

Doctorado en Ciencia Animal

Tesis

Impacto del uso de antibióticos en la cerda gestante sobre
la salud intestinal del lechón lactante

Por: María Belén Fernández Paggi

Facultad de Ciencias Veterinarias

U.N.C.P.B.A.



2018

Doctorado en Ciencia Animal

Tesis

Impacto del uso de antibióticos en la cerda gestante sobre la
salud intestinal del lechón lactante

Por: María Belén Fernández Paggi

Director: Dr. Alejandro Luis Soraci

Codirectora: Dra. María Ofelia Tapia

Facultad de Ciencias Veterinarias

U.N.C.P.B.A.

Miembros del Jurado:

Dr. José Ignacio Badiola Sáiz

Dra. Nori G. Tolosa de Talamoni

Dr. Adrián L. Lifschitz

Dedicatoria

A mi familia por su acompañamiento y apoyo incondicional...

A mis padres, Esther y Jorge

A mi hermana, Laura

A mi abuela, María Esther

A mi pareja, Martín

Agradecimientos

Quiero agradecer especialmente a mis directores, el *Dr. Alejandro Soraci* y la *Dra. Ofelia Tapia* por su confianza para poder desempeñarme y formarme en su grupo de trabajo, al cual valoro y aprecio mucho. Por trasmitirme su pasión por la investigación y sus conocimientos en lo académico y en el trabajo en equipo. Por invitarme a participar desde la finalización de mi carrera de grado. Por incluirme en la participación en diferentes proyectos desarrollados por el grupo. Por apoyarme y permitir mi crecimiento en la docencia, a nivel personal y profesional.

A mis compañeras de trabajo y amigas, *Guadalupe Martínez, María Belén Riccio, Denisa Soledad Pérez Gaudio, Julieta Decundo* y *Agustina Romanelli* les agradezco por su acompañamiento, apoyo incondicional en el trabajo y por aconsejarme y contenerme en aspectos personales de la vida. A *Guadalupe Martínez* le agradezco su gran colaboración y enseñanza desde el inicio de mi trabajo en el laboratorio. Por su ayuda en el desarrollo de metodologías y en la recolección de muestras. A *Susana Diéguez* y *Julieta Decundo* les quiero agradecer por su colaboración y dedicación en el desarrollo y puesta a punto de metodologías analíticas en el laboratorio. A *Fabian Amanto*, con quien comencé a dar mis primeros pasos en la producción porcina desde el cuarto año de estudio trabajando en granjas y con quien inicié mi inserción en la docencia, trabajos de extensión y con productores, le agradezco infinitamente su apoyo y acompañamiento. A *Laura Denzoin Vulcano* le doy gracias por enseñarme sobre la observación de cortes histológicos al microscopio óptico. A *Rocío Collelo, Analía Echeverría* y *Nora Lía Padola* les doy gracias por enseñarme en los cultivos bacterianos. A *Fernanda Vega* y *Cristina Monteavaro* les agradezco infinitamente su tiempo, dedicación y enseñanza en el desarrollo y puesta a punto del cultivo de bifidobacterias. A *Edgardo Rodríguez* le quiero agradecer su ayuda en el análisis estadístico de los datos y por brindarme su tiempo para la aclaración de dudas. A *María Inés Rifé* le agradezco por su colaboración y excelente predisposición cada vez que le solicité ayuda. Y también por sus consejos y aliento para seguir adelante.

Quiero agradecer especialmente a nuestra casa de estudios, la *Facultad de Ciencias Veterinarias de la UNCPBA*, de la cual soy graduada de la Carrera de Veterinaria, por haberme permitido desempeñar mi trabajo de Tesis y tareas de docencia.

RESUMEN

La presencia de residuos antimicrobianos en calostro y leche puede ocasionar alteraciones en el normal crecimiento y desarrollo del tracto gastrointestinal de los lechones afectando las etapas de lactancia, recría y terminación. Entre los antibióticos más utilizados en las producciones intensivas en nuestro país y Latinoamérica se encuentran la fosfomicina (FOS) y la oxitetraciclina (OTC). El objetivo general de esta Tesis fue estudiar la eliminación calostralláctea de los antibióticos FOS y OTC en cerdas luego de su administración durante el peri-parto y los potenciales efectos de dichas concentraciones antibióticas sobre la morfo-fisiología intestinal y los parámetros zootécnicos/productivos de la camada. Se desarrollaron tres objetivos específicos. 1. *Estudiar la disposición de los antibióticos FOS y OTC en calostro y leche de cerda, luego de la administración IM durante el peri-parto.* Cuarenta y cuatro cerdas gestantes fueron inducidas al parto el día 114 de gestación con 1 mL de PGF2 α vía IM y divididas en cinco grupos experimentales: cerdas Control: tratadas con solución fisiológica, cerdas FOS1: tratadas con una dosis IM de FOS de 15 mg/Kg al momento de la inducción al parto, cerdas OTCLA: tratadas con una dosis IM de OTC LA (larga acción) de 20 mg/Kg al momento de la inducción al parto, cerdas FOS3: tratadas con tres dosis IM cada 24 h de FOS de 15 mg/Kg y cerdas OTC3: tratadas con tres dosis IM cada 24 h de OTC de 6 mg/Kg. Se recolectaron manualmente muestras de calostro y leche al inicio del parto (0 h) y a las 2, 4, 6, 8, 10, 12, 24 y 48 h post-parto, las cuales fueron analizadas por HPLC. La FOS disódica según un plan posológico mono y multidosis mostró perfiles de eliminación calostrales y lácteos diferentes (FOS1 AUC₀₋₄₈: 8,56 \pm 2,09 y FOS3 AUC₀₋₄₈: 80,62 \pm 60,66 μ g.h/mL). La concentración media de FOS eliminada en el calostro para FOS1 fue de 0,83 \pm 0,04 μ g/mL durante las primeras 10 h y para FOS3 de 1,55 \pm 0,36 μ g/mL durante las primeras 24 h pos parto. Para la OTC ambas curvas de eliminación calostralláctea presentaron perfiles similares, aunque los valores obtenidos para OTCLA (AUC₀₋₄₈: 28,36 \pm 16,71 μ g.h/mL) fueron levemente mayores a los cuantificados para el grupo OTC3 (AUC₀₋₄₈: 18,91 \pm 5,92 μ g.h/mL). La concentración media de OTC eliminada en el calostro durante las primeras 24 h después del inicio del parto fue de 0,78 \pm 0,18 y 0,48 \pm 0,07 μ g/mL para OTCLA y OTC3 respectivamente. Los cambios hormonales que explican el pasaje de la fase calostrala a la fase láctea impactan en la eliminación de FOS en calostro y leche, mientras que para el caso de la OTC ésta influencia no sería tan importante. Las concentraciones de FOS eliminadas en calostro y leche se mantuvieron por encima de la CIM₉₀ durante más de 8 h para bacterias patógenas de importancia productiva e involucradas en procesos infecciosos de mastitis y/o metritis (*Escherichia coli* y *Streptococcus sp.* CIM₉₀: 0,5-0,25 μ g/mL,

respectivamente). Sin embargo, los valores de OTC cuantificados en calostro y leche no alcanzaron la CIM₉₀ en ningún momento para *Escherichia coli* (CIM₉₀: > 64 µg/mL) y *Streptococcus suis* (CIM₉₀: 64 µg/ml). 2. *Determinar el consumo de calostro, la ingesta de concentraciones de FOS y OTC y su impacto sobre los parámetros zootécnicos de la camada luego de la administración de dichos antibióticos a cerdas durante el peri-parto.* Cuatrocientos treinta y seis lechones progenie de las cerdas de los grupos Control, FOS1, FOS3 y OTC3 fueron divididos en cuatro grupos de 110 animales cada uno aproximadamente. Se realizó el estudio del consumo medio de calostro por lechón (g/Kg PV) y la producción de calostro por cerda (g) durante las primeras 24 h después del parto, la determinación de la ingesta de FOS y OTC (mg/Kg PV) con el calostro, el efecto de la ingestión de calostro con antibióticos sobre los parámetros zootécnicos de la camada donde se evaluó el score de vitalidad al nacimiento, el número de lechones nacidos totales (NT) y nacidos vivos (NV), el número de muertos durante la lactancia, el número de lechones destetados a los 21 días de vida y el peso de los lechones en diferentes momentos de la lactancia. El tratamiento de las cerdas durante el peri-parto con FOS u OTC no afectó la producción de calostro, ni el consumo por parte de los lechones. Tampoco tuvo influencia sobre los parámetros zootécnicos de sus respectivas camadas. 3. *Evaluar los efectos de FOS y OTC sobre la morfo-fisiología intestinal de los lechones neonatos.* Treinta y dos lechones neonatos, hijos de 8 cerdas libres de antibióticos, fueron divididos en cuatro grupos y alimentados artificialmente con calostro según el siguiente esquema: lechones Control*: calostro sin antibióticos, lechones FOS1*: tratados con 0,26 mg/Kg PV de FOS, lechones FOS3*: tratados con 0,50 mg/Kg PV de FOS y lechones OTC3*: tratados con 0,13 mg/Kg PV de OTC. Los animales fueron eutanasiados a las 12 y 24 h de lactancia. Las concentraciones de FOS y OTC administradas con calostro vía oral en lechones no afectaron el recuento de enterobacterias, bacterias ácido-lácticas y relación E/BAL, pH gastrointestinal y producción de ácido acético a las 12 y 24 h de lactancia. Se observó un incremento en las UFC de las bifidobacterias en los lechones tratados con FOS3* sobre los lechones OTC3*. La estimación matemática de la superficie de absorción intestinal no presentó diferencias significativas. Se observó efecto de lugar de muestreo para el recuento de las células caliciformes, siendo mayor a nivel de íleon en vellosidades y criptas. También se observó efecto de los tratamientos en las criptas. En el estudio de la actividad de las disacaridasas intestinales, el efecto del lugar de muestreo presentó diferencias significativas, siendo superiores los niveles encontrados en el duodeno que en las otras porciones del intestino estudiado para lactasa, maltasa y sacarasa. Los resultados obtenidos para sacarasa y maltasa no fueron concluyentes. La variabilidad de los resultados puede adjudicarse a la categoría de animales empleada más que a un efecto de tratamiento, ya que la

actividad de ambas enzimas es baja durante la lactancia y adquiere mayor importancia en la etapa de recría cuando los cerdos reciben alimento sólido. Se debe tener en consideración que concentraciones de antibióticos eliminadas por calostro pueden inducir el desarrollo de resistencia bacteriana. Los resultados obtenidos en esta Tesis son innovadores y relevantes para la producción porcina, por lo que este trabajo estimula la concientización sobre el uso adecuado de los antimicrobianos en la sala de partos.

ABSTRACT

The presence of antimicrobial residues can cause alterations in the normal growth and development of the gastrointestinal tract of the piglets, affecting the stages of lactation, rearing and termination. Fosfomycin (FOS) and oxytetracycline (OTC) are among the antibiotics most frequently used in intensive production systems in our country and Latin America. The general objective of this Thesis was to study the elimination of the antibiotics FOS and OTC in colostrum and milk of sows after their administration during the peri-partum and the potential effects of these antibiotics on the intestinal morpho-physiology and the zootechnical/productive parameters of the litter. Furthermore, three specific objectives were proposed. *1. To study the disposition of the antibiotics FOS and OTC in sow colostrum and milk after the IM administration during the peri-partum.* Farrow was induced in forty-four pregnant sows on day 114 of gestation with 1 mL of PGF₂ α by the IM route. Sows were divided into five experimental groups: Control sows: treated with physiological solution, FOS1 sows: treated with an IM dose of FOS (15 mg/Kg) at the time of farrow induction, OTCLA sows: treated with an IM dose of OTC LA (long action) (20 mg/Kg) at the time of farrow induction, FOS3 sows: treated with three FOS IM doses every 24 h (15 mg/Kg) and OTC3 sows: treated with three OTC IM doses every 24 h (6 mg/Kg). Colostrum and milk samples were manually collected at the start of farrow (0 h) and at 2, 4, 6, 8, 10, 12, 24 and 48 h post-partum. Samples were analyzed by High-Performance Liquid Chromatography (HPLC). According to a mono- and multi-dose regime, disodic FOS showed different colostrum and milk elimination profiles (FOS1 AUC₀₋₄₈: 8.56 \pm 2.09 and FOS3 AUC₀₋₄₈: 80.62 \pm 60.66 μ g.h/mL). The mean concentration of FOS eliminated in colostrum for FOS1 was 0.83 \pm 0.04 μ g/mL during the first 10 h and for FOS3 of 1.55 \pm 0.36 μ g/mL during the first 24 h post-partum. The elimination of FOS in sow colostrum and milk is mainly dependent on the morpho-functional mammary changes of the sow (opening of the close junctions between the lactocytes), which occur during the passage from the colostrum to the milk phase. This is particularly associated with the physico-chemical characteristics of high water solubility and low molecular weight of FOS. Colostrum and milk elimination curves of OTC presented similar profiles, although the values obtained for OTCLA (AUC₀₋₄₈: 28.36 \pm 16.71 μ g.h/mL) were slightly higher than those quantified for the OTC3 group (AUC₀₋₄₈: 18.91 \pm 5.92 μ g.h/mL). The mean concentration of OTC eliminated in colostrum during the first 24 h after the onset of farrow was 0.78 \pm 0.18 and 0.48 \pm 0.07 μ g/mL for OTCLA and OTC3, respectively. Unlike FOS, it is apparent that passive diffusion is the main mechanism for the arrival of the

antibiotic from plasma to colostrum through mammary epithelial cells. The concentrations of FOS eliminated in colostrum and milk were maintained above MIC₉₀ for more than 8 h for pathogenic bacteria of productive importance and which are involved in infectious processes of mastitis and/or metritis (*Escherichia coli* and *Streptococcus sp.* MIC₉₀: 0.5-0.25 µg/mL, respectively). However, OTC values quantified in colostrum and milk did not reach the MIC₉₀ for *Escherichia coli* (MIC₉₀: > 64 µg/mL) and *Streptococcus suis* (MIC₉₀: 64 µg/mL), at any time.

2. *To determine the consumption of colostrum, the intake of FOS and OTC concentrations and the impact on the zootechnical parameters of the litter after the administration of these antibiotics to the sows during the peri-partum.* Four-hundred and thirty-six piglets, which were the progeny of the sows of the Control, FOS1, FOS3 and OTC3 groups were divided into four groups of approximately 110 animals each. In this study, the average consumption of colostrum per piglet (g/Kg body weight [BW]), the production of colostrum per sow (g) during the first 24 h after farrow, the determination of the intake of FOS and OTC (mg/Kg BW) with the colostrum and the effect of the ingestion of colostrum with antibiotics on the zootechnical parameters of the litter were analyzed. In the latter case, the vitality score at birth, the number of total-born (TB) and live-born (LB) piglets, the number of dead piglets during lactation, the number of piglets weaned at 21 days of age and the weight of piglets at different times of lactation, were evaluated. The treatment of the sows during the peri-partum with FOS or OTC did not affect the production of colostrum, nor the consumption by the piglets. Furthermore, there was no influence on the zootechnical parameters of their respective litters.

3. *To evaluate the effects of FOS and OTC on the intestinal morpho-physiology of neonate piglets.* Thirty-two newborn piglets from 8 antibiotic-free sows, which were divided into four groups and artificially fed with colostrum according to the following scheme: Control piglets*: colostrum without antibiotics, FOS1* piglets: treated with 0.26 mg/Kg BW of FOS, FOS3* piglets: treated with 0.50 mg/Kg BW of FOS and OTC3* piglets: treated with 0.13 mg/Kg BW of OTC. The animals were euthanized at 12 and 24 h of lactation. The concentrations of FOS and OTC administered with oral colostrum in piglets did not affect the count of enterobacteria, lactic acid bacteria and E/BAL ratio, gastrointestinal pH and production of acetic acid at 12 and 24 h of lactation. An increase in CFU of bifidobacteria was observed in piglets treated with FOS3* with respect to OTC3* piglets. The mathematical estimation of the intestinal absorption surface did not show significant differences. The effect of sampling site was observed for the counting of goblet cells, being higher in villi and crypts at the ileum level. The effect of the treatments on the crypts was also observed. In the study of the activity of the intestinal disaccharidases, the effect of the place of sampling presented significant differences, being higher the levels found for lactase, maltase and sucrase

in the duodenum than in the other portions of the intestine. The results obtained for sucrase and maltase are not conclusive. Rather than a treatment effect, the variability of the results can be attributed to the category of animals used, since the activity of both enzymes is low during lactation and acquires relevance in the stage of rearing when the pigs receive solid food. It must be taken into consideration that concentrations of antibiotics eliminated by colostrum can induce the development of bacterial resistance. The results obtained in this Thesis are innovative and relevant for pig production and therefore, stimulates awareness about the proper use of antimicrobials in the farrowing room.

ABREVIATURAS

AGVs: ácidos grasos volátiles

AUC: área bajo la curva concentración vs. tiempo

AUC₀₋₄₈: área bajo la curva concentración vs. tiempo de cero a cuarenta y ocho horas

CIM₉₀: concentración que inhibe el 90% de las cepas

C_{max}: concentración máxima

CV: coeficiente de variación

E/BAL: relación enterobacterias/bacterias ácido-lácticas

EEM: error estándar de la media

E2: estradiol-17 β

F: biodisponibilidad

FOS: fosfomicina

FUD: fudosteína

H&E: hematoxilina y eosina

HPLC: cromatografía líquida de alta resolución

HPLC-MS/MS: cromatografía líquida de alta resolución, acoplada a un detector de masas

HPLC-UV: cromatografía líquida de alta resolución, acoplada a un detector ultravioleta

Ig's: inmunoglobulinas

IM: intramuscular

M: superficie de absorción intestinal

OTC: oxitetraciclina

P4: progesterona

PAS: ácido peryódico Schiff

PGF_{2 α} : prostaglandina-F_{2 α}

PM: peso molecular

PO: oral

PRL: prolactina

PV: peso vivo

SAI: superficie de absorción intestinal

T_{max}: tiempo en alcanzar la concentración máxima

TTC: tetraciclinas

UFC: unidades formadoras de colonia

PALABRAS CLAVES

Fosfomicina, oxitetraciclina, cerda gestante, lechón lactante, calostro, ingesta de antibióticos, morfo-fisiología intestinal, parámetros zootécnicos.

ÍNDICE

DEDICATORIA	I
AGRADECIMIENTOS	II
RESUMEN	III
ABSTRACT	VI
ABREVIATURAS	IX
PALABRAS CLAVES	X

Introducción general	5
Hipótesis	6
Objetivo general	6
Objetivos específicos	7

CAPÍTULO I: CONOCIMIENTO ACTUAL SOBRE LA TEMÁTICA

Importancia de la Producción Porcina en Argentina	9
Uso de antimicrobianos en la producción de cerdos	10
El tracto intestinal del lechón	11
Calostro.....	15
Moléculas antibióticas	23
Fosfomicina	23
Oxitetraciclina	25
Pasaje de fármacos a fluidos mamarios (calostro y leche)	28

CAPÍTULO II: SECCIONES EXPERIMENTALES

SECCIÓN EXPERIMENTAL I

Determinación de concentraciones residuales de fosfomicina y oxitetraciclina en calostro y leche de cerda

Introducción.....	32
Objetivo	33
Materiales y métodos.....	33
Resultados.....	43
Discusión	50

SECCIÓN EXPERIMENTAL II

Estudio de la ingesta neonatal de fosfomicina y oxitetraciclina en calostro y leche e impacto sobre los parámetros zootécnicos de la camada

Introducción.....	56
Objetivo	57
Materiales y métodos.....	57
Resultados.....	61
Discusión	65

SECCIÓN EXPERIMENTAL III

Impacto del consumo de fosfomicina y oxitetraciclina con el calostro sobre la morfo-fisiología, la actividad enzimática y la microbiología intestinal de los lechones lactantes

Introducción.....	68
Objetivo	70
Materiales y métodos.....	70
Resultados.....	79
Discusión	96

CAPITULO III

Conclusiones Generales.....	101
Publicaciones y Comunicaciones surgidas de esta Tesis.....	103
Referencias Bibliográficas.....	105

INTRODUCCIÓN GENERAL

La producción porcina es una de las actividades intensivas que se encuentra en franco desarrollo en Argentina gracias a la incorporación e implementación de nuevas tecnologías eficientes y rentables. Actualmente, la producción porcina moderna ha alcanzado ritmos de crecimiento acelerados que conllevan a un delicado equilibrio entre el estatus sanitario de los animales y la posibilidad de contraer enfermedades, alterando, entre otros, los parámetros productivos de la granja, como ganancia de peso, conversión alimenticia y mayor número de días entre nacimiento y venta. Los avances en la selección genética porcina han permitido importantes cambios en la productividad en la última década. Las cerdas modernas producen camadas más numerosas, de aproximadamente 16 lechones/cerdas con un promedio de destete de 25 a 30 lechones/cerda/año (Rooke y Bland, 2002; Martineau y Badouard, 2009). Al nacer, estas camadas muestran una gran variabilidad de peso (CV: 23% en camadas con más de 11 lechones) (Beaulieu *et al.*, 2010; Baxter *et al.*, 2013; Rutherford *et al.*, 2013), haciendo particularmente a los lechones de bajo peso, más vulnerables a contraer enfermedades (Quiniou *et al.*, 2002; Foxcroft *et al.*, 2006; De Vos *et al.*, 2014), causando importantes pérdidas económicas (De Vos *et al.*, 2014). Además, las camadas más grandes se asocian con tiempos de parto más prolongados, lo que incrementa el riesgo de hipoxia en lechones recién nacidos, especialmente aquellos que nacen en último lugar (White *et al.*, 1996; Theil *et al.*, 2014). Los problemas entéricos, especialmente en lechones, son otras de las principales causas de pérdidas económicas en la industria porcina. Para enfrentar las potenciales problemáticas sanitarias derivadas de camadas de cerdas hiperprolíficas, una práctica común en las granjas porcinas, es la utilización de antibióticos de forma terapéutica y subterapéutica para el control de estos problemas. La medicación sistemática de cerdas, en los días previos y posteriores al parto, con el objetivo de reducir la carga bacteriana potencialmente patógena a la cual serán expuestos los lechones al nacimiento, conlleva al pasaje de concentraciones residuales de antimicrobianos a calostro y leche (Fleishaker, 2003; Fernández Paggi *et al.*, 2012). La FOS y la OTC son dos antibióticos ampliamente utilizados con estos propósitos.

La fosfomicina (ácido cis-1,2-epoxipropilfosfónico, FOS) es un antibiótico bactericida de amplio espectro (Escolar Jurado *et al.*, 1998; Popovic *et al.*, 2010) ampliamente utilizado en granjas de cerdos en Argentina, Brasil, Centroamérica y Sudeste de Asia para el tratamiento de diversas enfermedades infecciosas (Pérez *et al.*, 2014). Particularmente en lechones de destete, FOS está indicada para el tratamiento de una amplia variedad de infecciones bacterianas (*Haemophilus parasuis*, *Streptococcus suis*, *Pasteurella multocida*, *Bordetella bronchiseptica*,

Staphylococcus hyicus, *Escherichia coli*) asociadas con el estrés (Martineau, 1997). Los aspectos farmacocinéticos y concentraciones residuales de FOS en diversas matrices biológicas de origen porcino han sido estudiados por nuestro grupo de investigación (Pérez *et al.*, 2011; Soraci *et al.*, 2011a; Soraci *et al.*, 2011b).

La oxitetraciclina (OTC) (4*S*,4*aR*,5*S*,5*aR*,6*S*,12*aS*)-4-(dimetilamino)-3,5,6,10,11,12a-hexahidroxi-6-metil-1,12-dioxo-1,4,4*a*,5,5*a*,6,12,12*a* octahidrotetraceno-2-carboxamida, es un antibiótico bacteriostático, perteneciente al grupo de las tetraciclinas, de mayor liposolubilidad que la fosfomicina y de amplio uso en la producción porcina (Papadoyannis *et al.*, 2000). En producciones intensivas, se utiliza para el tratamiento de enteritis bacteriana (diarrea, colibacilosis), neumonía, leptospirosis, rinitis atrófica, erisipela, infecciones post-quirúrgicas, infección umbilical/articular. En cerdas se la emplea en el control de las enteritis infecciosas (diarreas de los recién nacidos, colibacilosis en los lechones), en el síndrome MMA (mastitis-metritis-agalactia) y en infecciones bacterianas secundarias a enfermedades víricas (Prescott y Baggot, 1993).

La información científica sobre el efecto de la exposición de la mucosa intestinal y la microbiota de los lechones neonatos a residuos de los antibióticos FOS y OTC vehiculizados en calostro/leche es limitada. Es por ello que el propósito de este proyecto de Tesis fue determinar el impacto del uso de dichos antibióticos en la cerda gestante sobre la salud intestinal del lechón lactante.

HIPÓTESIS

En base a lo expuesto se propuso la siguiente hipótesis:

La eliminación de concentraciones antibióticas de FOS y OTC a través de calostro-leche en la cerda impacta sobre la morfo-fisiología intestinal y los parámetros zootécnicos/productivos de la camada.

OBJETIVO GENERAL

Estudiar la eliminación calostrál-láctea de los antibióticos FOS y OTC en cerdas luego de su administración durante el peri-parto y los potenciales efectos de dichas concentraciones antibióticas sobre la morfo-fisiología intestinal y los parámetros zootécnicos/productivos de la camada.

OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- 1.** Estudiar la disposición de los antibióticos FOS y OTC en calostro y leche de cerda, luego de la administración IM durante el peri-parto.
- 2.** Determinar el consumo de calostro, la ingesta de concentraciones de FOS y OTC y su impacto sobre los parámetros zootécnicos de la camada luego de la administración de dichos antibióticos a cerdas durante el peri-parto.
- 3.** Evaluar los efectos de FOS y OTC sobre la morfo-fisiología intestinal de los lechones neonatos.

CAPÍTULO I: CONOCIMIENTO ACTUAL SOBRE LA TEMÁTICA

1. IMPORTANCIA DE LA PRODUCCIÓN PORCINA EN ARGENTINA

En la actualidad, la carne porcina se ha consolidado como la proteína animal más consumida en el mundo, a diferencia de la Argentina donde se encuentra muy por debajo de la carne vacuna o aviar. La aparición de enfermedades transmisibles al ser humano, tales como BSE o “Mal de la vaca loca” y HPAI o Influenza Aviar Altamente Patógena, sumado a que la carne de cerdo es un alimento de alto valor biológico, rico en minerales, vitaminas del complejo B y ácidos grasos monoinsaturados (omega 3), han llevado a que esta proteína animal se posicione en el mercado, incrementando su consumo exponencialmente (Fenoglio, 2009; Sirvén, 2009).

La producción mundial de carne de cerdo creció a una tasa promedio anual de 1,6 % durante el periodo 2007-2016. De acuerdo con estimaciones del Departamento de Agricultura de Estados Unidos (USDA), se espera que en 2017 se ubique en un máximo histórico de 111 millones de toneladas, lo que representa un incremento de 2,6 por ciento con respecto al año previo. Al igual que la producción, el consumo mundial de carne de cerdo creció a una tasa promedio anual de 1,6 % durante el período 2007-2016. El USDA estima que en el 2017 se ubicará en 110.7 millones de toneladas, lo que significa un incremento anual de 2,5 por ciento (Kuberka *et al.*, 2017).

En nuestro país la producción de carne porcina creció, en los últimos 5 años, a una tasa del 12%, llegando en 2015 a las 483 mil toneladas, mientras que el stock se incrementó a una tasa del 8%, alcanzando en 2016, las 4.9 millones de cabezas, acompañado de un incremento del consumo interno. El consumo de carne, que alcanzó los 113,5 Kg por habitante/año en 2015, se distribuyó en un 52% de carne vacuna, un 38% de carne aviar y un 10% de carne porcina (Busellini, 2016).

La producción nacional de carne de cerdo se destina principalmente al mercado doméstico. Más del 63% del stock de porcinos y el 90% de la faena se concentra en la región Centro, principalmente en Buenos Aires, Córdoba y Santa Fe. El 96% de los establecimientos del eslabón primario son de tamaño pequeño y poseen el 46% del total de porcinos; los de tamaño mediano representan el 3% de los establecimientos y concentran el 14% de las cabezas; mientras que los grandes representan el 1% del total de los establecimientos y poseen el 40% del total de porcinos. Mediante la intensificación de los sistemas de producción, la mejora genética y la formulación de raciones equilibradas, se lograron mejorar los índices de eficiencia productiva y aumentar la calidad del producto, así como también, un buen estatus sanitario, siendo nuestro país libre de Peste Porcina Clásica, Peste Porcina Africana y Síndrome Reproductivo y Respiratorio Porcino (PRRS) (Busellini, 2016).

Argentina tiene las condiciones naturales y sanitarias necesarias para la producción de cerdos a gran escala en el futuro. Se estima que la actividad porcina incrementará su producción no sólo porque existen un buen escenario para la cría y engorde de cerdos por la disponibilidad de excelente clima y suelos que posibilitan la cosecha de alimentos indispensables para los cerdos. Sino también, porque abunda el agua dulce, existe una genética de primer nivel y un excelente estatus sanitario (Sirvén, 2009).

2. USO DE ANTIMICROBIANOS EN LA PRODUCCIÓN DE CERDOS

Los antimicrobianos en producciones intensivas son utilizados con diversos fines: *terapéutico*, para el tratamiento de determinadas enfermedades infecciosas; *metafiláctico*, cuando al menos un 10-14% de los animales se encuentran afectados por una enfermedad y existe riesgo de contagio a todo el grupo; *profiláctico*, medicando en forma preventiva animales individuales o grupos de ellos debido a la presencia de factores de riesgos en la granja (estrés, cambios de alimentación, cambios de sitios, etc.); y como *promotores de crecimiento*, administrando concentraciones subterapéuticas de antimicrobianos durante períodos más o menos prolongados, con el fin de mejorar los parámetros zootécnicos de producción (Carro y Ranilla, 2002; Torres y Zarazaga, 2002).

La utilización de tecnologías específicas y de moléculas antibióticas, cobra un papel relevante en las explotaciones intensivas, llevando reiteradas veces, a utilizar los fármacos de manera inadecuada. El uso prolongado de antimicrobianos puede predisponer a la aparición de bacterias resistentes reduciendo así el número de antimicrobianos eficaces disponibles en el mercado y, además, incrementando el riesgo de resistencia en la salud pública (Mathew, 2000; de la Torre *et al.*, 2015; Becattini *et al.*, 2016). Tal es así, que la Comisión Europea (CE), en un intento de detener el aumento o incluso de disminuir la resistencia a los antimicrobianos en patógenos zoonóticos, ha prohibido su uso como promotores del crecimiento en la producción porcina desde enero de 2006 (Van der Fels-Klerx *et al.*, 2011).

Van Boeckel *et al.* (2015) estimaron que el uso global total de antibióticos en el ganado fue de 63.151 toneladas en el año 2010 y que aumentaría en un 67% para el 2030, casi el doble en China, Sudáfrica, Brasil, India y Rusia. Como resultado del amplio uso de los fármacos se han encontrado una variedad de residuos de antibióticos en carne, leche y huevo (Leung *et al.*, 2013; Liu y Wong, 2013). Numerosos estudios han sido realizados para determinar los efectos de los niveles subterapéuticos de antimicrobianos sobre las bacterias entéricas porcinas, demostrando

un incremento en la población de microorganismos resistentes en el tracto intestinal (Van der Fels-Klerx *et al.*, 2011).

El futuro rendimiento productivo de los lechones está estrechamente relacionado a los cambios morfo-fisiológicos y a la adquisición de inmunidad que ocurren en sus primeras semanas de vida. Es por tal motivo que la ingestión de calostro con residuos antimicrobianos puede ocasionar alteraciones en el normal crecimiento y desarrollo del tracto gastrointestinal llevando a un pobre desempeño del animal en el crecimiento desde el nacimiento a la venta, afectando parámetros productivos relevantes en la producción como ganancia diaria de peso (GDP), conversión alimenticia (CA) y días a faena (Pluske *et al.*, 2003).

3. EL TRACTO INTESTINAL DEL LECHÓN

El intestino del lechón al nacimiento posee en promedio un largo y diámetro de 3,15 m y 0,65 m respectivamente, cuadruplicándose en menos de 50 días (Vodovar *et al.*, 1964; Dibner y Richards, 2004). En el cerdo adulto el intestino delgado alcanza los 20 m y el intestino grueso los 4,5 m (Zhang y Xu, 2003). Durante las primeras 24 h de lactación el peso vivo, la longitud y superficie intestinal se incrementan 17%, 10% y 27% respectivamente (Zhang *et al.*, 1997). El intestino delgado experimenta un rápido desarrollo durante los 10 primeros días aumentando la longitud y el diámetro de las vellosidades, así como las células de la mucosa (Vodovar *et al.*, 1964; Cranwell, 1995; Dibner y Richards, 2004).

El intestino de un cerdo en crecimiento consume alrededor del 20-25% del oxígeno del organismo (Vodovar *et al.*, 1964). La renovación de proteínas es muy rápida, llegando a reemplazar el 50% de su contenido proteico por día (Tarvid, 1995; Soraci *et al.*, 2010). Entre las proteínas sintetizadas por el intestino, un elevado porcentaje es secretado hacia la luz intestinal bajo la forma mucina y células de descamación, mientras que sólo un 10% se acumula como masa tisular (Salmon, 1984; Guilhermet, 1996; Soraci *et al.*, 2010). El contenido de proteínas de la mucosa de todo el intestino se incrementa el 126% durante las primeras 6 h después del nacimiento, con un gran aumento en la porción media (149%) y distal (135%) (Zhang *et al.*, 1997; Adeola y King, 2006).

Las enzimas juegan un rol importante en la mucosa intestinal. La lactasa presenta niveles extraordinariamente altos al nacimiento (para poder hidrolizar la alta cantidad de lactosa presente en la leche), decreciendo levemente hasta alrededor de las 2-3 semanas de edad, para alcanzar luego los valores del adulto a las 6 semanas (Zhang *et al.*, 1997; Li *et al.*, 2004).

Mucosa intestinal

La mucosa intestinal participa en los procesos de digestión-absorción de nutrientes y provee una barrera físico-química, metabólica e inmunológica contra la entrada de compuestos xenobióticos y toxinas, macromoléculas y microorganismos (bacterias, virus, hongos) al organismo. En el cerdo adulto tiene una superficie aproximada de 300 m² (equivalente a una cancha de tenis) (Vodovar *et al.*, 1964; Salmon, 1984; Dibner y Richards, 2004; Skrzypek *et al.*, 2007).

Epitelio intestinal

Los enterocitos (células intestinales) se disponen en forma de monoestrato y en relación con células endocrinas, inmunes y células Goblet o caliciformes productoras de mucus (Salmon, 1984; Skrzypek *et al.*, 2007). La morfología epitelial cambia a lo largo del tracto intestinal, pero en esencia consiste en una región de criptas (donde se encuentran las células madres y de Paneth que participan en funciones de defensa) y una región apical (vellosidad) donde las células se encuentran en diferente grado de diferenciación y función (Skrzypek *et al.*, 2007). Estas proyecciones aumentan la superficie luminal haciendo que el intestino delgado sea más eficiente en el proceso de digestión y absorción. En el lechón recién nacido las vellosidades miden 0,5-1,0 mm de longitud y son más largas en el yeyuno que en el duodeno e íleon. La membrana superficial apical de los enterocitos se pliega intensamente formando una estructura denominada microvellosidad o membrana de bordes en cepillo. Estas proyecciones incrementan enormemente la superficie de absorción del enterocito (Zhang y Xu, 2003).

Las células epiteliales que alcanzan un determinado grado de diferenciación-maduración mueren y son liberadas a la luz del intestino. La velocidad de recambio de las células del epitelio intestinal del cerdo es muy rápida, oscilando entre 2-5 días (Salmon, 1984; Skrzypek *et al.*, 2007) (figura 1).

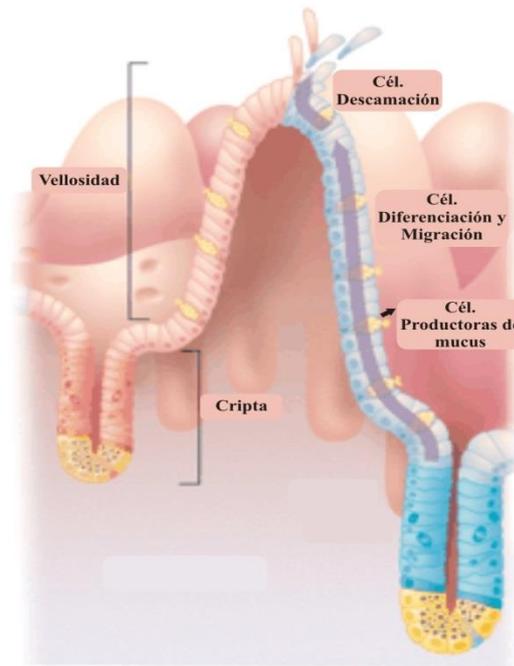


Figura 1. Epitelio Intestinal. Zona de cripta y vellosidad.

Mucus intestinal

El mucus intestinal es una biocapa de cobertura de la mucosa producida por secreción de las células caliciformes (Piel *et al.*, 2005). Constituye una barrera de defensa contra microorganismos y agentes físico-químicos (Piel *et al.*, 2005; Oswald, 2006). A su vez, cumple funciones de lubricación y transporte entre el contenido presente en la luz intestinal y la superficie del epitelio. Uno de los mecanismos de defensa del mucus contra microorganismos, se relaciona con la capacidad que tiene la mucina de establecer uniones a través de sus carbohidratos terminales con receptores presentes en la superficie de determinadas bacterias. Dicha interacción impide la fijación a las células epiteliales y su posterior destrucción o invasión intracelular (Blomberg *et al.*, 1995; Pestova *et al.*, 2000; Mathew y Ebner, 2004).

Desde el punto de vista químico se trata de un gel compuesto en un 95% de agua y electrolitos, carbohidratos, aminoácidos, proteínas y lípidos. Sus propiedades bio-elásticas responden a subunidades de mucina, proteína unida a largas cadenas de carbohidratos que contienen un azúcar neutral de hexosamina (Aubry *et al.*, 2004). Los carbohidratos poseen en sus cadenas terminales grupos sulfatos libres unidos a ácido siálico (Williams *et al.*, 2001; Aubry *et al.*, 2004).

La producción de mucus es un proceso dinámico y equilibrado de síntesis, secreción y utilización luminal para procesos de reparación de mucosa en sinergia con péptidos epiteliales y/o erosión en el lumen intestinal. Una buena protección mucosal depende de un balance en cantidad de mucus (espesor de la capa de mucus) y calidad (composición de los azúcares de los carbohidratos) (Pestova *et al.*, 2000; Piel *et al.*, 2005; Soraci *et al.*, 2010).

Intestino e inmunidad

El tejido linfoide intestinal se encuentra organizado de 2 maneras: 1- en placas de Peyer y nódulos linfáticos intestinales, 2- como células inmunes diseminadas en forma difusa a lo largo del tracto intestinal (lámina propia y células intra-epiteliales) (Stokes *et al.*, 2004; Bauer *et al.*, 2006).

El sistema inmune mucosal desempeña una doble función. Por una parte, debe identificar nutrientes inocuos y suprimir cualquier respuesta inmune sistémica que se pudiera generar contra ellos. Por otra parte, debe reaccionar para excluir cualquier invasión por virus, bacterias, parásitos y hongos (Lallès *et al.*, 2004). El sistema inmune intestinal del cerdo depende de una inmunidad no específica a cargo de células Killer, mastocitos, APC (células presentadoras de antígenos), células T-helper, macrófagos y neutrófilos, que actúan a través de mecanismos quimiotácticos y de mecanismos de respuesta inmune a cargo del tejido linfoide asociado al intestino (GALT: gut associated lymphoid tissue) (Stokes *et al.*, 2004; Bauer *et al.*, 2006). El sistema inmune específico participa a través de una respuesta humoral, normalmente dirigida a bacterias, y una respuesta celular dirigida a células infectadas por virus.

Microbiota intestinal

El lechón al nacimiento experimenta una importante transformación morfo-fisiológica (a nivel de las vellosidades intestinales, criptas, desarrollo de enzimas digestivas, etc.) y una progresiva colonización bacteriana de su tracto gastrointestinal. Las bacterias que dan origen a la microbiota intestinal del neonato provienen de la vagina, el periné y la glándula mamaria de la madre durante la lactación, así como de heces en la sala de parto. Estas bacterias, comensales y patógenas, buscan un nicho adecuado donde compiten e interaccionan entre sí, constituyendo finalmente una población relativamente estable y compleja (Radecki y Yokoyama, 1991; Snel *et al.*, 2002; Paßlack *et al.*, 2015). El estrés de los lechones y el manejo inadecuado de moléculas antibióticas, afectan el equilibrio normal de la microbiota intestinal, manifestándose con diarreas

e inclusive la muerte de los animales durante la lactancia. Esta afección se considera una de las principales causas de pérdidas económicas en la industria porcina (Corpet, 2000).

La cronología de colonización de la microbiota muestra en sus inicios coliformes, estreptococos y bifidobacterias (Corpet, 2000). La flora anaeróbica obligatoria aparece más tarde. Los clostridios están presentes durante un corto período. A los dos días los lactobacilos se convierten en el grupo dominante en duodeno, yeyuno e íleon, aunque en el último, también otras bacterias son numerosas. A la semana de edad, *Lactobacillus* y *Escherichia coli* son los grupos predominantes en el contenido cólico y cecal (Swords *et al.*, 1993; Jensen, 1998). A medida que el lechón consume leche, la microflora comienza a estabilizarse (Corpet, 2000; Laplace *et al.*, 2001). Luego del destete, la introducción de alimento sólido y complejo, provoca cambios cuali y cuantitativos sobre la flora con la aparición de otros tipos de bacterias, como *Bacteroides*, *Ruminococcus* y *Enterobacter*, entre otras (Swords *et al.*, 1993; Corpet, 2000; Laplace *et al.*, 2001; Williams *et al.*, 2001; Roca Canudas *et al.*, 2008).

