



Universidad de Valladolid



**PROGRAMA DE DOCTORADO EN INVESTIGACIÓN EN
CIENCIAS DE LA SALUD**

TESIS DOCTORAL:

**Caracterización microbiana de las
diarreas neonatales en ganado rumiante
y porcino bajo el enfoque 'Una Salud'**

Presentada por Álvaro Cañete Reyes para optar
al grado de

Doctor por la Universidad de Valladolid

Dirigida por:

Dr, Marta Hernández Pérez

Dr. David Rodríguez Lázaro

“Era una lluvia que ahogaba todas las lluvias, y hasta el recuerdo de las otras lluvias. Caía a golpes, en toneladas; entraba como hachazos seccionaba los árboles, cortaba las hierbas, horadaba los suelos y deshacía las zarzas. Y, pese a todo, ellos caminaban, buscando la luz, buscando el sol, buscando la vida”

— Ray Bradbury, *El hombre ilustrado*, “La larga lluvia”

Agradecimientos

Ciertamente es complicado resumir en unas pocas líneas, todo el cariño y apoyo que he sentido a lo largo de estos años. Ha sido un camino largo, y aunque duro muy emocionante. He madurado, crecido como profesional y como persona. Este apasionante viaje no habría sido el mismo sin las personas que me han acompañado.

Quiero comenzar por el principio y por ello agradecer a el Dr José Muñoz Dorado, la enorme oportunidad que me dio durante mi grado para comenzar en el apasionante mundo de la microbiología, así como Dr. Aurelio Moraleda y a la Dra. Juani Lopez, por inculcarme la pasión por la ciencia en mis primeras fases.

A mi directora de tesis Dra. Marta Hernández, por enseñarme todo, apoyarme en los momentos más difíciles e infundir en mi la confianza que en muchos momentos me ha faltado. Le estaré siempre agradecido, permitiéndome crecer como profesional y acompañándome en cada momento a pesar de las dificultades.

También quiero agradecer a el Dr. David Rodriguez Lazaro, por darme la oportunidad de vivir una de las experiencias más enriquecedoras de mi vida, en la Universidad de Medicina Veterinaria de Viena. Gracias a ello pude conocer al Dr Martin Wagner y Dra. Lauren V. Alteio, han sido pieza fundamental para concluir la presente tesis.

Quiero dedicar una mención especial a mi compañera y amiga Sonia, gracias por cada momento, por tu interés y por hacerme sentir, a pesar de la distancia, integrado en un genial equipo. Gracias Sonia.

Estas últimas líneas las quiero dedicar a mi familia y amigos, porque ellos son parte inseparable de quien soy. Voy a comenzar por Alexis y Alejandro, han sido y serán compañeros de vida, una pieza fundamental de ella, prácticamente

comenzamos juntos y continuaremos caminando. También a mi buen amigo Lino por su apoyo y compañía en todas nuestras locuras.

Y lo más importante, a mi familia. Quiero dar las gracias a mi tío Juan Jesús, porque gracias a él, y a sus apasionantes relatos cada verano, sembró en mí la semilla de la curiosidad científica. A mi hermana María, por cuidarme siempre, incluso a pesar de la distancia. A mi padre, José Manuel, por apoyarme en todos los momentos de mi vida, por ser el reflejo de todas las bondades a las que aspiro como persona, y por su amor incondicional. Y a mi madre, María José, por ser mi compañera inquebrantable en este viaje, y en todos los viajes de mi vida.

A todos vosotros, gracias de corazón.

Índice

1. Introducción.....	1
1.1. Cabaña ganadera en España y Castilla y León	1
1.2. Enfermedades de Declaración Obligatoria (EDO).....	4
1.3. Las enfermedades diarreicas neonatales bacterianas en ganado	6
1.4. El estudio de la composición bacteriana digestiva en porcino y rumiantes	10
1.4.1. Microbiota en ganado ovino	13
1.4.2. Microbiota en ganado bovino.....	15
1.4.3. Microbiota en ganado caprino.....	17
1.4.4. Microbiota en ganado porcino.....	18
1.5. El concepto “One Health” en el contexto actual	19
2. Objetivos	25
3. Material y Métodos	27
3.1. Materiales	27
3.1.1. Material para la toma de muestras	27
3.1.2. Medios de cultivo	27
3.1.3. Materiales utilizados para la aplicación de técnicas de biología molecular ..	28
3.1.3.1. Soluciones y tampones	28
3.1.3.2. Kits de extracción de ADN.....	30
3.1.3.3. Cebadores	31
3.1.4. Instrumentos	31
3.1.5. Bases de datos	34
3.2. Métodos	35
3.2.1. Muestreo	35
3.2.1.1. Área de estudio.....	35
3.2.1.2. Colección de muestras y cepario.....	36
3.2.1.3. Toma y conservación de muestras.....	39
3.2.2. Técnicas de cultivo microbiológico.....	41
3.2.2.1. Aislamiento microbiológico.....	41
3.2.2.3. Recuento microbiológico	44
3.2.3. Técnicas de biología molecular	46
3.2.3.1. Extracción y purificación de ADN	46
3.2.3.2. PCR.....	49
3.2.3.3. Electroforesis en gel de agarosa	50

