Junio 2016. Disponible en: <http://nutricionanimal.info>

Fairbrother, J.M. (2015). *E.coli* asociada a diarrea post-destete. Etiología, signos clínicos y factores de riesgo. Disponible en: <http://www.3tres3.com>

Fairbrother, J.M., Nadeau, E., y Gyles, C.L. (2005). *Escherichia coli* in postweaning diarrhea in pigs: an update on bacterial types, pathogenesis, and prevention strategies. *Animal Health Research Reviews* 6(1); 17-39. DOI: 10.1079/AHR2005105

Faleiro Naves, P.L (2009). Formación de biopelículas por *Escherichia coli* y su correlación con factores de virulencia: prevención y actividad de antimicrobianos frente a organismos planctónicos y asociados a biopelículas (Tesis doctoral). Universidad Complutense de Madrid.

Foster, J.W. (2004). *Escherichia coli* acid resistance: Tales of an amateur acidophile. *Nature Reviews Microbiology* 2, 898-907. DOI: 10.1038/nrmicro1021

Funderburke, D.W. (2006). Effects of dietary supplementation with mannan oligosaccharides on performance of commercial sows and their litters. Disponible en: <http://en.engormix.com>

Guilloteau, P., Martin, L., Eeckhaut, V., Ducatelle, R., Zabielski, R., y Van Immerseel, F. (2010). From the gut to the peripheral tissues: the multiple effects of butyrate. *Nutrition Research Reviews*, 23, 366-384. DOI: 10.1017/S0954422410000247

Jang, Y.D., Lindemann, M.D., Monegue, H.J., y Monegue, J.S. (2017). The effect of coated sodium butyrate supplementation in sow and nursery diets on lactation performance and nursery pig growth performance. *Livestock Science*, 195, 13-20. DOI: 10.1016/j.livsci.2016.11.005

Jiménez Marchan, C. (2012). Diarrea Neonatal por *Escherichia coli*. Disponible en: <http://www.engormix.com>

Kaper, J.B., Nataro, J. P., y Mobley, H.L.T. (2004). Pathogenic *Escherichia coli*. *Nature Reviews*, Volumen 2, 123-138. DOI: 10.1038/nrmicro818

Kotunia, A., Wolinski, J., Laubitz, D., Jurkowska, M., Rome, V., Guilloteau, P., y Zabielski, R. (2004). Effect of sodium butyrate on the small intestine development in neonatal piglets feed by artificial sow. *Journal of Physiology and Pharmacology* 55, Suppl 2, 59-68.

Laboratory for *Escherichia coli* (2013). Identification of Animal Pathogenic and Zoonotic *Escherichia coli* by Polymerase Chain Reaction (PCR). Universidad de Montréal. Disponible en: http://www.apzec.ca/en/APZEC/Protocols/APZEC_PCR_en.aspx

Luppi, A., Gibellini, A.M., Gin, T., Vangroenweghe, F., Vandenbroucke, V., Bauerfeind, R., Bonilauri, P., Labarque, G., y Hidalgo, A. (2016). Prevalence of virulence factors in enterotoxigenic *Escherichia coli* isolated from pigs with post-weaning diarrhea in Europe. *Porcine Health Management*. DOI: 10.1186/s40813-016-0039-9

Mainil, J. (2012). *Escherichia coli* virulence factors. *Veterinary immunology and immunopathology*, volume 152, p. 2-12. Editorial: Elsevier Science. Disponible en: <http://orbi.ulg.ac.be>

McOrist, S. (2015). Diarrea, vacunación y estrategias de prevención asociadas a *Escherichia coli* en los cerdos. *Revista Suis* 120, Septiembre. Disponible en: <http://albeitar.portalveterinaria.com>

Nataro, J.P., y Kaper, J.B. (1998). Diarrheagenic *Escherichia coli*. *Clinical Microbiology Reviews*, p. 142-201. American Society for Microbiology.

NutriNews, Mayo 2015. Los ácidos orgánicos en la alimentación animal. Disponible en: <http://nutricionanimal.info>

Pierce, J., Marien, M., y Goossens, T. (2014). Butyrate: Feeding the gut and beyond for animal health. Disponible en: <http://en.engormix.com>

Piñeyro, P. (2016). Vaccination strategies for the prevention of oedema disease and diarrhea caused by *E.coli*. *Oedema disease (1/2)*. Disponible en: <http://www.pig333.com>

Rhouma, M., Fairbrother, J.M., Thériault, W., Beaudry, F., Bergeron, N., Laurent-Lewandowski, S., y Letellier, A. (2017). The fecal presence of enterotoxin and F4 genes as an indicator of efficacy of treatment with colistin sulfate in pigs. *BMC Microbiology* 17:6. DOI: 10.1186/s12866-016-0915-0

Richard, H.T., y Foster, J.W. (2003). Acid resistance in *Escherichia coli*. *Advances in applied microbiology*, volume 52, 167-186. Elsevier. DOI: 10.1016/S0065-2164(03)01007-4

Roth, F.X. (2000). Los ácidos orgánicos en nutrición porcina: Eficacia y modo de acción. XVI Curso de Especialización FEDNA, 169-181.

Stenutz, R., Wientraub, A., y Widmalm, G. (2006). The structures of *Escherichia coli* o-polysaccharide antigens. *FEMS Microbiology Reviews*, Volume 30, Issue 3, 382-403.

Tsiloyiannis, V.K., Kyriakis, S.C., Vlemmas, J., y Sarris, K. (2001). The effect of organic acids on the control of porcine post-weaning diarrhea. *Research in Veterinary Science*, 70, 287-293. DOI: 10.1053/rvsc.2001.0476

Vadillo, S., Píriz, S., y Mateos, E. (2002). Manual de Microbiología Veterinaria. McGraw-Hill/Interamericana.

Zentek, J., Ferrara, F., Pieper, R., Tedin, L., Meyer, W., y Vahjen, W. (2014). Effects of dietary combinations of organic acids and medium chain fatty acids on the gastrointestinal microbial ecology and bacterial metabolites in the digestive tract of weaning piglets. *American Society of Animal Science*. DOI: 10.2527/jas2012-5673

Zhang, W., Berberov, E.M., Freeling, J., He, D., Moxley, R.A., y Francis, D.H. (2006). Significance of heat-labile and heat-labiles enterotoxins in porcine colibacillosis in an additive model for pathogenicity studies. *Infection and immunity*, June 2006, p. 3107-3114.