La flora intestinal del cerdo cumple con diferentes funciones, tales como: protección competitiva y química (bacteriocinas y fermentación ácida que mantiene un pH relativamente bajo) frente a la invasión de microorganismos; incremento de la absorción de nutrientes, particularmente minerales como el Ca^{++} ; manutención del equilibrio, integración del epitelio intestinal y síntesis metabólica de vitaminas (grupo B y C), de ácidos AGVs (acético, propiónico y butírico) y metabolismo de urea, sales biliares y ácidos grasos (Lallès *et al.*, 2004); estimulación del desarrollo de la respuesta inmune a través de comunicaciones cruzadas o “cross-talk” entre la microbiota intestinal y el huésped.

4. CALOSTRO

Importancia del calostro

La especie porcina se caracteriza por presentar un porcentaje de mortalidad neonatal muy elevado en comparación con otras especies como la bovina, ovina o equina, constituyendo aproximadamente del 10 al 35% de los lechones nacidos vivos. Más del 50% de las muertes pre-destete ocurren dentro de los tres primeros días de lactación y se deben a una inadecuada incorporación de calostro (Dyck y Swierstra, 1987; Alonso-Spilsbury *et al.*, 2007; Manteca y Gasa, 2008). Este fluido cumple con una serie de roles primordiales para el lactante: aporta

inmunidad pasiva, es una fuerza de energía para la termorregulación y participa del desarrollo del tracto gastrointestinal. El calostro es un fluido dinámico cuya composición evoluciona rápidamente en el curso de las 12 primeras h siguientes al inicio del primer nacimiento, para transformarse progresivamente en leche dentro de 24 h (Rooke y Bland, 2002).

Desde el punto de vista inmunológico un adecuado calostrado es indispensable para la supervivencia del lechón debido a que nace totalmente desprovisto de anticuerpos plasmáticos. La cerda posee una placenta epitelio-corial impermeable, que impide la transferencia de anticuerpos hacia el feto a lo largo de toda la gestación (Muirhead y Alexander, 2001). Los anticuerpos plasmáticos que adquiere el lechón a partir del calostro se encuentran principalmente representados por la IgG. La concentración total de inmunoglobulinas (IgA, IgG, IgM) en el calostro es de 120-130 mg/mL en una proporción de: 68-87% de IgG, 8-22% de IgA y 5-9% de IgM (Klobasa y Butler, 1987; Rooke y Bland, 2002). Esta concentración disminuye a tasas de 3,4% por hora post-parto.

- A las 3 horas post-parto: el nivel de Ig's ha disminuido casi un 30%.
- A las 6-7 horas post-parto: prácticamente ha disminuido en un 50%.
- A las 12 horas post-parto: prácticamente ha disminuido en un 70%.
- Alrededor de las 24 horas post-parto: casi sólo queda un 10% de la concentración inicial (Devillers *et al.*, 2007).

A su vez, el calostro contiene linfocitos (células B y T), citocinas, nucleótidos y factores de crecimiento naturales (IGF I - IGF II) que ayudan en el desarrollo normal de los órganos vitales y estimulan la maduración funcional del tubo digestivo en las primeras 24 h de vida (Noblet y Le Dividich, 1981; Wagstrom *et al.*, 2000; Rooke y Bland, 2002; Devillers *et al.*, 2006).

La composición y la cantidad de calostro y de leche que consume el lechón son determinantes en el crecimiento, desarrollo y función biológica del tracto gastrointestinal en el período postnatal. Esto repercute en forma directa sobre el crecimiento, el desarrollo y la resistencia a contraer enfermedades del animal (Simmen *et al.*, 1990; Le Dividich *et al.*, 2005; Devillers *et al.*, 2011; Quesnel *et al.*, 2012; Theil *et al.*, 2014; Pluske, 2016).

Durante las primeras horas de vida ocurre la absorción intestinal (mediante mecanismos especializados de endocitosis) de una importante concentración de inmunoglobulinas (Muirhead y Alexander, 2001; Baxter *et al.*, 2013). Sin embargo, este fenómeno disminuye de manera significativa hacia las 12-18 h pos nacimiento (Gaskin y Kelly, 1995), impidiendo la transferencia de IgG desde la luz intestinal a la circulación sistémica. Dicha inmunidad calostrada en el lechón

recibida por transferencia pasiva disminuye con la edad, siendo prácticamente nula a las 3 semanas de vida. Sin embargo, al mismo tiempo se va instaurando una inmunidad activa (generada por el propio lechón) que pasará a ser importante a partir de las 3-4 semanas de vida (Muirhead y Alexander, 2001).

Desde el punto de vista energético-nutricional se sabe que los lechones que consumen poca cantidad de calostro son menos vigorosos y menos aptos para competir con sus hermanos por las tetas productivas, presentando mayor predisposición a morir por hipotermia y/o desnutrición (Devillers *et al.*, 2007). Es por tal motivo que la adquisición de inmunidad pasiva no es una garantía de supervivencia para el neonato, sino que es necesaria también la energía que le otorga el calostro (más de 1000 kJ/Kg) para realizar los procesos de nutrición y termorregulación. El lechón nace con una baja autonomía energética (400 - 600 kJ/Kg) (Le Dividich *et al.*, 2005; Devillers *et al.*, 2007; Devillers *et al.*, 2011), es por ello que necesita indefectiblemente ingerir un mínimo de 170 gramos/Kg PV de calostro para mantener la temperatura corporal por encima de la termoneutralidad (entre 30-35°C) y sobrevivir (Devillers *et al.*, 2005; Quesnel *et al.*, 2012).

Producción y consumo de calostro y leche

El consumo de calostro por los lechones depende principalmente de su peso y de su vitalidad, pero también de la capacidad de producción de la cerda (Le Dividich *et al.*, 2005; Devillers *et al.*, 2005). La cantidad de calostro producido por la cerda varía entre 2 y 5 Kg en el curso de las primeras 24 h siguientes al parto para una camada con un tamaño de 8 a 12 lechones (Devillers *et al.*, 2005). La producción de leche en el día 4 de lactancia varía entre 4,60 y 9,64 Kg/día con un promedio de 8 Kg/día aproximadamente (Devillers *et al.*, 2007).

Los factores que afectan la producción y composición del calostro son el genotipo, la habilidad materna, el número y la duración de los partos, la inducción temprana al parto, el estatus nutricional de la cerda, el balance hormonal, el estado sanitario y factores ambientales tales como falta de higiene, ruidos, elevada humedad, corrientes de aire y temperaturas diferentes a la de confort (Le Dividich *et al.*, 2005; Devillers *et al.*, 2007; Devillers *et al.*, 2007). El 60-80% de las cerdas producen calostro suficiente para alimentar adecuadamente a una camada de 12-13 lechones (Devillers *et al.*, 2007). La tasa de consumo de calostro en los lechones es inicialmente alta, representando del 5 al 7% PV en las primeras 2 h post-nacimiento, decreciendo luego gradualmente. En una camada de 9 lechones o más, el consumo de calostro por lechón se reduce

de 22 a 42 gramos por cada lechón adicional que nace (Le Dividich *et al.*, 2005; Devillers *et al.*, 2007).

La producción de leche está influenciada principalmente por el tamaño de la camada; la producción total aumenta con el tamaño de la camada, mientras la producción de leche por lechón disminuye. Esto no necesariamente significa que la producción de leche es inadecuada para los lechones de grandes camadas, dado que el peso al nacimiento de los lechones también disminuye con el tamaño de la camada. De hecho, los lechones de peso corporal mayor consumen más leche que los lechones más livianos. Sin embargo, el consumo relativo de leche (g/Kg PV) es similar para todos los lechones (Klopfenstein *et al.*, 1995).

Comportamiento y sobrevida del lechón. Peso de la camada

La supervivencia del lechón recién nacido depende de su habilidad para pararse, moverse desde el sitio de nacimiento hacia el área de las ubres, alcanzar la mama y lograr una mamada funcional. Sin embargo, el peso y el vigor al nacimiento influyen de manera directa en la sobrevida.

En la producción porcina actual, es común que las cerdas hiperprolíficas paran camadas numerosas, ocasionando que los lechones tengan variación en el tamaño de la camada y en promedio un bajo peso al nacimiento (Lund *et al.*, 2002; Quesnel *et al.*, 2012). El peso del lechón es un factor fundamental para su supervivencia en las primeras horas post-nacimiento, dado que un bajo peso al nacimiento predispone a una mayor probabilidad de mortalidad predestete (Rooke y Bland, 2002; Baxter *et al.*, 2008; Huygelen *et al.*, 2015). Estudios demuestran que el neonato deberá aumentar al menos un 10% de su PV en el primer día de vida para sobrevivir (Devillers *et al.*, 2007), y que tan sólo el 28% de los lechones con un peso inferior a 1,1 Kg al nacimiento sobrevivirá más de siete días (Alonso-Spilsbury *et al.*, 2007).

La variación individual del peso dentro de la camada de cerdas hiperprolíficas es debida a la disminución del espacio uterino disponible para el desarrollo del feto y a la reducción en el aporte de los nutrientes a través de cada placenta (Baxter *et al.*, 2008; D’Inca *et al.*, 2010; Campos *et al.*, 2012; Rootwelt *et al.*, 2014; De Vos *et al.*, 2014). El primer día después del nacimiento se caracteriza por grandes fluctuaciones en la ganancia de peso entre camadas. En algunas se produce un aumento de peso sostenido, en otras, la ganancia es muy baja y, en ciertas camadas, los lechones incluso pierden peso durante uno o más días (Alonso-Spilsbury *et al.*, 2007).

Los lechones con mayor peso al nacer son más competitivos por la ubre y por lo tanto pueden ingerir una mayor cantidad de calostro que los lechones con menor peso al nacimiento (Le Dividich *et al.*, 2005). De esta manera, los lechones más pesados beberán parte del calostro destinado a otros compañeros de camada, provocando una variación en la ingesta intra camada, especialmente cuando se prolonga la duración del parto (Hartsock y Graves, 1976; Le Dividich y Noblet, 1981; Rooke y Bland, 2002).

No obstante, algunos estudios demuestran que existe una importante correlación positiva entre el peso al nacimiento, el vigor y la tasa de supervivencia postnatal. Los lechones con poco vigor presentan un comportamiento menos agresivo y como consecuencia menor oportunidad de ingesta de calostro (Alonso-Spilsbury *et al.*, 2007).

Mecanismo de secreción del calostro

La lactogénesis corresponde al inicio de lactación. Ella comienza en el final de la gestación y sigue hasta el establecimiento de una lactación abundante, que se da dentro de las 24 a 48 h después del inicio del parto. La lactogénesis se divide en 2 fases (Hartmann y Holmes, 1989):

- Lactogénesis I: inicio del metabolismo mamario en el final de la gestación con una actividad secretoria limitada por las células epiteliales mamarias además de una acumulación progresiva de pre-calostro dentro del lumen de los alvéolos.
- Lactogénesis II: inicio de una secreción abundante por las células epiteliales mamarias.

La síntesis de calostro tiene lugar esencialmente durante la lactogénesis I (Kensinger *et al.*, 1982; Kensinger *et al.*, 1986).

Secreción de componentes del calostro

Los diferentes componentes del calostro son secretados dentro del lumen de los alvéolos por mecanismos diversos y característicos (figura 2).

El mecanismo de exocitosis comprende los elementos contenidos dentro de las vesículas de secreción, como proteínas y lactosa sintetizadas dentro del retículo endoplasmático y el aparato de Golgi (Klopfenstein *et al.*, 2002). Estas vesículas contienen electrolitos monovalentes (sodio, potasio y cloro). Las vesículas de secreción forman especies de canales hasta la parte

apical de las células y uniones con la membrana celular, liberando, por exocitosis, el contenido dentro del lumen de los alvéolos (Devillers *et al.*, 2006).

La secreción de gotitas lipídicas contenidas dentro del citoplasma, después de fusionarse y migrar hacia la parte apical de las células, son envueltas por la membrana celular apical y liberadas bajo la forma de glóbulos lipídicos dentro del lumen alveolar (Keenan, 2001).

Durante la lactogénesis ocurren mecanismos de pasaje de componentes inmunológicos. El pasaje de Ig's implica particularmente a IgG e IgE provenientes del plasma de la madre, y a numerosos factores de crecimiento y hormonas. El mecanismo de entrada de las Ig's desde los vasos sanguíneos dentro de las células no está todavía completamente dilucidado en la cerda. No obstante se proponen diferentes teorías: el pasaje para-celular y el pasaje mediante transportadores (mecanismo activo). En el pasaje para-celular se lleva a cabo durante el curso de la gestación, donde las uniones estrechas entre los lactocitos que aseguran la impermeabilidad del epitelio mamario, por acción hormonal son abiertas, permitiendo el pasaje entre las células epiteliales de células inmunitarias, de Ig's plasmáticas y de electrolitos hacia el lumen alveolar (Klopfenstein *et al.*, 2002). En el pasaje mediante transportadores, mediante efecto hormonal (progesterona, estrógenos) se sintetizan localmente transportadores encargados de llevar desde el lumen vascular a la extremidad apical del acino diferentes tipos de Ig's y otras células inmunitarias, como los linfocitos (Devillers *et al.*, 2006).

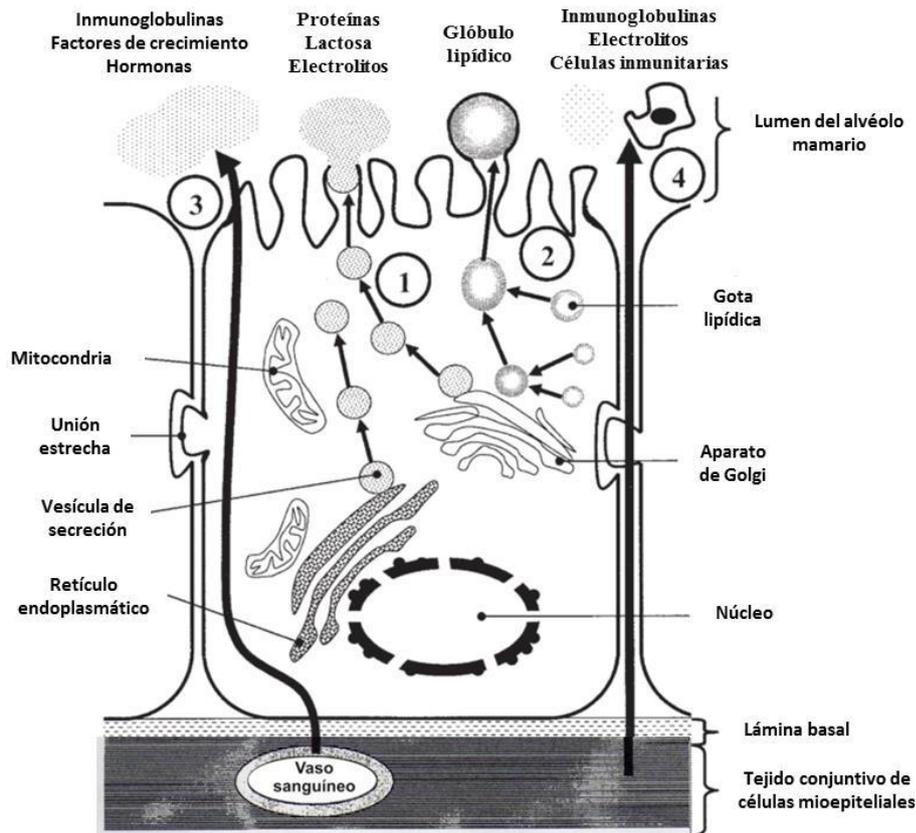


Figura 2. Estructura de una célula epitelial mamaria y mecanismos de secreción de contenidos del calostro. 1-Exocitosis; 2-Secreción de gotitas lipídicas; 3-Pasaje trans-celular; 4-Pasaje para-celular (adaptado de Devillers *et al.*, 2006).

Regulación hormonal de la secreción de calostro

Las hormonas sexuales de la lactogénesis, prolactina (PRL), progesterona (P4), estrógenos, relaxina, prostaglandinas y oxitocina, influyen en la producción de calostro de diferentes maneras. En primer lugar, ellas regulan el desarrollo mamario durante la gestación. Por otra parte, controlan la síntesis de diferentes contenidos del calostro, inducen el cierre de las uniones estrechas entre las células epiteliales mamarias y por consiguiente el pasaje de la secreción calostrual a la secreción láctea.

Dentro de las 48 h siguientes al parto, las concentraciones plasmáticas de P4, estradiol-17 β (E2), relaxina, cortisol, PRL y prostaglandina-F2 α (PGF2 α) evolucionan rápidamente. Estas hormonas influyen en la síntesis de los contenidos del calostro y por consiguiente la evolución de su composición. La PRL es la hormona más importante durante la primera fase de la lactación (Taverne *et al.*, 1982; Farmer *et al.*, 1998). Influye en la producción láctea y estimula la síntesis

de caseína, de α -lactoalbúmina (α -LA), de lactosa y de ácidos grasos (Plaut *et al.*, 1989; Delouis *et al.*, 2001). La caída de la P4 en el final de la gestación parece ser el factor desencadenante de la lactogénesis. Además, estimula el crecimiento de la glándula mamaria (Farmer, 2001). La actividad de síntesis de las células epiteliales mamarias es por consiguiente dependiente de la caída de la tasa de plasmática de P4 y del incremento de las concentraciones de PRL (Falconer, 1980; Devillers *et al.*, 2006).

El incremento de la concentración de E2 al final de la gestación es necesario para la iniciación de la lactación a pesar de que el rol exacto todavía no se ha determinado (Willcox *et al.*, 1983). La relaxina no parece tener un efecto particular sobre la iniciación de la lactación en la cerda (Nara *et al.*, 1982; Zaleski *et al.*, 1996).

Amamantamiento

La primera ingestión de calostro por el lechón ocurre aproximadamente 20 minutos después del nacimiento (Le Dividich *et al.*, 2005) y el orden de las mamas se establece dentro de las 48-72 h post-parto. Esta jerarquía se instaura de tal manera que cada lechón mama en forma constante de una o dos mamas específicas durante toda la lactancia (Scheel *et al.*, 1977; De Passille y Rushen, 1989; Klopfenstein *et al.*, 1995; Andersen *et al.*, 2011; Pedersen *et al.*, 2011). El orden jerárquico se correlaciona con el tamaño de la camada, la capacidad productora de leche de la cerda y la morbilidad-mortalidad de los lechones (Alonso-Spilsbury *et al.*, 2007). Los lechones que nacen primero tienen la ventaja de poder elegir las mamas pectorales. Normalmente se observa una preferencia por estas glándulas mamarias que son las más ricas en Ig's, a su vez se encuentran "más protegidos" por el contacto materno por efecto de vocalización de la madre y seguros también de los miembros traseros (patas).

Las eyecciones de calostro durante el peri parto ocurren cada 10-20 minutos, y el periodo de alta presión intramamaria que permite la extracción del calostro puede mantenerse durante 1 minuto o más. Después de la fase de calostro, y durante el resto de la lactación, la eyección de leche es cíclica, con aproximadamente 24 ciclos por día (Klopfenstein *et al.*, 1995; Pedersen *et al.*, 2011). La duración del flujo de leche en la cerda es muy corto y solo dura 20-30 segundos. Un lechón necesita los 20 segundos completos para consumir 20 a 30 gramos de leche. Por consiguiente, es importante que los cerdos empiecen a mamar en cuanto la leche esté disponible, porque un retraso de sólo 5 segundos causa una pérdida de ingestión de leche de 25-50% (Alonso-Spilsbury *et al.*, 2007).

Regulación del cierre de las uniones estrechas entre las células epiteliales mamarias

Un acontecimiento sobresaliente del pasaje de la fase calostrala a la fase láctea es el cierre progresivo de las uniones estrechas entre las células epiteliales mamarias, que aseguran la impenetrabilidad de los alvéolos en relación al ambiente extracelular. Este mecanismo, regulado por las hormonas implicadas en la regulación de la parición ha sido poco estudiado al momento. Sólo se ha observado una correlación negativa entre las concentraciones de IgG y PRL en el calostro (Devillers *et al.*, 2004). Así mismo se sabe que la P4 actúa como un freno en la actividad de síntesis de células epiteliales mamarias y en el cierre de sus uniones estrechas, mientras que la PRL y el cortisol los estimulan (Devillers *et al.*, 2006).

5. MOLÉCULAS ANTIBIÓTICAS

FOSFOMICINA

La FOS (ácido cis-1,2-epoxipropilfosfónico), conocida inicialmente con el nombre de fosfomicina (Hendlin *et al.*, 1969), es un antibiótico bactericida de amplio espectro y de bajo peso molecular (es casi el menor de entre todos los antimicrobianos: 138 g/mol) (Escolar Jurado *et al.*, 1998; Popovic *et al.*, 2010) que actúa bloqueando la biosíntesis de la pared celular bacteriana en su primera etapa de la síntesis del peptidoglicano (Kahan *et al.*, 1974). La molécula presenta varias características químicas no observadas habitualmente en los compuestos fosforados orgánicos, ya que por un lado, está formada por un grupo epóxido al que se une un grupo fosfórico cargado negativamente y que es determinante para su acción antibacteriana (Barón y Drugeon, 1985) (figura 3). Por otra parte, presenta una unión directa entre el carbono y el fósforo sin puente intermedio de oxígeno (Escolar Jurado *et al.*, 1998), como es habitual en los compuestos orgánicos fosforados (Barón y Drugeon, 1985). La FOS fue aislada en 1966 de una cepa de *Streptomyces fradiae*, obtenida de una muestra de suelo, y posteriormente de *Streptomyces viridochromogenes* y *Streptomyces wedmorensis* (Grassi, 1990). Es un antibiótico español, poco valorado en la bibliografía médica anglosajona y de escasa utilización en su país de origen, siendo considerado habitualmente de segunda línea. Es, sin embargo, un buen antimicrobiano con características fisicoquímicas y farmacocinéticas que permite su administración vía parenteral y oral. Es un antibiótico natural, no relacionado químicamente con ningún otro de los conocidos (Escolar Jurado *et al.*, 1998).

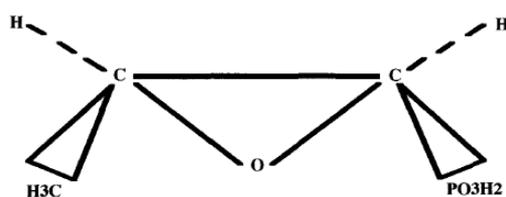


Figura 3. Estructura química de la fosfomicina.

Farmacocinética: la absorción de FOS se produce a lo largo del tubo digestivo, siendo superior en el duodeno y yeyuno (Tamai y Tsuji, 1996). Su baja unión a proteínas (<0,50%) junto con su bajo peso molecular e hidrosolubilidad, permiten una buena difusión de la FOS a los tejidos corporales, atraviesa la barrera hematoencefálica pudiendo alcanzar el fluido amniótico, humor acuoso, tejido linfático, secreciones bronquiales y fluidos purulentos (Sauer mann *et al.*, 2005). Una proporción pequeña de la molécula pasa por bilis, leche y calostro. La FOS no presenta transformación metabólica (Roussos *et al.*, 2009) y se excreta en orina en forma activa, principalmente por filtración glomerular (10-60%) sin secreción tubular o reabsorción. Un 20% de la droga se elimina por las heces (Eardley *et al.*, 2006). La vía oral en el tratamiento de infecciones de menor gravedad (vías respiratorias altas) es insegura, ya que depende de la absorción intestinal. No obstante, en las infecciones del tracto digestivo, el antibiótico responde satisfactoriamente porque actúa en la luz intestinal (Gobernado, 2003).

La estructura química de la FOS se presenta en diferentes sales: la sal disódica es la utilizada para la administración por vía intravenosa, mientras que la sal trometamol (trometamina [trihidroximetil-aminometano]) y la sal cálcica se utilizan para la administración oral. Administrada por vía intramuscular alcanza concentraciones plasmáticas de tres a cinco veces mayores que las obtenidas por vía oral. Las sales disódica y cálcica se obtienen substituyendo los dos átomos de hidrógeno del radical fosfórico por otros tantos de sodio y uno de calcio, respectivamente. La sal de trometamol, disponible desde 1990 y comercializada para uso oral, se obtiene agregando al radical fosfórico una molécula de trometamina (tris-hidroximetil-aminometano), la cual es un tampón sintético para uso a corto plazo que da lugar a que el peso molecular de la fosfomicina casi se duplique, sin contribuir ni interferir con su acción antibacteriana (Escolar Jurado *et al.*, 1998). En todas las especies se han encontrado diferencia en la F% luego de la administración PO en relación con las diferentes formulaciones, tales como FOS disódica (41-85%), FOS cálcica (20%) y FOS trometamol (34-41%) (Segre *et al.*, 1987; Patel *et al.*, 1997). Sin embargo, la administración IM de FOS disódica ofrece una ruta más predictiva de la dosis de absorción que la administración PO, que puede asociarse con dos

hechos. Por un lado, la absorción en el tracto gastrointestinal es un proceso saturable asociada al sistema de fosfato y, por el otro, hay una degradación de FOS disódica debido al pH gástrico ácido (Gutierrez *et al.*, 2008).

Para poder actuar la FOS atraviesa las membranas externas mediante las porinas, pasa la barrera de peptidoglicano sin dificultad y finalmente atraviesa la membrana citoplasmática a través de sistema de transporte activo, que se favorece por la presencia de L- α -glicerol fosfato y D-glucosa 6 fosfato (Calvo y Martínez-Martínez, 2009; Pérez *et al.*, 2014).

La cinética de la FOS ha sido descripta en humanos (Kirby, 1977; Segre *et al.*, 1987; Vargas *et al.*, 1987), aves (Aramayona *et al.*, 1997; Pérez *et al.*, 2011; Soraci *et al.*, 2011b), conejos (Fernandez Lastra *et al.*, 1987), bovinos (Sumano *et al.*, 2007), equinos (Zozaya *et al.*, 2008), caninos (Gutierrez *et al.*, 2008) y cerdos (Soraci *et al.*, 2011a).

Farmacodinamia: la FOS es una droga tiempo dependiente es decir que debe alcanzar concentraciones constantes por encima de la concentración mínima inhibitoria (CIM) para ejercer su efecto bactericida (Toutain *et al.*, 2002). En producciones intensivas la FOS se utiliza para el tratamiento de infecciones causadas por bacterias Gram positivas y Gram negativas sensibles: *Salmonella sp.*, *Escherichia coli*, *Pseudomona sp.*, *Pasteurella sp.*, *Staphilococcus sp.*, *Streptococcus sp.*, *Haemophilus sp.*, *Klebsiella s.p.*, entre otras. No es activa contra bacteroides (García-Rodríguez, 1984). Posee rápido efecto, buena tolerancia, sinergismo en asociaciones con otros antimicrobianos del grupo de los aminoglucósidos, betalactámicos, cloranfenicol, tetraciclinas, eritromicina, cotrimoxazol y quinolonas (Salhi *et al.*, 1986), siendo activa y estable frente a betalactamasas. Está demostrada su penetración en las células fagocitarias, donde alcanza concentraciones elevadas, presentando una actividad intracelular próxima a la de la rifampicina (Barón y Drugeon, 1985; Trautmann *et al.*, 1992). Esta penetración no altera la capacidad de ingestión y destrucción de las mencionadas células, en estudios “*in vitro*”. No posee resistencia cruzada con ningún otro antibiótico o quimioterápico (Barón y Drugeon, 1985; Gutierrez *et al.*, 2008).

OXITETRACICLINA

El nombre de la IUPAC para la OTC es (4*S*,4*aR*,5*S*,5*aR*,6*S*,12*aS*)-4-(dimetilamino)-3,5,6,10,11,12*a*-hexahidroxi-6-metil-1,12-dioxo-1,4,4*a*,5,5*a*,6,12,12^aoctahidrotetracen-2 carboxamida, siendo su fórmula química abreviada C₂₂H₂₄N₂O₉. La OTC posee 4 anillos (A, B,

C y D), siendo su núcleo el naftacenocarboximida. En el anillo D hay un grupo fenólico, en el B un grupo enólico, en el A un grupo dimetilamino y una función carboxamida y en el C un radical metilo (figura 4). La OTC fue aislada por primera vez en el año 1950 de ciertas cepas de *Streptomyces rimosus* (Finlay *et al.*, 1950) y su peso molecular es de 460,4 g/mol. Su mecanismo de acción consiste en inhibir la síntesis proteica bacteriana en el proceso de reproducción y crecimiento celular, al ligarse al ribosoma bacteriano 30S (Connamacher y Mandel, 1965).

La OTC perteneciente al grupo de las tetraciclinas (TTC), posee mayor liposolubilidad que la FOS y es de amplio uso en la producción porcina (Papadoyannis *et al.*, 2000; Alonso Dupuy, 2016; Ramírez Llorente, 2016). Las TTC son fármacos de primera línea en animales de producción, incluyendo especies acuícolas, animales exóticos y abejas, pero su uso es mucho menor en animales de compañía, caballos y seres humanos. En la actualidad, la cría de ganado porcino es la que más antibióticos consume a nivel mundial (aún por encima del ganado bovino), siendo las TTC en general los antibióticos más utilizados en esta especie. En el Reino Unido, de acuerdo con el Veterinary Medicines Directorate (VMD) (Burch, 2012), de las 387 toneladas de antibióticos utilizados en animales en el 2007, el 45% fueron TTC, el 19% sulfonamidas/trimetropin, el 19% beta-lactámicos y el 9% macrólidos.

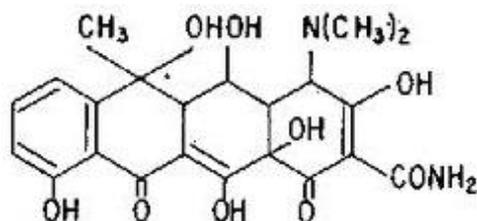


Figura 4. Estructura química de la oxitetraciclina.

Farmacocinética: las TTC son sustancias cristalinas ligeramente amarillas, sin olor y levemente amargas; son anfóteras ya que en solución acuosa forman sales tanto con ácidos como con bases. Son estables en forma de polvo, pero no en solución acuosa, siendo particularmente inestables a pH superiores a 7 y destruyéndose con soluciones ácidas de pH inferiores a 2. La OTC es un polvo cristalino amarillo, muy poco soluble en agua que se disuelve en disoluciones diluidas de ácidos o bases (Prescott y Baggot, 1993; Alonso Dupuy, 2016).

La OTC se absorbe en el estómago y la porción inicial del intestino delgado, alcanzando una biodisponibilidad tan solo del 3-5%. Sin embargo, su absorción disminuye cuando se administra junto con alimento o por la ingestión simultánea de productos lácteos, hidróxido de

aluminio, y distintas sales (calcio, magnesio, hierro o zinc) (Ericsson *et al.*, 1982). La absorción también puede verse disminuida por la formación de complejos y cationes divalentes y trivalentes en el medio (Aronson, 1980). La quelación del catión por parte del antibiótico provoca la alteración de la estructura química (Caswell y Hutchison, 1971), reduciéndose la absorción hasta niveles mínimos, sobre todo en TTC de acción prolongada. La absorción de la OTC administrada por vía intramuscular y subcutánea es excelente, por vía parenteral es completa y superior a la obtenida por vía oral. Se detecta en plasma a los 15 minutos, alcanzando su valor máximo en una hora. Se mantiene en márgenes terapéuticos durante 12 h, declinando posteriormente hasta ser indetectable 24 h después de la inyección (Davey *et al.*, 1985; Escudero *et al.*, 1994; El Korchi, 2006; Alonso Dupuy, 2016).

Las TTC se distribuyen de forma rápida y difunden bien por todos los tejidos y líquidos corporales. La OTC circula en plasma fijada a proteínas en una proporción alrededor del 20-40%. Las mayores concentraciones se encuentran en riñón, hígado, bazo, pulmón y, además, pasa al líquido pleural, pericardio, atraviesa la placenta y llega a la circulación fetal y a la leche (El Korchi, 2006). Según del Castillo (2013) estos antibióticos alcanzan concentraciones en la leche que se aproximan a las del suero. Sin embargo, otros autores describen que el nivel alcanzado en leches es aproximadamente la mitad que el plasmático (Blobel y Burch, 1960; Ziv y Sulman, 1974).

Las TTC se metabolizan en el hígado en diferentes proporciones, de acuerdo con el tipo de TTC que se trate. La TTC original es el compuesto detectado con mayor frecuencia en las heces, orina y tejidos, y el grado de biotransformación es mínimo (Kunin *et al.*, 1973). Se ha estimado que la tasa de metabolismo de las TTC en vacas lecheras es del 25-75% (Elmund *et al.*, 1971; Rysz y Alvarez, 2004).

La OTC se excreta principalmente con la orina por filtración glomerular y, en menor medida, por la bilis, alcanzándose en la última concentraciones de 5 a 10 veces mayores que en plasma. También se excreta por saliva, leche y huevos (Kunin *et al.*, 1973; Fritz y Zuo, 2007).

Para que los antibióticos lleguen a los ribosomas se requiere un primer proceso de difusión pasiva a través de los canales hidrófilos formados por las proteínas porinas (membrana del patógeno). El segundo proceso implica un transporte activo, que permite el paso a todas las TTC a través de la membrana citoplásmica interna. Este último proceso puede requerir un transportador proteico periplasmático (Gale y Folkes, 1953; Hash *et al.*, 1964).

Se ha señalado que existe sinergismo entre las TTC y la tilosina frente a *Pasteurella* y es posible que este fenómeno se dé también entre las TTC y los demás macrólidos. Del mismo

modo, su asociación con las polimixinas produce efectos sinérgicos, apreciándose un aumento de la captación de los antibióticos por parte de las bacterias (Bentley, 1983).

Farmacodinamia: la OTC es co-dependiente, es decir, que su eficacia depende tanto de su concentración como del tiempo. Uno de estos parámetros puede dominar sobre el otro pero ambos son determinantes en la eficacia del antimicrobiano (Alonso Dupuy, 2016). Las TTC tienen un espectro antimicrobiano muy amplio que incluye gran parte de bacterias Gram positivas y Gram negativas, también son efectivas contra algunos micro-organismos resistentes a agentes que ejercen sus efectos sobre la pared de la célula bacteriana, por ejemplo *Rickettsia*, *Mycoplasma*, *Chlamydia* y algunos protozoos (Baxter y McKellar, 1995). En producciones intensivas, la OTC se utiliza para el tratamiento de enteritis bacteriana (diarrea, colibacilosis), neumonía, leptospirosis, rinitis atrófica, erysipela, infecciones post-quirúrgicas, infección umbilical/articular. En cerdas es apropiado como adyuvante en el control de las enteritis infecciosas (diarreas de los recién nacidos, colibacilosis en los lechones), en el síndrome MMA y en infecciones bacterianas secundarias a enfermedades víricas (Prescott y Baggot, 1993).

La OTC se emplea además como promotor del crecimiento, incrementando la productividad y el consecuente beneficio económico para la industria avícola y porcina (Izquierdo *et al.*, 2010). Como consecuencia del amplio uso que se ha hecho de estos antibióticos, se presentan con cierta frecuencia bacterias resistentes a las tetraciclinas (principalmente entre bacterias de la flora intestinal del animal). La *Escherichia coli* es un indicador de resistencia bacteriana (Arias-Andrés *et al.*, 2014). Se han registrado también bacterias resistentes a diferentes cepas de estafilococos, estreptococos, neumococos, pseudomonas y enterobacterias y algunas cepas de *Mycoplasma hyopneumoniae* y *Mycobacterium bovis* (Speer *et al.*, 1992; Schnappinger y Hillen, 1996; Prescott y Baggot, 1993).

6. PASAJE DE FÁRMACOS A FLUIDOS MAMARIOS (CALOSTRO Y LECHE)

El mecanismo de pasaje de fármacos a los fluidos mamarios es similar a los mecanismos de pasaje a través de membranas plasmáticas (Gremmo-Féger *et al.*, 2003; Damase-Michel *et al.*, 2004). El principal mecanismo de pasaje de un fármaco a calostro se realiza por difusión simple de la forma no ionizada de la molécula (Fleishaker, 2003; Pons y Rey, 2003; Lee, 2007). En relación a las características fisicoquímicas del antibiótico (pKa, hidrosolubilidad,

liposolubilidad, unión a proteínas plasmáticas, entre otros), las concentraciones de los mismos en el calostro pueden variar considerablemente impactando sobre la salud intestinal del lechón lactante.

Factores que influyen la concentración de fármacos en calostro/leche

- *Concentración plasmática maternal del fármaco:* es un factor importante a tener en consideración, el cual está fuertemente relacionado a la dosis y duración del tratamiento, a la vía de administración, a la vida media y al clearance renal del fármaco (Damase-Michel *et al.*, 2004).
- *Grado de ionización del fármaco:* el grado de ionización depende del pKa del fármaco y del pH del medio. Sólo las formas no ionizadas difunden a través de las membranas biológicas (Howard y Lawrence, 1999).
- *Liposolubilidad:* los compuestos más liposolubles son los que más fácilmente atraviesan las membranas biológicas y por ende se concentran en calostro y leche (Wilson *et al.*, 1980).
- *Unión a las proteínas:* sólo la fracción libre puede experimentar pasaje a través de las membranas biológicas. Una vez en los fluidos de calostro o leche el fármaco puede unirse o ligarse a las proteínas de esas matrices biológicas.
- *Peso molecular (PM):* cuanto más bajo sea el PM más fácil difundirá la molécula a través de los espacios intercelulares (difusión para-celular). PM mayores a 800-1000 Daltons difícilmente difundirán a fluidos mamarios.
- *Flujo sanguíneo mamario:* el flujo sanguíneo mamario aumenta durante el curso de cada mamada. Por tanto este factor podría condicionar la concentración de fármacos en leche o calostro y por consiguiente la exposición al fármaco en los lechones. Los lechones que nacen primero serán los más expuestos en función de las concentraciones sanguíneas maternas post-administración, con respecto a los que nacen últimos (la concentración del fármaco en calostro y leche son fuertemente dependientes de la vida media y el clearance renal de la madre) (Pons y Rey, 2003).

- *Composición lipídica del fluido:* con el transcurso del tiempo post-parto, el calostro va variando en su composición lipídica en forma progresiva y significativa, facilitando la concentración de los fármacos liposolubles (Cregan y Hartmann, 1999).

CAPÍTULO II: SECCIONES EXPERIMENTALES

SECCIÓN EXPERIMENTAL I

DETERMINACIÓN DE LAS CONCENTRACIONES RESIDUALES DE FOSFOMICINA Y OXITETRACICLINA EN CALOSTRO Y LECHE DE CERDA

1. INTRODUCCIÓN

La aplicación de antibióticos a cerdas durante el peri-parto es una práctica no recomendada que aún se encuentra profundamente arraigada en diversos sistemas de producción, sin tener en consideración la eliminación de residuos de fármacos en calostro y leche. Diversos estudios han demostrado que la mayor parte de las formulaciones antibióticas administradas a las hembras lactantes se eliminan con la leche (Tornadijo *et al.*, 1998; Cinquina *et al.*, 2003; Fritz y Zuo, 2007; Máttar *et al.*, 2009; Li *et al.*, 2017). Sin embargo, la información científica sobre dicha temática en la especie porcina es limitada debido a que la leche de cerda no se destina a consumo humano. La mayoría de los trabajos de investigación han sido realizados en el ganado vacuno, y en menor medida en ovejas y cabras lecheras, por su posible implicancia en la salud pública y la industria láctea, dado al peligro que conlleva el consumo de leche o derivados contaminados con residuos de antibióticos (Blobel y Burch, 1960; Ziv y Sulman, 1974; Cinquina *et al.*, 2003; Fritz y Zuo, 2007; Máttar *et al.*, 2009; Berruga *et al.*, 2016; Liu *et al.*, 2016; Mullen *et al.*, 2017).

La importancia de determinar la disposición de concentraciones antimicrobianas residuales en el fluido mamario porcino radica fundamentalmente en evaluar el efecto sobre la camada. La ingestión de calostro y leche contaminada con antibióticos puede provocar un quiebre en la morfo-fisiología y microbiología del lactante impactando en su vida productiva futura. Estudios en ratones revelaron que la exposición a bajas concentraciones de antibióticos en la vida temprana tiene efectos sobre el metabolismo y la microbiota intestinal (Cox *et al.*, 2014; Cox y Blaser, 2015). Además, también se ha documentado que los antibióticos presentes en la leche pueden modificar la flora intestinal, el desarrollo de microorganismos patógenos, la reducción de la síntesis de vitaminas (Khachatryan *et al.*, 2006; Fritz y Zuo, 2007) y el desarrollo de bacterias resistentes a los antibióticos (Roberts, 1996; Tornadijo *et al.*, 1998).

Los antibióticos seleccionados para este trabajo de tesis fueron FOS y OTC. Ambos tienen amplio espectro bacteriano y son comúnmente utilizados en producciones intensivas, aunque poseen características físico-químicas, hidro y liposolubles opuestas (Escolar Jurado *et*

al., 1998; Papadoyannis *et al.*, 2000; Popovic *et al.*, 2010; Alonso Dupuy, 2016; Ramírez Llorente, 2016). Esto conlleva a que el pasaje a través de las membranas biológicas sea diferencial para cada antibiótico y por consiguiente su llegada al fluido mamario.

2. OBJETIVO

Estudiar la disposición de los antibióticos FOS y OTC en calostro y leche de cerda, luego de la administración IM durante el peri-parto.