3.2.3.4. Preparación de librerías para secuenciación	51
3.2.3.4.1. Librerías de amplicones del gen del ARNr 16S	51
3.2.3.4.2. Librerías de secuenciación de genoma completo	54
3.2.3.4.3. Desnaturalización y dilución de librerías para secuenciación.....	56
3.2.4. Procesamiento bioinformático	57
3.2.4.1. Análisis de genomas completos	57
3.2.4.2. Análisis de amplicones 16S	59
3.2.5. Análisis estadístico y gráfico	60
4. Resultados y discusión	63
4.1. Capítulo 1: El síndrome diarreico de la boca mojada etiología y factores ambientales.....	64
Summary	64
4.1.1. Contextualización y justificación del estudio	66
4.1.2. Objetivos.....	68
4.1.3. Muestreo	69
4.1.4. Resultados	70
4.1.4.1. Perfiles bacterianos en la enfermedad de la boca mojada	70
4.1.4.2. Identificación de los componentes de <i>Escherichia-Shigella</i> y <i>Clostridios</i> en corderos con boca mojada.....	81
4.1.4.3 Estudio de los puntos de contaminación	84
4.1.4.4. Medidas para el control del síndrome de la boca mojada	90
4.1.4.4.1. Tratamiento de la cama.....	91
4.1.4.4.2. Tratamiento del cordero.....	95
4.1.5. Discusión	96
4.1.6. Conclusions	102
4.1.7. Related Research Article.....	104
4.2. Capítulo 2: Sistemas de ordeño y la manipulación del calostro como agentes para la propagación de <i>Streptococcus dysgalactiae</i> causante de poliartritis y diarrea en ovino neonato.....	105
Summary	105
4.2.1. Contextualización y justificación del caso	107
4.2.2. Objetivos.....	110
4.2.3. Muestreo	111
4.2.4. Resultados	112

4.2.4.1. Identificación y caracterización del patógeno	112
4.2.4.2. Estudio de los focos de contaminación asociados al brote	115
4.2.5. Discusión	119
4.2.6. Conclusions	122
4.2.7. Related Research Article.....	123
4.3. Capítulo 3: Sistema de distribución de agua como difusor de <i>Streptococcus</i> <i>pasteurianus</i> causante de diarrea y meningitis en ovino	124
Summary	124
4.3.1. Contextualización y justificación del caso	126
4.3.2. Objetivos.....	127
4.3.4. Resultados	129
4.3.4.1. Identificación y caracterización del patógeno	129
4.3.4.2. Estudio de los focos de contaminación asociados al brote	132
4.3.5. Discusión	138
4.3.6 Conclusions	140
4.4. Capítulo 4: Caracterización de las diarreas neonatales en rumiantes y porcino	141
Summary	141
4.4.1. Contextualización y justificación del estudio.....	143
4.4.2. Objetivos.....	145
4.4.3. Muestreo	146
4.4.4. Resultados	148
4.4.4.1. Determinación de ASVs y análisis de la diversidad microbiana por especie	148
4.4.4.2. Estudio de la composición bacteriana en ovino.....	151
4.4.4.3. Estudio de la composición bacteriana en bovino.....	157
4.4.4.4. Estudio de la composición bacteriana en porcino	162
4.4.4.5. Estudio de la composición bacteriana en caprino.....	169
4.4.5. Discusión.....	171
4.4.6. Conclusions.....	176
5. Conclusions	179
Bibliografía	181
Bases de datos	202
Anexo I.....	204
Anexo II	232

1. Introducción

1. Introducción

1.1. Cabaña ganadera en España y Castilla y León

El sector ganadero constituye una actividad de amplia tradición en España, alcanzó su máximo apogeo con la consolidación del modelo industrial durante el periodo comprendido entre 1960 y 1985. Durante estos años, la producción cárnica experimentó un notable incremento, multiplicándose por cinco, mientras que la producción láctea se duplicó (Domínguez Martín, 2001).