3. MATERIALES Y MÉTODOS

3.a) Animales

El estudio se llevó a cabo en una granja comercial del partido de Tandil, Provincia de Buenos Aires, que cuenta con 400 hembras en producción. La granja consiste en un sistema de producción de ciclo completo, en confinamiento total y en un solo sitio. Se trabajó con cerdas gestantes clínicamente sanas, de una misma línea genética, con 2,4 partos/hembra/año, >27 lechones nacidos vivos/cerda/año, >22 lechones destetados/hembra/año. Las cerdas no recibieron tratamiento antibiótico previo al ensayo y no presentaron historial de partos distócicos o complicaciones post-parto. Las hembras, alojadas en parideras de hierro en salas de maternidad fueron ingresadas 4 días previos al parto y se mantuvieron allí durante 21 días hasta el destete de sus respectivos lechones. La alimentación administrada consistió en una dieta comercial gestación (3,0 Mcal EM/Kg y 14% proteína) antes del parto y dieta comercial lactancia (3,2 Mcal EM/Kg y 16% proteína) durante la lactancia. El estudio se realizó siguiendo las normas éticas aprobadas por el comité de Bienestar Animal de la Facultad de Ciencias Veterinarias, Universidad Nacional del Centro de la Provincia de Buenos Aires, Argentina.

3.b) Antibióticos

- Fosfomicina: FOS disódica (Fosbac®, formulación al 25% de laboratorio Bedson S.A., Pilar, Buenos Aires, Argentina) administrada por vía IM a razón de 15 mg/Kg de PV.

- Oxitetraciclina: OTC solución (Terramicina® solución inyectable de laboratorio Zoetis S.A., Argentina) administrada por vía IM a razón de 6 mg/Kg de PV y OTC LA (Oxilen AD, formulación al 20% de laboratorio Vetanco S.A., Argentina) administrada por vía IM a razón de 20 mg/Kg de PV.

3.c) Grupos experimentales y administración de los antimicrobianos

Todos los animales fueron inducidos al parto a los 114 días de gestación con 1 mL de PGF2 α vía IM y divididos en cinco grupos experimentales (figura 5):

- **Cerdas Control:** tratadas con solución fisiológica.
- **Cerdas FOS1:** tratadas con una dosis IM de FOS de 15 mg/Kg al momento de la inducción al parto.
- **Cerdas OTCLA:** tratadas con una dosis IM de OTC LA (larga acción) de 20 mg/Kg al momento de la inducción al parto.
- **Cerdas FOS3:** tratadas con tres dosis IM de FOS de 15 mg/Kg. La primera dosis se administró al momento de la inducción al parto y las dos siguientes cada 24 h.
- **Cerdas OTC3:** tratadas con tres dosis IM de OTC de 6 mg/Kg. La primera dosis se administró al momento de la inducción al parto y las dos siguientes cada 24 h.

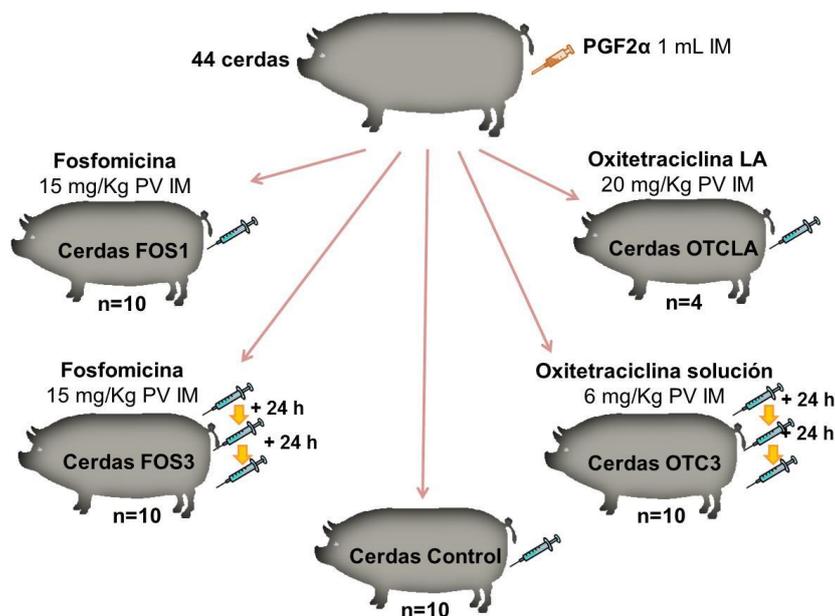


Figura 5. Esquema de dosificación de los grupos de cerdas en estudio.

Cabe aclarar que para conformar los grupos se realizó la inducción al parto y el tratamiento con antibióticos de un número mayor de cerdas, y sólo se eligieron las hembras que en promedio comenzaban el parto a las 20 ± 1 h pos inducción.

Muestras de calostro y leche

Las muestras de calostro y leche fueron colectadas manualmente (5 mL) de las glándulas mamarias pectorales y medias en tubos de polipropileno de 50 mL a los siguientes tiempos post administración de los antibióticos: al inicio del parto (0 h) y a las 2, 4, 6, 8, 10, 12, 24 y 48 h post-parto (figura 6). Las muestras fueron almacenadas a -80°C hasta su procesamiento y análisis por HPLC en el Laboratorio de Toxicología, Departamento de Fisiopatología de la Facultad de Ciencias Veterinarias, UNCPBA. Es dable destacar que en el presente ensayo no se consideró la posibilidad de extraer muestras a las cerdas en parición para realizar cinética en sangre, ya que el estrés inducido por las maniobras de inmovilización y toma serial de sangre durante el parto, modifica considerablemente el mismo, así como la producción y disposición de calostro-leche (McGlone *et al.*, 1993) y por ende el objetivo central del estudio.



Figura 6. Toma de muestras de calostro y leche de cerda.

3.d) Determinaciones de las concentraciones de antibióticos en calostro y leche

Puesta a punto de las metodologías

Para llevar adelante este objetivo particular, se puso a punto y validó una metodología analítica HPLC-MS/MS para la determinación de FOS y HPLC-UV para la cuantificación de

OTC en las matrices biológicas en estudio (calostro y leche) (Fritz y Zuo, 2007; Fernández Paggi *et al.*, 2012).

❖ **Metodología analítica de la FOS**

Reactivos y químicos: todos los reactivos y solventes empleados fueron de grado/calidad HPLC. Fosfomicina Sigma Aldrich, Mo (USA). Fudosteína (FUD) (Estándar Interno, ISTD) EH Field Co; LTD (Nanjing, China). Acetato de etilo y metanol de Laboratorios J. T. Baker (Deventer, Holanda). Agua ultra purificada, desionizada.

Equipamiento: cromatógrafo líquido de alta resolución masa masa (HPLC-MS/MS): Thermo Electron Corporation (Bomba de gradiente cuaternaria, equipo de inyección automática termostaticado y horno columna). Columna: Phenomenex de fase CN. Tamaño de partícula 3 µm, 4.6 mm de diámetro interno y 75 mm de largo. Detector: Espectrómetro de masas de triple cuádruplo marca Thermo Electron Corporation, modelo TQS Quantum Discovery Max, (U.S.A). Fuente de iones ESI (ionización electro spray). Centrífuga de 12.000 rpm (Beckman Coulter®), balanza analítica de 0,01 mg de precisión (Denver Instruments), equipo de purificación de agua Pure Lab UHQ de ELGA (Lane End, UK), freezer, agitadora, vórtex.

Material de laboratorio: material volumétrico de vidrio certificado de clase A (probetas, matraces). Micropipetas automáticas Gilson (P20; P100; P200 y P1000). Tubos de ensayo. Tubos de polipropileno de 50 mL. Jeringas plásticas de 3 mL y filtros de jeringa de 0,22 µm (Agilent Technologies). Eppendorf de polipropileno de 3 mL. Viales de vidrio color ámbar de 1,5 mL para inyector automático.

Método:

Preparación de soluciones estándares

- Soluciones madre de FOS y FUD: 400 µg/mL en agua (400 ppm)
- Soluciones de trabajo de 1, 10 y 100 µg/mL de FOS
- Soluciones intermedias de 0,05; 0,1; 0,5; 1; 5; 10; 15 y 20 ppm de FOS para la curva de calibración.

Preparación de curva de calibración

Se realizó un “pool” calostro proveniente de cerdas libres de antibióticos, recolectado al momento del parto. Se utilizaron 100 μL de extracto calostro blanco filtrado, 100 μL de la solución estándar correspondiente, se fortificó con 100 μL de FUD 10 ppm (10 $\mu\text{g}/\text{mL}$ en agua) y se agregó 700 μL de agua a cada vial.

Extracción y purificación de la FOS

Para la extracción y purificación del FOS se utilizó una técnica desarrollada por nuestro equipo de trabajo (Fernández Paggi *et al.*, 2012). Las muestras de calostro y leche fueron descongeladas a temperatura ambiente de laboratorio (21°C) y posteriormente homogeneizadas en vórtex durante 30 segundos. Un mL de calostro de cada muestra fue colocado en tubos de polipropileno de 50 mL. Las muestras fueron sometidas a una doble extracción líquido-líquido mediante el agregado de 6 mL de acetato de etilo. Los tubos fueron mezclados en vórtex, agitados durante 20 minutos, centrifugados a 9000 rpm a 4°C durante 10 minutos y congelados en freezer durante toda la noche. En cada extracción la fase orgánica (solvente) fue descartada con pipeta Pasteur de 2 mL. Posteriormente se agregó 1 mL de metanol a la fase acuosa, con el objetivo de precipitar las proteínas hidrosolubles presentes en la misma (figura 7). Las muestras fueron sometidas a vórtex (30 segundos) y centrifugadas a 10000 rpm a 4°C durante 20 minutos. El sobrenadante así obtenido fue filtrado mediante jeringa y filtros de jeringa de 0,22 μm . Finalmente se tomaron 100 μL de filtrado de las muestras, 100 μL de FUD 10 ppm y 800 μL de agua HPLC des-ionizada, se colocaron en viales de vidrio y fueron analizados por HPLC-MS/MS. La determinación de FOS en calostro se llevó a cabo por triplicado.

La curva de calibración contempló 6 concentraciones por quintuplicado en un rango de 0,1 a 10 $\mu\text{g}/\text{mL}$. A partir de las mismas se determinó la homogeneidad de varianza para evaluar la linealidad (Test de Hartley). El límite de cuantificación fue calculado por sextuplicado tomando la última concentración (0,1 $\mu\text{g}/\text{mL}$) de la curva de calibración. El porcentaje de recuperación fue calculado en 3 concentraciones por quintuplicado de la curva de calibración (10, 5 y 0,1 $\mu\text{g}/\text{mL}$). Así mismo, se calcularon las variaciones inter día e intra día. La interferencia fue determinada por sextuplicado de extracto blanco de calostro libre de FOS. Para evaluar selectividad y verificar que no hubiese interferencias en el tiempo de retención de nuestros analitos en estudio, se inyectaron en el equipo una muestra de matriz blanco de calostro (sin adición de antibióticos) y una muestra de matriz blanco fortificada con antibióticos.



Figura 7. Muestras de FOS durante la precipitación de proteínas.

Análisis cromatográfico

Se trabajó con un equipo HPLC-MS/MS Thermo Inc. que posee un inyector automático termostaticado a 14°C, con bomba de gradiente cuaternario (figura 8). La fase móvil estuvo compuesta por acetonitrilo/agua (20:80), que trabajó en modo isocrático a un flujo de 250 $\mu\text{L}/\text{min}$. La separación cromatográfica se realizó en una columna Phenomenex de fase CN, tamaño de partícula de 5 μm , 4,6 mm de diámetro interno y 75 mm de largo, que se encuentra en un horno a 30°C. El volumen de inyección fue de 20 μL , el tiempo de corrida para una muestra de 6 minutos y el tiempo de retención de 2,53 minutos. La detección de FOS fue realizada por un analizador-detector de triple cuádruplo, marca Thermo (TSQ Quantum). La fuente de iones fue ESI trabajando en modo negativo. La detección se realizó utilizando SRM para las transiciones 137 - > 79 y 178 - > 91 de FOS y FUD, respectivamente. Los iones precursores de m/z 137 y 178 fueron seleccionados en el primer cuádruplo (Q1). Luego de la fragmentación inducida por colisión con gas argón en Q2, los iones productos de m/z 79 y 91 fueron monitoreados en Q3. El procesamiento de los datos se realizó utilizando el software Xcalibur de Thermo.

Los parámetros de validación de FOS en calostro y leche fueron determinados acorde a las exigencias de las guías internacionales (U. S. Department of Health and Human Services, FDA, CDER, CVM. Guidance for Industry, Bioanalytical Method Validation, May 2001).



Figura 8. Equipo de HPLC-MS/MS.

❖ Metodología analítica de la OTC

Reactivos y químicos: todos los reactivos y solventes empleados fueron de grado/calidad HPLC. Oxitetraciclina clorhidrato y tetraciclina clorhidrato (TTC) (Estándar Interno, ISTD) de Sigma Aldrich, Mo (USA). Acetonitrilo y metanol de Laboratorios J. T. Baker (Deventer, Holanda). Ácido oxálico, acetato de sodio anhidro y fosfato de sodio dibásico anhidro de Biopack (Argentina). Ácido fosfórico de EM Science, ácido cítrico monohidrato de Anedra Research Ag. S.A. y EDTA disódico dihidrato de Cicarelli Laboratorios. Agua ultra purificada, desionizada.

Equipamiento: cromatógrafo líquido (HPLC): Gilson con detector 151 UV/Vis con inyector automático (Thermo Scientific UltiMate 3000) con loop de 20 mL. Columna ODS Hypersil C18 de 3 μm , 150 x 4,6mm (Thermo Scientific). Centrífuga de 12.000 rpm (Beckman Coulter®), balanza analítica de 0,01 mg de precisión (Denver Instruments), sonicador (Transonic 460/H Ultrasonic bath (Elma, Germany), cámara de vacío (Visiprep Supelco Vacuum Manifold) conectada a una bomba de vacío (medi-pump modelo 1136), equipo de purificación de agua Pure Lab UHQ de ELGA (Lane End, UK), freezer, vórtex. Columna cromatográfica: SPE Strata® C18-E (500 μm , 70A) 500 mg/6 mL para extracción en fase sólida (Phenomenex).

Material de Laboratorio: material volumétrico de vidrio certificado de clase A (probetas, matraces). Micropipetas automáticas Gilson (P20; P100; P200; P1000). Tubos de ensayo. Tubos de polipropileno de 50 mL. Membranas de microfibra de vidrio de 0,45 mm (microclar/MIMillipore®). Jeringas plásticas de 3 mL y filtros de jeringa de 0,22 μm (Agilent

Technologies). Eppendorf de polipropileno de 3 mL. Viales de vidrio de 1,5 mL para inyector automático.

Método:

Preparación de soluciones

- Solución Mc Ilvaine: se preparó una solución de ácido cítrico 0,2 M (42 g/L) y una solución de fosfato de sodio 0,4 M (56,8 g/L) con agua grado HPLC. Se mezclaron 176,5 mL de la solución de ácido cítrico con 823,5 mL de la solución de fosfato de sodio en un matraz aforado de 1 L.
- Solución de extracción (Mc Ilvaine-EDTA 50:50): se preparó una solución de EDTA 0,1 M (37,2 g/L) con agua grado HPLC. Se mezcló 1 L de cada solución (Mc Ilvaine y EDTA) en recipiente para formar la solución final 50:50 v/v.
- Solución acuosa de ácido oxálico 0,01 M (1,26 g/L) diluido en agua grado HPLC.
- Fase móvil: acetonitrilo/metanol (50:50 v/v) y solución acuosa de ácido oxálico 0,01 M (35:35:30 v/v). Primeramente se mezcló acetonitrilo-metanol y se agregó a la solución acuosa de ácido oxálico en proporción 70:30. Estos solventes fueron filtrados diariamente previo a su utilización.
- Acetato de sodio 0,1 M (13,6g/L) diluido en agua grado HPLC.
- Metanol al 2% en agua grado HPLC.

Preparación de soluciones estándares

- Soluciones madres 1 de OTC y TTC: 1000 µg/mL en metanol (1000 ppm)
- Solución madre 2 de OTC: 100 µg/mL en metanol (100 ppm)
- Solución madre 3 de OTC: 10 µg/mL en metanol (10 ppm)
- Soluciones de trabajo de 0,05; 0,1; 0,25; 0,5; 0,8 y 1 µg/mL de OTC.
- Soluciones intermedias de 0,2; 0,5; 1; 2; 3 y 5 ppm de OTC para la curva de calibración.

Preparación de curva de calibración

Se realizó un “pool” calostro proveniente de cerdas libres de antibióticos, recolectado al momento del parto. Se colocaron 1950 mL de extracto calostro blanco filtrado, 25 µL de la solución intermedia correspondiente y 25 µL de TTC en cada vial.

Extracción y purificación de la OTC

Para la extracción y purificación de OTC se utilizó parte de la técnica de Fritz y Zuo (2007) modificada. Las muestras de calostro y leche fueron descongeladas a temperatura ambiente de laboratorio (21°C) y posteriormente homogeneizadas en vórtex durante 30 segundos. En tubos de polipropileno de 50 mL previamente rotulados, se colocaron 1990 µL de calostro, se adicionaron 10 µL TTC (solución madre 1 de 1000 µg/mL) y 8 mL de la solución de extracción a fin de precipitar las proteínas. Las muestras fueron sometidas a vórtex durante 30 segundos y sonicadas durante 10 minutos en ultrasonido. Posteriormente, fueron centrifugadas a 10000 rpm a 4°C durante 15 minutos. El sobrenadante fue recolectado con micropipeta en tubos de polipropileno de 50 mL y se adicionaron 50 µL de acetonitrilo y 50 µL de ácido fosfórico. Nuevamente las muestras fueron sometidas a vórtex 30 segundos y centrifugadas a 10000 rpm a 4°C durante 15 minutos. Luego el nuevo sobrenadante fue filtrado con jeringa de 5 mL y membranas en cámara de vacío conectada a una bomba de vacío sin presión. El filtrado fue recolectado en tubos de vidrio de 15 mL para su purificación en un sistema de columnas de extracción sólido-líquido.

Purificación en fase sólida:

Posteriormente el filtrado fue eluido a través de columnas de fase sólida (SPE) en cámara de vacío acopladas a una jeringa en la parte superior, previa activación y acondicionamiento de la columna. Para la activación se utilizaron 5 mL de metanol y luego el acondicionamiento se hizo con 5 mL de solución de extracción. Posteriormente se cargó la muestra, para lo cual se colocó una membrana en cada jeringa y se pasó todo el filtrado (ayudando con el émbolo). Luego de descartar la jeringa, se procedió al lavado de la columna con 5 mL de solución Mc Ilvaine, 2,5 mL de acetato de sodio, 5 mL de agua grado HPLC y 2 mL de metanol al 2%. El procedimiento se realizó a un flujo lento de 5 mL/min (0-3 in Hg) y todo el filtrado fue descartado. Posteriormente se incrementó el vacío con el objetivo de que no quedasen residuos del lavado en las columnas y se realizó el sacado durante 10 minutos. A continuación, se efectuó la elución del analito con 2 mL de fase móvil 70:30 en tubos de vidrio de 15 mL (figura 9). Este proceso se realizó a un flujo lento para garantizar un buen recobrado de la sustancia adsorbida en la columna. Finalmente, las muestras fueron filtradas con jeringa de 3 mL y filtro de jeringa y depositadas en viales de vidrio color ámbar, para la separación y cuantificación en HPLC-UV.

Para evaluar la linealidad, la curva de calibración contempló 6 concentraciones por quintuplicado en un rango de 0,2 a 5 µg/mL, considerando un $r^2 > 0,995$. A su vez, se determinó

la homogeneidad de varianza mediante el Test de Hartley. El límite de cuantificación fue calculado por sextuplicado tomando la última concentración (0,2 µg/mL) de la curva de calibración. El porcentaje de recuperación fue calculado en 3 concentraciones por quintuplicado de la curva de calibración (10, 5 y 0,1 µg/mL), aceptando una recuperación mayor al 70%. Para verificar precisión y exactitud se tomaron 3 concentraciones por triplicado en tres días consecutivos para calcular las variaciones inter día e intra día. La interferencia fue determinada por sextuplicado de extracto blanco de calostro libre de OTC, tomando como criterio de aceptación un coeficiente de variación (CV) menor al 5%. Para evaluar selectividad y verificar que no hubiese interferencias en el tiempo de retención de nuestros analitos en estudio, se inyectaron en el equipo una muestra de matriz blanco de calostro (sin adición de antibióticos) y una muestra de matriz blanco fortificada con antibióticos.

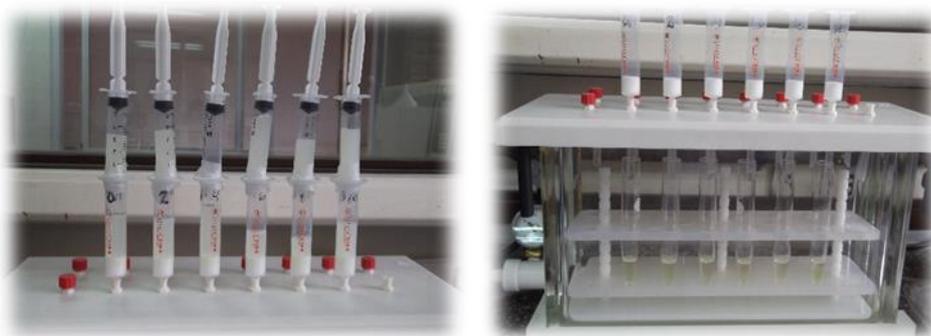


Figura 9. Extracción de OTC: elución del filtrado con jeringa con membrana y elución del analito en columnas de fase sólida.

Análisis cromatográfico

Se utilizó un sistema de bomba de gradiente HPLC marca Gilson equipado con un detector 151 UV/Vis con inyector automático (Thermo Scientific UltiMate 3000) con loop de 20 mL (figura 10). La fase móvil estuvo compuesta por acetonitril/metanol (50:50 v/v) y solución acuosa de ácido oxálico 0,01 M, en proporción 70:30, respectivamente, trabajando en modo isocrático manteniendo un flujo de 1,5 mL/min. Estos solventes fueron filtrados diariamente previos a su utilización. La separación cromatográfica se realizó mediante una columna ODS Hypersil C18 de 3 µm, 150 x 4,6mm (Thermo Scientific) en horno a 40°C, operando a una longitud de onda de 365 nm (AUFS=0,0010) y presión de 168 bar. El volumen de inyección fue

de 20 μL y el tiempo de retención de 3,06 minutos. El programa de integración de datos utilizado fue Chromeleon.

Los parámetros de validación de OTC en calostro y leche fueron determinados acorde a las exigencias de las guías internacionales (U. S. Department of Health and Human Services, FDA, CDER, CVM. Guidance for Industry, Bioanalytical Method Validation, May 2001).



Figura 10. Equipo de HPLC.

3.e) Análisis estadístico

El área bajo la curva (AUC) fue calculada mediante el empleo del software PK Solutions 2.0 (Summit Research Services, Asland, OH, USA).

4. RESULTADOS

Determinación de concentraciones residuales de FOS y OTC en calostro y leche

La utilización de un sistema de análisis de triple cuádruplo asegura selectividad y sensibilidad en la detección de FOS. En las condiciones operatorias seleccionadas, el efecto de la supresión de iones no implica modificaciones analíticas a los tiempos de retención del antibiótico. La cuantificación fue lineal (r^2 : 0,9995) a los rangos de concentraciones de ensayo y el estudio estadístico aplicado a la linealidad (Test de Hartley) demostró que las varianzas fueron homogéneas. La metodología fue precisa con una exactitud de ER menor al 2%. El porcentaje de recuperación de los analitos en los diferentes niveles de concentración estuvo dentro del rango 94,9-106,2% acorde con los criterios de aceptación de las guías internacionales. El límite de

cuantificación en calostro fue establecido a $0,1 \mu\text{g/mL}$. En la figura 11 se presentan los cromatogramas para FOS: se graficó la abundancia relativa con relación al tiempo de calostro blanco, calostro fortificado con FOS y calostro fortificado con FUD. No se observaron interferencias de componentes endógenos de la matriz para los tiempos de retención del analito y del ISTD. Los tiempos de retención para la FOS y la FUD fueron 2,53 y 5,08 minutos, respectivamente.

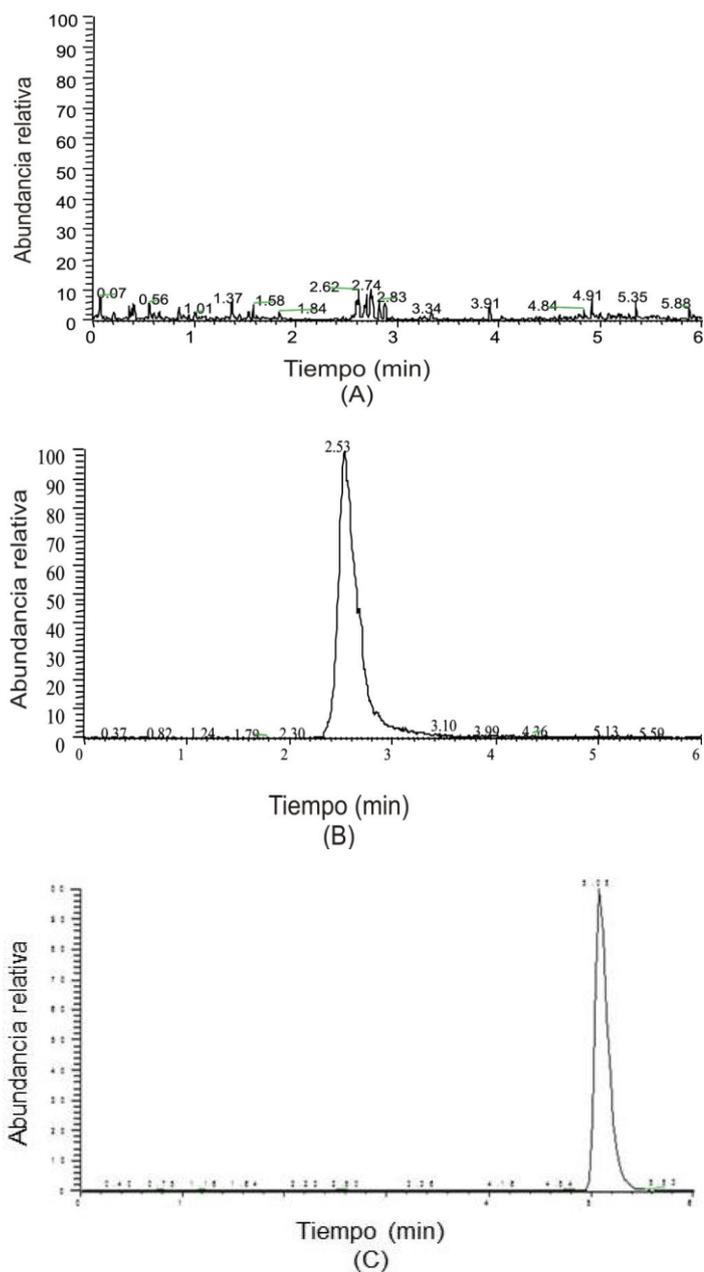
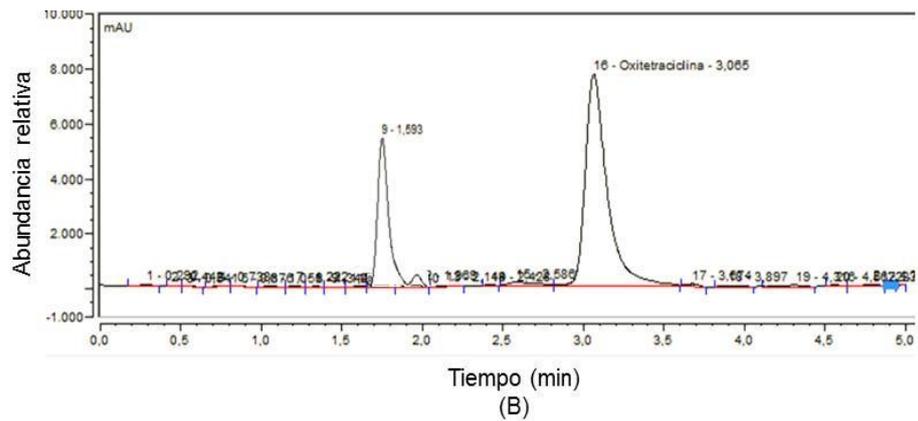
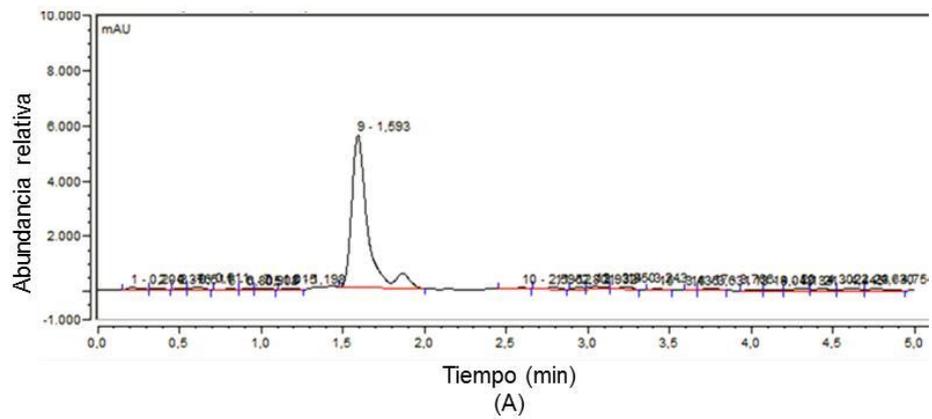


Figura 11. Extracción y purificación de calostro: (A) Muestra de calostro blanco; (B) Muestra de calostro blanco fortificado con $1 \mu\text{g/mL}$ de FOS en el límite de cuantificación ($0,1 \mu\text{g/mL}$) y (C) Muestra de calostro blanco fortificado con $30 \mu\text{g/mL}$ de FUD.

Para la detección de OTC, la utilización de método de HPLC fue sensible y selectivo. La cuantificación fue lineal (r^2 : 0,9985) a los rangos de concentraciones de ensayo y el estudio estadístico aplicado a la linealidad (Test de Hartley) demostró que las varianzas fueron homogéneas. El porcentaje de recuperación de los analitos en los diferentes niveles de concentración estuvo dentro del rango 75,2 y 83,2% acorde con los criterios de aceptación de las guías internacionales. La metodología fue precisa con una exactitud de ER menor a 2%. El límite de cuantificación en calostro fue establecido a 0,2 $\mu\text{g/mL}$. En la figura 12 se presentan los cromatogramas para OTC donde se grafican la abundancia relativa con relación al tiempo en blanco de calostro y calostro fortificado con OTC y calostro fortificado con TTC como estándar interno. No se observaron interferencias de componentes endógenos de la matriz para los tiempos de retención del analito y del ISTD. Los tiempos de retención para la OTC y la TTC fueron 3,06 y 3,44 minutos, respectivamente.



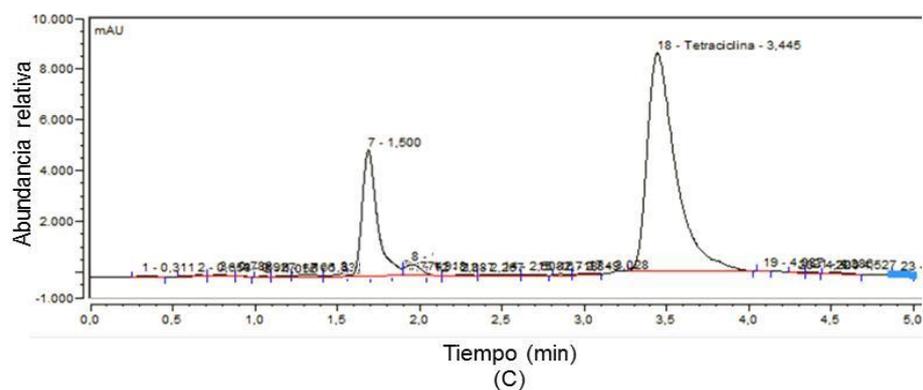


Figura 12. Extracción y purificación de calostro: (A) Muestra de calostro blanco; (B) Muestra de calostro fortificado con 1 µg/mL de OTC y (C) Muestra de calostro blanco fortificado con 1 µg/mL de TTC.

La figura 13 muestran el perfil de las concentraciones calostrales de FOS1 y FOS3 (µg/mL) en función del tiempo, obtenidas luego de la administración IM de una y tres dosis/24 h respectivamente de 15 mg/Kg de FOS, a las cerdas durante el peri-parto. La figura 14 y la tabla 1 muestran el perfil de las concentraciones calostrales promedio (\pm EEM) de FOS1 y FOS3 (µg/mL). Para el grupo FOS1 los valores obtenidos estuvieron en un rango de $1,12 \pm 0,03$ y $0,09 \pm 0,02$ µg/mL entre las 0 y 10 h post parto y no fueron detectadas concentraciones en calostro luego de las 10 h post parto. El AUC_{0-48} fue de $8,56 \pm 2,09$ µg.h/mL. Para las cerdas del grupo FOS3 las concentraciones estuvieron entre los valores $1,07 \pm 0,19$ y $1,21 \pm 0,57$ µg/mL entre las 0 y 48 horas de muestreo y el AUC_{0-48} fue de $80,62 \pm 60,66$ µg.h/mL.

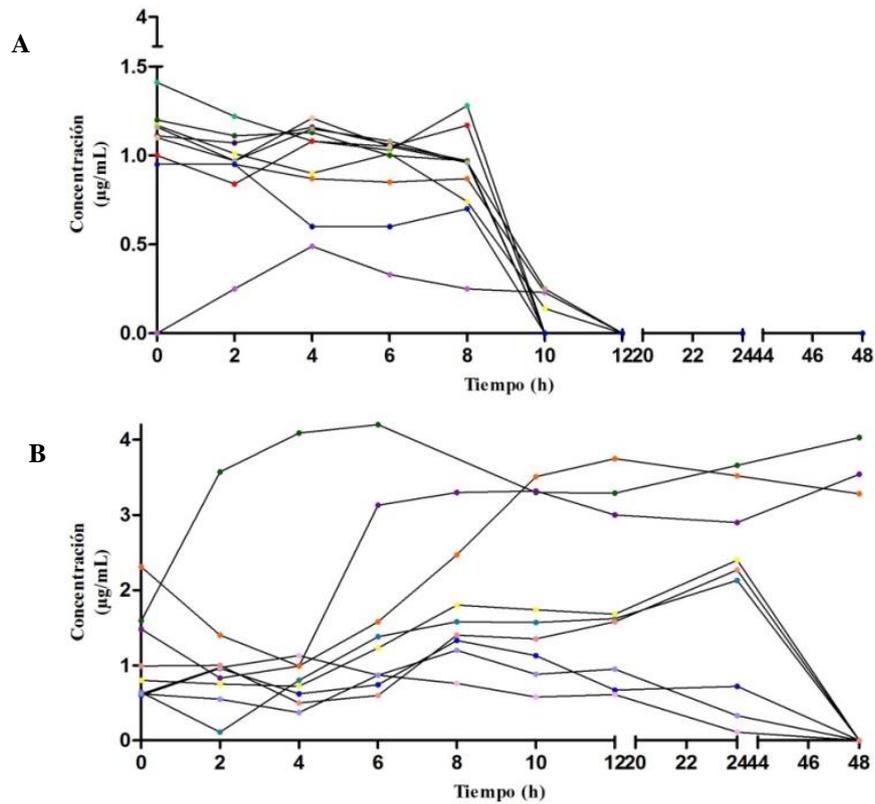


Figura 13. (A) Perfil de eliminación de FOS1 ($\mu\text{g/mL}$) y (B) perfil de eliminación de FOS3 ($\mu\text{g/mL}$) en calostro/leche luego de la administración IM de una y tres dosis de 15 mg/Kg de FOS, respectivamente en cerdas durante el peri-parto.

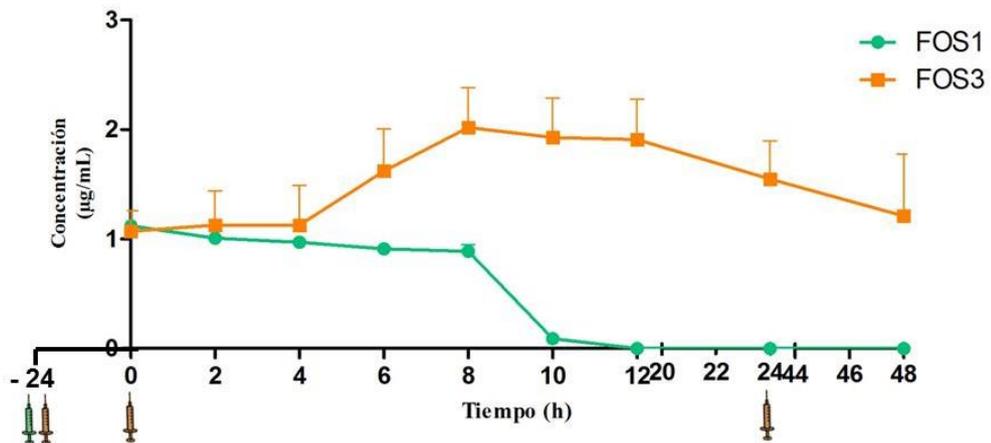


Figura 14. Disposición calostrual/láctea promedio (\pm EEM) de FOS1 y FOS3 ($\mu\text{g/mL}$) luego de la administración IM de una y tres dosis de 15 mg/Kg de FOS, respectivamente en cerdas durante el peri-parto. La jeringa verde indica el momento de la administración del antibiótico en el tratamiento monodosis. Las 3 jeringas naranjas indican las aplicaciones del antibiótico en el tratamiento multidosis.

Tabla 1. Disposición calostr/láctea de FOS1 y FOS3 en cerdas tratadas con una y tres dosis de antibiótico/24 h durante el peri-parto.

Tiempo (h)	FOS1 ($\mu\text{g/mL}$)	FOS3 ($\mu\text{g/mL}$)
0	$1,12 \pm 0,03^*$	$1,07 \pm 0,19$
2	$1,01 \pm 0,02$	$1,13 \pm 0,31$
4	$0,97 \pm 0,05$	$1,13 \pm 0,36$
6	$0,91 \pm 0,05$	$1,62 \pm 0,39$
8	$0,89 \pm 0,06$	$2,02 \pm 0,36$
10	$0,09 \pm 0,02$	$1,93 \pm 0,36$
12	NC	$1,91 \pm 0,37$
24	NC	$1,55 \pm 0,35$
48	NC	$1,21 \pm 0,57$

* Valor promedio (\pm EEM).

La figura 15 muestran el perfil de las concentraciones calostrales de OTCLA y OTC3 ($\mu\text{g/mL}$) en función del tiempo, obtenidas luego de la administración IM de una y tres dosis/24 h respectivamente de 20 y 6 mg/Kg de OTC a las cerdas durante el peri-parto. La figura 16 y la tabla 2 muestran el perfil de las concentraciones calostrales promedio (\pm EEM) de OTCLA y OTC3 ($\mu\text{g/mL}$). Los valores determinados para las cerdas del grupo OTCLA estuvieron entre $0,68 \pm 0,08$ y $0,22 \pm 0,19 \mu\text{g/mL}$ entre las 0 y 48 h post parto. En el grupo OTC3 las concentraciones estuvieron entre los valores $0,34 \pm 0,04$ y $0,10 \pm 0,06 \mu\text{g/mL}$ para las mismas horas de muestreo. El AUC_{0-48} fue de $28,36 \pm 16,71 \mu\text{g.h/mL}$ para el grupo OTCLA y de $18,91 \pm 5,92 \mu\text{g.h/mL}$ para OTC3.

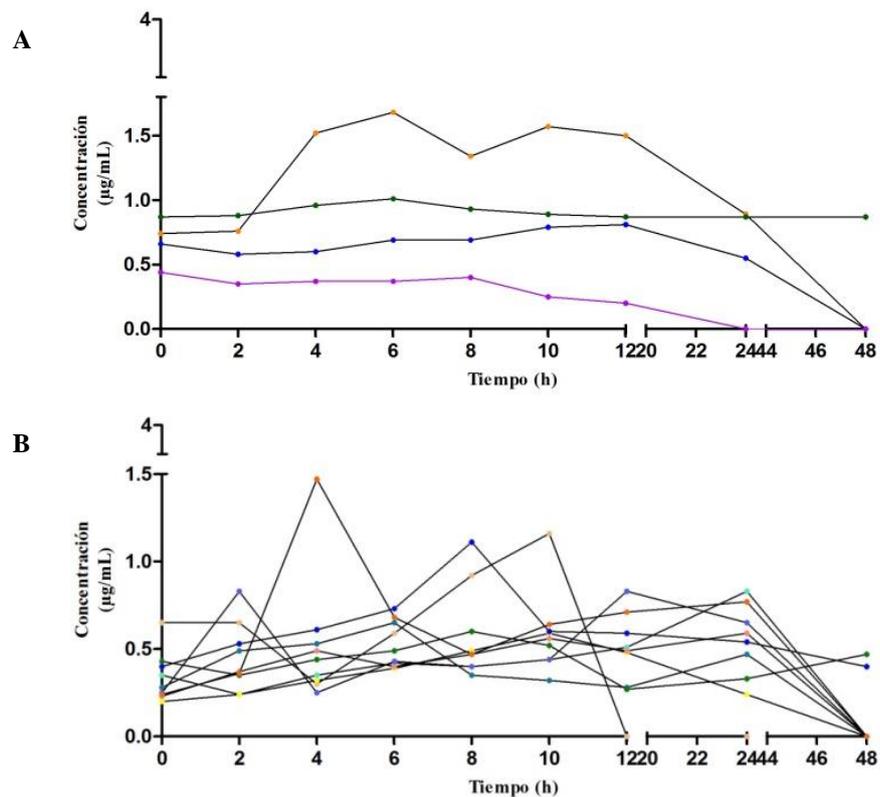


Figura 15. (A) Perfil de eliminación de OTCLA ($\mu\text{g/mL}$) y (B) perfil de eliminación de OTC3 ($\mu\text{g/mL}$) en calostro/leche luego de la administración IM de una dosis de 20 mg/Kg de OTC LA y tres dosis de 6 mg/Kg de OTC solución, respectivamente en cerdas durante el peri-parto.

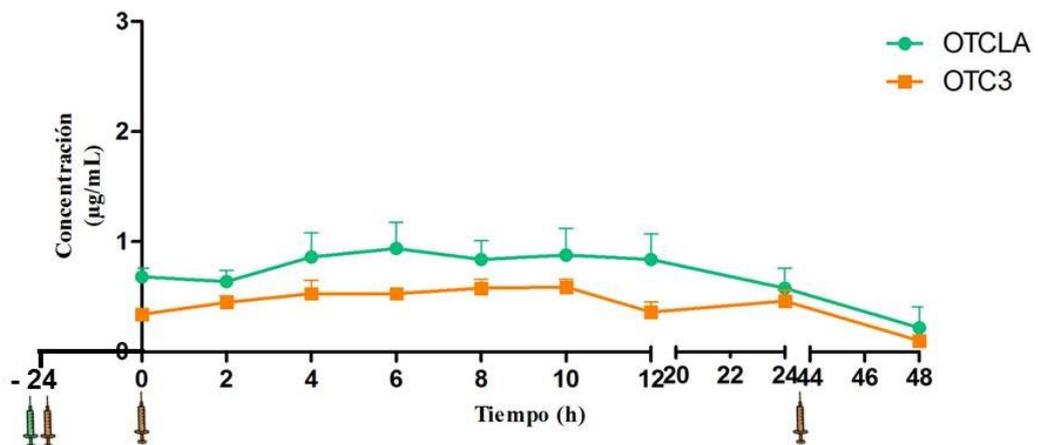


Figura 16. Disposición calostroal/láctea promedio (\pm EEM) de OTCLA y OTC3 ($\mu\text{g/mL}$) luego de la administración IM de una dosis de 20 mg/Kg de OTC LA y tres dosis de 6 mg/Kg de OTC solución respectivamente, en cerdas durante el peri-parto. La jeringa verde indica el momento de la administración del antibiótico en el tratamiento monodosis. Las 3 jeringas naranjas indican las aplicaciones del antibiótico en el tratamiento multidosis.

Tabla 2. Disposición calostr/láctea de OTCLA y OTC3 en cerdas tratadas con una y tres dosis de antibiótico/24 h durante el peri-parto.

Tiempo (h)	OTCLA ($\mu\text{g/mL}$)	OTC3 ($\mu\text{g/mL}$)
0	$0,68 \pm 0,08$	$0,34 \pm 0,04$
2	$0,64 \pm 0,10$	$0,45 \pm 0,06$
4	$0,86 \pm 0,22$	$0,53 \pm 0,12$
6	$0,94 \pm 0,24$	$0,53 \pm 0,04$
8	$0,84 \pm 0,17$	$0,58 \pm 0,08$
10	$0,88 \pm 0,24$	$0,59 \pm 0,07$
12	$0,84 \pm 0,23$	$0,36 \pm 0,09$
24	$0,58 \pm 0,18$	$0,46 \pm 0,10$
48	$0,22 \pm 0,19$	$0,10 \pm 0,06$

* Valor promedio (\pm EEM).

5. DISCUSIÓN

La administración de FOS disódica según un plan posológico mono y multidosis a razón de 15 mg/Kg vía IM en cerdas gestantes, mostró perfiles de eliminación calostrales y lácteos diferentes. Estas desigualdades se corresponden con las interacciones dinámicas que se establecen entre las características fisicoquímicas, de liposolubilidad y de difusibilidad del antibiótico, y los importantes cambios morfo-funcionales mamarios de la cerda acontecidos durante el pasaje de la fase colostr a la fase de la leche (Devillers *et al.*, 2005).

Los resultados demuestran que las concentraciones calostrales determinadas al inicio del parto (0 h) luego de la primera aplicación de FOS en ambos tratamientos (FOS1 y FOS3) fueron similares. Sin embargo, en las horas posteriores el perfil de eliminación de la FOS presentó variaciones entre los tratamientos. En las cerdas del grupo FOS1 la curva calostr mostró una caída gradual de las concentraciones del antibiótico hasta quedar por debajo del límite de cuantificación ($0,1 \mu\text{g/mL}$) hacia las 12 h post primer nacimiento (AUC_{0-48} : $8,56 \pm 2,09 \mu\text{g.h/mL}$). Este comportamiento de eliminación del fármaco a calostro se corresponde con el perfil plasmático y comportamiento farmacocinético luego de su administración IM a cerdos a razón de 15 mg/Kg ($T_{1/2}$: $1,85 \pm 0,19$ h; CL: $131,50 \pm 30,07$ mL/Kg/h) (Soraci *et al.*, 2011a). En contraposición, el tratamiento multidosis (FOS3) presentó un comportamiento diferente en calostro (AUC_{0-48} : $80,62 \pm 60,66 \mu\text{g.h/mL}$). Los resultados demuestran que no todas las hembras respondieron de la misma manera a partir de la aplicación del segundo tratamiento.

El pasaje de macromoléculas, células inmunitarias y otros componentes del calostro a través del epitelio mamario dependen de una cascada de eventos hormonales que tienen lugar dentro de las 72 h previas y 24 h posteriores al parto (Devillers *et al.*, 2005). La P4 inhibe la actividad de síntesis de las células epiteliales mamarias y el cierre de sus uniones estrechas, asegurando el aislamiento de los alvéolos del medio extracelular y transformando así al calostro en leche, mientras que la PRL y el cortisol ejercen el efecto contrario (Cregan y Hartmann, 1999; Farmer, 2001; Neville *et al.*, 2001; Fleishaker, 2003; Pons y Rey, 2003; Le Dividich, 2006; Lee, 2007). La FOS es un antibiótico hidrosoluble que posee un pKa de 6,7, un bajo peso molecular (138 g/mol), una insignificante unión a proteínas plasmáticas y tisulares (Kirby, 1977; Gobernado, 2003), con un moderado a bajo volumen de distribución (Vd: $273,00 \pm 40,70$ mL/Kg) y un rápido clearance corporal en cerdos (CL: $131,50 \pm 30,07$ mL/Kg/h) (Soraci *et al.*, 2011a). Para esta molécula se han descrito tres mecanismos de absorción a nivel intestinal: difusión pasiva, pasaje para-celular y transporte activo mediante bombas fosfato sodio dependientes (Ishizawa *et al.*, 1991). Sin embargo, en la glándula mamaria se desconoce el mecanismo de transporte activo. Las características de la FOS previamente mencionadas, como alta hidrosolubilidad y el bajo peso molecular, limitan su difusión pasiva a través de las células epiteliales mamarias. Por lo tanto, su llegada al calostro sería por pasaje para-celular (Peaker y Taylor, 1975; Tamai y Tsuji, 1996) (figura 17), como lo demuestran los resultados obtenidos.

La alta disponibilidad de la FOS en sangre (F: 85.5%) estudiada por nuestro equipo de trabajo (Soraci *et al.*, 2011a) y la apertura de las uniones estrechas entre los lactocitos (por acción hormonal previamente descrita) (Cregan y Hartmann, 1999; Farmer, 2001; Fleishaker, 2003; Pons y Rey, 2003; Le Dividich, 2006; Lee, 2007), harían que este antibiótico alcance importantes concentraciones en el fluido calostrado. No obstante, las diferencias de los perfiles calostrales hallados entre cerdas tratadas con tres dosis de FOS pondrían en evidencia que el inicio del cierre de las uniones estrechas de los lactocitos se encontraría influenciado por cambios hormonales propios de cada cerda asociadas con estrés tales como: alojamiento, temperatura ambiente, luz, ruido, presencia del operario, etc., así como también, de factores endógenos de cada cerda, como paridad, estado de salud, tratamiento hormonal, etc., afectando indirectamente la producción de calostro y el inicio de la lactancia (Devillers *et al.*, 2006). Una alta concentración de cortisol en el momento del parto, el estrés ambiental (Molokwu y Wagner, 1973) o la incorrecta expresión de la conducta de anidación en la jaula de partos (Jarvis *et al.*, 2001-2002), serían factores de estrés desencadenantes del inicio temprano del cierre de las uniones estrechas, impidiendo la llegada de los fármacos a los fluidos mamarios.

La concentración media (\pm EEM) de FOS eliminada en el calostro para FOS1 fue de $0,83 \pm 0,04 \mu\text{g/mL}$ durante las primeras 10 h y para FOS3 de $1,55 \pm 0,36 \mu\text{g/mL}$ durante las primeras 24 h pos parto.

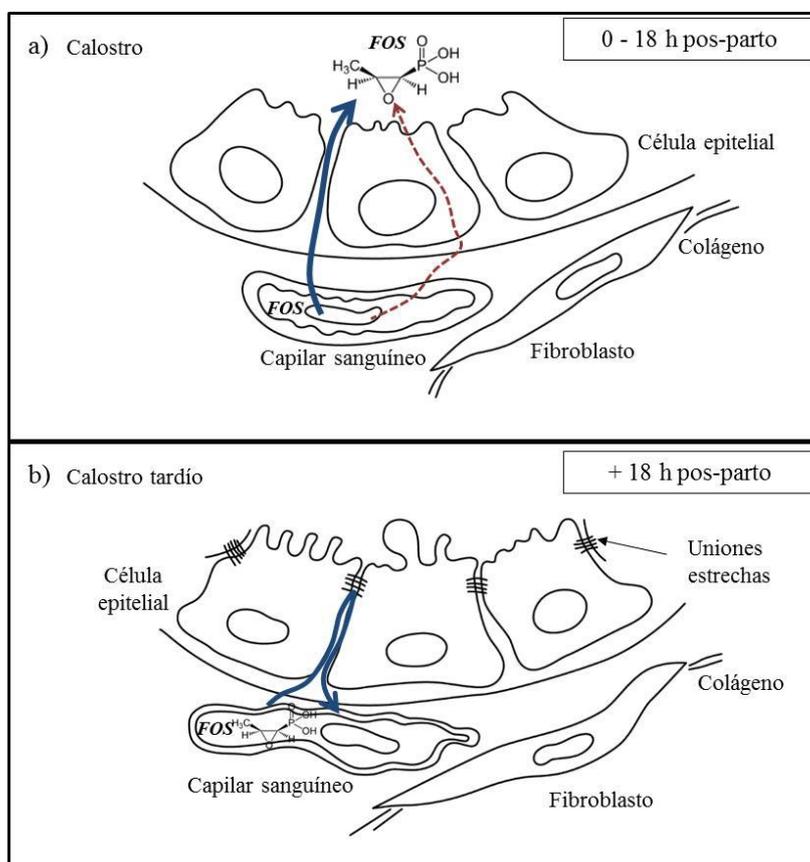


Figura 17. Potenciales rutas de pasaje del antibiótico FOS desde el plasma sanguíneo al fluido calostroal de la cerda. a) Representa el pasaje para-celular (flecha azul) y la difusión pasiva (flecha roja punteada) del antibiótico. b) Indica el cierre de las uniones estrechas entre las células epiteliales mamarias y el impedimento del paso de la FOS por la vía para-celular (figura adaptada de Ollivier-Bousquet (1993)).

El perfil de eliminación calostroal de la OTC, luego de la administración IM de una dosis de 20 mg/Kg de OTC LA y tres dosis de 6 mg/Kg de OTC solución (OTC3), presentó un comportamiento diferente con respecto al antibiótico FOS. Las principales diferencias se asocian con las características fisicoquímicas, de liposolubilidad y difusibilidad del antibiótico OTC al calostro y leche.

Si bien ambas curvas de OTC en calostro presentaron un perfil similar, los valores obtenidos para OTCLA (AUC_{0-48} : $28,36 \pm 16,71 \mu\text{g.h/mL}$) fueron levemente mayores a los

cuantificados para el grupo OTC3 (AUC_{0-48} : $18,91 \pm 5,92 \mu\text{g}\cdot\text{h}/\text{mL}$), lo que representaría una ventaja sobre la posología de multidosis. En la formulación LA, denominada de “larga acción” o “liberación retardada”, el principio activo se libera desde su sitio de administración en forma más lenta, distribuyéndose al plasma y eliminándose posteriormente en el calostro. La utilización de fórmulas farmacéuticas LA ha adquirido con los años relevancia en el tratamiento de patologías infecciosas de especies productivas tales como bovinos (Landoni y Errecalde, 1992), porcinos (Nouws *et al.*, 1990) y aves (Flammer *et al.*, 1990). Este tipo de formulación de depósito permite mantener concentraciones plasmáticas sobre la CIM por un tiempo más prolongado, siendo ideal para un antibiótico tiempo dependiente como lo es la OTC. Además, posee ventajas como disminución del estrés del animal por manipulación en periodos de 48 a 72 h, dependiendo del tipo excipiente (Davey *et al.*, 1985).

Diversos estudios demuestran que la OTC posee una buena absorción vía IM detectándose en el plasma dentro de los 15 minutos de la administración, alcanzando su C_{max} dentro de la hora (T_{max}). Además, se mantiene en márgenes terapéuticos durante 12 h, declinando posteriormente hasta ser indetectable transcurridas 24 h de su administración (Davey *et al.*, 1985; Fourtillan *et al.*, 1989; Escudero *et al.*, 1994). En este ensayo las concentraciones de OTC en calostro obtenidas al inicio del parto fueron bajas. Esto puede deberse en parte a la lenta liberación de la droga desde el sitio de administración, particularmente en la formulación LA.

La difusión de la OTC a través de la barrera hematomamaria se realiza principalmente mediante un mecanismo de difusión pasiva dependiente del pH que determinará la fracción no ionizada así como la solubilidad en lípidos lácteos (Blobel y Burch, 1960; Ziv y Sulman, 1974; Alonso Dupuy, 2016). A diferencia de la FOS, el mecanismo de pasaje para-celular sería poco importante para la OTC. La difusión pasiva se presenta como el principal mecanismo de llegada del antibiótico desde el plasma a calostro a través de las células epiteliales mamarias (figura 18), demostrado por el hallazgo de concentraciones relativamente estables en el tiempo en calostro hasta las 24 h post parto. Así mismo, características farmacológicas de la OTC, tales como como moderada unión a proteínas plasmáticas (20-40%) (Sande y Mandell, 1991), alta lipofilicidad y $pK_a > 7,7$, favorecerían una mayor eliminación del fármaco desde el plasma (pH 7,4) hacia el calostro (pH 6,9), donde se disocia. El pK_a más elevado de la OTC haría que se encuentre ionizada en el calostro ligeramente ácido, experimentando cierto ion trapping (las glándulas mamarias de las cerdas no tienen cisterna), y posterior eliminación desde el fluido mamario. La formación de complejos y quelación del antibiótico con el calcio presente en el fluido calostrual también contribuirían a su eliminación en el calostro (Caswell y Hutchison, 1971).

La concentración media (\pm EEM) de OTC eliminada en el calostro durante las primeras 24 h después del inicio del parto fue de $0,78 \pm 0,18$ y $0,48 \pm 0,07$ $\mu\text{g/mL}$ para OTCLA y OTC3 respectivamente.

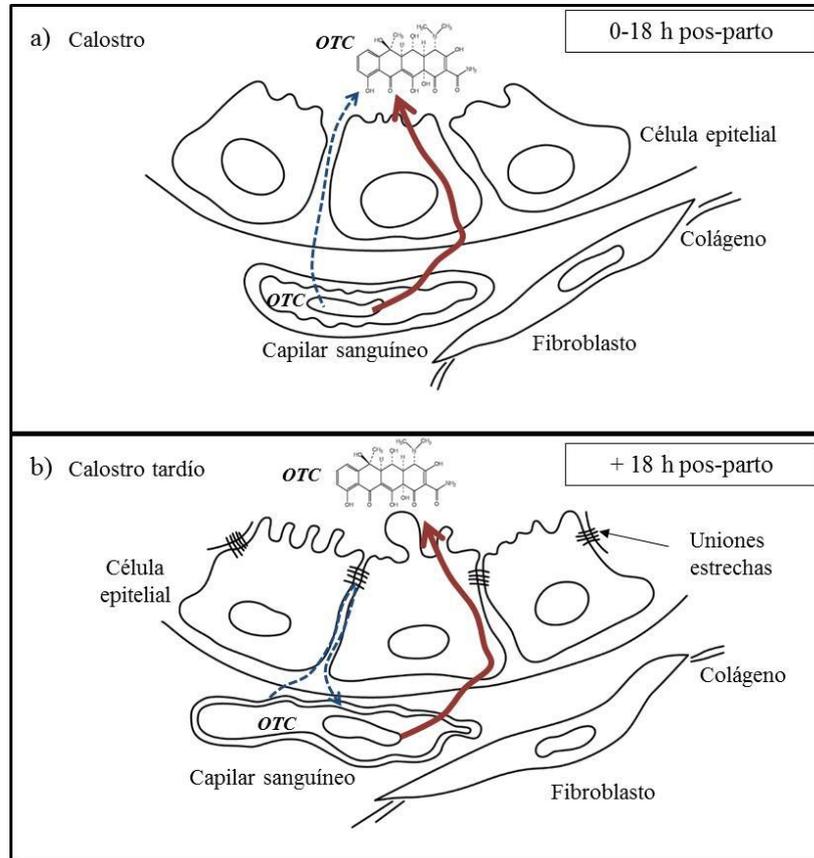


Figura 18. Potenciales rutas de pasaje del antibiótico OTC desde el plasma sanguíneo al fluido calostroal de la cerda. a) Representa el pasaje por difusión pasiva (flecha roja) y el pasaje para-celular (flecha azul punteada) del antibiótico. b) Indica el cierre de las uniones estrechas entre las células epiteliales mamarias y el pasaje de la OTC por difusión pasiva (figura adaptada de Ollivier-Bousquet (1993)).

La eliminación de FOS1 a fluido mamario abarcó 10 h del periodo calostroal y dichas concentraciones se mantuvieron por encima de la CIM_{90} durante más de 8 h para bacterias patógenas de importancia productiva e involucradas en procesos infecciosos de mastitis y/o metritis (Martineau, 1997) (*Escherichia coli* y *Streptococcus sp.* CIM_{90} : 0,5-0,25 $\mu\text{g/mL}$, respectivamente) (Fernández *et al.*, 1995; Sumano *et al.*, 2007). Para la FOS3 las concentraciones halladas en calostro durante 48 h también se mantuvieron por encima de la CIM_{90} para las bacterias mencionadas. Ello indicaría que la FOS puede considerarse efectiva

para el tratamiento específico de procesos infecciosos bacterianos en cerdas durante el peri y post parto.

A pesar de los beneficios de la administración de formulaciones LA sobre dosificaciones múltiples, los valores de OTC cuantificados en calostro y leche hasta las 48 h post primer nacimiento de los lechones para ambos grupos de estudio (OTCLA y OTC3), no alcanzaron la CIM₉₀ en ningún momento para *Escherichia coli* (CIM₉₀: > 64 µg/mL) y *Streptococcus suis* (CIM₉₀: 64 µg/mL) (Klein *et al.*, 2015). Este resultado demuestra que la OTC, en presentación LA y formulación solución, debería reconsiderarse para el tratamiento de patologías de implicancia reproductiva en la sala de partos (metritis y mastitis), por su insuficiente concentración alcanzada en la glándula mamaria de la cerda.

SECCIÓN EXPERIMENTAL II

ESTUDIO DE LA INGESTA NEONATAL DE FOSFOMICINA Y OXITETRACICLINA EN CALOSTRO Y LECHE E IMPACTO SOBRE LOS PARÁMETROS ZOOTÉCNICOS DE LA CAMADA

1. INTRODUCCIÓN

El calostro es el primer alimento que ingiere el lechón después del nacimiento. Es una fuente de nutrientes muy digestibles y vehículo de compuestos bioactivos tales como inmunoglobulinas, enzimas hidrolíticas, hormonas, factores de crecimiento naturales (Noblet y Le Dividich, 1981; Rooke y Bland, 2002), así como también de antibióticos. Como ya fue mencionado en la revisión bibliográfica, la práctica de administración de antibióticos a la cerdas durante el peri-parto puede ser riesgosa para el lechón, afectando la salud intestinal y posterior desempeño productivo. Es por tal motivo, que en esta sección experimental se propone estudiar la producción de calostro como una estimación de la cantidad de FOS y OTC a las cuales estaría expuesto el neonato. El rendimiento del calostro y leche de la cerda no es sencillo de medir, sin embargo, existen varios métodos para estimar su producción. Uno de los métodos se denomina peso-amamantamiento-pesaje. Este método se realiza pesando los lechones antes y después del amamantamiento con el objetivo de medir la diferencia de peso, atribuyendo el aumento a la ingesta de leche. Sin embargo, este procedimiento puede causar estrés, ya que los lechones deben ser separados de su madre, provocando a una disminución de la ingesta de leche. Otro aspecto es que la defecación, la micción, los procesos metabólicos y la salivación deben ser considerados, ya que el lechón también pierde peso debido a estos factores. Otro método es la técnica denominada dilución de isótopos. Éste tiene como objetivo medir la tasa de rotación total de agua en los lechones. La dificultad es que se debe asegurar que los lechones no coman ni beban nada más allá de la leche de la cerda (Pettigrew *et al.*, 1987; Theil *et al.*, 2002). La técnica de dilución de óxido de deuterio es otro método estudiado para cuantificar la ingesta de calostro por los lechones. En este caso los investigadores desarrollaron un modelo a fin de comparar sus datos con los obtenidos por un modelo predictivo empírico previamente desarrollado para lechones alimentados con mamadera (Theil *et al.*, 2014). Existe otra metodología, similar a la empleada en esta Tesis, que se basa en el aumento de peso de los lechones. Los lechones se pesan al nacer y de nuevo a otra edad, por ejemplo 24 h después del nacimiento (para estimar la

producción de calostro) o tres semanas después del nacimiento (para estimar la producción de leche). Posteriormente se utiliza una relación de conversión de alimento para recalcular el aumento de peso en producción de leche (Devillers *et al.*, 2004; Devillers *et al.*, 2005; Devillers *et al.*, 2007; Bergsma *et al.*, 2008; Aguinaga *et al.*, 2011).

La valoración de la producción de calostro y leche en la cerda es crucial para estimar la cantidad de residuos de antibióticos presentes en dichos fluidos que serán posteriormente ingeridos por los neonatos.

2. OBJETIVO

Determinar el consumo de calostro, la ingesta de concentraciones de FOS y OTC y su impacto sobre los parámetros zootécnicos de la camada luego de la administración de dichos antibióticos a cerdas durante el peri-parto.

3. MATERIALES Y MÉTODOS

3.a) Animales

El estudio se realizó en una granja comercial descrita en la Sección Experimental I. Se trabajó con 436 lechones neonatos clínicamente sanos, pertenecientes a las cerdas de la sección experimental I. Los lechones se alojaron en la paridera con su respectiva madre durante toda la lactancia hasta el momento del destete (21 días de vida). La temperatura del ambiente de la sala de maternidad se mantuvo entre 23°C al momento del parto y alrededor de 20°C en los días subsiguientes, contando además con un espacio para los lechones con una lámpara infrarroja y una manta térmica (materiales que permiten otorgarles a los lechones una temperatura de confort de 32°C). A los tres días de edad, los lechones recibieron una inyección IM de hierro dextrano (Cali-Dex 200®) y a los 10 días comenzaron a ingerir alimento nursery para su categoría. Los lechones no tuvieron acceso a la alimentación de las cerdas. El estudio fue realizado siguiendo las normas éticas aprobadas por el comité de Bienestar Animal de la Facultad de Ciencias Veterinarias, Universidad Nacional del Centro de la Provincia de Buenos Aires, Argentina.

3.b) Grupos experimentales

Cuatrocientos treinta y seis lechones progenie de las cerdas de los grupos Control, FOS1, FOS3 y OTC3 fueron divididos en cuatro grupos de 110 animales cada uno aproximadamente (figura 19). Todos los partos fueron supervisados y los lechones se pesaron individualmente al nacer y a las 24 horas. Para su seguimiento, los animales fueron identificados con caravanas y números en la región dorsal (figura 20). Los animales fueron monitoreados para detectar signos de diarrea durante todo el estudio. Cabe destacar que no se obtuvieron datos correspondientes a las camadas de las cerdas tratadas con OTCLA detallado en la sección experimental I, ya que la recolección de muestras solo se utilizó para la comparación del tratamiento monodosis con FOS.

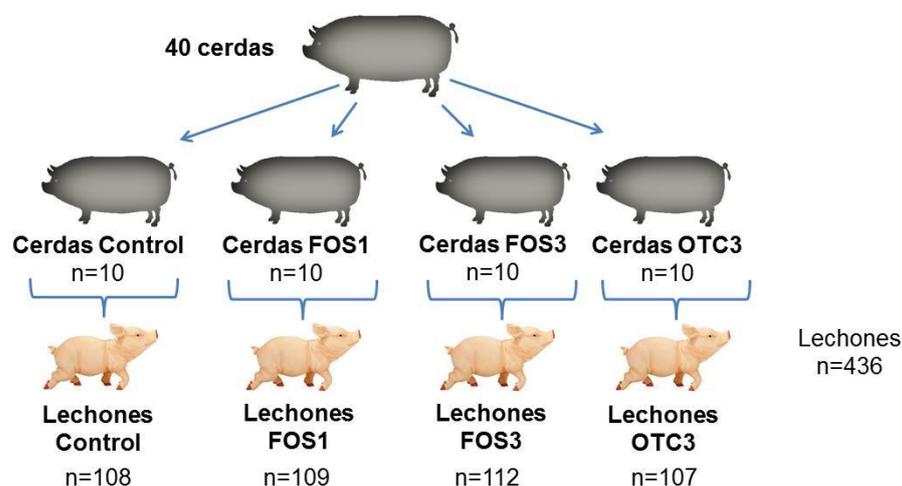


Figura 19. Esquema de la conformación de los grupos de lechones en estudio.



Figura 20. Identificación de los lechones mediante numeración dorsal.

Estudio del consumo de calostro

Para determinar el consumo de calostro, la camada fue monitoreada mediante un sistema de video-grabación continuo (PSS, Pro Surveillance System®) colocado en la sala de partos. Para cada lechón, se determinó el intervalo de tiempo entre el nacimiento, el inicio de masaje de la mama, la toma del pezón y la mamada efectiva. Los datos obtenidos fueron incorporados a una hoja de cálculo de Excel para calcular el consumo individual de calostro de cada lechón, la ingesta media de la camada y la producción de calostro por la cerda durante las primeras 24 h después del parto de acuerdo a la metodología descrita por Devillers *et al.* (2004-2005):

$$CI = -217.4 + 0.217 \times t + 1861019 \times BW/t + BW_B \times (54.80 - 1861019/t) \times (0.9985 - 3.7 \times 10^{-4} \times t_{FS} + 6.1 \times 10^{-7} \times t_{FS}^2)$$

Dónde: el consumo de calostro por el lechón (CI en g) se basó en el peso al nacimiento (BW_B en Kg), la ganancia de peso [$(BW - BW_B)$ en Kg], la edad (t en min) y el intervalo entre el nacimiento y la mamada efectiva (t_{FS} en min).

Determinación de la ingesta de FOS con el calostro

A partir de las concentraciones medias de FOS eliminadas en el calostro (FOS_{cal}) y de la cantidad media de calostro ingerida por la camada (CAL_{in}) se pudo estimar el consumo de FOS por cada lechón (FOS_{in}) utilizando la siguiente formula:

$$FOS_{in} \frac{mg}{Kg} = FOS_{cal} \frac{mg}{g} * CAL_{in} \frac{g}{Kg}$$

Determinación de la ingesta de OTC con el calostro

A partir de las concentraciones medias de OTC eliminadas en el calostro (OTC_{cal}) y de la cantidad media de calostro ingerida por la camada (CAL_{in}) se pudo estimar el consumo de OTC por cada lechón (OTC_{in}) utilizando la siguiente formula:

$$OTC_{in} \frac{mg}{Kg} = OTC_{cal} \frac{mg}{g} * CAL_{in} \frac{g}{Kg}$$

Impacto de la ingestión de calostro con antibióticos sobre los parámetros zootécnicos de la camada

Para el estudio del efecto sobre los parámetros zootécnicos se registró concomitantemente el score de vitalidad al nacimiento, el número de lechones nacidos totales (NT) y nacidos vivos (NV), el número de muertos durante la lactancia, el número de lechones destetados a los 21 días de vida y el peso de los lechones en diferentes momentos.

Para la evaluación del score de vitalidad al nacimiento se utilizó una escala de clasificación de 0 a 3 (Baxter *et al.*, 2008):

0: neonato sin movimiento y que no respira dentro de los 15 segundos de nacido.

1: neonato sin movimiento dentro de los 15 segundos de nacido, que respira o intenta respirar (tos, balbuceos, limpieza de pulmones).

2: neonato con algún movimiento dentro de los 15 segundos de nacido y que respira o intenta respirar.

3: neonato con buenos movimientos, que respira y se para dentro de los 15 segundos de nacido.

Los 436 lechones fueron pesados al nacimiento, a las 24 h de vida (día 1), a la mitad de la lactancia (día 10) y al destete (día 21) en la sala de maternidad (figura 21), a fin de determinar el efecto de la ingesta de antibióticos sobre la variación de peso.



Figura 21. Pesaje de los lechones con balanza electrónica en distintos momentos del ensayo.

3.c) Análisis estadístico

En este ensayo fue estimada la producción total de calostro de cada cerda a partir del consumo de calostro de cada lechón. También fue registrado el peso al nacimiento de los lechones (peso 0), a las 24 h (peso 1), 10 y 21 días de vida (peso 10 y peso 21, respectivamente).

Las comparaciones entre los grupos tratados y control fueron realizadas por un análisis de variancia (ANOVA), utilizando el SAS V.9.2. Las diferencias fueron consideradas significativas cuando $p < 0,05$. Los resultados fueron presentados como los promedios \pm los errores estándar (EEM).

Además, se analizó el score de vitalidad al nacimiento, el N° de lechones NT, el N° de lechones NV, el N° de lechones muertos en la lactancia y el N° de lechones destetados. Para cada variable fue calculada la mediana, presentado los valores mínimo y máximo.

4. RESULTADOS

Estudio del consumo de calostro y determinación de la ingesta de FOS y OTC con el calostro

La producción total de calostro (g) estimada durante las primeras 24 h de lactancia para cada cerda no fue afectada por los tratamientos ($p = 0,2703$) (figura 22). El consumo medio (\pm EEM) de calostro por lechón (g/Kg PV) tampoco fue afectado por los tratamientos ($p = 0,1078$) (figura 23). Este parámetro depende estrechamente del peso al nacimiento de los lechones ($p = 0,0139$). Considerando las concentraciones medias de FOS y OTC ($\mu\text{g/mL} = \text{mg/g}$) eliminadas en el calostro durante las primeras 24 h de lactancia, determinadas en la sección experimental I (tabla 3), y la cantidad media de calostro ingerida por lechón, se determinó la ingestión de antibiótico por lechón (mg/Kg PV) (figura 24).

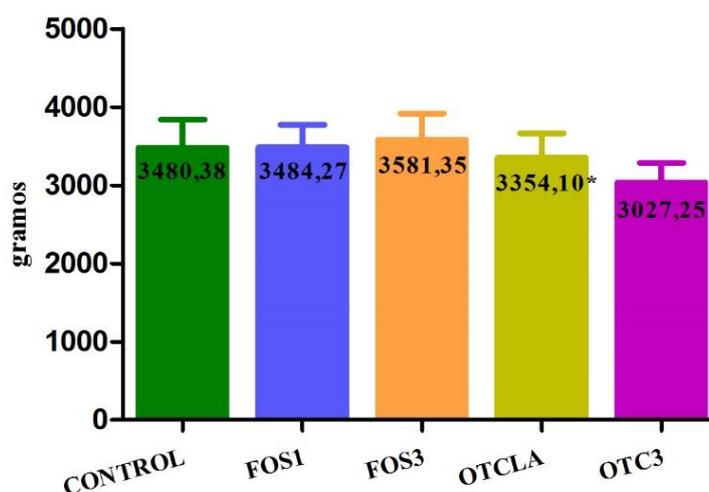


Figura 22. Efecto del tratamiento de las cerdas con FOS y OTC durante el peri-parto sobre la producción de calostro estimado por cerda. Se muestra el promedio (\pm EEM).

* Producción media de calostro en cerdas (Devillers *et al.*, 2004).

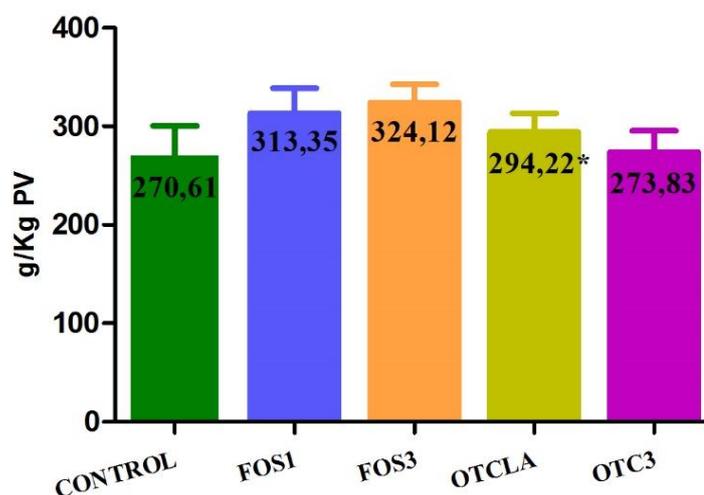


Figura 23. Efecto del tratamiento de las cerdas con FOS y OTC durante el peri-parto sobre el consumo medio (\pm EEM) de calostro por lechón.

* Consumo medio de calostro por lechón (Devillers *et al.*, 2004).

Tabla 3. Concentración media (\pm EEM) residual de FOS y OTC en calostro durante las primeras 24 h de lactancia en cerdas tratadas con una y tres dosis de antibiótico/24 h durante el peri-parto

Tiempo (h)	FOS1 ($\mu\text{g/mL}$)	OTCLA ($\mu\text{g/mL}$)	FOS3 ($\mu\text{g/mL}$)	OTC3 ($\mu\text{g/mL}$)
0	1,12 \pm 0,03	0,68 \pm 0,08	1,07 \pm 0,19	0,34 \pm 0,04
2	1,01 \pm 0,02	0,64 \pm 0,10	1,13 \pm 0,31	0,45 \pm 0,06
4	0,97 \pm 0,05	0,86 \pm 0,22	1,13 \pm 0,36	0,53 \pm 0,12
6	0,91 \pm 0,05	0,94 \pm 0,24	1,62 \pm 0,39	0,53 \pm 0,04
8	0,89 \pm 0,06	0,84 \pm 0,17	2,02 \pm 0,36	0,58 \pm 0,08
10	0,09 \pm 0,02	0,88 \pm 0,24	1,93 \pm 0,36	0,59 \pm 0,07
12	NC	0,84 \pm 0,23	1,91 \pm 0,37	0,36 \pm 0,09
24	NC	0,58 \pm 0,18	1,55 \pm 0,35	0,46 \pm 0,10
Media	0,83 \pm 0,03	0,78 \pm 0,18	1,55 \pm 0,33	0,48 \pm 0,07

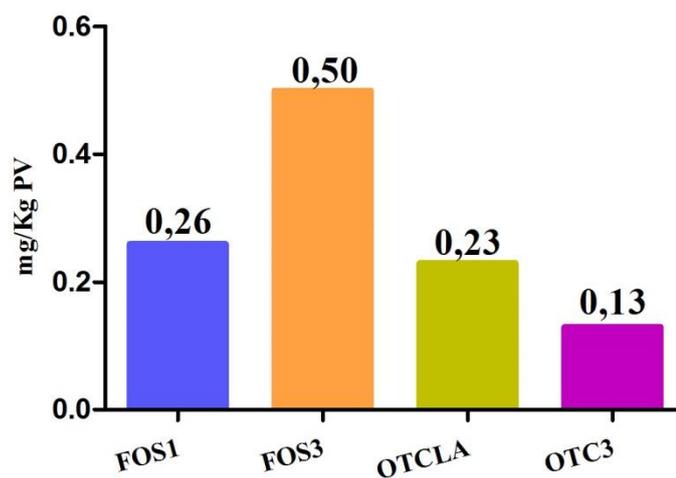


Figura 24. Ingestión promedio de FOS y OTC por lechón correspondiente a cada grupo de cerdas tratadas con FOS y OTC durante el peri-parto.

Impacto de la ingestión de calostro con antibióticos sobre los parámetros zootécnicos de la camada

La figura 25 representa la media del score de vitalidad de los lechones Control, FOS1, FOS3 y OTC3. Para todos los grupos, el score 3 estuvo por encima del 80% de los lechones evaluados al nacimiento para cada tratamiento, indicando una excelente vitalidad al nacimiento. El score 2 no superó el 16,5% y tan sólo se registró un máximo de 2,8% para el score 1 para todos los lechones evaluados en los diferentes tratamientos. No fueron registrados lechones con score 0 al momento del nacimiento. La ingestión de calostro con FOS u OTC no afectó el score de vitalidad al nacimiento de los lechones.

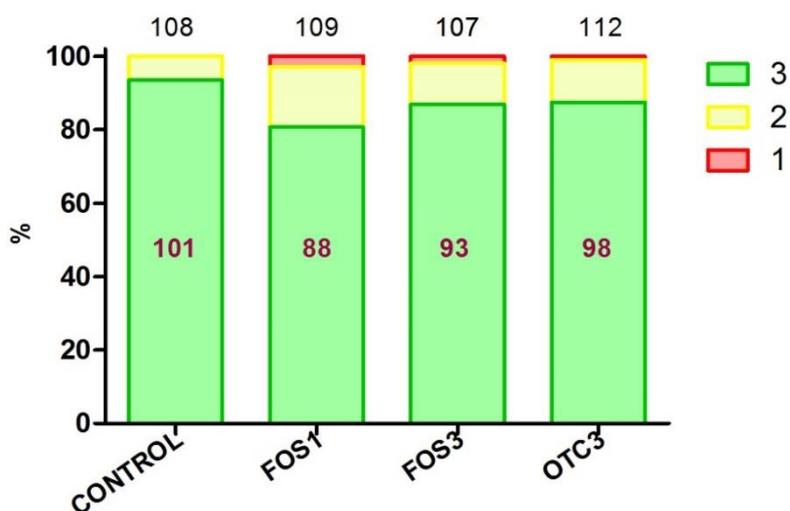


Figura 25. Efecto del tratamiento de las cerdas con FOS y OTC durante el peri-parto sobre el score de vitalidad (n (%)) de los lechones al nacimiento. Se muestra la media.

El tratamiento de las cerdas con FOS y OTC y posterior ingestión de calostro con dichos antibióticos no afectó el número de lechones nacidos totales (NT) y nacidos vivos (NV), el número de lechones muertos durante la lactancia y el número de lechones destetados a los 21 días de vida (figura 26). Los valores registrados para cada variable fueron similares entre los grupos.

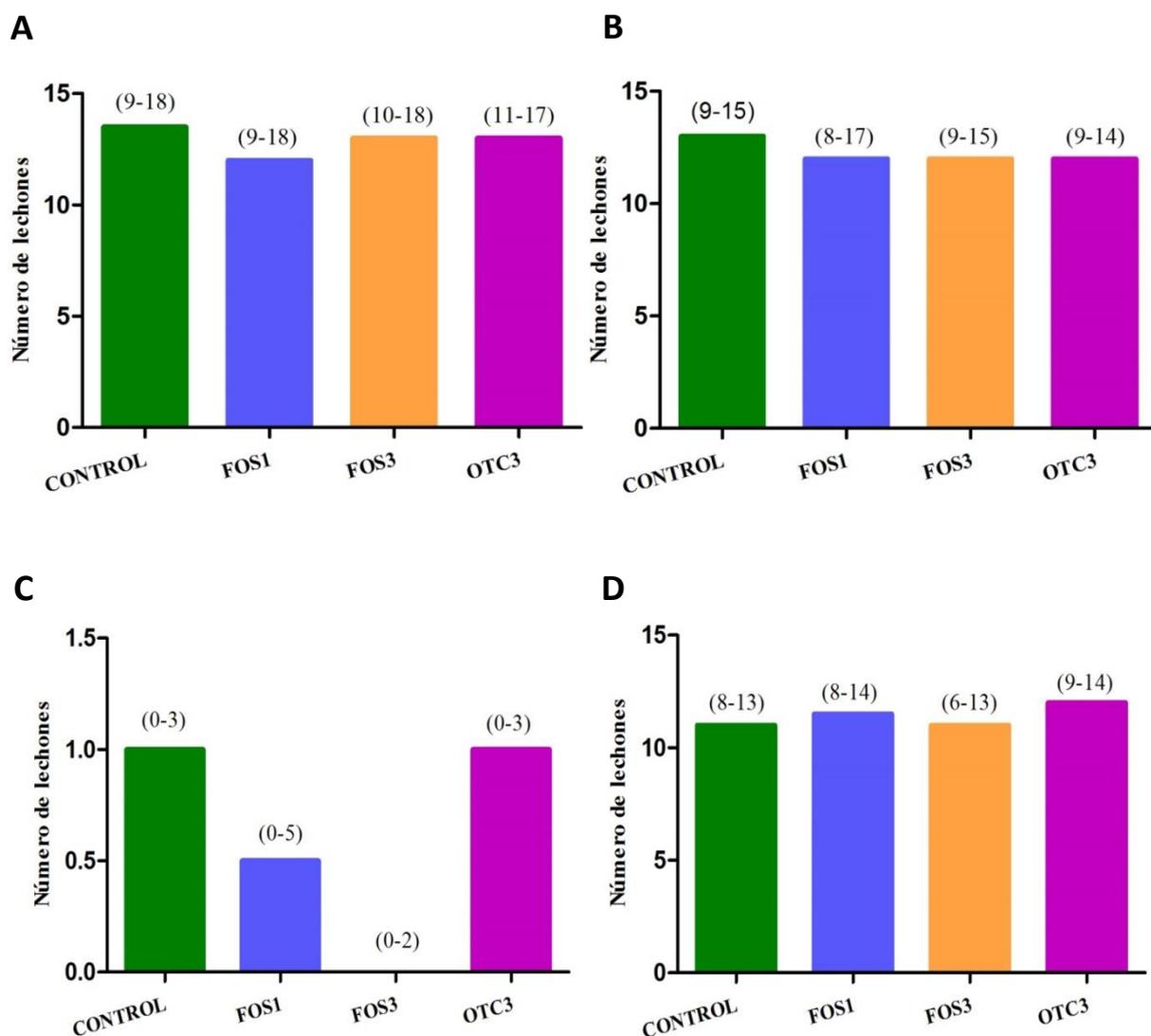


Figura 26. Efecto del tratamiento de las cerdas con FOS y OTC durante el peri-parto sobre: (A) número de lechones nacido totales (NT); (B) número de lechones nacido vivos (NV); (C) número de lechones muertos durante el periodo de la lactancia y (D) número de lechones destetados. Mediana (mínimo-máximo).