Actualmente la cabaña ganadera nacional cuenta con un total de 55.98.711 cabezas de ganado según los resultados de las últimas encuestas ganaderas (S.G. de Análisis, Coordinación y Estadística, 2023). Esta cifra se distribuye en los cuatro principales subsectores productivos: 6.294.640 en bovino, 13.596.561 en ovino, 2.293.470 en caprino y 33.803.040 en porcino. En particular, la comunidad autónoma de Castilla y León alberga 1.417.241 bovinos, 2.147.532 ovinos, 135.432 caprinos y 4.622.581 porcinos, lo que hace de Castilla y León uno de los principales productores nacionales. Su participación en la producción ganadera nacional es del 22,51% en bovino, un 15,79% en ovino, un 5,90% en caprino y un 13,67 % en porcino.

En la Figura 1 se representa la densidad de ganado nacional por subsector productivo. Si atendemos únicamente a la comunidad de Castilla y León, podemos identificar una especialización a nivel provincial. Así, Salamanca destaca como la principal productora de ganado bovino, concentrando el 40% del total autonómico; en el subsector ovino, Zamora lidera, con un 23,72%; Segovia se posiciona como la principal productora de porcino, con un 29,29%; y en el subsector caprino, Ávila sobresale con un 47,24%.

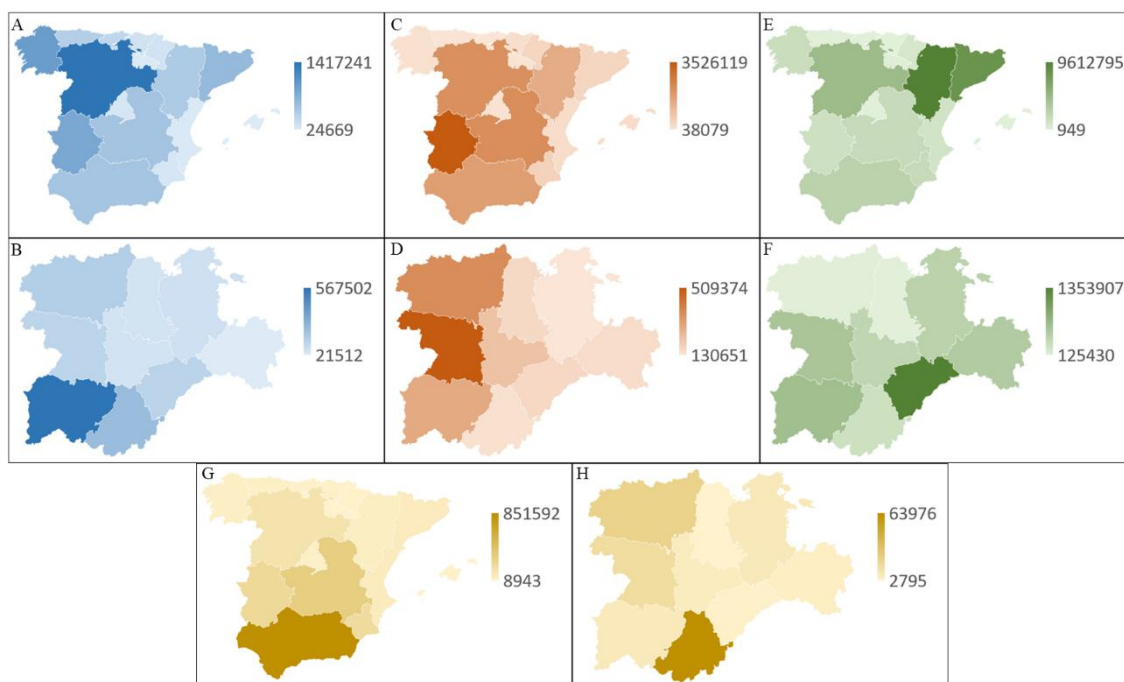


Figura 1. Mapa de calor del número de cabezas de ganado por subsector productivo a nivel peninsular y provincial en Castilla y León. Para ganado: bovino (A y B), ovino (C y D), porcino (E y F) y caprino (G y H).

El sector cárnico es de vital importancia debido al incremento constante de la población mundial, que ha sobrepasado los 8.000 millones de habitantes según las estimaciones del último informe de naciones unidas (Taagepera & Nemčok, 2023). Este crecimiento demográfico viene acompañado de un aumento sostenido en el consumo de carne. En el caso de España, el consumo ha aumentado desde 11,7 kg en 1970 a más de 65 kg en la actualidad (Ríos-Núñez et al., 2013).