La tabla 4 muestra la evolución del peso (promedio \pm EEM) de los lechones durante el periodo de lactancia (0, 1, 10 y 21 días de vida) para cada tratamiento. La interacción entre el

tratamiento y los días no fue significativa ($p= 0,5681$) observado un comportamiento similar en todos los grupos durante el ensayo. Tampoco fueron observadas diferencias significativas entre los tratamientos ($p= 0,4555$). En el modelo de análisis fue incluido el peso al nacimiento como covariable, la cual fue significativa ($p< 0,0001$).

Tabla 4. Efecto del tratamiento de las cerdas con FOS y OTC durante el peri-parto sobre el peso vivo (Kg) de los lechones de la camada en los diferentes días de lactancia¹**

Tiempo (días)	PV (Kg)			
	Lechones Control	Lechones FOS1	Lechones FOS3	Lechones OTC3
0	1,34 ± 0,07	1,36 ± 0,06	1,33 ± 0,05	1,46 ± 0,05
1	1,43 ± 0,07	1,46 ± 0,07	1,43 ± 0,05	1,53 ± 0,06
10	3,02 ± 0,10	2,91 ± 0,08	2,94 ± 0,08	3,11 ± 0,14
21	6,50 ± 0,22	6,10 ± 0,15	6,35 ± 0,20	6,60 ± 0,24

¹ La interacción entre el tratamiento y los días no fue significativa ($p > 0,05$).

** Se presentan los valores promedio (± EEM).

5. DISCUSIÓN

En el presente estudio no se registraron diferencias estadísticamente significativas entre la producción media de calostro (g) de las cerdas pertenecientes al grupo control y las tratadas con una y tres dosis IM de FOS u OTC durante el peri-parto (sección experimental I). Ello demuestra que la administración de dichos antibióticos en las hembras previo y posterior al parto, no influye sobre la cantidad de calostro producido. Los valores obtenidos fueron similares a los reportados por Devillers *et al.*, (2004-2005). No obstante, la amplia variación en la producción de calostro registrada entre las cerdas es un hallazgo común que depende estrechamente de factores fisiológico-productivos de cada individuo. Entre ellos se mencionan las alteraciones del estado endócrino de las cerdas al final de la gestación, la nutrición, el número de partos, la genética, la vitalidad de los lechones al nacimiento, la heterogeneidad de peso de la camada, así como también situaciones inherentes al parto tales como inducción, duración, estrés y utilización de hormonas, entre otras (Farmer, 2001; Le Dividich *et al.*, 2005; Devillers *et al.*, 2005; Devillers *et al.*, 2007). El estudio del consumo medio de calostro por lechón tampoco arrojó diferencias estadísticamente significativas entre los grupos de cerdos en ensayo. Como era esperable, por el tipo de método de medición utilizado en este trabajo, el valor de consumo de

calostro determinado depende estrechamente del peso al nacimiento de los neonatos. Los resultados muestran que la ingesta media de calostro por los lechones hijos de cerdas controles y tratadas con FOS u OTC no se modifica por la presencia de dichos antibióticos en el calostro.

Como se puede observar en los resultados para todos los tratamientos la concentración media de antibiótico eliminada en calostro fue baja. Este hallazgo se correlaciona con el efecto sobre los parámetros estudiados en la presente sección experimental. La dosis media de FOS ingerida por lechón fue diferente en relación a la posología de administración (mono o multidosis). Para los lechones hijos de cerdas tratadas con una dosis IM de 15 mg/Kg de FOS durante el peri-parto, la concentración media de FOS ingerida fue de 0,26 mg/Kg (representando tan solo el 0,86% de la dosis terapéutica oral de 30 mg/Kg). Mientras que para los lechones del grupo FOS3, cuyas madres fueron tratadas con tres dosis IM de 15 mg/Kg de FOS con intervalos de 24 h durante el peri-parto, la concentración media de FOS ingerida fue de mayor, alcanzando el valor de 0,50 mg/Kg (1,66% de la dosis terapéutica oral de 30 mg/Kg). Los lechones hijos de las cerdas medicadas con una dosis IM de 20 mg/Kg de OTC LA durante el peri-parto, ingirieron una concentración media de 0,23 mg/Kg de OTC. En el caso de la administración de tres dosis IM de 6 mg/Kg de OTC solución a intervalos de 24 h durante el peri-parto, la dosis media de antibiótico ingerida por lactante fue de 0,13 mg/Kg OTC. Dichas concentraciones representaron el 0,57% (OTCLA) y el 0,32% (OTC3) de la dosis terapéutica oral de 40 mg/Kg para OTC.

No obstante, es importante destacar que según el orden de nacimiento los lechones estarán expuestos a diferentes concentraciones de la droga en su primer consumo de calostro. Si consideramos a los tratamientos monodosis realizados en las cerdas con FOS y OTCLA, para el caso de los lechones FOS1 que nacen al inicio del parto, en su primer consumo, consumirán mayor concentración de FOS con respecto a los que nacen hacia el final del parto. Sin embargo, en los lechones OTCLA, el comportamiento sería el contrario. Los primeros lechones nacidos consumirán una menor cantidad de OTC con respecto a los que nacen posteriormente, que ingerirán la mayor concentración del antibiótico. En el caso del tratamiento multidosis de las cerdas con FOS y OTC solución, el comportamiento fue diferente. Los lechones que nacen primero serán los menos expuestos a las elevadas concentraciones de FOS que se alcanzan hacia la finalización del parto. Mientras que las concentraciones de OTC determinadas en calostro fueron constantes, no mostrando diferencias en la ingestión de diferentes concentraciones del antibiótico según el orden de nacimiento de los lechones de sus camadas.

Habitualmente en la maternidad se miden parámetros zootécnicos como score de vitalidad al nacimiento, número de lechones NT y NV, número de muertos durante la lactancia y peso en diferentes momentos de la lactancia, con el objetivo de evaluar la producción de las

hembras y el manejo eficiente de los operarios en este sector. Luego del tratamiento de cerdas con dos moléculas antibióticas ampliamente utilizadas en la producción porcina durante el parto, se puede concluir que la ingestión de calostro con FOS u OTC por los lechones de los diferentes grupos no afectó los parámetros zootécnicos más relevantes en la sala de partos.

SECCIÓN EXPERIMENTAL III

IMPACTO DEL CONSUMO DE FOSFOMICINA Y OXITETRACICLINA CON EL CALOSTRO SOBRE LA MORFO-FISIOLOGÍA, LA ACTIVIDAD ENZIMÁTICA Y LA MICROBIOLOGÍA INTESTINAL DE LOS LECHONES LACTANTES

1. INTRODUCCIÓN

Un intestino “saludable” es aquel que presenta adecuada integridad morfo-fisiológica y equilibrio entre su inmunidad y microbiota. Toda acción que se realice para beneficiar el ámbito nutricional, sanitario y ambiental del cerdo interferirá de manera directa en la salud intestinal.

La instauración y composición de la microbiota en el intestino durante la vida temprana del lechón es un proceso complejo que contribuye en el establecimiento de la homeostasis intestinal y la maduración del sistema inmunológico (Bailey *et al.*, 2005; Bauer *et al.*, 2006; Ashida *et al.*, 2012). Tal es así, que un gran número de estudios han demostrado que la colonización temprana del intestino con microorganismos deseables puede ayudar a establecer una ecología bacteriana estable y un mejor desarrollo inmunológico en el animal (Bauer *et al.*, 2006; Round y Mazmanian, 2009). Por lo tanto, asegurar un buen calostrado de los lechones y establecer estrategias de limpieza en la sala de partos contribuirán a un adecuado desarrollo bacteriano en el tracto gastrointestinal. Cualquier alteración en el proceso cronológico de la implantación de la microbiota impactará en el futuro productivo del animal (Bauer *et al.*, 2006; Round y Mazmanian, 2009; Buffie *et al.*, 2012). Es así como el estrés en los lechones lactantes y el manejo inadecuado de ciertas moléculas antibióticas, afectan el equilibrio normal de la microbiota intestinal, manifestándose con diarreas e inclusive la muerte de los animales durante la lactancia (Corpet, 2000).

Las bacterias presentes en la microbiota impulsan el desarrollo intestinal promoviendo la vascularización, el engrosamiento de las vellosidades, el ensanchamiento de la superficie de la mucosa, la producción de moco, la proliferación celular y el mantenimiento de las uniones epiteliales (Reinhardt *et al.*, 2012; Sommer y Bäckhed, 2013). Las bacterias ácido-lácticas y las bifidobacterias son representantes de las bacterias benéficas del intestino del lechón (Brown *et al.*, 1997; White *et al.*, 2002; Mikkelsen y Jensen, 2004; Loh *et al.*, 2006). El predominio de especies bacterianas benéficas sobre las comensales y patógenas es esencial para favorecer la

salud intestinal (Apgar *et al.*, 1993; Flickinger y Fahey, 2002; Mikkelsen *et al.*, 2003; Reilly *et al.*, 2010; Vondruskova *et al.*, 2010). La proliferación de enterobacterias no patógenas presentes en el tracto intestinal promueven al delicado estado de “inflamación controlada del intestino” (Biancone *et al.*, 2002; Briwn *et al.*, 2017) que generan un gasto energético relevante para el cerdo (Thomke y Elwinger, 1998; Corpet, 2000). La relación enterobacterias/bacterias ácido-lácticas (E/BAL) es un parámetro de utilidad que será estudiado en esta sección experimental, indicativo del equilibrio de la microbiota intestinal, de manera tal que aquellos animales que presentan una menor relación bacteriana poseen mayor resistencia a enfermedades gastrointestinales (Castillo *et al.*, 2007; Han *et al.*, 2011; O’Shea *et al.*, 2011; Chen *et al.*, 2012).

Los ácidos grasos volátiles representan uno de los principales productos metabólicos de las bacterias en conjunto con el ácido láctico. El ácido butírico constituye la principal fuente de energía para la mucosa intestinal (García Peris *et al.*, 2002; Samanta *et al.*, 2013). Este ácido es metabolizado por los colonocitos donde aportan aproximadamente el 70% de la energía total consumida por el colon. Además, posee una acción promotora sobre crecimiento de la pared del intestino grueso (Galfi y Bokori, 1990), interviene en la prevención de diarreas (Williams *et al.*, 2001), e incrementa la superficie de contacto de las microvellosidades intestinales y la secreción de enzimas digestivas y la absorción de sodio (Goodlad y Mathers, 1990). El ácido acético también es muy importante ya que constituye un tipo de sustrato para las interacciones de alimentación cruzada que ocurren entre las bacterias del colon que contribuyen a mantener la salud intestinal (Barcenilla *et al.*, 2000; Duncan *et al.*, 2004; Mølbak *et al.*, 2007; Patterson, *et al.*, 2010; Liu *et al.*, 2012).

La superficie de absorción intestinal se relaciona con una mejor función digestiva, la cual aumenta asociada a cambio histo-morfológicos de la mucosa intestinal (Pluske y Williams, 1996; Awad *et al.*, 2013). Se ha estudiado que los enterocitos inmaduros tienen menor actividad de disacaridasas (Van Dijk *et al.*, 2002), por lo tanto la evaluación de dichas enzimas, es indicativo del grado de maduración intestinal. El recuento de células caliciformes también es relevante, ya que es considerado por muchos autores como un índice de la capacidad secretora y productora de mucus protector intestinal (Piel *et al.*, 2005).

Las principales disacaridasas intestinales son maltasa, sacarasa y lactasa. Las tres enzimas se encuentran presentes en el lechón al nacimiento, mostrando una mayor actividad a nivel del duodeno y yeyuno. La actividad de estas enzimas se encuentra influenciada por la edad, el tipo de carbohidrato dietario y el estatus fisiológico del cerdo (Li *et al.*, 2004). La lactasa es necesaria para el metabolismo de la lactosa presente en la leche, por lo que se encuentra en mayor concentración que las otras dos. Por el contrario, en la etapa de recría donde los animales

ingieren dietas sólidas, adquiere mayor relevancia la actividad de la sacarasa y la maltasa (Manners y Stevens, 1972; Zhang *et al.*, 1997; Adeola y King, 2006).

El desarrollo de la morfo-fisiología del tracto gastrointestinal del neonato en las primeras horas de vida es fundamental para el futuro desempeño productivo del animal. Es por ello relevante el estudio en su conjunto de las variables histológicas, fisiológicas y bacteriológicas luego de la administración de antibióticos con el calostro.

2. OBJETIVO

Evaluar los efectos de FOS y OTC sobre la morfo-fisiología intestinal de los lechones neonatos.

3. MATERIALES Y MÉTODOS

3.a) Animales

El estudio se realizó en una granja comercial descrita en la Sección Experimental I. Se trabajó con 32 lechones neonatos clínicamente sanos, provenientes de 8 cerdas libres de antibióticos, seleccionadas con el mismo criterio descrito en la sección experimental I. La temperatura del ambiente de la sala de maternidad se mantuvo a 23°C durante el parto de las cerdas, contando además con un espacio para los lechones con una lámpara infrarroja y una manta térmica (materiales que permiten otorgarles a los lechones una temperatura de confort de 32°C). El estudio fue realizado siguiendo las normas éticas aprobadas por el comité de Bienestar Animal de la Facultad de Ciencias Veterinarias, Universidad Nacional del Centro de la Provincia de Buenos Aires, Argentina.

3.b) Grupos experimentales

Treinta y dos lechones lactantes (n = 4 lechones/cerda) con un PV promedio de $1,0 \pm 0,30$ Kg fueron divididos en cuatro grupos seleccionados al nacer (figura 27).

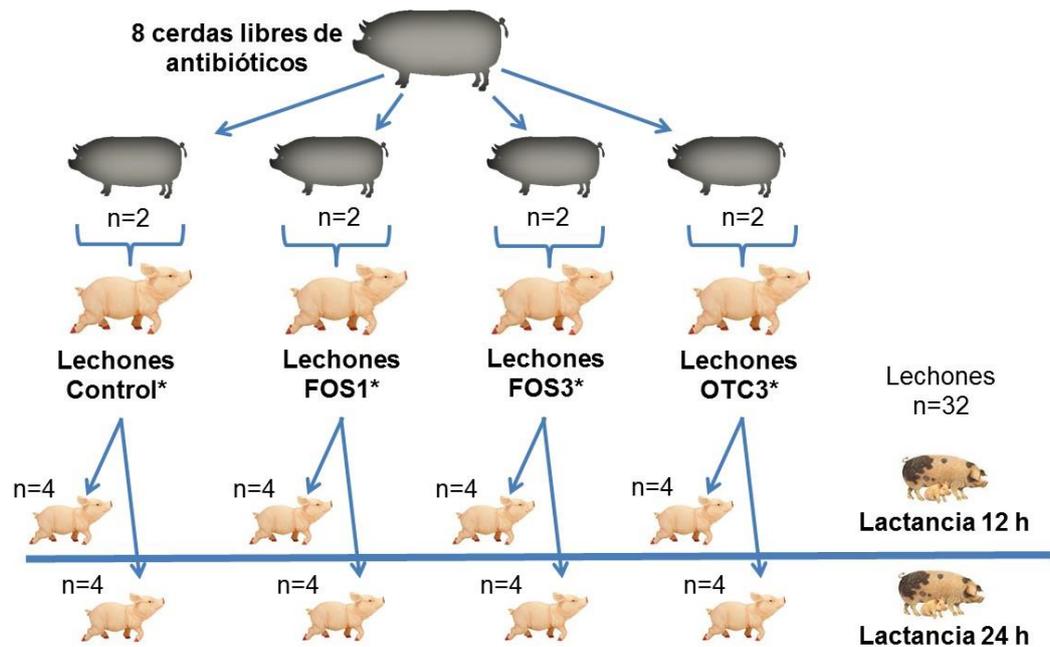


Figura 27. Esquema de la conformación de los grupos de lechones en estudio.

Todos los animales fueron alimentados artificialmente con calostro recolectado de manera manual como se detalló en la sección experimental I. El pool de calostro fue mantenido a temperatura corporal de la cerda. Por medio de una jeringa se administró vía oral calostro libre de antibióticos (al grupo control) y calostro adicionado con FOS u OTC (a los grupos tratados) de acuerdo al siguiente esquema:

- **Lechones Control*:** calostro sin antibióticos.
- **Lechones FOS1*:** tratados con 0,26 mg/Kg PV de FOS.
- **Lechones FOS3*:** tratados con 0,50 mg/Kg PV de FOS.
- **Lechones OTC3*:** tratados con 0,13 mg/Kg PV de OTC.

Cabe destacar que la concentración de cada antibiótico (eliminada en calostro) fue obtenida en la sección experimental II y que el volumen total fue dividido y suministrado en las 3 primeras tomas de calostro. La cantidad de calostro suministrada a los lechones fue de 15 mL por toma y se brindó a intervalos regulares de una hora (según lo determinado por White *et al.*, 1996 y Le Dividich *et al.*, 2005) hasta el momento del sacrificio de los animales. De manera tal que una mitad de cada grupo recibió calostro durante 12 h y la otra mitad durante 24 h.

Los animales fueron monitorizados para detectar signos de diarrea durante todo el estudio. Después de 12 h de lactancia, 4 lechones seleccionados aleatoriamente de cada grupo

fueron eutanasiados. Los 4 animales restantes de cada grupo se eutanasiaron a las 24 h de lactancia. Inmediatamente después todo el tracto intestinal fue extraído para su análisis.

3.c) Muestreo del intestino

Inmediatamente después del sacrificio, se recogieron muestras del tracto gastrointestinal de cada lechón para las diferentes determinaciones (figura 28). Todas las muestras fueron procesadas en el Laboratorio de Toxicología, en el Laboratorio de Microbiología y en el Laboratorio de Inmunoquímica y Biotecnología de la Facultad de Ciencias Veterinarias, UNCPBA.

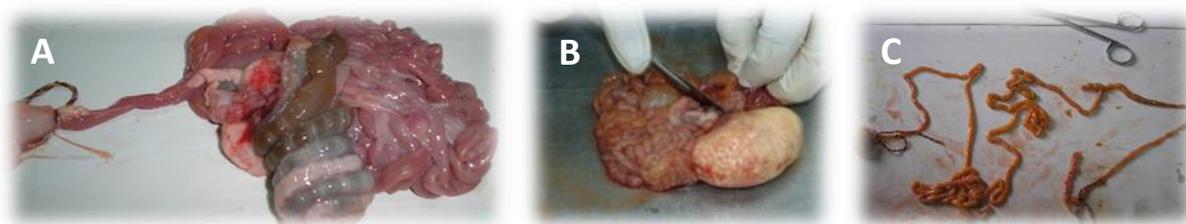


Figura 28. (A) Tracto gastrointestinal de lechón. (B) Disección del tracto gastrointestinal. (C) Extensión de la masa intestinal.

3.d) Determinaciones

Análisis microbiológico: se tomaron muestras de contenido intestinal de tres porciones (yeyuno-íleon a 10 cm proximal al ciego, ciego y colon a 20 cm posterior a la válvula íleo-cecal) en recipiente estéril y se remitieron en forma refrigerada al laboratorio para su procesamiento. Las muestras fueron recolectadas de los recipientes con hisopos estériles y colocadas en tubos con agua de peptona y luego de su homogeneización, se realizaron diluciones seriadas 1:10 hasta 10^{-6} en eppendorf. Alícuotas de 100 μ L de cada dilución fueron sembradas en placa por duplicado con espátula en medios selectivos (figura 29). En medio Man-Rogosa-Sharpe (MRS) (Britania S.A.) para bacterias ácido-lácticas como los lactobacilos y para las enterobacterias representante de comensales, se utilizó el medio Mac Conkey Agar (Britania S.A.). Las placas se incubaron 24 h bajo condiciones aerobias para las enterobacterias y en microaerofilia 48 h para las bacterias de ácido-lácticas (Gyawali *et al.*, 2015) a 37°C en estufa. Los resultados de los recuentos fueron expresados como el logaritmo del número de UFC por gramo de heces frescas. Se determinó la

relación E/BAL. Para el recuento de bifidobacterias se elaboró un medio de cultivo que denominamos “medio para *Bifidobacterium* modificado” (MBM).

El desarrollo del MBM fue controlado mediante el cultivo de una cepa comercial liofilizada *Bifidobacterium animalis* (BLC1) Lyofast, (Laboratorio Sacco SRL, Italia), observando colonias pequeñas redondas color verde oscuro y de borde netos, a las cuales se les realizó un extendido y coloración de Gram, observando bacilos G (+) pleomórficos y posterior prueba de catalasa, cuyo resultado fue (-). Luego de verificar el desarrollo de la cepa comercial de bifidobacteria, se realizó la siembra de bacterias obtenidas de lechones. La morfología de colonia fue redondas pequeñas (menos de 1 mm) color verde oscuro y de bordes netos. A la coloración de Gram se obtuvo morfología compatible con *Bifidobacterium globosum*.

Para demostrar selectividad se realizó la siembra en el medio MBM de cepas de referencia. *Escherichia coli* como representante de coliformes, de la cual no se obtuvo desarrollo. Además, se realizó la siembra de dos cepas comerciales liofilizadas de lactobacilos: *Lactobacillus acidophilus* (LA3) Lyofast, (Laboratorio Sacco SRL, Italia) y *Lactobacillus ramosus* (LB21) Lyofast, (Laboratorio Sacco SRL, Italia), obteniendo morfología de colonia diferente. Las mismas fueron redondas e irregulares grandes (2 mm) color amarillo con el centro verde y a la coloración se observaron bacilos G (+) (figura 30).

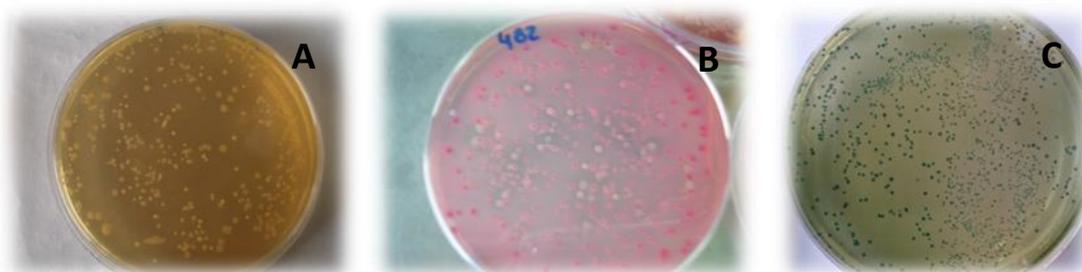
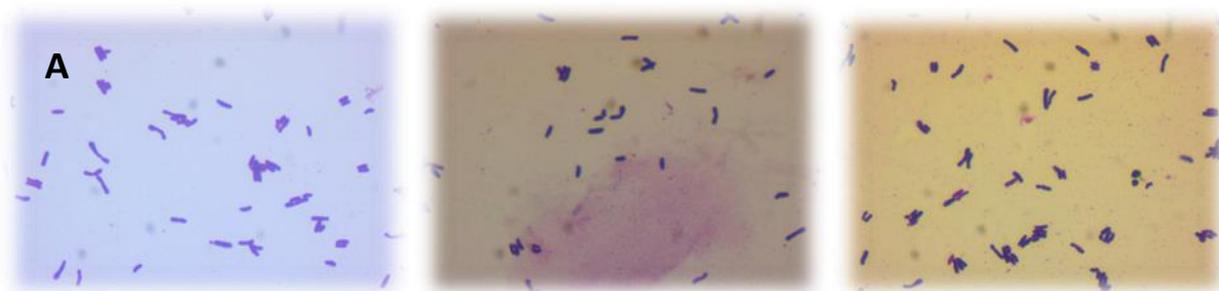


Figura 29. Medios de cultivo. (A) Bacterias ácido-lácticas en placa de agar MRS. (B) Enterobacterias en placa de agar Mac Conckey. (C) Bifidobacterias en placa de agar MBM.



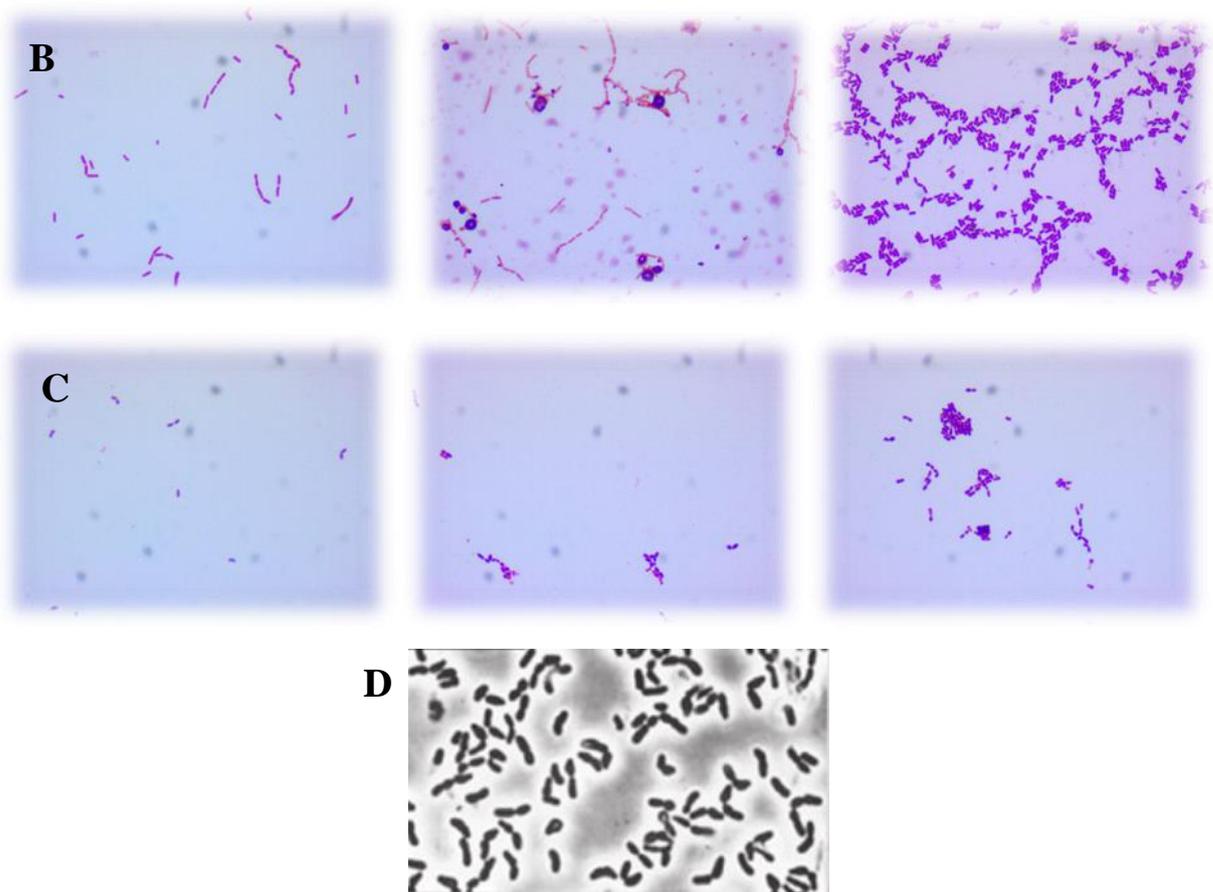


Figura 30. Morfología bacteriana obtenida con coloración de Gram. (A) *Bifidobacterium animalis*; (B) *Lactobacillus acidophilus*; (C) Bifidobacteria de cerdo (compatible con *Bifidobacterium globosum*); (D) foto modelo de *Bifidobacterium globosum* (Biavati y Mattarelli, 2012).

Preparación de “medio para *Bifidobacterium* modificado” (MBM)

Ingredientes para 1 litro:

- Medio Lactobacilli Agar AOAC (Difco Laboratories, USA)..... 24 g
- Agar Diferencial para Clostridios (Britania S.A.).....21 g
- Verde de bromocresol (Biopack) en solución de Na (OH).....20 mL
- Cloruro de litio (Biopack)2,5 g
- Ácido propiónico al 5% (Sigma-Aldrich) en agua destilada.....25 mL
- Agar-agar (Britania S.A.).....4,4 g
- Agua destilada.....950 mL

Se preparó el medio en erlenmeyer agregando Medio Lactobacilli Agar AOAC, Agar Diferencial para Clostridios, verde de bromocresol, cloruro de litio, agar-agar y agua destilada.

Posteriormente se fundió y autoclavó a 121°C durante 15 minutos. Al retirar del autoclave, se dejó enfriar a 50-55°C, se midió el pH con tiras y se ajustó a pH 5-5,5 con el agregado del ácido propiónico previamente esterilizado mediante filtración utilizando filtros de jeringa de 0,22 µm. Finalmente se homogeneizó y volcó en placas de Petri.

A partir de colonias sospechosas con bifidobacteria se llevó a cabo el repique y siembra en placa con MBM y se tomó material para realizar PCR.

Identificación Genotípica

Las muestras fueron caracterizadas por medio de la técnica de PCR, la cual se puso a punto empleando cepas de referencia, según la metodología descrita por Dubernet *et al.* (2002). La identificación se realizó amplificando regiones específicas de cada una de las especies analizadas, los productos de amplificación fueron visualizados mediante electroforesis en geles de agarosa teñidos con bromuro de etidio (Kwon *et al.*, 2004). La extracción de ADN se realizó con el kit *Highway*® ADN PuriPrep-B kit K1209. Para la identificación de género *Bifidobacterium*, se utilizaron los primers generales g-Bifid-F (CTCCTGGAAACGGGTGG) y g-Bifid-R (GGTGTCTTCCCGATATCTACA) (Matsuki *et al.*, 2002). En la identificación de género *Lactobacillus*, se utilizaron los primers generales LbLMA1-rev (5'-CTC AAA ACT AAA CAA AGT TTC-3') y R16-1 (5'-CTT GTA CAC ACC GCC CGT CA-3') (Dubernet *et al.*, 2002).

Se preparó el cóctel con los siguientes reactivos, buffer: 5 µL, cloruro de magnesio: 10 µL, desoxiribonucleotico trifosfato (DNTP's), 0,5 µL, primers: reverse y forward 0,5 µL de cada uno, taq ADN polimerasa: 0,2 µL, agua bidestilada: 28,3 µL, ADN bacteriano: 5 µL. Para la amplificación se empleó un termociclador marca Multigene con un programa específico que incluye, desnaturalización inicial un ciclo a 94°C durante 5 minutos, luego 35 ciclos (desnaturalización a 94 °C por 20 seg.), annealing o unión con gradiente entre 55 y 50°C por 20 segundos, extensión a 72 °C por 30 seg., 5 minutos finales de extensión a 72 °C y finalmente el almacenamiento a 4 °C.

Posteriormente a la confirmación genotípica, se realizó la siembra de las muestras recolectadas de los lechones en placas con MBM. Las mismas fueron incubadas 96 h bajo condiciones de anaerobiosis (jarra Oxoid con sobre de anaerobiosis AnaeroGen™ Oxoid) a 37°C en estufa. A fin de realizar con mayor precisión el recuento de las colonias de bifidobacterias se

utilizó una lupa (Olympus SZ-ST). Los resultados de los recuentos fueron expresados como el logaritmo del número de UFC por gramo de heces frescas.

Criopreservación: las cepas puras de *Bifidobacterium*, *Lactobacillus* y *Escherichia coli* fueron congeladas en eppendorf con caldo triptosa-fosfato con glicerina (17%) y suero equino (1%). Para realizar el congelado se escobillo parte del cultivo y se guardó en heladera durante 30 minutos. Luego los eppendorf se congelaron a -20°C en freezer.

pH del tracto gastrointestinal: se midió el pH con un electrodo de peachímetro (UP-25, Denver Instrument Company, Denver, Colorado, EE.UU.), en cuatro segmentos del tracto gastrointestinal: porción caudal del estómago, íleon a 15 cm proximal a la válvula íleo-cecal, ciego y colon a 20 cm distal del ciego (figura 31).



Figura 31. Determinación de pH en ciego.

Determinación de la superficie de absorción del intestino: se recogieron muestras de intestino delgado (yeyuno medio a 75 cm distal del estómago e íleon a 15 cm proximal de la válvula íleo-cecal), se lavaron con agua destilada para eliminar restos de heces y se fijaron en medio Bouin (75% de solución saturada de ácido pícrico, 20% de formol y 5% de ácido acético) durante 24 h. A continuación, las muestras se colocaron en alcohol etílico al 70% para liberar el exceso de solución fijadora. El procesamiento se realizó mediante método de rutina y coloración con hematoxilina y eosina (H&E) y ácido peryódico Schiff (PAS). El estudio morfométrico del epitelio intestinal se realizó en el Laboratorio de Toxicología. Se utilizó un sistema de análisis de imágenes compuesto por un microscopio Olympus BX40, cámara de vídeo ToupCam™ y un programa de procesamiento de imágenes ToupTek ToupView con un zoom de 200-400 veces. Se analizaron cinco campos aleatorios diferentes para cada sección histológica. Se midieron longitud y ancho de vellosidades (μm) y profundidad y ancho de las criptas (μm). Se determinó el número de células caliciformes en las vellosidades y en las criptas (expresadas como número de células caliciformes/100 vellosidades o criptas) en las secciones intestinales teñidas con PAS

(figura 32). La superficie de absorción del intestino (M) se estimó utilizando el modelo matemático propuesto por Kisielinski *et al.* (2002):

$$M = \frac{(\text{ancho vellosidad} * \text{longitud vellosidad}) + \left(\frac{\text{ancho vellosidad}}{2} + \frac{\text{ancho cripta}}{2}\right)^2 - \left(\frac{\text{ancho vellosidad}}{2}\right)^2}{\left(\frac{\text{ancho vellosidad}}{2} + \frac{\text{ancho cripta}}{2}\right)^2}$$

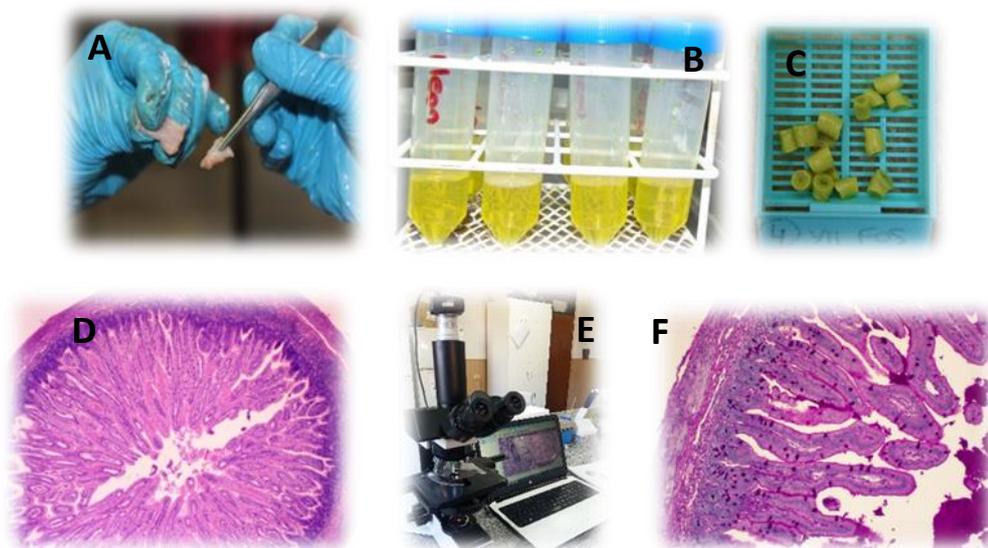


Figura 32. (A) Corte transversal de muestra intestinal para histología. (B) Medio Bouin para la fijación de las porciones intestinales. (C) Cortes fijados en cassette listos para su procesamiento. (D) Corte histológico con tinción H&E. (E) Cámara de video acoplada a un microscopio óptico y observación en computadora. (F) Corte histológico con tinción PAS.

Determinación de los ácidos grasos volátiles (AGVs): muestras de contenido cecal fueron recolectadas en tubos de plástico con tapa roscada. Se añadió ácido fosfórico de grado HPLC (EM Science) en una relación 1:4. Las muestras se congelaron en freezer a -80°C hasta su análisis. Para la medición de la concentración de AGVs, las muestras de contenido cecal fueron desproteinizadas y analizadas por cromatografía de gases con detector FID, de acuerdo con la metodología validada propuesta por Jouany (1982). Se utilizó un cromatógrafo de gases Shimadzu (Modelo GC-17A, Kyoto, Japón), equipado con un detector FID. La separación cromatográfica se realizó con una columna Innowax 30M (Agilent, Santa Clara, Estados Unidos) (figura 33).



Figura 33. Cromatógrafo de gases para la cuantificación de AGVs.

Actividad de disacaridasas intestinales: las muestras fueron recolectadas de cuatro porciones intestinales: duodeno, inmediatamente después del estómago; yeyuno proximal, a continuación del duodeno; yeyuno medio a 1,5 m de yeyuno proximal y yeyuno distal-íleon a 15 cm proximal a la válvula ileocecal. Los segmentos intestinales fueron lavados con solución fisiológica para eliminar el contenido intestinal y se enviaron refrigerados al laboratorio. Un gramo de mucosa intestinal se recogió raspando firmemente la superficie luminal con espátula. A continuación, se agregó a la mucosa 2 ml de solución salina, se trituró en un mezclador (Ultra-Turrax®) a 22000 rpm durante 1 minuto y se homogeneizó con un homogeneizador de pistón y tubo (Potter Heidolph tipo RZR 50, Alemania). A continuación, las muestras se centrifugaron a 6630 rpm a 4°C durante 10 minutos (Beckman coulter®). Las concentraciones de proteína de los homogeneizados se determinaron por espectrofotometría (Dupont, Sorvall Instruments) a 595 nm de acuerdo con el método de Bradford (1976) usando albúmina de suero bovino. Las actividades de la lactasa, la sacarasa y la maltasa se determinaron por espectrofotometría a 450 nm según el método de Dahlqvist (1964). La actividad de las disacaridasas se expresó como U/mg de proteína, siendo una U la cantidad de enzima que hidroliza 1 mmol de lactosa, sacarosa o maltosa en 1 min en condiciones de ensayo estándar (figura 34).

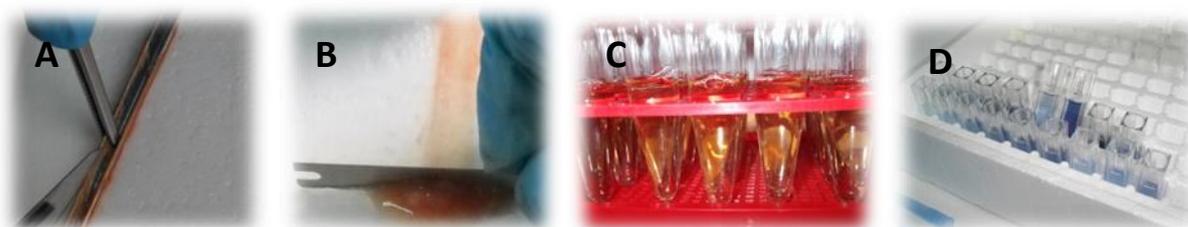


Figura 34. (A) Exposición de la mucosa del íleon para la determinación de disacaridasas. (B) Extracción de la mucosa por medio de raspaje. (C) Tubos incubándose en la estufa. (D) Cubetas con muestras para la cuantificación de proteínas.

3.e) Análisis estadístico

Las variables (análisis microbiológico, pH del tracto gastrointestinal, determinación de la superficie de absorción, AGVs y actividad de las disacaridasas intestinales) fueron cuantificadas en lechones con tratamientos: Control*, FOS1*, FOS3* y OTC3*. Las mismas se midieron con 4 repeticiones, a las 12 y 24 h de lactancia y en diferentes porciones del intestino. En el modelo para el análisis estadístico fue incluido el efecto de tratamiento, tiempo, localización intestinal y sus interacciones contemplando la medición repetida en el intestino de cada animal. Las

variables del análisis microbiológico y de la actividad de las disacaridasas fueron transformadas con la función logaritmo para obtener la normalidad de los residuos y estabilizar las variancias. Las diferencias fueron consideradas significativas cuando $p < 0,05$. El análisis fue realizado con SAS V9.3 (SAS, Instituto Inc., Cary, NC, EE.UU.).

4. RESULTADOS

La incorporación de los antibióticos FOS y OTC al calostro que se les administró a los lechones durante los periodos de lactancia de 12 y 24 h, no produjo diarrea en dichos animales.

Análisis microbiológico

La tabla 5 muestra el promedio (\pm EEM) del \log_{10} (UFC/g) para las enterobacterias, bacterias ácido-lácticas, E/BAL y bifidobacterias para cada grupo (lechones Control*, FOS1*, FOS3* y OTC*) a las 12 y 24 h de lactancia en las diferentes regiones intestinales (yeyuno-íleon, ciego y colon).

Enterobacterias: no fueron observadas interacciones significativas ($p > 0,05$). Tampoco hubo diferencia entre los tratamientos ($p = 0,1583$), y en las horas de lactancia ($p = 0,9527$). El efecto del lugar de muestreo presentó diferencias significativas ($p = 0,0226$), observando diferencias entre en el logaritmo del recuento entre el yeyuno-íleon y el ciego ($p = 0,0265$) (figura 35).

Bacterias ácido-lácticas: no fueron encontradas interacciones significativas ($p > 0,05$). Tampoco hubo diferencias significativas entre los tratamientos ($p = 0,1044$), las horas de lactancia ($p = 0,6147$) y lugar de muestreo ($p = 0,1557$).

E/BAL: no se encontraron interacciones significativas ($p > 0,05$). Tampoco se hallaron diferencias entre los tratamientos ($p = 0,2130$), las horas de lactancia ($p = 0,1339$) y lugar de muestreo ($p = 0,2489$).

Bifidobacterias: no se hallaron interacciones significativas ($p > 0,05$). Tampoco se encontraron diferencias significativas entre las horas de lactancia ($p = 0,370$), ni en el lugar de muestreo ($p = 0,7548$). El efecto de tratamiento (FOS3* y OTC3*) presentó diferencias significativas ($p = 0,0170$), con un logaritmo de recuento superior en el tratamiento FOS3* que en el OTC3* ($6,98 \pm 0,12$ y $5,94 \pm 0,19$ UFC, respectivamente) (figura 36).

Tabla 5. Efecto de la FOS y la OTC sobre la microbiología (\log_{10} UFC/g) y la relación enterobacterias/bacterias ácido lácticas (E/BAL) en diferentes porciones intestinales de lechones lactantes¹**

Item	12 h						24 h				
	Lechones Control*		Lechones FOS1*		Lechones FOS3*		Lechones OTC3*		Lechones FOS1*	Lechones FOS3*	Lechones OTC3*
	Control*	FOS1*	FOS1*	FOS3*	FOS3*	OTC3*	OTC3*	FOS1*	FOS3*	OTC3*	
Enterobacterias (\log_{10} UFC/g)											
Yejuno-íleon	6,80 ± 0,54	5,81 ± 0,83	7,94 ± 0,06	8,21 ± 0,50	7,13 ± 0,64	8,21 ± 0,50	7,13 ± 0,64	6,42 ± 0,86	5,91 ± 0,91	8,32 ± 0,03	
Ciego	6,92 ± 0,35	7,17 ± 0,36	8,51 ± 0,03	8,88 ± 0,22	7,61 ± 0,35	8,88 ± 0,22	7,61 ± 0,35	7,31 ± 0,81	8,13 ± 0,45	7,72 ± 0,77	
Colon	6,32 ± 0,57	7,55 ± 0,63	8,12 ± 0,64	8,17 ± 0,32	7,41 ± 0,46	8,17 ± 0,32	7,41 ± 0,46	7,76 ± 0,48	8,35 ± 0,17	7,60 ± 0,29	
Bacterias ácido-lácticas (\log_{10} UFC/g)											
Yejuno-íleon	6,66 ± 0,58	5,86 ± 1,25	8,76 ± 0,04	8,30 ± 0,43	7,58 ± 0,30	8,30 ± 0,43	7,58 ± 0,30	7,04 ± 0,62	6,51 ± 0,89	8,28 ± 0,31	
Ciego	6,35 ± 0,74	7,44 ± 0,49	8,35 ± 0,13	8,90 ± 0,29	7,30 ± 0,42	8,90 ± 0,29	7,30 ± 0,42	7,66 ± 0,72	8,48 ± 0,04	7,79 ± 0,60	
Colon	6,14 ± 0,79	7,40 ± 0,47	9,16 ± 0,04	8,34 ± 0,33	7,60 ± 0,22	8,34 ± 0,33	7,60 ± 0,22	8,13 ± 0,45	8,76 ± 0,08	7,69 ± 0,20	
Relación E/BAL											
Yejuno-íleon	1,03 ± 0,06	1,07 ± 0,15	0,91 ± 0,01	0,99 ± 0,04	0,94 ± 0,06	0,99 ± 0,04	0,94 ± 0,06	0,90 ± 0,05	0,91 ± 0,02	1,01 ± 0,03	
Ciego	1,13 ± 0,10	0,97 ± 0,02	1,02 ± 0,01	1,00 ± 0,02	1,05 ± 0,07	1,00 ± 0,02	1,05 ± 0,07	0,95 ± 0,02	0,96 ± 0,06	0,99 ± 0,05	
Colon	1,05 ± 0,07	1,02 ± 0,05	0,89 ± 0,07	0,98 ± 0,03	0,97 ± 0,04	0,98 ± 0,03	0,97 ± 0,04	0,96 ± 0,03	0,96 ± 0,02	0,99 ± 0,04	
Bifidobacterias (\log_{10} UFC/g)											
Yejuno-íleon			6,80 ± 0,44	6,31 ± 0,15					7,26 ± 0,02	4,52 ± 0,04	
Ciego			6,85 ± 0,04	6,49 ± 0,60					7,34 ± 0,11	5,39 ± 0,28	
Colon			6,50 ± 0,16	6,06 ± 0,40					7,26 ± 0,03	5,74 ± 0,42	

¹ No se observaron interacciones significativas entre los diferentes grupos ($p > 0,05$).

** Se presentan los valores promedio (\pm EEM).

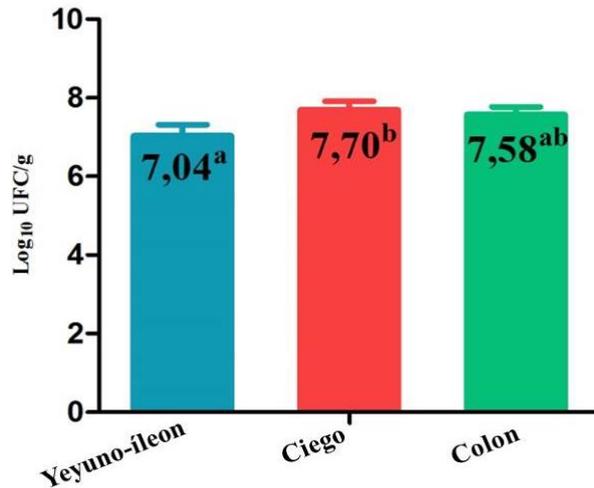


Figura 35. Efecto del lugar de muestreo sobre las UFC/g (\log_{10}) enterobacterias de lechones lactantes. Se muestra el promedio (\pm EEM). Diferentes letras indican diferencias significativas ($p < 0,05$).

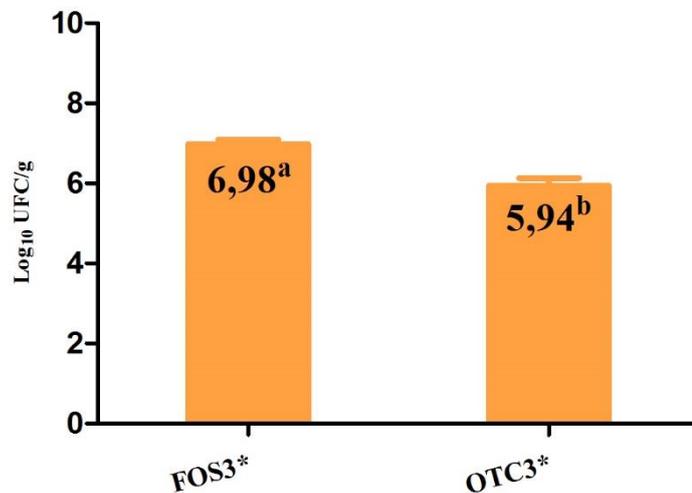


Figura 36. Efecto de tratamiento sobre las UFC/g (\log_{10}) bifidobacterias de lechones lactantes. Se muestra el promedio (\pm EEM). Diferentes letras indican diferencias significativas ($p < 0,05$).

pH del tracto gastrointestinal

La tabla 6 muestra los valores de pH (promedio \pm EEM) obtenidos en las diferentes secciones del intestino (porción caudal del estómago, íleon, ciego y colon) para cada grupo (lechones Control*, FOS1*, FOS3* y OTC3*) a las 12 y 24 h de lactancia. No se observó efecto significativo de los antibióticos sobre el pH registrado ($p > 0,05$). Tampoco se encontró efecto de tratamiento, de lugar de muestreo, ni de tiempo de lactancia.

Efecto de la FOS y la OTC sobre el pH en diferentes segmentos del tracto gastrointestinal (TGI) de lechones lactantes^{1}**

Segmento TGI	12 h				24 h			
	Lechones Control*	Lechones FOS1*	Lechones FOS3*	Lechones OTC3*	Lechones Control*	Lechones FOS1*	Lechones FOS3*	Lechones OTC3*
Estómago	5,01 ± 0,13	5,09 ± 0,15	4,62 ± 0,21	4,83 ± 0,18	4,71 ± 0,19	4,94 ± 0,44	5,16 ± 0,35	5,20 ± 0,30
Íleon ²	7,33 ± 0,11	7,18 ± 0,26	7,41 ± 0,29	7,22 ± 0,11	7,31 ± 0,13	7,18 ± 0,01	7,17 ± 0,01	7,63 ± 0,16
Ciego	7,31 ± 0,05	7,08 ± 0,03	7,79 ± 0,20	7,56 ± 0,01	7,31 ± 0,10	7,51 ± 0,02	7,45 ± 0,08	7,63 ± 0,20
Colon ³	7,34 ± 0,13	7,11 ± 0,02	7,51 ± 0,40	7,22 ± 0,04	7,39 ± 0,15	7,40 ± 0,39	7,57 ± 0,09	7,40 ± 0,18

¹No se observaron interacciones significativas entre los diferentes grupos ($p > 0,05$).

²Íleon: el pH se midió a 15 cm. proximal a la válvula ileo-cecal.

³Colon: el pH se midió a 20 cm. distal del ciego.

** Se presentan los valores promedio (\pm EEM).

Determinación de la superficie de absorción intestinal

La tabla 7 muestra los promedios (\pm EEM) de las variables histológicas y la superficie de absorción intestinal para cada grupo (lechones Control*, FOS1*, FOS3* y OTC*) a las 12 y 24 h de lactancia en yeyuno medio e íleon del intestino de los lactantes.

Vellosidades: para las variables largo y ancho de las vellosidades no hubo interacción entre los factores principales ($p > 0,05$). Tampoco se observó efecto del tiempo de lactancia (largo, $p = 0,2486$ y ancho, $p = 0,3050$).

En el largo de las vellosidades el efecto lugar de muestreo fue significativo ($p = 0,0027$), siendo mayor la medición en el yeyuno medio ($446,22 \pm 16,71 \mu\text{m}$) que en el íleon ($396,09 \pm 17,39 \mu\text{m}$) (figura 37).

El efecto de los tratamientos también fue significativo (largo, $p = 0,0003$ y ancho, $p = 0,0343$) (figuras 38 y 39). La medición no mostró diferencias entre los grupos Control* y FOS1*, sin embargo fue mayor que para los grupos FOS3* y OTC3*.

Criptas: para las variables profundidad y ancho de las criptas no fue observado efecto de interacción entre los factores principales ($p > 0,05$). Tampoco fue significativo el efecto de las horas de lactancia (profundidad, $p = 0,1265$ y ancho, $p = 0,3192$) ni del lugar de muestreo (profundidad, $p = 0,8866$ y ancho, $p = 0,3198$).

El efecto de los tratamientos fue significativo (profundidad, $p < 0,0001$ y ancho, $p = 0,0002$). La media de los grupos Control* y FOS1* fueron similares entre sí (profundidad, $p = 0,9736$ y ancho, $p = 0,6467$), al igual que las medias de los grupos FOS3* y OTC3* (profundidad, $p = 0,9999$ y ancho, $p = 0,9871$). Sin embargo, si hubo diferencias entre estos grupos (profundidad, $p < 0,0001$ y ancho, $p < 0,05$), siendo mayor la medición para los grupos Control* y FOS1* (figuras 40 y 41).

Células caliciformes: para las variables recuento de células caliciformes en las vellosidades y criptas intestinales no se observó interacción entre los factores principales ($p > 0,05$). Tampoco fue significativo el efecto de las horas de lactancia (vellosidades, $p = 0,4088$ y criptas, $p = 0,7700$).

El efecto lugar de muestreo fue significativo para el recuento de las células caliciformes (vellosidades, $p < 0,0001$ y criptas, $p = 0,0030$), siendo mayor el recuento promedio registrado a nivel de íleon para ambas variables ($989,50 \pm 50,33$ células/100 vellosidades y $420,94 \pm 3,66$ células/100 criptas) (figuras 42 y 43).

El efecto de los tratamientos no fue estadísticamente significativo para el recuento en las vellosidades ($p= 0,2735$) pero si en las criptas ($p< 0,0001$). Los valores obtenidos fueron mayores para los grupos Control* y FOS1* (figura 44).

Superficie de absorción intestinal: no se observó interacción entre los factores principales ($p> 0,05$). Las diferencias entre las horas de lactancia ($p= 0,0640$) y el efecto de los tratamientos ($p= 0,1245$) no fueron estadísticamente significativos.

El efecto lugar de muestreo fue significativo ($p= 0,0128$) observando en yeyuno medio un área mayor que en el íleon ($9,63 \pm 0,27$ y $8,79 \pm 0,32 \mu\text{m}^2$, respectivamente) (figura 45).

Tabla 7. Efecto de la FOS y la OTC sobre las características histológicas y la superficie de absorción intestinal (SAI) en diferentes porciones del tracto gastrointestinal de lechones lactantes**

Item	12 h				24 h			
	Lechones Control*	Lechones FOS1*	Lechones FOS3*	Lechones OTC3*	Lechones Control*	Lechones FOS1*	Lechones FOS3*	Lechones OTC3*
VELLOSIDAD								
Largo (μm)	Yeyuno medio 488,78 \pm 62,84	526,90 \pm 23,93	409,21 \pm 71,23	421,76 \pm 39,76	453,52 \pm 20,55	495,03 \pm 23,29	406,26 \pm 8,18	345,67 \pm 30,12
	Íleon 438,64 \pm 44,31	477,25 \pm 21,75	470,81 \pm 16,88	301,55 \pm 26,76	445,08 \pm 17,59	443,91 \pm 84,90	338,88 \pm 10,24	323,61 \pm 27,84
Ancho (μm)	Yeyuno medio 82,77 \pm 5,90	92,15 \pm 6,82	87,93 \pm 4,09	85,41 \pm 3,02	92,92 \pm 2,21	91,63 \pm 6,22	82,39 \pm 0,75	75,08 \pm 4,67
	Íleon 79,73 \pm 6,96	85,98 \pm 1,86	75,52 \pm 0,39	67,54 \pm 5,63	96,01 \pm 5,06	78,86 \pm 3,13	84,97 \pm 3,20	78,41 \pm 6,16
Cél caliciformes ¹	Yeyuno medio 627,50 \pm 217,50	555,83 \pm 78,19	670,00 \pm 67,50	505,63 \pm 27,62	855,00 \pm 147,50	810,00 \pm 102,30	425,00 \pm 120,00	612,50 \pm 137,67
	Íleon 1007,50 \pm 77,31	1115,00 \pm 297,50	925,00 \pm 90,02	878,75 \pm 105,00	1157,50 \pm 127,50	1020,00 \pm 98,36	1028,45 \pm 134,05	913,75 \pm 87,13
CRIPTA								
Profundidad (μm)	Yeyuno medio 88,54 \pm 4,42	84,56 \pm 3,59	68,32 \pm 4,53	70,47 \pm 1,86	97,22 \pm 5,95	100,24 \pm 7,49	65,50 \pm 6,13	63,99 \pm 2,71
	Íleon 91,34 \pm 3,67	87,50 \pm 3,10	66,43 \pm 1,19	64,52 \pm 2,05	92,01 \pm 5,29	105,64 \pm 6,72	65,05 \pm 4,32	67,16 \pm 6,27
Ancho (μm)	Yeyuno medio 49,18 \pm 3,75	44,27 \pm 1,64	39,60 \pm 1,15	39,38 \pm 0,86	44,95 \pm 4,75	53,09 \pm 2,08	38,74 \pm 0,80	37,71 \pm 1,96
	Íleon 47,85 \pm 0,84	47,25 \pm 1,56	36,58 \pm 1,31	37,76 \pm 1,27	47,86 \pm 4,03	58,11 \pm 5,62	37,75 \pm 0,75	41,54 \pm 1,75
Cél caliciformes ¹	Yeyuno medio 383,75 \pm 6,25	398,33 \pm 21,13	258,75 \pm 1,25	348,13 \pm 31,99	476,25 \pm 18,75	378,33 \pm 64,96	463,75 \pm 238,75	273,13 \pm 25,56
	Íleon 480,63 \pm 35,01	530,00 \pm 106,14	332,50 \pm 10,00	371,25 \pm 22,88	556,67 \pm 19,06	403,75 \pm 18,75	288,75 \pm 8,75	346,25 \pm 48,83
SAI (μm^2) ²	Yeyuno medio 9,47 \pm 0,57	11,03 \pm 0,71	10,71 \pm 0,35	9,74 \pm 0,67	8,63 \pm 0,31	9,30 \pm 0,69	9,66 \pm 0,04	8,78 \pm 0,88
	Íleon 9,16 \pm 0,76	9,85 \pm 0,60	10,43 \pm 1,95	7,95 \pm 0,62	8,83 \pm 0,83	8,26 \pm 1,96	9,30 \pm 0,20	7,64 \pm 0,58

¹ Células caliciformes: se expresa como el número de células caliciformes/100 vellosidades o criptas.

² SAI: superficie de absorción intestinal expresada en μm^2 .

** Se presentan los valores promedio (\pm EEM).

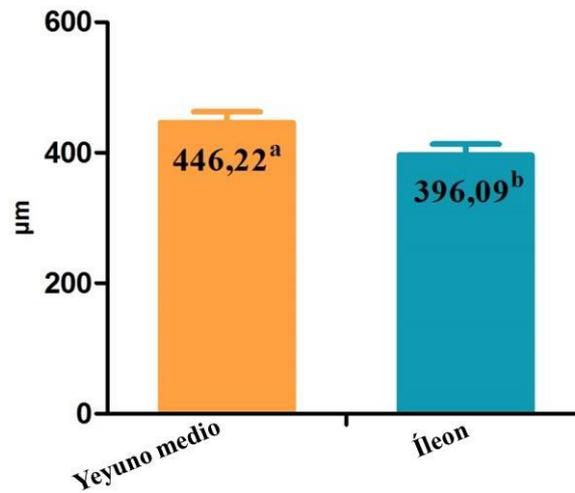


Figura 37. Efecto del lugar de muestreo sobre el largo de las vellosidades (μm) en lechones lactantes. Se muestra el promedio (\pm EEM). Diferentes letras indican diferencias significativas ($p < 0,05$).

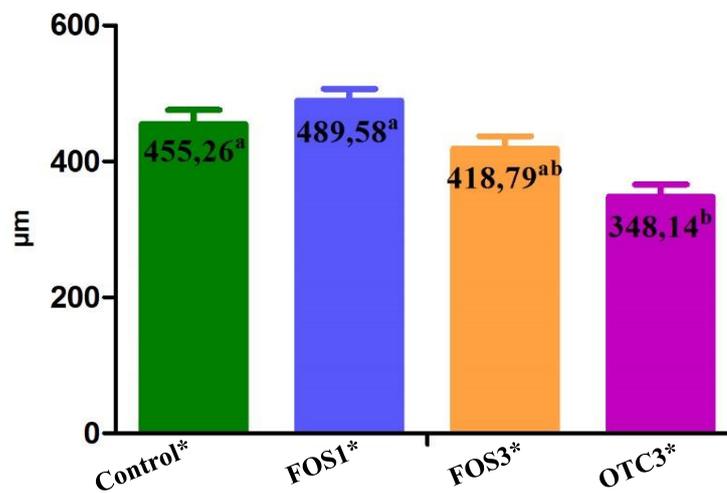


Figura 38. Efecto de tratamiento sobre el largo de las vellosidades (μm) en lechones lactantes. Se muestra el promedio (\pm EEM). Diferentes letras indican diferencias significativas ($p < 0,05$).

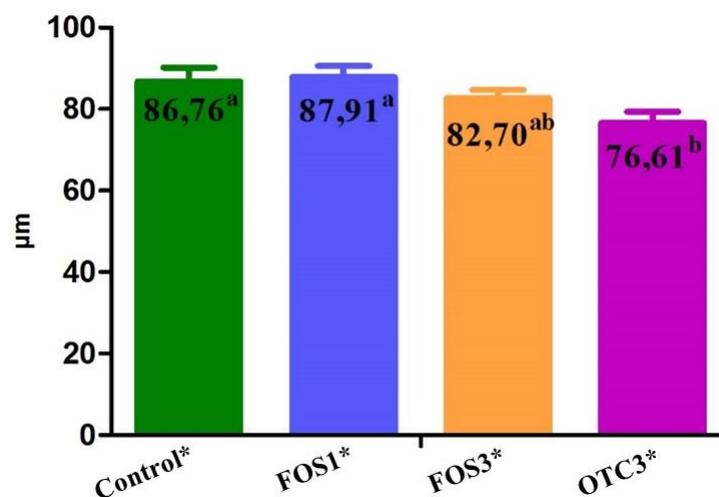


Figura 39. Efecto de tratamiento sobre el ancho de las vellosidades (μm) en lechones lactantes. Se muestra el promedio (\pm EEM). Diferentes letras indican diferencias significativas ($p < 0,05$).

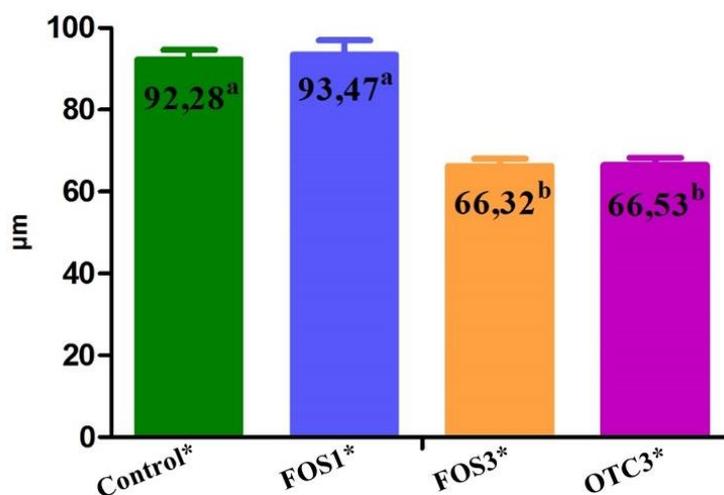


Figura 40. Efecto de tratamiento sobre la profundidad de las criptas (μm) en lechones lactantes. Se muestra el promedio (\pm EEM). Diferentes letras indican diferencias significativas ($p < 0,05$).

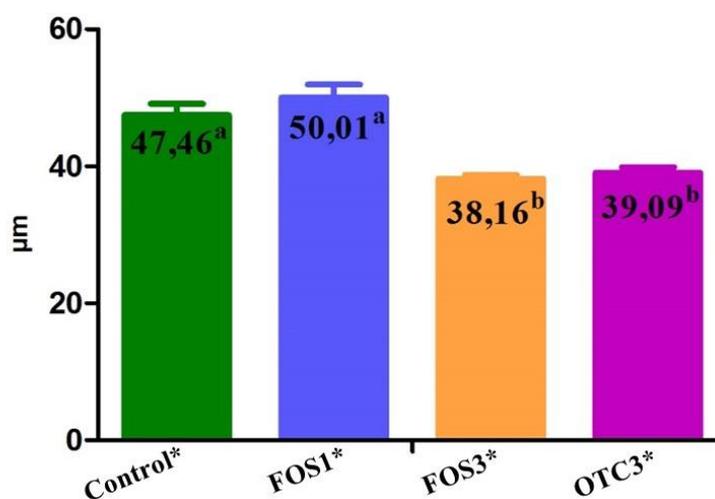


Figura 41. Efecto de tratamiento sobre el ancho de las criptas (μm) en lechones lactantes. Se muestra el promedio (\pm EEM). Diferentes letras indican diferencias significativas ($p < 0,05$).

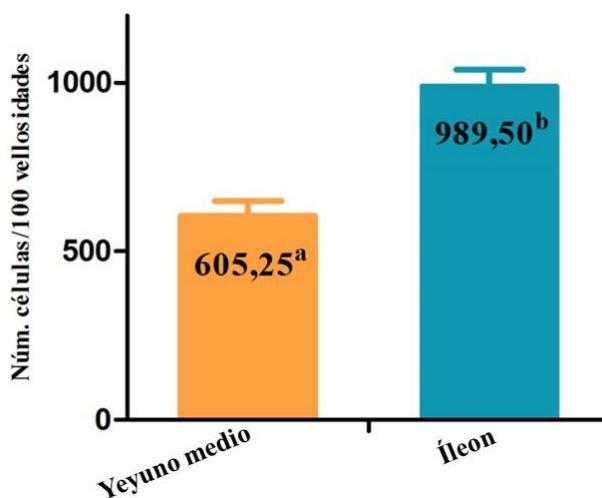


Figura 42. Efecto del lugar de muestreo sobre el recuento de células caliciformes/100 vellosidades en lechones lactantes. Se muestra el promedio (\pm EEM). Diferentes letras indican diferencias significativas ($p < 0,05$).

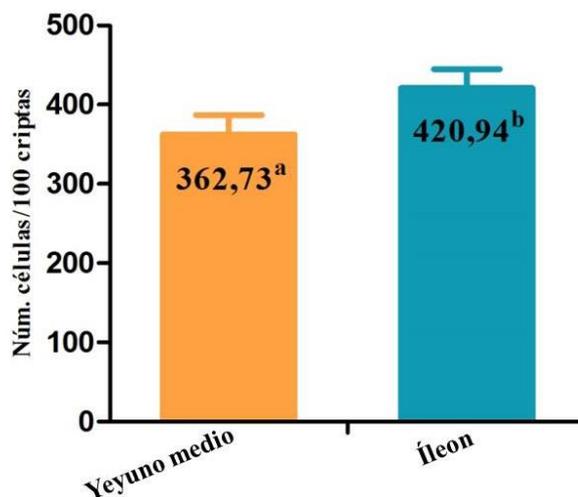


Figura 43. Efecto del lugar de muestreo sobre el recuento de células caliciformes/100 criptas en lechones lactantes. Se muestra el promedio (\pm EEM). Diferentes letras indican diferencias significativas ($p < 0,05$).

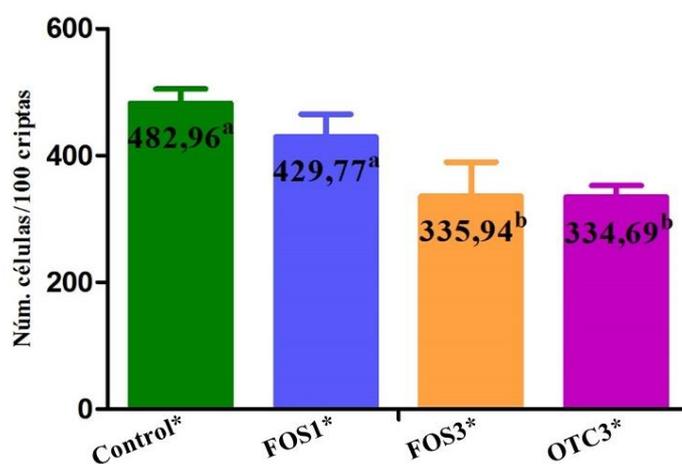


Figura 44. Efecto de tratamiento sobre el recuento de las células caliciformes/100 criptas en lechones lactantes. Se muestra el promedio (\pm EEM). Diferentes letras indican diferencias significativas ($p < 0,05$).

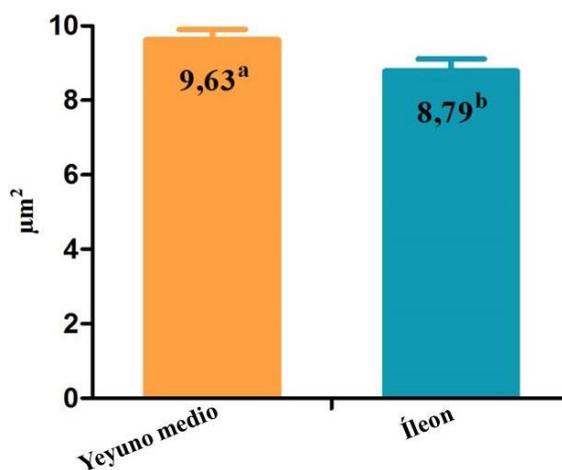


Figura 45. Efecto del lugar de muestreo sobre la superficie de absorción intestinal (μm^2) en lechones lactantes. Se muestra el promedio (\pm EEM). Diferentes letras indican diferencias significativas ($p < 0,05$).

AGVs

El contenido intestinal del ciego de lechones lactantes se analizó mediante cromatografía de gases. Debido a la escasa cantidad de muestra recolectada del ciego, solamente se pudo cuantificar el ácido acético. Los resultados para dicha variable (mmol/L) se presentan en la tabla 8 (promedio \pm EEM) para cada grupo (lechones Control*, FOS1*, FOS3* y OTC*) y horas de lactancia (12 y 24 h). No hubo interacción entre los tratamientos y las horas de lactancia ($p=0,4205$). Tampoco se observó efecto de tratamiento y horas de lactancia ($p=0,5628$ y $p=0,3501$, respectivamente).

Tabla 8. Efecto de la FOS y la OTC sobre la producción de ácido acético (mmol/L) en el ciego de lechones lactantes¹**

Item	12 h				24 h			
	Lechones Control*	Lechones FOS1*	Lechones FOS3*	Lechones OTC3*	Lechones Control*	Lechones FOS1*	Lechones FOS3*	Lechones OTC3*
Ác. acético	4,58 ± 1,86	4,43 ± 0,57	5,38 ± 0,42	4,72 ± 1,84	4,99 ± 1,56	5,74 ± 0,75	2,34 ± 0,59	1,21 ± 1,05

¹ No se observaron interacciones significativas entre los diferentes grupos ($p > 0,05$).

** Se presentan los valores promedio (\pm EEM).

Actividad de disacaridasas intestinales

La Tabla 9 muestra los niveles de lactasa, maltasa y sacarasa (promedio \pm EEM) para cada grupo (lechones Control*, FOS1*, FOS3* y OTC*) a las 12 y 24 horas de lactancia y en las diferentes porciones del intestino (duodeno, yeyuno proximal, yeyuno medio y yeyuno-distal íleon).

Lactasa: no se observaron interacciones significativas ($p > 0,05$). No se observó efecto entre las horas de lactancia ($p = 0,0650$).

Se observó diferencia significativa entre los tratamientos en el duodeno ($p = 0,0135$), en la comparación de a pares solo se halló diferencia entre FOS1* y FOS3* ($p = 0,0443$) (figura 46).

El efecto del lugar de muestreo presentó diferencias significativas ($p < 0,0001$), siendo superiores los niveles encontrados en el duodeno (> 1400 U/mg proteína) que en las otras porciones del intestino (< 290 U/mg proteína) (figura 47).

Sacarasa: se observó interacción significativa entre el tratamiento y el lugar del intestino estudiado ($p = 0,0094$) y entre las horas de lactancia y el lugar de muestreo ($p = 0,0152$). Por lo tanto, los efectos de tratamiento y horas de lactancia, fueron estudiados en cada porción intestinal.

En duodeno los niveles de sacarasa del grupo Control* fueron superiores al resto de los tratamientos ($p < 0,05$), siendo FOS1* y FOS3* similares ($p > 0,05$), pero distintos del grupo OTC3* ($p < 0,05$).

En el yeyuno proximal los niveles de sacarasa en el grupo Control* y FOS1* no fueron diferentes entre sí ($p > 0,05$), pero fueron distintos a FOS3* y OTC3* ($p < 0,05$).

En la porción media del intestino no se observaron diferencias en los niveles de sacarasa ($p > 0,05$).

En la porción distal se observó el mismo comportamiento que en la porción proximal (figura 48).

El efecto del tiempo de lactancia solo presentó diferencias en el yeyuno distal-íleon (figura 49).

El efecto del lugar de muestreo presentó diferencias significativas ($p = 0,0003$), siendo superiores los niveles encontrados en el duodeno (> 11 U/mg proteína) que en las otras porciones del intestino (< 5 U/mg proteína) (figura 50).

Maltasa: no se observó efecto de la hora de lactancia ($p > 0,05$). Pero si hubo interacción significativa entre el tratamiento y el lugar del intestino estudiado ($p = 0,0059$). Por lo tanto, los efectos de tratamiento fueron estudiados en cada lugar.

En el duodeno y yeyuno proximal los niveles de maltasa del grupo FOS3* fueron inferiores al resto de los tratamientos ($P < 0,05$), mientras que los otros tratamientos no presentaron diferencias entre sí ($p > 0,05$).

En las porciones yeyuno medio y yeyuno distal-íleon los niveles de maltasa de OTC3* fueron superior al resto de los tratamientos ($p < 0,05$). Los grupos Control* y FOS1* no presentaron diferencias entre si ($p > 0,05$) y nuevamente la actividad de la maltasa en FOS3* fue muy inferior ($p < 0,05$) (figura 51).

El nivel de maltasa fue significativamente mayor en el duodeno ($p < 0,05$) (figura 52).

Tabla 9. Efecto de la FOS y la OTC sobre la actividad de las disacaridasas (U/mg de proteína) en distintas porciones intestinales de lechones lactantes**

Enzima	24 h											
	12 h						24 h					
	Lechones Control*	Lechones FOS1*	Lechones FOS3*	Lechones OTC3*	Lechones Control*	Lechones FOS1*	Lechones FOS3*	Lechones OTC3*	Lechones Control*	Lechones FOS1*	Lechones FOS3*	Lechones OTC3*
LACTASA												
Duodeno	2190,5 ± 287,9	1289,7 ± 491,3	1858,2 ± 420,5	1130,1 ± 229,3	1454,1 ± 412,3	1020,4 ± 462,9	1841,3 ± 27,2	1063,7 ± 107,1				
Yeyuno proximal	243,2 ± 23,5	232,9 ± 15,7	413,3 ± 1,92	357,7 ± 63,2	194,3 ± 36,7	221,1 ± 24,3	476,8 ± 116,1	362,6 ± 16,3				
Yeyuno medio	178,9 ± 28,6	190,4 ± 46,5	341,9 ± 11,8	285,9 ± 27,3	163,3 ± 19,1	148,0 ± 16,0	313,2 ± 22,9	281,2 ± 30,1				
Yeyuno distal-ileon	253,5 ± 89,4	388,2 ± 193,3	218,5 ± 53,7	304,5 ± 10,4	115,4 ± 30,2	141,5 ± 26,9	232,3 ± 2,7	266,6 ± 13,6				
SACARASA												
Duodeno	20,1 ± 5,5	6,1 ± 3,1	2,4 ± 4,4	0,5 ± 0,3	25,0 ± 8,9	21,4 ± 18,3	4,0 ± 1,3	2,1 ± 1,1				
Yeyuno proximal	5,9 ± 1,3	2,7 ± 0,8	0,8 ± 0,4	1,9 ± 0,8	1,9 ± 0,6	5,9 ± 3,1	0,9 ± 0,3	1,4 ± 0,3				
Yeyuno medio	4,2 ± 1,5	7,0 ± 4,7	0,8 ± 0,8	1,3 ± 0,7	2,0 ± 0,4	1,4 ± 0,2	2,3 ± 0,2	0,8 ± 0,3				
Yeyuno distal-ileon	5,5 ± 1,5	16,7 ± 11,9	0,7 ± 1,1	1,4 ± 0,5	1,4 ± 0,1	1,6 ± 0,5	0,2 ± 0,1	0,6 ± 0,1				
MALTASA												
Duodeno	693,9 ± 270,01	426,1 ± 164,7	46,2 ± 5,4	622,6 ± 123,1	687,4 ± 259,0	677,0 ± 218,8	60,1 ± 37,0	351,8 ± 103,2				
Yeyuno proximal	235,6 ± 80,7	200,6 ± 43,2	54,3 ± 4,0	256,8 ± 30,7	206,2 ± 65,4	310,2 ± 59,3	43,6 ± 8,7	278,9 ± 51,9				
Yeyuno medio	167,9 ± 34,5	206,2 ± 77,6	67,2 ± 9,4	322,7 ± 52,1	196,8 ± 36,0	173,5 ± 32,6	51,4 ± 13,8	349,4 ± 102,4				
Yeyuno distal-ileon	176,5 ± 42,5	229,5 ± 140,2	84,7 ± 10,8	242,0 ± 19,5	167,6 ± 34,5	153,0 ± 27,2	70,6 ± 4,4	357,1 ± 57,4				

** Se presentan los valores promedio (± EEM).

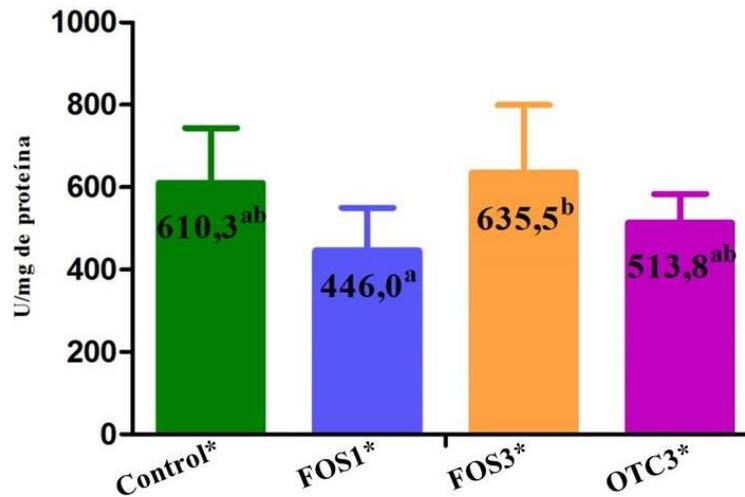


Figura 46. Efecto de tratamiento sobre la actividad de la lactasa (U/mg de proteína) en el duodeno de lechones lactantes. Se muestra el promedio (\pm EEM). Diferentes letras indican diferencias significativas ($p < 0,05$).

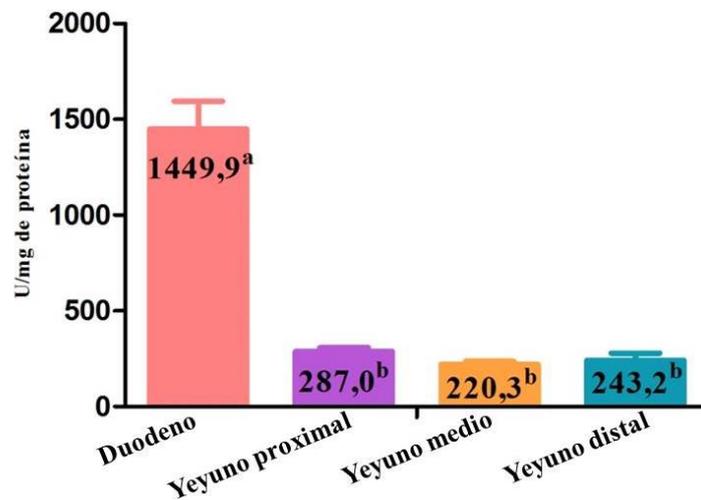


Figura 47. Efecto lugar sobre la actividad de la lactasa (U/mg de proteína) en lechones lactantes. Se muestra el promedio (\pm EEM). Diferentes letras indican diferencias significativas ($p < 0,05$).

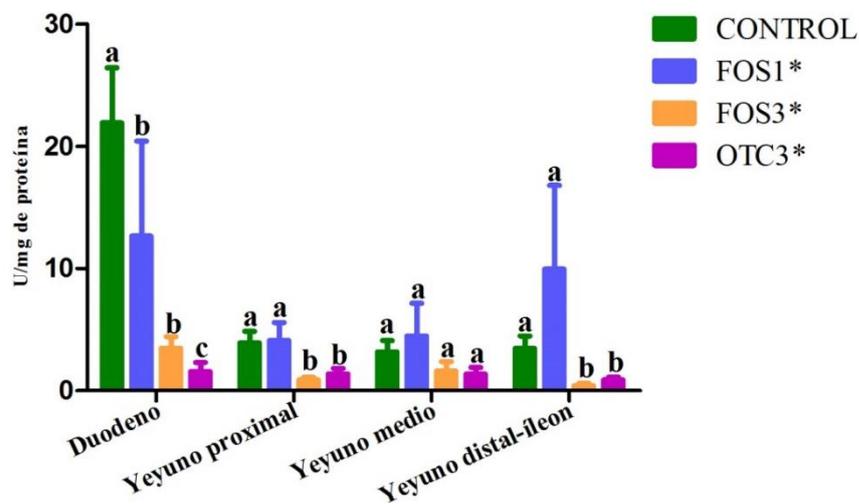


Figura 48. Efecto tratamiento y lugar de muestreo sobre la actividad de la sacarasa (U/mg de proteína) en lechones lactantes. Se muestra el promedio (\pm EEM). Diferentes letras entre las mismas porciones intestinales indican diferencias significativas ($p < 0,05$).