A pesar del incremento constante en la demanda de productos ganaderos, en la actualidad existen en España unas 480.000 explotaciones ganaderas, lo que supone una reducción del 64% respecto 1999. Esta disminución ha afectado a todos los subsectores productivos: reduciéndose las explotaciones bovinas en un 54%, las ovinas y caprinas en torno al 50%, las producciones avícolas han disminuido un 96% y las porcinas un 84%. Estos datos contrastan con un incremento en el número de cabezas en determinadas especies como el bovino

(6,28%), el porcino (36,29%) y las aves de corral (16%). El aumento en la producción en determinados subsectores, junto a la reducción en el número de explotaciones señala un notable incremento en las dimensiones medias de las explotaciones ganaderas, llegando a valores que superan el 750% en porcino. El resto de los subsectores alcanzan también incrementos notables superando el 130% en bovino, al 102,74% en caprino y al 52,47% en ovino (Gamazo Chillón, 2022). Estos datos reflejan un cambio de paradigma en el modelo productivo ganadero en España, con una clara transición hacia sistemas de producción intensiva, en detrimento del modelo extensivo tradicional.

Tomando los datos de las encuestas ganaderas elaborada por S. G. de Análisis, Coordinación y Estadístico del Ministerio de Agricultura, Pesca y Alimentación, se presenta la evolución en los cuatro principales subsectores ganaderos en España (bovino, ovino, caprino y porcino), para los cuales se dispone de registros continuados desde 1999. Los datos se presentan en la Figura 2. Atendiendo a estos datos, las tendencias nacionales se reproducen en la comunidad autónoma de Castilla y León: se observa un incremento general en el número de cabeza de bovino y porcino, en cambio en ovino y caprino la tendencia es decreciente.

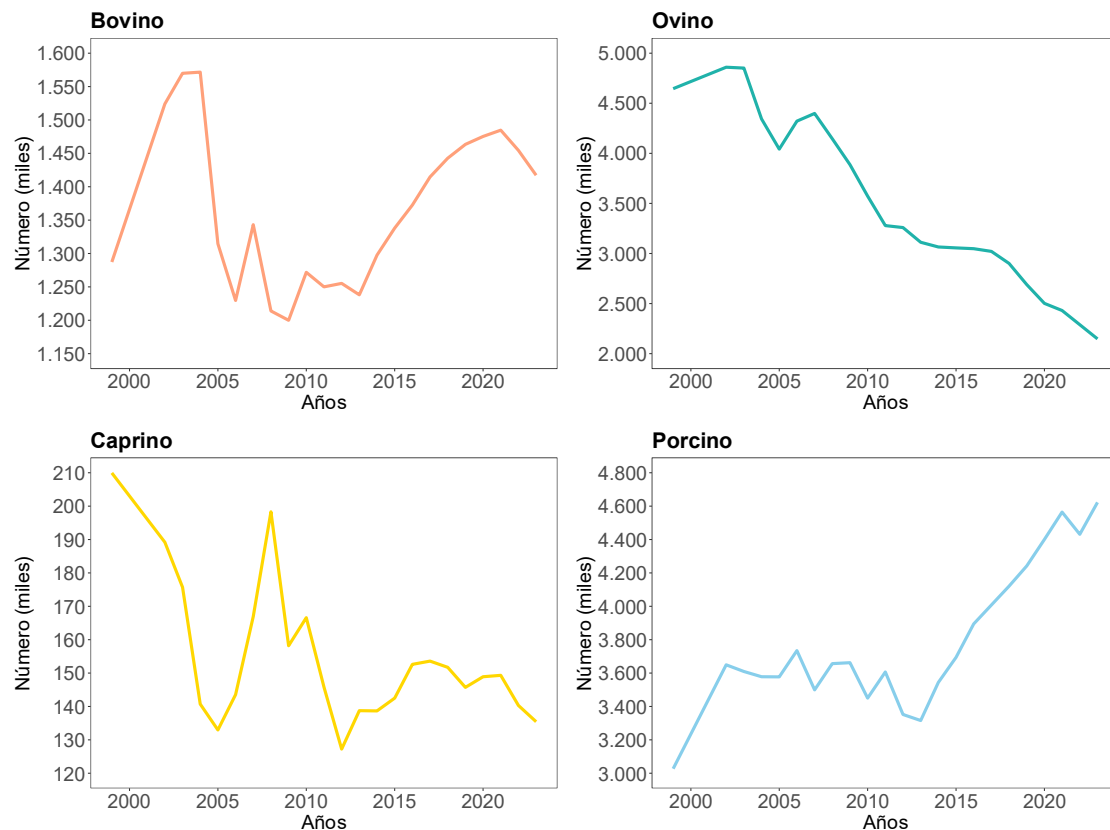


Figura 2. Tendencias en el número de cabezas por año en bovino, ovino, caprino y porcino, en Castilla y León