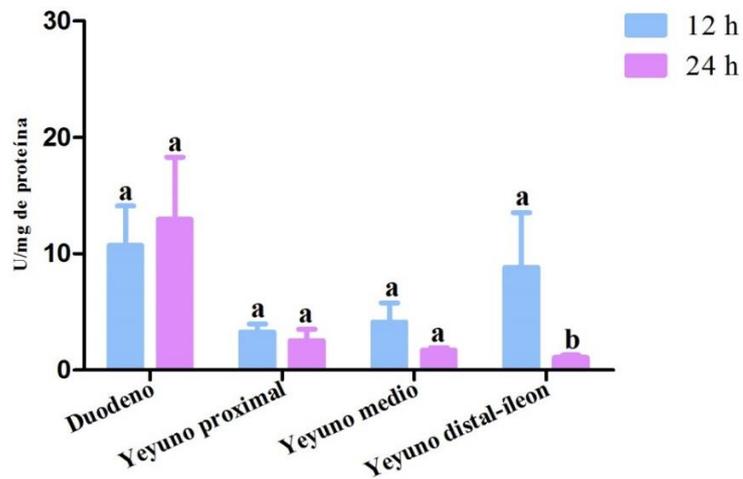


Figura 49. Efecto horas de lactancia y lugar de muestreo sobre la actividad de la sacarasa (U/mg de proteína) en lechones lactantes. Se muestra el promedio (\pm EEM). Diferentes letras entre las mismas porciones intestinales indican diferencias significativas ($p < 0,05$).

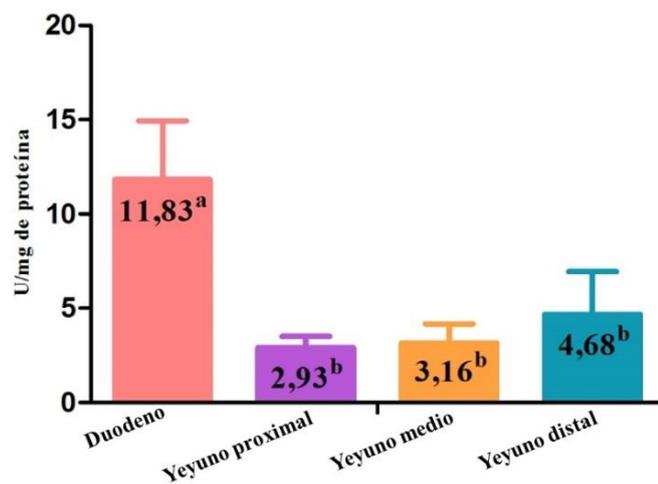


Figura 50. Efecto del lugar de muestreo sobre de la actividad de la sacarasa (U/mg de proteína) en lechones lactantes. Se muestra el promedio (\pm EEM). Diferentes letras indican diferencias significativas ($p < 0,05$).

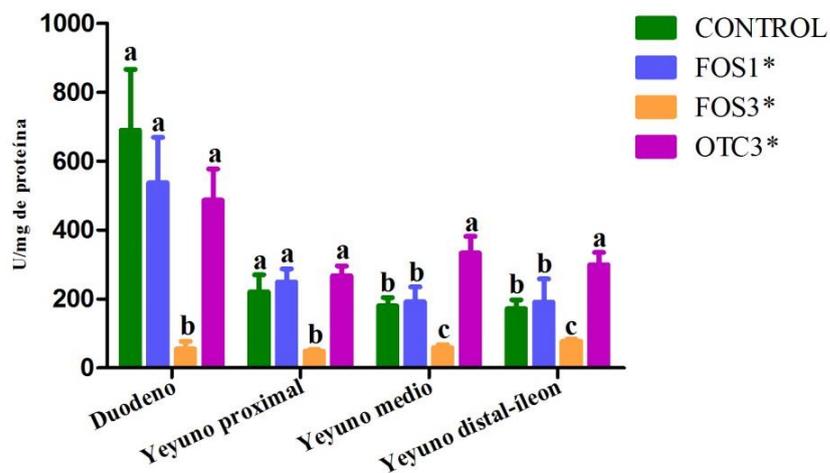


Figura 51. Efecto tratamiento y lugar sobre la actividad de la maltasa (U/mg de proteína) en lechones lactantes. Se muestra el promedio (\pm EEM). Diferentes letras entre las mismas porciones intestinales indican diferencias significativas ($p < 0,05$).

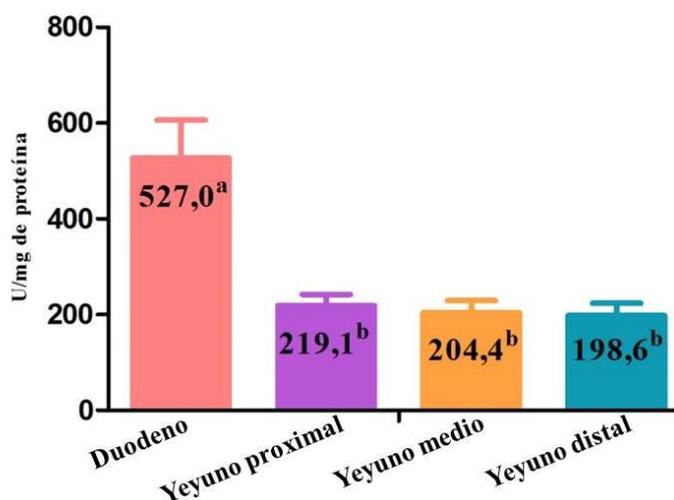


Figura 52. Efecto del lugar de muestreo sobre la actividad de la maltasa (U/mg de proteína) en lechones lactantes. Se muestra el promedio (\pm EEM). Diferentes letras indican diferencias significativas ($p < 0,05$).

5. DISCUSIÓN

En el presente estudio, las concentraciones de FOS y OTC administradas con calostro no afectaron el recuento de enterobacterias y bacterias ácido-lácticas a las 12 y 24 horas de lactancia. Si se observó un incremento en las UFC de las bifidobacterias en los lechones tratados con FOS3* sobre los lechones OTC3*. Los resultados obtenidos corresponden a una colonización normal de la microbiota y esto es muy importante ya que cualquier alteración en el desarrollo cronológico de la implantación de la microbiota repercutirá en el futuro productivo del animal (Bauer *et al.*, 2006; Round y Mazmanian, 2009; Buffie *et al.*, 2012).

Para la relación E/BAL todos los valores promedios obtenidos fueron cercanos a uno. Debido a que no se encontraron diferencias estadísticamente significativas entre los lechones controles y tratados con FOS u OTC, podemos suponer que dichos antibióticos ingeridos con el calostro no interfieren con el crecimiento normal de estas bacterias. Los valores para ambos grupos bacterianos en el contenido cecal de los lechones al nacimiento fueron similares a los obtenidos por Heim *et al.* (2015). Estos resultados difirieron de los hallados por Martínez (2017), quien demostró una menor relación E/BAL debido a una disminución en las enterobacterias en ciego y colon de lechones de destete tratados con FOS. Esto podría deberse a que en el trabajo mencionado las dosis de FOS administradas a los animales fueron mayores a las empleadas en esta investigación.

La ausencia de diarrea en este trabajo es un hecho indicativo de que los animales mantuvieron una microbiología equilibrada. Es sabido que el manejo inadecuado de determinadas moléculas antibióticas y el estrés de los lechones lactantes afectan el equilibrio normal de la microbiota intestinal, manifestándose con diarrea e incluso la muerte de los animales durante la lactancia (Corpet, 2000).

Los resultados obtenidos en la microbiología se relacionan con los valores de pH recolectados, en donde tampoco se hallaron diferencias significativas entre los tratamientos.

El pH registrado en el estómago se mantuvo entre los parámetros normales. El valor más bajo obtenido fue de $4,62 \pm 0,21$, indicativo de una baja producción de ácidos. Estos valores de pH favorecen la estabilidad de los antibióticos FOS y OTC y su posterior llegada al intestino delgado sin sufrir cambios. Además, este pasaje se ve beneficiado por la ingestión de calostro y leche de cerda que poseen un poder tampón importante protegiendo a dichas moléculas (Manners, 1976).

En el presente estudio no se observaron diferencias significativas en la producción de ácido acético a nivel cecal en las diferentes horas de lactancia para los diferentes tratamientos. Es conocido que en el lechón lactante la producción de AGVs es relativamente baja en las primeras horas de vida ya que es en ese periodo cuando comienza a establecerse la flora bacteriana en el intestino del neonato.

En este estudio, se determinó el recuento de células caliciformes en vellosidades y criptas intestinales a través de la evaluación histológica de la mucosa intestinal. El recuento de estas células fue superior en las criptas a nivel del íleon de los lechones de los grupos Control* y FOS1*. Estos resultados coinciden con los estudios realizados por nuestro grupo de investigación, donde también se observó un aumento en el número de células caliciformes en las criptas a nivel del íleon ($p= 0,0159$) de lechones destetados tratados con FOS (Martínez, 2017). El recuento de las células caliciformes es considerado importante por muchos autores porque es un índice de la capacidad secretora y la producción del moco protector intestinal (Piel *et al.*, 2005).

En las secciones histológicas estudiadas, la medición del largo y ancho de las vellosidades y la profundidad y ancho de las criptas fue mayor para los grupos Control* y FOS1* comparado con los grupos FOS3* y OTC3*. A pesar de que se observaron efectos significativos sobre largo y ancho de las vellosidades y ancho de las criptas, cuando se realizó la estimación matemática de la superficie de absorción intestinal, este efecto desapareció o no se hace evidente al menos de manera significativa. No obstante, existe una tendencia que muestra una mayor área de absorción a las 12 h de lactancia para los lechones controles y tratados. Esto

se relaciona con el desarrollo morfo-fisiológico normal del intestino de los lechones lactantes mencionado anteriormente, que implica, en las primeras horas de vida, el desarrollo de la mucosa intestinal responsable de la absorción de las inmunoglobulinas y de los diferentes componentes que son indispensables para la supervivencia del neonato.

Los resultados de lactasa obtenidos en este estudio estuvieron dentro de los parámetros normales y son concordantes con la bibliografía internacional (Manners y Stevens, 1972; Zhang *et al.*, 1997; Adeola y King, 2006). La mayor actividad enzimática se observó en el duodeno. Al nacimiento el lechón tiene una actividad extraordinariamente importante de esta enzima, especialmente en las primeras porciones del intestino delgado, con el objetivo de poder hidrolizar las elevadas concentraciones de lactosa presente en el calostro y la leche de la cerda (Manners y Stevens, 1972; Zhang *et al.*, 1997; Adeola y King, 2006).

Los resultados obtenidos para sacarasa y maltasa no fueron concluyentes. Se observó una mayor actividad de sacarasa en el grupo Control* a nivel de duodeno, y junto con el grupo FOS1* a nivel yeyuno proximal y yeyuno distal-íleon. Por otro lado, en el caso de la maltasa, la actividad fue superior para los grupos Control*, FOS1* y OTC3* en las porciones duodeno y yeyuno proximal. Mientras que, en el yeyuno medio y yeyuno distal-íleon, el grupo OTC3* tuvo el mayor efecto.

Esta variabilidad de los resultados puede adjudicarse a la categoría de animales empleada más que a un efecto de tratamiento. Es sabido que la actividad de la maltasa y la sacarasa depende del grado de maduración de la mucosa intestinal de cada animal en particular y comienza a producirse en forma progresiva asociada con los cambios en la dieta. De tal manera que la actividad de ambas enzimas es baja durante la lactancia y adquiere mayor importancia en la etapa de recría cuando los cerdos reciben alimento sólido (Manners y Stevens, 1972; Zhang *et al.*, 1997).

Si bien consideramos que la realización de una cinética plasmática hubiese sido relevante para la interpretación de los resultados, en este trabajo no se realizó la recolección seriada de muestras de sangre a fin de no alterar los parámetros fisiológicos en los recién nacidos. A pesar de que ambas moléculas antibióticas presentan una baja disponibilidad oral (FOS: 20% y OTC: 3-5%) (Ericsson *et al.*, 1982; Segre *et al.*, 1987; Patel *et al.*, 1997), es probable que gran parte de la FOS haya sido absorbida dada la mayor permeabilidad que experimenta el intestino del lactante durante las primeras horas de vida.

Por otro lado es de suponer que la OTC haya tenido una menor absorción debido a su quelación con el catión Ca^{++} presente en el fluido mamario que provoca alteración de la estructura química de antibiótico (Caswell y Hutchison, 1971).

Se ha documentado que las tetraciclinas administradas por vía oral pueden originar una irritación directa sobre la mucosa digestiva, siendo estos efectos consecuencia de la acción directa de los quelatos formados con iones metálicos di y trivalentes sobre la mucosa gástrica e intestinal (Lieber y Lefèvre, 1959). Si bien esta acción no se observó en el estudio de los cortes histológicos, la formación de complejos podría disminuir la actividad sobre las bacterias.

Por otra parte, el efecto microbiota-mucosa, se relaciona con la gran variabilidad de la microflora proveniente de sus madres y que va a formar parte del intestino del lechón. Es posible que los neonatos, de la flora comenzal de la madre, hayan adquirido resistencia a los antibióticos que a su vez difieren en cada individuo en particular, en cuanto a manejo, ambiente, tipo de flora bacteriana, exposición previa y tolerancia a otros antibióticos, etc. Si bien las cerdas madres para este estudio fueron seleccionadas teniendo en consideración la paridad (segundo parto) y que no habían recibido tratamiento antibiótico previo al ensayo, en su historial en la granja comercial podrían haber recibido antibióticos para diversos tratamientos, haciendo que esas bacterias resistentes lleguen a su camada (Lewis, 2012). Es por ello que debería considerarse que concentraciones residuales pueden favorecer la adquisición y transferencia de resistencia.

La transferencia horizontal de genes aparece como la causa principal de la aparición rápida de genes resistentes a los antibióticos (Gyles *et al.*, 1978; Christie y Dunny, 1984; Gonzalez y Blanco, 1986; Bischoff *et al.*, 2005; Hansen *et al.*, 2005), siendo el tracto gastrointestinal del animal un importante reservorio de bacterias para este intercambio de información genética (Nikolich *et al.*, 1994; Blake *et al.*, 2003; Hoa *et al.*, 2011). Estudios de nuestro grupo de investigación (de la Torre *et al.*, 2014; de la Torre *et al.*, 2015) han demostrado que los animales y el medio ambiente de las granjas porcinas pueden actuar como depósitos para la propagación potencial de bacterias resistentes. Esto puede ocurrir por intermedio de elementos genéticos móviles como los integrones que participan en la resistencia a los antibióticos. En dichos estudios se detectó la presencia de integrones de resistencia para seis antibióticos en cepas comensales de *Escherichia coli* de lechones de menos de 12 horas de vida.

CAPÍTULO III

CONCLUSIONES GENERALES

- La administración de FOS y OTC a las cerdas durante el peri-parto según un plan posológico mono (FOS1) y multidosis (FOS3 y OTC3) no afectó la producción de calostro de las hembras.
- Se demostró que la eliminación calostrál-láctea de FOS y OTC luego de su administración en cerdas gestantes durante el peri-parto según un plan posológico monodosis (FOS1 y OTCLA) y multidosis (FOS3 y OTC3) difiere según el tipo de antibiótico utilizado y la cantidad de dosis administradas.
- Los cambios hormonales que explican el pasaje de la fase calostrál a la fase láctea impactan en la eliminación de FOS en calostro y leche, mientras que para el caso de la OTC ésta influencia no sería tan importante.
- Las concentraciones de FOS halladas en calostro y leche de cerdas tratadas con una y tres dosis del antibiótico excedieron a la CIM₉₀ durante más de 8 h para *Escherichia coli* y *Streptococcus sp.*, ambas bacterias implicadas en afecciones reproductivas como metritis y/o mastitis. Mientras que para el caso de la OTC las concentraciones cuantificadas en calostro y leche no alcanzaron la CIM₉₀ para las bacterias mencionadas anteriormente.
- Las concentraciones ingeridas de FOS y OTC en calostro por los lechones luego de la administración de FOS y OTC a las cerdas durante el peri-parto, no afectaron el consumo de calostro y los parámetros zootécnicos como score de vitalidad al nacimiento, número de lechones NT, NV, muertos durante la lactancia y peso en diferentes momentos de la lactancia.
- La dosificación oral de FOS y OTC con el calostro a lechones neonatos durante 12 y 24 h de lactancia no presentó efecto sobre el recuento de UFC de enterobacterias y bacterias ácido-lácticas en yeyuno-íleon, ciego y colon, sobre la superficie de absorción intestinal en yeyuno medio e íleon, sobre la producción de ácido acético en el ciego y sobre el pH de todas las porciones intestinales estudiadas.
- No se encontraron diferencias importantes para la producción de enzimas intestinales a excepción de la maltasa.
- Se debe tener en consideración que las concentraciones de antibióticos eliminadas por calostro y leche pueden inducir el desarrollo de resistencia bacteriana.

- Los resultados obtenidos en esta Tesis son innovadores y relevantes para la producción porcina. Hasta la fecha, no se disponía de información científica sobre el efecto de la exposición del tracto gastrointestinal y la microbiología de los lechones neonatos a los residuos de antibióticos eliminados en el calostro por la cerda. Este trabajo abre las puertas a futuros estudios y estimula la concientización sobre el uso adecuado de los antimicrobianos en la sala de partos.

PUBLICACIONES Y COMUNICACIONES SURGIDAS DE ESTA TESIS

1. PUBLICACIONES EN REVISTAS

2017 Fernández Paggi, M. B.; Martínez, G.; Diéguez, S. N.; Pérez Gaudio, D. S.; Decundo, J. M.; Riccio, M. B.; Amanto, F. A.; Tapia, M. O.; Soraci, A. L.

Fosfomicin residues in colostrum: impact on morpho-physiology and microbiology of suckling piglets. *Journal of Veterinary Pharmacology and Therapeutics*.

DOI: 10.1111/jvp.12480.

2015 Fernández Paggi, M. B.; Martínez, G.; Pérez Gaudio, D. S.; Diéguez, S.; Riccio, M. B.; Denzoin-Vulcano, L.; Amanto, F.; Tapia, M. O. y Soraci, A. L.

Fosfomicin residues in colostrum: Impact on morpho-physiology of suckling piglets. *Journal of Veterinary Pharmacology and Therapeutics*. Paper ISSN 0140-7783, online ISSN 1365-2885. Special Issue: Abstracts of the 13th International Congress of the European Association for Veterinary Pharmacology and Toxicology (EAVPT 2015), 19-22 July, Nantes, France. 38, Issue Supplement S1, pp 91-92.

2012 Fernández Paggi, M.B.; Soraci, A.L.; Tapia, M.O. y Amanto, F.A.

Estudio de la distribución del antibiótico fosfomicina en calostro-leche de cerdas.

Analecta Veterinaria 2012; 32 (1): 5-10. Impresa ISSN 0365514-8 Electrónica ISSN 1514-2590.

2. PUBLICACIONES EN CONGRESOS

2016 Fernández Paggi, M. B.; Martínez, G.; Decundo, J. M.; Pérez Gaudio, D. S.; Riccio, M. B.; Diéguez, S.; Tapia, M. O.; Amanto, F. A. y Soraci, A. L.

Excreción calostrál-láctea de Fosfomicina Sódica y Oxitetraciclina en cerda. XIIIº Congreso Nacional de Producción Porcina, XIXº Jornadas de Actualización Porcina, VIIIº Congreso de Producción Porcina del Mercosur, Encuentros más Productores, más Producción. Resistencia, 9 al 12 de agosto de 2016. Memorias del XII Congreso Nacional de Producción Porcina.

- 2015 Fernández Paggi, M. B.; Martínez, G.; Pérez, D. S.; Diéguez, S.; Riccio, M. B.; Denzoin-Vulcano, L.; Amanto, F. A.; Tapia, M. O. y Soraci, A. L.
Fosfomicin residues in colostrum: Impact on morpho-physiology of suckling piglets.
AEVPT 13th International Congress of the European Association for Veterinary Pharmacology and Toxicology. Nantes, 19 al 22 de Julio 2015, Francia.
- 2014 Fernández Paggi, M. B.; Martínez, G.; Pérez, D. S.; Riccio, M. B.; Tapia, M. O.; Rodriguez, E.; Amanto, F. A. y Soraci, A. L.
Efecto del uso de fosfomicina en cerdas sobre la salud intestinal del lechón lactante.
XII Congreso Nacional de Producción Porcina, XVIII Jornadas de Actualización Porcina y VII Congreso de Producción Porcina del Mercosur. Mar del Plata, 12 al 15 de agosto de 2014. Memorias del XII Congreso Nacional de Producción Porcina, p. 181.
- 2012 Martínez, G.; Fernández Paggi, M. B.; Pérez, D. S.; Amanto, F. A.; Soraci, A. L. y Tapia, M. O.
Perfil de la actividad enzimática de disacarasas en lechones recién nacidos.
XI Congreso Nacional de Producción Porcina (XI CNPP), XVII Jornadas de Actualización Porcina (XVII JAP) y VI Congreso de Producción Porcina del Mercosur (VI CPPM). Salta, 14 al 17 de agosto de 2012. Memorias del XI CNPP, XVII JAP y VI CPPM, p. 219.
- 2011 Fernández Paggi, M. B.; Soraci, A. L.; Tapia, M. O. y Amanto F.A.
Estudio de la distribución del antibiótico fosfomicina en calostro de cerdas.
XVII Congreso Argentino de Toxicología. 29 de Septiembre al 1° de octubre de 2011. Tandil, Buenos Aires, Argentina. Acta Toxicol. Argent. (2011) 19 (Suplem): 30-116, p. 52-53.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Adeola, O., y King, D. E. (2006). Developmental changes in morphometry of the small intestine and jejunal sucrase activity during the first nine weeks of postnatal growth in pigs. *Journal of Animal Science*, 84(1), 112–118.
- Aguinaga, M. A., Gomez-Carballar, F., Nieto, R., y Aguilera, J. F. (2011). Production and composition of Iberian sow's milk and use of milk nutrients by the suckling Iberian piglet. *Animal*, 5(9), 1390–1397.
- Alonso-Spilsbury, M., Ramirez-Necoechea, R., Gonzalez-Lozano, M., Mota-Rojas, D., y Trujillo-Ortega, M. (2007). Piglet survival in early lactation: a review. *Journal of Animal and Veterinary Advances*, 6(1), 76–86.
- Alonso Dupuy, M. (2016). *Farmacocinética de oxitetraciclina en dosificación oral múltiple en cerdos. Análisis PK-PD*. (Tesis Doctoral). Universidad Complutense de Madrid, Facultad de Veterinaria, España.
- Andersen, I. L., Nævdal, E., y Bøe, K. E. (2011). Maternal investment, sibling competition, and offspring survival with increasing litter size and parity in pigs (*Sus scrofa*). *Behavioral Ecology and Sociobiology*, 65(6), 1159–1167.
- Apgar, G. A., Kornegay, E. T., Lindemann, M. D., y Wood, C. M. (1993). The effect of feeding various levels of *Bifidobacterium globosum* A on the performance, gastrointestinal measurements, and immunity of weanling pigs and on the performance and carcass measurements of growing-finishing pigs. *Journal of Animal Science*, 71(8), 2173–2179.
- Aramayona, J. J., Bregante, M. A., Solans, C., Rueda, S., Fraile, L. J., y Garcia, M. A. (1997). Pharmacokinetics of fosfomicin in chickens after a single intravenous dose and tissue levels following chronic oral administration. *Veterinary Research*, 28(6), 581–588.
- Arias-Andrés, M., Mena, F., y Pinnock, M. (2014). Ecotoxicological evaluation of aquaculture and agriculture sediments with biochemical biomarkers and bioassays: antimicrobial potential exposure. *Journal of Environmental Biology*, 35(1), 107.
- Aronson, A. L. (1980). Pharmacotherapeutics of the newer tetracyclines. *Journal of the American Veterinary Medical Association*, 176(10 Spec No), 1061–1068.
- Ashida, H., Ogawa, M., Kim, M., Mimuro, H., y Sasakawa, C. (2012). Bacteria and host interactions in the gut epithelial barrier. *Nature Chemical Biology*, 8(1), 36–45.
- Aubry, A., Quiniou, N., Le Cozler, Y., y Querne, M. (2004). Modelisation de la croissance et de la consommation d'aliment des porcs de la naissance a l'abattage: actualisation des coefficients appliques aux criteres standardises de performances en Gestion Technico-

- Economique. *Journées de La Recherche Porcine En France*, 36, 409.
- Awad, W. A., Ghareeb, K., Paßlack, N., y Zentek, J. (2013). Dietary inulin alters the intestinal absorptive and barrier function of piglet intestine after weaning. *Research in Veterinary Science*, 95(1), 249–254.
- Bailey, M., Haverson, K., Inman, C., Harris, C., Jones, P., Corfield, G., Miller, B., y Stokes, C. (2005). The influence of environment on development of the mucosal immune system. *Veterinary Immunology and Immunopathology*, 108(1), 189–198.
- Barcenilla, A., Pryde, S. E., Martin, J. C., Duncan, S. H., Stewart, C. S., Henderson, C., y Flint, H. J. (2000). Phylogenetic relationships of butyrate-producing bacteria from the human gut. *Applied and Environmental Microbiology*, 66(4), 1654–1661.
- Barón, D., y Drugeon, H. (1985). Fosfomicine. *Sem Hop Paris*, 61, 2341–2349.
- Bauer, E., Williams, B. A., Smidt, H., Verstegen, M. W. A., y Mosenthin, R. (2006). Influence of the gastrointestinal microbiota on development of the immune system in young animals. *Current Issues in Intestinal Microbiology*, 7(2), 35–52.
- Baxter, E. M., Jarvis, S., D'Eath, R. B., Ross, D. W., Robson, S. K., Farish, M., Nevison, I. M., Lawrence, A. B., y Edwards, S. A. (2008). Investigating the behavioural and physiological indicators of neonatal survival in pigs. *Theriogenology*, 69(6), 773–783.
- Baxter, E. M., Rutherford, K. M. D., D'Eath, R. B., Arnott, G., Turner, S. P., Sandøe, P., Moustsen, V. A., Thorup, F., Edwards, S. A., y Lawrence, A. B. (2013). The welfare implications of large litter size in the domestic pig II: Management factors. *Animal Welfare*, 22(2), 219–238.
- Baxter, P., y McKellar, Q. (1995). Plasma and lung concentrations of oxytetracycline after its intramuscular administration in rats. *Journal of the American Association for Laboratory Animal Science*, 45(1), 107–9.
- Beaulieu, A. D., Aalhus, J. L., Williams, N. H., y Patience, J. F. (2010). Impact of piglet birth weight, birth order, and litter size on subsequent growth performance, carcass quality, muscle composition, and eating quality of pork. *Journal of Animal Science*, 88(8), 2767–2778.
- Becattini, S., Taur, Y., y Pamer, E. G. (2016). Antibiotic-Induced Changes in the Intestinal Microbiota and Disease. *Trends in Molecular Medicine*, 22(6), 458–478.
- Bentley, O. E. (1983). Comparative efficacy of neomycin and oxytetracycline alone and in combination against concurrent salmonellosis and pasteurellosis in swine [*Salmonella choleraesuis* and *Pasteurella multocida*]. *VM SAC. Veterinary Medicine and Small Animal Clinician*.

- Bergsma, R., Kanis, E., Verstegen, M. W. A., y Knol, E. F. (2008). Genetic parameters and predicted selection results for maternal traits related to lactation efficiency in sows. *Journal of Animal Science*, 86(5), 1067–1080.
- Berruga, M. I., Molina, A., Althaus, R. L., y Molina, M. P. (2016). Control and prevention of antibiotic residues and contaminants in sheep and goat's milk. *Small Ruminant Research*, 142, 38–43.
- Biancone, L., Monteleone, I., Del Vecchio Blanco, G., Vavassori, P., y Pallone, F. (2002). Resident bacterial flora and immune system. *Digestive and Liver Disease*, 34, S37–S43.
- Biavati, B., y Mattarelli, P. (2012). *Bifidobacterium*. In Whitman, W. B. (Ed.). *Bergey's Manual of Systematics of Archaea and Bacteria*, pp. 1–57. B. T. John Wiley & Sons, Inc., in association with Bergey's Manual Trust.
- Bischoff, K. M., White, D. G., Hume, M. E., Poole, T. L., y Nisbet, D. J. (2005). The chloramphenicol resistance gene *cmlA* is disseminated on transferable plasmids that confer multiple-drug resistance in swine *Escherichia coli*. *FEMS Microbiology Letters*, 243(1), 285–291.
- Blake, D. P., Hillman, K., Fenlon, D. R., y Low, J. C. (2003). Transfer of antibiotic resistance between commensal and pathogenic members of the Enterobacteriaceae under ileal conditions. *Journal of Applied Microbiology*, 95(3), 428–436.
- Blobel, H., y Burch, C. W. (1960). Oxytetracycline concentrations in blood serums and milk secretions of cows following intravenous or intramammary treatment. *Journal of the American Veterinary Medical Association*, 137(12), 701–704.
- Blomberg, L., Gustafsson, L., Cohen, P. S., Conway, P. L., y Blomberg, A. (1995). Growth of *Escherichia coli* K88 in piglet ileal mucus: protein expression as an indicator of type of metabolism. *Journal of Bacteriology*, 177(23), 6695–6703.
- Bradford, M. M. (1976). A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical Biochemistry*, 72(1–2), 248–254.
- Brown, I., Warhurst, M., Arcot, J., Playne, M., Illman, R. J., y Topping, D. L. (1997). Fecal numbers of bifidobacteria are higher in pigs fed *Bifidobacterium longum* with a high amylose cornstarch than with a low amylose cornstarch. *The Journal of Nutrition*, 127(9), 1822–1827.
- Buffie, C. G., Jarchum, I., Equinda, M., Lipuma, L., Gobourne, A., Viale, A., Ubeda, C., Xavier, J., y Pamer, E. G. (2012). Profound Alterations of Intestinal Microbiota following a Single Dose of Clindamycin Results in Sustained Susceptibility to *Clostridium difficile* -Induced

- Colitis. *Infection and Immunity*, 62–73.
- Burch, D. G. S. (2012). Examination of the pharmacokinetic/pharmacodynamic (PK/PD) relationships of orally administered antimicrobials and their correlation with the therapy of various bacterial and mycoplasmal infections in pigs.
- Busellini, L. (2016). Informes de cadenas de valor: Cárnica-Porcina. *Informes de Cadenas de Valor. Ministerio de Hacienda y Finanzas Publicas*, 9(1), 1–35.
- Calvo, J., y Martínez-Martínez, L. (2009). Mecanismos de acción de los antimicrobianos. *Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica*, 27(1), 44–52.
- Campos, P., Silva, B. A. N., Donzele, J. L., Oliveira, R. F. M., y Knol, E. F. (2012). Effects of sow nutrition during gestation on within-litter birth weight variation: a review. *Animal*, 6(5), 797–806.
- Carro, M. D., y Ranilla, M. J. (2002). Los aditivos antibióticos promotores del crecimiento de los animales: situación actual y posibles alternativas. *Exopol. Circular*, 90(7).
- Castillo, M., Martín-Orúe, S. M., Anguita, M., Pérez, J. F., y Gasa, J. (2007). Adaptation of gut microbiota to corn physical structure and different types of dietary fibre. *Livestock Science*, 109(1), 149–152.
- Caswell, A. H., y Hutchison, J. D. (1971). Selectivity of cation chelation to tetracyclines: evidence for special conformation of calcium chelate. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 43(3), 625–630.
- Chen, K., Gao, J., Li, J., Huang, Y., Luo, X., y Zhang, T. (2012). Effects of probiotics and antibiotics on diversity and structure of intestinal microflora in broiler chickens. *African Journal of Microbiology Research*, 6(37), 6612–6617.
- Christie, P. J., y Dunny, G. M. (1984). Antibiotic selection pressure resulting in multiple antibiotic resistance and localization of resistance determinants to conjugative plasmids in streptococci. *Journal of Infectious Diseases*, 149(1), 74–82.
- Cinquina, A. L., Longo, F., Anastasi, G., Giannetti, L., y Cozzani, R. (2003). Validation of a high-performance liquid chromatography method for the determination of oxytetracycline, tetracycline, chlortetracycline and doxycycline in bovine milk and muscle. *Journal of Chromatography A*, 987(1–2), 227–233.
- Connamacher, R. H., y Mandel, H. G. (1965). Binding of tetracycline to the 30S ribosomes and to polyuridylic acid. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 20(1), 98–103.
- Corpet, D. E. (2000). Mécanismes de la promotion de croissance des animaux par les additifs alimentaires antibiotiques. *Revue de Médecine Vétérinaire*, 151(2), 99–104.

- Cox, L. M., y Blaser, M. J. (2015). Antibiotics in early life and obesity. *Nature Reviews Endocrinology*, *11*(3), 182–190.
- Cox, L. M., Yamanishi, S., Sohn, J., Alekseyenko, A. V, Leung, J. M., Cho, I., Kim, S. G., Li, H., Gao, Z., y Mahana, D. (2014). Altering the intestinal microbiota during a critical developmental window has lasting metabolic consequences. *Cell*, *158*(4), 705–721.
- Cranwell, P. D. (1995). Development of the neonatal gut and enzyme systems. *The Neonatal Pig: Development and Survival*, *1*, 99–112.
- Cregan, M. D., y Hartmann, P. E. (1999). Computerized breast measurement from conception to weaning: clinical implications. *Journal of Human Lactation*, *15*(2), 89–96.
- D’Inca, R., Che, L., Thymann, T., Sangild, P. T., y Le Huërou-Luron, I. (2010). Intrauterine growth restriction reduces intestinal structure and modifies the response to colostrum in preterm and term piglets. *Livestock Science*, *133*(1–3), 20–22.
- Dahlqvist, A. (1964). Method for Assay of Intestinal Disaccharidases. *Analytical Biochemistry*, *25*, 18–25.
- Damase-Michel, C., Rolland, M., Assouline, C., Tricoire, J., y Lacroix, I. (2004). Médicaments et allaitement maternel. *EMC-Médecine*, *1*(5), 417–432.
- Davey, L. A., Ferber, M. T., y Kaye, B. (1985). Comparison of the serum pharmacokinetics of a long acting and a conventional oxytetracycline injection. *The Veterinary Record*, *117*(17), 426–429.
- de la Torre, E., Colello, R., Fernández, D., Etcheverría, A., Di Conza, J., Gutkind, G. O., Tapia, M. O., Dieguez, S. N., Soraci, A. L., y Padola, N. L. (2015). Multidrug resistance in *Escherichia coli* carrying integrons isolated from a pig farm with moderate antibiotic use. *The Journal of General and Applied Microbiology*, *61*(6), 270–273.
- de la Torre, E., Colello, R., Padola, N. L., Etcheverría, A., Rodríguez, E., Amanto, F., Tapia, M. O., y Soraci, A. L. (2014). Detection of Integrase Gene in *E. coli* Isolated from Pigs at Different Stages of Production System. *International Journal of Microbiology*, *2014*, ID 489569, 7 pages.
- De Passille, A. M. B., y Rushen, J. (1989). Suckling and teat disputes by neonatal piglets. *Applied Animal Behaviour Science*, *22*(1), 23–38.
- De Vos, M., Che, L., Huygelen, V., Willems, S., Michiels, J., Van Cruchten, S., y Van Ginneken, C. (2014). Nutritional interventions to prevent and rear low-birthweight piglets. *Journal of Animal Physiology and Animal Nutrition*, *98*(4), 609–619.
- del Castillo, J. R. (2013). Tetracyclines. In S. Giguère, J. F. Prescott, y P. M. Dowling (Eds.) *John Wiley*, pp. 5, 257–268. Antimicrobial therapy in veterinary medicine.

- Delouis, C., Houdebine, L. M., y Richard, P. (2001). La lactation. In Thibault, C., y Levasseur, M. C. (Eds.). *La reproduction chez les mammifères et l'homme*, INRA Editions, pp. 580–610. Ellipses, Paris.
- Devillers, N., Farmer, C., Le Dividich, J., y Prunier, A. (2007). Variability of colostrum yield and colostrum intake in pigs. *Animal*, 1(7), 1033–1041.
- Devillers, N., Le Dividich, J., y Prunier, A. (2006). Physiologie de la production de colostrum chez la truie. *Productions Animales*, 19(1), 29–38.
- Devillers, N., Le Dividich, J., y Prunier, A. (2011). Influence of colostrum intake on piglet survival and immunity. *Animal*, 5(10), 1605–1612.
- Devillers, N., LeDividich, J., Farmer, C., Mounier, A.-M., Lefebvre, M., y Prunier, A. (2005). Origine et conséquences de la variabilité de la production de colostrum par la truie et de la consommation de colostrum par les porcelets. *Journée Recherche Porcine*, 37(1), 435–442.
- Devillers, N., Van Milgen, J., Prunier, A., y Le Dividich, J. (2004). Estimation of colostrum intake in the neonatal pig. *Animal Science*, 78(2), 305–313.
- Dibner, J. J., y Richards, J. D. (2004). The digestive system: challenges and opportunities. *Journal of Applied Poultry Research*, 13(1), 86–93.
- Dubernet, S., Desmasures, N., y Guéguen, M. (2002). A PCR-based method for identification of lactobacilli at the genus level. *FEMS Microbiology Letters*, 214(2), 271–275.
- Duncan, S. H., Holtrop, G., Lobley, G. E., Calder, A. G., Stewart, C. S., y Flint, H. J. (2004). Contribution of acetate to butyrate formation by human faecal bacteria. *British Journal of Nutrition*, 91(6), 915–923.
- Dubernet, S., Desmasures, N., y Guéguen, M. (2002). A PCR-based method for identification of *Lactobacilli* at the genus level. *FEMS Microbiology Letters*, 214(2), 271–275.
- Dyck, G. W., y Swierstra, E. E. (1987). Causes of piglet death from birth to weaning. *Canadian Journal of Animal Science*, 67(2), 543–547.
- Eardley, I., Whelan, P., Kirby, R., y Schaeffer, A. (2006). Drug treatment in urology, chapter 5, pp. 86. Blackwell Publishing Ltd. Massachusetts USA.
- El Korchi, G. (2006). Farmacocinética y eficacia de oxitetraciclina tras su administración intramuscular en bovino. Depleción tisular. (Tesis Doctoral). Universidad Autónoma de Barcelona, Facultad de Veterinarias, España.
- Elmund, G. K., Morrison, S. M., Grant, D. W., y Nevins, M. P. (1971). Role of excreted chlortetracycline in modifying the decomposition process in feedlot waste. *Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology*, 6(2), 129–132.
- Ericsson, C. D., Feldman, S., Pickering, L. K., y Cleary, T. G. (1982). Influence of subsalicylate

- bismuth on absorption of doxycycline. *JAMA*, 247(16), 2266–2267.
- Escolar Jurado, M., Azanza Perea, J. R., Sádaba Díaz de Rada, B., y Honorato Pérez, J. (1998). Tetraciclinas, cloranfenicol y fosfomicina. *Med.*, 7(76), 3524–3532.
- Escudero, E., Carceles, C. M., y Serrano, J. M. (1994). Pharmacokinetics of oxytetracycline in goats: modifications induced by a long-acting formulation. *The Veterinary Record*, 135(23), 548–552.
- Falconer, I. R. (1980). Aspects of the biochemistry, physiology and endocrinology of lactation. *Australian Journal of Biological Sciences*, 33(1), 71–84.
- Farmer, C. (2001). The role of prolactin for mammogenesis and galactopoiesis in swine. *Livestock Production Science*, 70(1), 105–113.
- Farmer, C., Robert, S., y Rushen, J. (1998). Bromocriptine given orally to periparturient of lactating sows inhibits milk production. *Journal of Animal Science*, 76(3), 750–757.
- Fenoglio, D. (2009). El impacto de la apertura económica sobre la producción porcina argentina. (Tesis de Magister). Universidad Católica Argentina, Facultad de Ciencias Agrarias, Argentina.
- Fernández, P., Herrera, I., Martínez, P., Gomez-Lus, M. L., y Prieto, J. (1995). Enhancement of the susceptibility of *Staphylococcus aureus* to phagocytosis after treatment with fosfomicin compared with other antimicrobial agents. *Chemotherapy*, 41(1), 45–49.
- Fernandez Lastra, C., Mariño, E. L., y Dominguez-Gil, A. (1987). Phosphomycin levels in serum and interstitial tissue fluid in a multiple dosage regimen in rabbits. *Arzneimittel-Forschung*, 37(8), 927–929.
- Fernández Paggi, M. B., Soraci, A. L., Tapia, M. O., y Amanto, F. (2012). Estudio de la distribución del antibiótico fosfomicina en calostro-leche de cerdas. *Analecta Veterinaria*, 32(1), 5–10.
- Flammer, K., Aucoin, D. P., Whitt, D. A., y Styles, D. K. (1990). Potential use of long-acting injectable oxytetracycline for treatment of chlamydiosis in Goffin's cockatoos. *Avian Diseases*, 228–234.
- Fleishaker, J. C. (2003). Models and methods for predicting drug transfer into human milk. *Advanced Drug Delivery Reviews*, 55(5), 643–652.
- Flickinger, E. A., y Fahey, G. C. (2002). Pet food and feed applications of inulin, oligofructose and other oligosaccharides. *British Journal of Nutrition*, 87(S2), S297–S300.
- Fourtillan, J. B., Ingrand, I., y Moreau, J. (1989). Biodisponibilités de l'oxytetracycline chez les bovins après administrations intramusculaires de deux formes à libération contrôlée. *Recueil de Medecine Veterinaire*, 165, 8–9.

- Foxcroft, G. R., Dixon, W. T., Novak, S., Putman, C. T., Town, S. C., y Vinsky, M. D. (2006). The biological basis for prenatal programming of postnatal performance in pigs. *Journal of Animal Science*, 84 Suppl, 105–112.
- Fritz, J. W., y Zuo, Y. (2007). Simultaneous determination of tetracycline, oxytetracycline, and 4-epitetracycline in milk by high-performance liquid chromatography. *Food Chemistry*, 105(3), 1297–1301.
- Gale, E. F., y Folkes, J. P. (1953). The assimilation of amino-acids by bacteria. 15. Actions of antibiotics on nucleic acid and protein synthesis in *Staphylococcus aureus*. *Biochemical Journal*, 53(3), 493.
- Galfi, P., y Bokori, J. (1990). Feeding trial in pigs with a diet containing sodium n-butyrate. *Acta Vet Hung*, 38(1–2), 3–17.
- García-Rodríguez, J. A. (1984). Antimicrobianos. In Pumarola, A., Rodríguez-Torres, A., García-Rodríguez, J. A., y Piédrola-Angulo, G. Salvat (Eds.), *Microbiología y Parasitología Médica*, pp. 118–150. SA Barcelona.
- García Peris, P., Bretón Lesmes, I., de la Cuerda Compes, C., y Camblor Alvarez, M. (2002). Metabolismo colónico de la fibra. *Nutricion Hospitalaria*, 17 Suppl 2, 11–16.
- Gaskin, H. R., y Kelly, K. W. (1995). Immunology and neonatal mortality. In Varley, M. A. (Ed.), *The Neonatal Pig. Development and Survival*, pp. 39–56. CABI: Wallingford, UK.
- Gobernado, M. (2003). Fosfomicin. *Revista Española de Quimioterapia : Publicación Oficial de La Sociedad Española de Quimioterapia*, 16(1), 15–40.
- Gonzalez, E. A., y Blanco, J. (1986). Colonization antigens, antibiotic resistance and plasmid content of enterotoxigenic *Escherichia coli* isolated from piglets with diarrhoea in Galicia (north-western Spain). *Veterinary Microbiology*, 11(3), 271–283.
- Goodlad, J. S., y Mathers, J. C. (1990). Large bowel fermentation in rats given diets containing raw peas (*Pisum sativum*). *British Journal of Nutrition*, 64(2), 569–587.
- Grassi, G. G. (1990). Fosfomicin trometamol: historical background and clinical development. *Infection*, 18, S57–S59.
- Gremmo-Féger, G., Dobrzynski, M., y Collet, M. (2003). Allaitement maternel et médicaments. *Journal de Gynécologie Obstétrique et Biologie de La Reproduction*, 32(5), 466–475.
- Guidance for Industry, B. M. V. 2001. (n.d.). *U. S. Department of Health and Human Services, Food and Drug Administration (FDA), Center for Drug Evaluation and Research (CDER), Center for Veterinary Medicine (CVM)*.
- Guilhermet, R. G. (1996). Fonctions nutritionnelles et métaboliques de l'arginine. *Productions Animales-Paris-Institut National de la Recherche Agronomique-*, 9, 265–272.

- Gutierrez, O. L., Ocampo, C. L., Aguilera, J. R., Luna, J., y Sumano, L. H. (2008). Pharmacokinetics of disodium-fosfomicin in mongrel dogs. *Research in Veterinary Science*, 85(1), 156–161.
- Gyawali, R., Minor, R. C., Donovan, B., y Ibrahim, S. A. (2015). Inclusion of oat in feeding can increase the potential probiotic bifidobacteria in sow milk. *Animals*, 5(3), 610–623.
- Gyles, C., Falkow, S., y Rollins, L. (1978). In vivo transfer of an Escherichia coli enterotoxin plasmid possessing genes for drug resistance. *American Journal of Veterinary Research*, 39(9), 1438–1441.
- Han, K. S., Balan, P., Molist Gasa, F., y Boland, M. (2011). Green kiwifruit modulates the colonic microbiota in growing pigs. *Letters in Applied Microbiology*, 52(4), 379–385.
- Hansen, L. H., Sørensen, S. J., Jørgensen, H. S., y Jensen, L. B. (2005). The prevalence of the OqxAB multidrug efflux pump amongst olaquinox-resistant Escherichia coli in pigs. *Microbial Drug Resistance*, 11(4), 378–382.
- Hartmann, P. E., y Holmes, M. A. (1989). Sow lactation. In Barnett, J. L., y Hennessy, D. P. (Eds.), *Manipulating pig production II*, pp. 72–97. Australia: Australasian Pig Science Association.
- Hartsock, T. G., y Graves, H. B. (1976). Neonatal behavior and nutrition-related mortality in domestic swine. *Journal of Animal Science*, 42(1), 235–241.
- Hash, J. H., Wishnick, M., y Miller, P. A. (1964). On the mode of action of the tetracycline antibiotics in Staphylococcus aureus. *Journal of Biological Chemistry*, 239(6), 2070–2078.
- Heim, G., O’Doherty, J. V., O’Shea, C. J., Doyle, D. N., Egan, A. M., Thornton, K., y Sweeney, T. (2015). Maternal supplementation of seaweed-derived polysaccharides improves intestinal health and immune status of suckling piglets. *Journal of Nutritional Science*, 4, e27.
- Hendlin, D., Stapley, E. O., Jackson, M., Wallick, H., Miller, A. K., Wolf, F. J., Miller, T. W., Chaiet, L., Kahan, F. M., y Foltz, E. L. (1969). Phosphonomycin, a new antibiotic produced by strains of Streptomyces. *Science*, 166(3901), 122–123.
- Hoa, N. T., Chieu, T. T. B., Nga, T. T. T., Van Dung, N., Campbell, J., Anh, P. H., Tho, H. H., Chau, N. V. V., Bryant, J. E., y Hien, T. T. (2011). Slaughterhouse pigs are a major reservoir of *Streptococcus suis* serotype 2 capable of causing human infection in southern Vietnam. *PloS One*, 6(3), e17943.
- Howard, C. R., y Lawrence, R. A. (1999). Drugs and breastfeeding. *Clinics in Perinatology*, 26(2), 447–478.
- Huygelen, V., De Vos, M., Prims, S., Vergauwen, H., Fransen, E., Casteleyn, C., Van Cruchten,

- S., y Van Ginneken, C. (2015). Birth weight has no influence on the morphology, digestive capacity and motility of the small intestine in suckling pigs. *Livestock Science*, 182, 129–136.
- Ishizawa, T., Hayashi, M., y Awazu, S. (1991). Effect of Carrier-Mediated Transport System on Intestinal Fosfomicin Absorption in Situ and in Vivo. *Journal of Pharmacobio-Dynamics*, 14, 82–86.
- Izquierdo, P., Mavárez, R., Ysambertt, F., Piñero, M. Y., Torres, G., y Allara, M. (2010). Extracción de oxitetraciclina en carne de pollo: estudios de rendimiento con aumento de la fase polar del solvente de extracción. *Revista Científica*, 20(4).
- Jarvis, S., Calvert, S. K., Stevenson, J., VanLeeuwen, N., y Lawrence, A. B. (2002). Pituitary-adrenal activation in pre-parturient pigs (*Sus scrofa*) is associated with behavioural restriction due to lack of space rather than nesting substrate. *Animal Welfare*, 11(4), 371–384.
- Jarvis, S., Van der Vegt, B. J., Lawrence, A. B., McLean, K. A., Deans, L. A., Chirnside, J., y Calvert, S. K. (2001). The effect of parity and environmental restriction on behavioural and physiological responses of pre-parturient pigs. *Applied Animal Behaviour Science*, 71(3), 203–216.
- Jensen, B. (1998). Gut environment of pigs. *Journal Animal Feed Science and Technology*, 7, 45–64.
- Jouany, J. P. (1982). Volatile fatty acid and alcohol determination in digestive contents, silage juices, bacterial cultures and anaerobic fermentor contents [microbial fermentation, biological liquids, analytic method using gas-liquid chromatography]. *Sciences Des Aliments*, (2) 131–144.
- Kahan, F. M., Kahan, J. S., Cassidy, P. J., y Kropp, H. (1974). The mechanism of action of fosfomicin (phosphonomycin). *Annals of the New York Academy of Sciences*, 235(1), 364–386.
- Keenan, T. W. (2001). Historical perspective: milk lipid globules and their surrounding membrane: a brief history and perspectives for future research. *Journal of Mammary Gland Biology and Neoplasia*, 6(3), 365–371.
- Kensinger, R. S., Collier, R. J., y Bazer, F. W. (1986). Ultrastructural changes in porcine mammary tissue during lactogenesis. *Journal of Anatomy*, 145, 49.
- Kensinger, R. S., Collier, R. J., Bazer, F. W., Ducsay, C. A., y Becker, H. N. (1982). Nucleic acid, metabolic and histological changes in gilt mammary tissue during pregnancy and lactogenesis. *Journal of Animal Science*, 54(6), 1297–1308.

- Khachatryan, A. R., Besser, T. E., Hancock, D. D., y Call, D. R. (2006). Use of a nonmedicated dietary supplement correlates with increased prevalence of streptomycin-sulfa-tetracycline-resistant *Escherichia coli* on a dairy farm. *Applied and Environmental Microbiology*, 72(7), 4583–4588.
- Kirby, W. M. M. (1977). Pharmacokinetics of fosfomicin. *Chemotherapy*, 23(Suppl. 1), 141–151.
- Kisielinski, K., Willis, S., Prescher, A., Klosterhalfen, B., y Schumpelick, V. (2002). A simple new method to calculate small intestine absorptive surface in the rat. *Clinical and Experimental Medicine*, 2(3), 131–135.
- Klein, U., Thomas, V., de Jong, A., Simjee, S., Moyaert, H., Siegwart, E., El Garch, F., Butty, P., Marion, H., Rigaut, D., Haag-Diergarten, S., y Richard-Mazet, A. (2015). Antimicrobial susceptibility monitoring of respiratory and enteric tract pathogens isolated from diseased pigs across Europe between 2009 and 2012. In *7th European Symposium of Procine Health Management*.
- Klobasa, F., y Butler, J. E. (1987). Absolute and relative concentrations of immunoglobulins G, M, and A, and albumin in the lacteal secretion of sows of different lactation numbers. *American Journal of Veterinary Research*, 48(2), 176–182.
- Klopfenstein, C., Couture, Y., Martineau, G.-P., y Bouchard, E. (2002). Physiopathologie comparative de la lactation chez la truie et chez la vache. *Médecin Vétérinaire Du Québec*, 32(2), 52–57.
- Klopfenstein, C., D'Allaire, S., y Martineau, G. P. (1995). Effect of adaptation to the farrowing crate on water intake of sows. *Livestock Production Science*, 43(3), 243–252.
- Kuberka, L., Cozzens, T., Bedford, R., y Mezoughem, C. (2017). Livestock and Poultry: World Markets and Trad, (October 2016), 28.
- Kunin, C. M., Craig, W. A., Kornguth, M., y Monson, R. (1973). Influence of binding on the pharmacologic activity of antibiotics. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 226(1), 214–224.
- Kwon, H.-S., Yang, E.-H., Yeon, S.-W., Kang, B.-H., y Kim, T.-Y. (2004). Rapid identification of probiotic *Lactobacillus* species by multiplex PCR using species-specific primers based on the region extending from 16S rRNA through 23S rRNA. *FEMS Microbiology Letters*, 239(2), 267–275.
- Lallès, J.-P., Boudry, G., Favier, C., Le Floc'h, N., Luron, I., Montagne, L., Oswald, I. P., Pié, S., Piel, C., y Sève, B. (2004). Gut function and dysfunction in young pigs: physiology. *Animal Research*, 53(4), 301–316.

- Landoni, M. F., y Errecalde, J. O. (1992). Tissue concentrations of a long-acting oxytetracycline formulation after intramuscular administration in cattle. *Revue Scientifique et Technique-Office International Des Epizooties*, 11, 909.
- Laplace, J.-P., Aumaitre, A., y Rerat, A. (2001). Forty years of achievement in French research on digestive physiology in the pig. *Reproduction Nutrition Development*, 41(2), 129–151.
- Le Dividich, J. (2006). Les enjeux du colostrum. *Expo-Congrès Du Porc Du Québec. 2006-04-12/2006-04-13, Québec, CAN*. Promotions Roger, 49–72.
- Le Dividich, J., y Noblet, J. (1981). Colostrum Intake and Thermoregulation in the Neonatal Pig in Relation to Environmental Temperature. *Biology of the Neonate*, 40, 167–174.
- Le Dividich, J., Rokke, J. A., y Herpin, P. (2005). Nutritional and immunological importance of colostrum for the new born. *Journal of Agricultural Science*, 143, 469–485.
- Lee, K. G. (2007). Lactation and drugs. *Paediatrics and Child Health*, 17(2), 68–71.
- Leung, H. W., Jin, L., Wei, S., Tsui, M. M. P., Zhou, B., Jiao, L., Cheung, P. C., Chun, Y. K., Murphy, M. B., y Lam, P. K. S. (2013). Pharmaceuticals in tap water: human health risk assessment and proposed monitoring framework in China. *Environmental Health Perspectives*, 121(7), 839.
- Lewis, K. (2012). Persister cells: molecular mechanisms related to antibiotic tolerance. In *Antibiotic resistance*, pp. 121–133. Springer Berlin Heidelberg.
- Li, J., Li, D., Yin, Y.-L., Piao, X. S., He, J. H., Chen, G. P., y Shu, J. C. (2004). Performance, nutrient digestibility and intestinal disaccharidase activity of weaner/grower pigs given diets containing extruded Chinese stored brown rice with exogenous enzyme supplements. *Animal Science*, 79(3), 429–438.
- Li, N., Ho, K. W. K., Ying, G.-G., y Deng, W.-J. (2017). Veterinary antibiotics in food, drinking water, and the urine of preschool children in Hong Kong. *Environment International*, 108(July), 246–252.
- Lieber, C. S., y Lefèvre, A. (1959). Ammonia as a source of gastric hypoacidity in patients with uremia. *Journal of Clinical Investigation*, 38(8), 1271.
- Liu, H., Ivarsson, E., Dicksved, J., Lundh, T., y Lindberg, J. E. (2012). Inclusion of chicory (*Cichorium intybus* L.) in pigs' diets affects the intestinal microenvironment and the gut microbiota. *Applied and Environmental Microbiology*, 78(12), 4102–4109.
- Liu, J.-L., y Wong, M.-H. (2013). Pharmaceuticals and personal care products (PPCPs): a review on environmental contamination in China. *Environment International*, 59, 208–224.
- Liu, Y., Zhu, K., Wang, J., Huang, X., Wang, G., Li, C., Cao, J., y Ding, S. (2016). Simultaneous detection and comparative pharmacokinetics of amoxicillin, clavulanic acid and

- prednisolone in cows' milk by UPLC-MS/MS. *Journal of Chromatography B: Analytical Technologies in the Biomedical and Life Sciences*, 1008, 74–80.
- Loh, G., Eberhard, M., Brunner, R. M., Hennig, U., Kuhla, S., Kleessen, B., y Metges, C. C. (2006). Inulin alters the intestinal microbiota and short-chain fatty acid concentrations in growing pigs regardless of their basal diet. *The Journal of Nutrition*, 136(5), 1198–1202.
- Lund, M. S., Puonti, M., Rydhmer, L., y Jensen, J. (2002). Relationship between litter size and perinatal and pre-weaning survival in pigs. *Animal Science*, 74(2), 217–222.
- Manners, M. J. (1976). The development of digestive function in the pig nutrition. *Proceedings Of The Nutrition Society*, 35, 49–55.
- Manners, M. J., y Stevens, J. A. (1972). Changes from birth to maturity in the Pattern of Distribution of Lactase and Sucrase activity in the mucosa of the small intestine of pigs. *British Journal of Nutrition*, 28, 113.
- Manteca, X., y Gasa, J. (2008). Bienestar en maternidad. In Manteca, X., y Gasa, J. (Eds.) *Bienestar en el ganado porcino*, pp. 27–40. Boehringer Ingelheim España, S.A.
- Martineau, G. P. (1997). Maladies d'élevage des porcs. *Editions France Agricole*, 174–209.
- Martineau, G. P., y Badouard, B. (2009). Managing highly prolific sows. In *Proceedings of the London Swine Conference, London Convention Centre, London, Ontario*, pp. 14–30.
- Martínez, G. (2017). Interacción entre Antibiótico, Prebiótico y Micotoxina sobre la Salud Intestinal y Performance Productiva en Lechones Post Destete. (Tesis Doctoral). Universidad Nacional del Centro de la Provincia de Buenos Aires, Facultad de Ciencias Veterinarias, Argentina.
- Mathew, A. G. (2000). Nutritional influences on gut microbiology and enteric diseases. *Time*, 49–64.
- Mathew, A. G., y Ebner, P. D. (2004). Issues of drug use and antibiotic resistance in pig production. *Pig News and Information*, 25(4), 133N.
- Matsuki, T., Watanabe, K., Fujimoto, J., Miyamoto, Y., Takada, T., Matsumoto, K., Oyaizu, H., y Tanaka, R. (2002). Development of 16S rRNA-Gene-Targeted Group-Specific Primers for the Detection and Identification of Predominant Bacteria in Human Feces. *Applied and Environmental Microbiology*, 68(11), 5445–5451.
- Máttar, S., Calderón, A., Sotelo, D., Sierra, M., y Tordecilla, G. (2009). Detección de Antibióticos en Leches: Un Problema de Salud Pública. *Salud Pública*, 11(4), 579–590.
- Matthews, D. M., y Laster, L. (1965). Absorption of protein digestion products: a review. *Gut*, 6(5), 411.
- McGlone, J. J., Salak, J. L., Lumpkin, E. A., Nicholson, R. I., Gibson, M., y Norman, R. L.

- (1993). Shipping stress and social status effects on pig performance, plasma cortisol, natural killer cell activity, and leukocyte numbers. *Journal of Animal Science*, 71(4), 888–896.
- Mikkelsen, L. L., Bendixen, C., Jakobsen, M., y Jensen, B. B. (2003). Enumeration of bifidobacteria in gastrointestinal samples from piglets. *Applied and Environmental Microbiology*, 69(1), 654–658.
- Mikkelsen, L. L., y Jensen, B. B. (2004). Effect of fructo-oligosaccharides and transgalacto-oligosaccharides on microbial populations and microbial activity in the gastrointestinal tract of piglets post-weaning. *Animal Feed Science and Technology*, 117(1), 107–119.
- Mølbak, L., Thomsen, L. E., Jensen, T. K., Bach Knudsen, K. E., y Boye, M. (2007). Increased amount of *Bifidobacterium thermacidophilum* and *Megasphaera elsdenii* in the colonic microbiota of pigs fed a swine dysentery preventive diet containing chicory roots and sweet lupine. *Journal of Applied Microbiology*, 103(5), 1853–1867.
- Molokwu, E. C. I., y Wagner, W. C. (1973). Endocrine physiology of the puerperal sow. *Journal of Animal Science*, 36(6), 1158–1163.
- Muirhead, M., y Alexander, T. (2001). Manejo y tratamiento de la enfermedad en el período del parto y lactación. In Muirhead, M., y Alexander, T. *Manejo Sanitario y Tratamiento de Las Enfermedades Del Cerdo*, pp. 263–322. Editorial Inter-Médica. Argentina.
- Mullen, K. A., Beasley, E., Rizzo, J. Q., Washburn, S. P., Baynes, R. E., Mason, S. E., y Anderson, K. L. (2017). Potential of phytoceuticals to affect antibiotic residue detection tests in cow milk in a randomised trial. *Veterinary Record Open*, 4(1), e000214.
- Nara, B. S., Welk, F. A., Rutherford, J. E., Sherwood, O. D., y First, N. L. (1982). Effect of relaxin on parturition and frequency of live births in pigs. *Journal of Reproduction and Fertility*, 66(1), 359–365.
- Neville, M. C., Morton, J., y Umemura, S. (2001). Lactogenesis: the transition from pregnancy to lactation. *Pediatric Clinics of North America*, 48(1), 35–52.
- Nikolich, M. P., Hong, G., Shoemaker, N. B., y Salyers, A. A. (1994). Evidence for natural horizontal transfer of tetQ between bacteria that normally colonize humans and bacteria that normally colonize livestock. *Applied and Environmental Microbiology*, 60(9), 3255–3260.
- Noblet, J., y Le Dividich, J. (1981). Energy Metabolism of the Newborn Pig during the First 24 h of Life. *Biology of the Neonate*, 40, 175–182.
- Nouws, J. F. M., Smulders, A., y Rappalini, M. (1990). A comparative study on irritation and residue aspects of five oxytetracycline formulations administered intramuscularly to calves, pigs and sheep. *Veterinary Quarterly*, 12(3), 129–138.
- O’Shea, C. J., Sweeney, T., Lynch, M. B., Callan, J. J., y O’Doherty, J. V. (2011). Modification

- of selected bacteria and markers of protein fermentation in the distal gastrointestinal tract of pigs upon consumption of chitosan is accompanied by heightened manure odor emissions. *Journal of Animal Science*, 89(5), 1366–1375.
- Ollivier-Bousquet, M. (1993). Les hormones du lait: provenance et rôles. *INRA Productions Animales*, 6(4), 253–263.
- Oswald, I. P. (2006). Role of intestinal epithelial cells in the innate immune defence of the pig intestine. *Veterinary Research*, 37, 359–368.
- Papadoyannis, I. N., Samanidou, V. F., y Kovatsi, L. A. (2000). A rapid high performance liquid chromatographic (HPLC) assay for the determination of oxytetracycline in commercial pharmaceuticals. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, 23(2), 275–280.
- Paßlack, N., Vahjen, W., y Zentek, J. (2015). Dietary inulin affects the intestinal microbiota in sows and their suckling piglets. *BMC Veterinary Research*, 11, 51.
- Patel, S. S., Balfour, J. A., y Bryson, H. M. (1997). Fosfomicin tromethamine. *Drugs*, 53(4), 637–656.
- Patterson, J. K., Yasuda, K., Welch, R. M., Miller, D. D., y Lei, X. G. (2010). Supplemental Dietary Inulin of Variable Chain Lengths Alters Intestinal Bacterial Populations in Young Pigs. *Journal of Nutrition*, 140(12), 2158–2161.
- Peaker, M., y Taylor, J. C. (1975). Milk secretion in the rabbit: changes during lactation and the mechanism of ion transport. *The Journal of Physiology*, 253, 527–545.
- Pedersen, L. J., Berg, P., Jørgensen, G., y Andersen, I. L. (2011). Neonatal piglet traits of importance for survival in crates and indoor pens. *Journal of Animal Science*, 89(4), 1207–1218.
- Pérez, D. S., Soraci, A. L., Diéguez, S. N., y Tapia, M. O. (2011). Determination and withdrawal time of fosfomicin in chicken muscle, liver and kidney. *International Journal of Poultry Science*, 10(8), 644–655.
- Pérez, D. S., Tapia, M. O., y Soraci, A. L. (2014). Fosfomicin: Uses and potentialities in veterinary medicine. *Open Veterinary Journal*, 4(1), 26–43.
- Pestova, M. I., Clift, R. E., Vickers, R. J., Franklin, M. A., y Mathew, A. G. (2000). Effect of weaning and dietary galactose supplementation on digesta glycoproteins in pigs. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 80(13), 1918–1924.
- Pettigrew, J. E., Cornelius, S. G., Moser, R. L., y Sower, A. F. (1987). A refinement and evaluation of the isotope dilution method for estimating milk intake by piglets. *Livestock Production Science*, 16(2), 163–174.
- Piel, C., Montagne, L., Sève, B., y Lallès, J.-P. (2005). Increasing digesta viscosity using

- carboxymethylcellulose in weaned piglets stimulates ileal goblet cell numbers and maturation. *The Journal of Nutrition*, 135(1), 86–91.
- Plaut, K. I., Kensinger, R. S., Griel, L. C., y Kavanaugh, J. F. (1989). Relationships among prolactin binding, prolactin concentrations in plasma and metabolic activity of the porcine mammary gland. *Journal of Animal Science*, 67(6), 1509–1519.
- Pluske, J. R. (2016). Invited review: Aspects of gastrointestinal tract growth and maturation in the pre- and postweaning period of pigs. *Journal of Animal Science*, 94(7), 399–411.
- Pluske, J. R., Black, B., Pethick, D. W., Mullan, B. P., y Hampson, D. J. (2003). Effects of different sources and levels of dietary fibre in diets on performance, digesta characteristics and antibiotic treatment of pigs after weaning. *Animal Feed Science and Technology*, 107(1–4), 129–142.
- Pluske, J., y Williams, I. (1996). Split weaning increases the growth of light piglets during lactation. *Australian Journal of Agricultural Research*, 47(4), 513.
- Pons, G., y Rey, E. (2003). Passage des médicaments dans le lait. In Brion, F., Cabrol, D., Moriette, G., y Pons, G. *Les médicaments en périnatalogie*, pp. 17–26. Paris, Masson.
- Popovic, M., Steinort, D., Pillai, S., y Joukhadar, C. (2010). Fosfomicin: An old, new friend? *European Journal of Clinical Microbiology and Infectious Diseases*, 29(2), 127–142.
- Prescott, J. F., y Baggot, J. D. (1993). Principles of antimicrobial drug disposition. *Antimicrobial Therapy in Veterinary Medicine*, pp. 37-73. Iowa State University Press, Ames.
- Quesnel, H., Farmer, C., y Devillers, N. (2012). Colostrum intake: Influence on piglet performance and factors of variation. *Livestock Science*, 146(2–3), 105–114.
- Quiniou, N., Dagorn, J., y Gaudré, D. (2002). Variation of piglets' birth weight and consequences on subsequent performance. *Livestock Production Science*, 78(1), 63–70.
- Radecki, S. V., y Yokoyama, M. T. (1991). Swine nutrition. In Miller, E. R., Ullrey, D. E., y Lewis, A. J. (Eds.), pp.439–447. Boston, USA: Butterworth Heinemann.
- Ramírez Llorente, D. (2016). Evaluación de los perfiles cinéticos y de las interacciones de fármacos coadministrados en pienso en explotaciones porcinas. (Tesis Doctoral). Universidad Autónoma de Barcelona, Facultad de Veterinaria, España.
- Reilly, P., Sweeney, T., O'Shea, C., Pierce, K. M., Figat, S., Smith, A. G., Gahan, D. A., y O'Doherty, J. V. (2010). The effect of cereal-derived beta-glucans and exogenous enzyme supplementation on intestinal microflora, nutrient digestibility, mineral metabolism and volatile fatty acid concentrations in finisher pigs. *Animal Feed Science and Technology*, 158(3–4), 165–176.
- Reinhardt, C., Bergentall, M., Greiner, T. U., Schaffner, F., Ostergren-Lunden, G., Petersen, L.

- C., Ruf, W., y Backhed, F. (2012). Tissue factor and PAR1 promote microbiota-induced intestinal vascular remodelling. *Nature*, 483(7391), 627–631.
- Roberts, M. C. (1996). Tetracycline resistance determinants: mechanisms of action, regulation of expression, genetic mobility, and distribution. *FEMS Microbiology Reviews*, 19(1), 1–24.
- Roca Canudas, M., Majó i Masferrer, N., y Badiola Sáiz, I. (2008). Estudio del ecosistema bacteriano del tracto digestivo del cerdo mediante técnicas moleculares. (Tesis Doctoral). Universidad Autónoma de Barcelona, Facultad de Veterinaria, España.
- Rooke, J. A., y Bland, I. M. (2002). The acquisition of passive immunity in the new-born piglet. *Livestock Production Science*, 78(1), 13–23.
- Rootwelt, V., Reksen, O., Farstad, W., y Framstad, T. (2013). Postpartum deaths: Piglet, placental, and umbilical characteristics. *Journal of Animal Science*, 91(6), 2647–2656.
- Round, J. L., y Mazmanian, S. K. (2009). The gut microbiota shapes intestinal immune responses during health and disease. *Nature Reviews Immunology*, 9(5), 313–323.
- Roussos, N., Karageorgopoulos, D. E., Samonis, G., y Falagas, M. E. (2009). Clinical significance of the pharmacokinetic and pharmacodynamic characteristics of fosfomicin for the treatment of patients with systemic infections. *International Journal of Antimicrobial Agents*, 34(6), 506–515.
- Rutherford, K. M. D., Baxter, E. M., D'Eath, R. B., Turner, S. P., Arnott, G., Roehe, R., Ask, B., Sandøe, P., Moustsen, V. A., Thorup, F., Edwards, S. A., Berg, P., y Lawrence, A. B. (2013). The welfare implications of large litter size in the domestic pig I: Biological factors. *Animal Welfare*, 22(2), 199–218.
- Rysz, M., y Alvarez, P. J. J. (2004). Amplification and attenuation of tetracycline resistance in soil bacteria: aquifer column experiments. *Water Research*, 38(17), 3705–3712.
- Salhi, A., Combes, T., Roche, G., y Roncucci, R. (1986). In vitro combinations studies with fosfomicin. *Proceedings of the International Symposium*, pp. 34–45.
- Salmon, H. (1984). Immunité chez le foetus et le nouveau-né: modèle porcin. *Reproduction Nutrition Développement*, 24(2), 197–206.
- Samanta, A. K., Jayapal, N., Senani, S., Kolte, A. P., y Sridhar, M. (2013). Prebiotic inulin: Useful dietary adjuncts to manipulate the livestock gut microflora. *Brazilian Journal of Microbiology*, 44(1), 1–14.
- Sande, M. A., y Mandell, G. L. (1991). Agentes antimicrobianos: tetraciclina, cloramfenicol, eritromicina y agentes antibacterianos varios. *Las Bases Farmacológicas de La Terapéutica. Editorial Médica Panamericana, Buenos Aires, Argentina*, 1083–1109.
- Sauermann, R., Karch, R., Langenberger, H., Kettenbach, J., Mayer-Helm, B., Petsch, M.,

- Wagner, C., Sautner, T., Gattringer, R., y Karanikas, G. (2005). Antibiotic abscess penetration: fosfomicin levels measured in pus and simulated concentration-time profiles. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 49(11), 4448–4454.
- Scheel, D. E., Graves, H. B., y Sherritt, G. W. (1977). Nursing order, social dominance and growth in swine. *Journal of Animal Science*, 45(2), 219–229.
- Schnappinger, D., y Hillen, W. (1996). Tetracyclines: antibiotic action, uptake, and resistance mechanisms. *Archives of Microbiology*, 165(6), 359–369.
- Segre, G., Bianchi, E., Cataldi, A., y Zannini, G. (1987). Pharmacokinetic profile of fosfomicin trometamol (Monuril). *European Urology*, 13, 56–63.
- Simmen, F. A., Cera, K. R., y Mahan, D. C. (1990). Stimulation by colostrum or mature milk of gastrointestinal tissue development in newborn pigs. *Journal of Animal Science*, 68(11), 3596–3603.
- Sirvén, R. (2009). Importancia de la Producción Porcina. Hoy cerdo! Retrieved from www.blogs.clarin.com.
- Skrzypek, T., Piedra, J. L. V., Skrzypek, H., Kazimierczak, W., Szymańczyk, S., Pawłowska, M., y Zabielski, R. (2007). Intestinal villi structure during the development of pig and wild boar crossbreed neonates. *Livestock Science*, 109(1), 38–41.
- Snel, J., Harmsen, H. J. M., Van der Wielen, P., y Williams, B. A. (2002). Dietary strategies to influence the gastrointestinal microflora of young animals, and its potential to improve intestinal health. *Nutrition and Health on the Gastrointestinal Tract*, 37–69.
- Sommer, F., y Bäckhed, F. (2013). The gut microbiota-masters of host development and physiology. *Nature Reviews Microbiology*, 11(4), 227–238.
- Soraci, A. L., Harkes, R., Pérez, D. S., Martínez, G., Diéguez, S. N., y Tapia, M. O. (2010). Uso estratégico de aditivos: impacto sobre el equilibrio y salud gastrointestinal del lechón. *Analecta Veterinaria*, 30(1), 42–53.
- Soraci, A. L., Pérez, D. S., Martínez, G., Diéguez, S., Tapia, M. O., Amanto, F., Harkes, R., y Romano, O. (2011a). Disodium-fosfomicin pharmacokinetics and bioavailability in post weaning piglets. *Research in Veterinary Science*, 90(3), 498–502.
- Soraci, A. L., Pérez, D. S., Tapia, M. O., Martínez, G., Diéguez, S., Buronfosse-Roque, F., Harkes, R., Colusi, A., y Romano, O. (2011b). Pharmacocinétique et biodisponibilité de fosfomicine chez le poulet de chair. *Revue de Medecine Veterinaire*, 162(7), 358–363.
- Speer, M. C., Yamaoka, L. H., Gilchrist, J. H., Gaskell, C. P., Stajich, J. M., Vance, J. M., Kazantsev, A., Lastra, A. A., Haynes, C. S., y Beckmann, J. S. (1992). Confirmation of genetic heterogeneity in limb-girdle muscular dystrophy: linkage of an autosomal dominant

- form to chromosome 5q. *American Journal of Human Genetics*, 50(6), 1211.
- Stokes, C. R., Bailey, M., Haverson, K., Harris, C., Jones, P., Inman, C., Pié, S., Oswald, I. P., Williams, B. A., y Akkermans, A. D. L. (2004). Postnatal development of intestinal immune system in piglets: implications for the process of weaning. *Animal Research*, 53(4), 325–334.
- Sumano, L. H., Ocampo, C. L., y Gutierrez, O. L. (2007). Intravenous and intramuscular pharmacokinetics of a single-daily dose of disodium-fosfomicin in cattle, administered for 3 days. *Journal of Veterinary Pharmacology and Therapeutics*, 30(1), 49–54.
- Swords, W. E., Wu, C., Champlin, F. R., y Buddington, R. K. (1993). Postnatal Changes in Selected Bacterial Groups of the Pig Colonic Microflora. *Biology of the Neonate*, 63, 191–200.
- Tamai, I., y Tsuji, A. (1996). Carrier-mediated approaches for oral drug delivery. *Advanced Drug Delivery Reviews*, 20, 5–32.
- Tarvid, I. (1995). Neonatal development of protein digestion. In *Proceedings of the Nutrition Society of Australia*.
- Taverne, M., Bevers, M., Bradshaw, J. M. C., Dieleman, S. J., Willemsse, A. H., y Porter, D. G. (1982). Plasma concentrations of prolactin, progesterone, relaxin and oestradiol-17 β in sows treated with progesterone, bromocriptine or indomethacin during late pregnancy. *Journal of Reproduction and Fertility*, 65(1), 85–96.
- Theil, P. K., Lauridsen, C., y Quesnel, H. (2014). Neonatal piglet survival: impact of sow nutrition around parturition on fetal glycogen deposition and production and composition of colostrum and transient milk. *Animal*, 8(7), 1021–1030.
- Theil, P. K., Nielsen, T. T., Kristensen, N. B., Labouriau, R., Danielsen, V., Lauridsen, C., y Jakobsen, K. (2002). Estimation of milk production in lactating sows by determination of deuterated water turnover in three piglets per litter. *Acta Agriculturae Scandinavica, Section A-Animal Science*, 52(4), 221–232.
- Thomke, S., y Elwinger, K. (1998). Growth promotants in feeding pigs and poultry . I . Growth and feed efficiency responses to antibiotic growth promotants. *Annales de Zootechnie*, 47(2), 85–97.
- Tornadizo, M. E., Marra, A. I., Fontán, M. C. G., Prieto, B., y Carballo, J. (1998). La Calidad De La Leche Destinada a La Fabricación De Queso: Calidad Química Milk Quality for Cheese Production: Chemical Quality a Calidade Da Leite Destinada Á Fabricación De Queixo: Calidade Química. *Ciencia Y Tecnologia Alimentaria*, 2(2), 79–91.
- Torres, C., y Zarazaga, M. (2002). Antibióticos como promotores del crecimiento en animales:

- ¿Vamos por el buen camino? *Gaceta Sanitaria*, 16(2), 109–112.
- Toutain, P.-L., Del Castillo, J. R. E., y Bousquet-Mélou, A. (2002). The pharmacokinetic–pharmacodynamic approach to a rational dosage regimen for antibiotics. *Research in Veterinary Science*, 73(2), 105–114.
- Trautmann, M., Meincke, C., Vogt, K., Ruhnke, M., y Lajous-Petter, A. M. (1992). Intracellular bactericidal activity of fosfomicin against staphylococci: a comparison with other antibiotics. *Infection*, 20(6), 350–354.
- Van Boeckel, T. P., Brower, C., Gilbert, M., Grenfell, B. T., Levin, S. A., Robinson, T. P., Teillant, A., y Laxminarayan, R. (2015). Global trends in antimicrobial use in food animals. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 112(18), 5649–5654.
- Van der Fels-Klerx, H. J., Puister-Jansen, L. F., Van Asselt, E. D., y Burgers, S. (2011). Farm factors associated with the use of antibiotics in pig production. *Journal of Animal Science*, 89(6), 1922–1929.
- Van Dijk, A. J., Niewold, T. A., Nabuurs, M. J. A., Van Hees, J., De Bot, P., Stockhofe-Zurwieden, N., Ubbink-Blanksma, M., y Beynen, A. C. (2002). Small intestinal morphology and disaccharidase activities in early-weaned piglets fed a diet containing spray-dried porcine plasma. *Journal of Veterinary Medicine. A, Physiology, Pathology, Clinical Medicine*, 49(2), 81–6.
- Vargas, E., Pacheco, E., y Beneit, J. A. (1987). Antibióticos (V): Misceláneos: Fosfomicina. *Farmacología y Su Proyección a La Clínica. Velázquez, BL Ed. Oteo. Madrid*, 840–841.
- Vodovar, N., Flanzky, J., y François, A. C. (1964). Intestin Grêle Du Porc. I. Dimensions En Fonction De L'age Et Du Poids, Étude De La Jonction Du Canal Cholédoque Et Du Canal Pancréatique A Celui-Ci. In *Annales de Biologie Animale Biochimie Biophysique* (Vol. 4, pp. 27–34). EDP Sciences.
- Vondruskova, H., Slamova, R., Trckova, M., Zraly, Z., y Pavli, I. (2010). Alternatives to antibiotic growth promoters in prevention of diarrhea in weaned piglets: a review. *Veterinary Medicine*, 55(5), 199–224.
- Wagstrom, E. A., Yoon, K. J., y Zimmerman, J. J. (2000). Immune Components in Porcine Mammary Secretions. *Viral Immunology*, 13(3), 383–397.
- White, K. R., Anderson, D. M., y Bate, L. A. (1996). Increasing piglet survival through an improved farrowing management protocol. *Canadian Journal of Animal Science*, 76(4), 491–495.
- White, L. A., Newman, M. C., Cromwell, G. L., y Lindemann, M. D. (2002). Brewers dried yeast as a source of mannan oligosaccharides for weanling pigs. *Journal of Animal Science*,

80(10), 2619–2628.

- Willcox, D. L., Arthur, P. G., Hartmann, P. E., y Whitely, J. L. (1983). Perinatal changes in plasma oestradiol-17B, cortisol and progesterone and the initiation of lactation in sows. *Australian Journal of Biological Sciences*, 36(2), 173–182.
- Williams, B. A., Verstegen, M. W., y Tamminga, S. (2001). Fermentation in the large intestine of single-stomached animals and its relationship to animal health. *Nutrition Research Reviews*, 14(2), 207–228.
- Wilson, J. T., Brown, R. D., Cherek, D. R., Dailey, J. W., Hilman, B., Jobe, P. C., Manno, B. R., Manno, J. E., Redetzki, H. M., y Stewart, J. J. (1980). Drug excretion in human breast milk. *Clinical Pharmacokinetics*, 5(1), 1–66.
- Zhang, Y. Q., y Xu, R. J. (2003). Anatomy and histology of the gastrointestinal tract. In Xu, R. J., y Cranwell, P. D. (Eds.). *The Neonatal Pig: Gastrointestinal Physiology and Nutrition*, pp. 1–30. Nottingham University Press, United Kingdom.
- Xu, R. J., Sangild, P. T., Zhang, Y. Q., y Zhang, S. H. (2002). Bioactive compounds in porcine colostrum and milk and their effects on intestinal development in neonatal pigs. *Biology of Growing Animals*, 1, 169-192.
- Xu, R. J., Wang, F., y Zhang, S. H. (2000). Postnatal adaptation of the gastrointestinal tract in neonatal pigs: A possible role of milk-borne growth factors. *Livestock Production Science*, 66(2), 95–107.
- Zaleski, H. M., Winn, R. J., Jennings, R. L., y Sherwood, O. D. (1996). Effects of relaxin on lactational performance in ovariectomized gilts. *Biology of Reproduction*, 55(3), 671–675.
- Zhang, H., Malo, C., y Buddington, R. K. (1997). Suckling induces rapid intestinal growth and changes in brush border digestive functions of newborn pigs. *The Journal of Nutrition*, 127(June 1996), 418–426.
- Ziv, G., y Sulman, F. G. (1974). Analysis of pharmacokinetic properties of nine tetracycline analogues in dairy cows and ewes [Antibiotic residues, milk, toxicity]. *American Journal of Veterinary Research (USA)*.
- Zozaya, D. H., Gutiérrez, O. L., Ocampo, C. L., y Sumano, L. H. (2008). Pharmacokinetics of a single bolus intravenous, intramuscular and subcutaneous dose of disodium fosfomycin in horses. *Journal of Veterinary Pharmacology and Therapeutics*, 31(4), 321–327.