1.2. Enfermedades de Declaración Obligatoria (EDO)

España como estado miembro de la Unión Europea se rige por la política zoosanitaria comunitaria, que se aplica a todos los animales destinados a explotación ganadera, compañía, ocio y zoológicos. Su objetivo principal es garantizar un entorno europeo seguro para el humano y los animales, mediante la implementación de programas de control sanitario (Control Programmes, CPs). La ejecución de estos programas ha demostrado ser eficaz, contribuyendo a reducir las pérdidas directas por la enfermedad, ya sea por mortalidad o por disminución del rendimiento productivo. Además, reduce las pérdidas indirectas a consecuencia de las restricciones comerciales impuestas al ganado afectado (Tamba et al., 2021).

Actualmente la Unión Europea establece una lista de enfermedades de declaración obligatoria, la base legal que sustenta esta lista es el Reglamento (UE) 2016/429. En el Anexo II del artículo 5 de dicho reglamento se enumeran las enfermedades con este rango de distinción. La lista asciende a 39 enfermedades, de las cuales 11 son de origen bacteriano, lo que representa un 28 %. Sin embargo, la lista de la Organización Mundial de Sanidad Animal (WAGIS) es mucho más amplia, incluyendo 117 enfermedades de origen bacteriano. Esta diferencia sugiere que la lista europea podría ampliarse progresivamente en los próximos años. Atendiendo a los 5 últimos años, WAGIS ha registrado 138 brotes bacterianos de enfermedades de declaración obligatoria, sobre un total de 2.527 totales, lo que representa menos de un 5,5% (WAHIS, 2024). Esta baja proporción puede atribuirse, en parte, a la eficacia de los tratamientos antibióticos, que han facilitado el control de la mayoría de enfermedades bacterianas (Doron & Gorbach, 2008). No obstante, esta tendencia podría cambiar en los próximos años, debido a la creciente preocupación global por el aumento de las resistencias a los antibióticos. Según el centro para el control y prevención de enfermedades (CDC), en Estados Unidos, cada año más de 2 millones de personas padecen infecciones causadas por bacterias multirresistentes, con un saldo estimado de 23.000 muertes al año. Si esta proyección continua, se estima que para 2050 podrían producirse hasta 10 millones de muertes anuales asociadas a resistencias bacterianas, superando incluso las muertes causadas por el cáncer (Luepke et al., 2017).

Ante este escenario, resulta imprescindible avanzar en el desarrollo de nuevas herramientas para combatir con estos patógenos. Bajo esta perspectiva los últimos estudios ponen el foco en las herramientas de prevención y detección precoz, como las estrategias más eficaces para combatirlas, especialmente en el ámbito de la producción ganadera (Virto et al., 2022).

1.3. Las enfermedades diarreicas neonatales bacterianas en ganado

Las tasas de mortalidad en granjas durante el estado prenatal son muy altas, llegando hasta el 25% en corderos, un 50% en terneros, un 35% en lechones y 50 % en cabritos (Merlot et al., 2013). La causa de estas altas tasas de mortalidad es diversa, con un carácter multifactorial. Aunque todas comparten un denominador común, un mal manejo, lo que lleva a una exposición continuada a altas cargas bacterianas de origen fecal (Heinemann et al., 2021). Además del manejo, otros factores desempeñan un papel crucial en el desarrollo de brotes diarreicos, como el estado nutricional, el estado inmunológico y la diversidad de cepas entéricas. Por lo tanto, resulta esencial adoptar un enfoque integral que considere tanto el estado fisiológico del animal, como las características de los patógenos y del entorno en el que ambos interactúan (Barrington et al., 2002).

Atendiendo a los patógenos implicados, los principales agentes bacterianos responsables de las diarreas neonatales en ganado son *Escherichia coli*, *Clostridium perfringens* y *Clostridioides difficile*. Estas bacterias están asociadas a episodios diarreicos de elevada virulencia, cuya incidencia es especialmente alta en España (Vidal et al., 2019).

Uno de los principales agentes implicados en cuadros diarreicos es la especie *E. coli*. Esta bacteria está ampliamente distribuida, asociada frecuentemente con contaminación fecal. Se clasifica en diferentes patotipos dependiendo de sus factores de virulencia, mecanismos de infección, tropismo, interacción con las células del hospedador y sintomatología asociada. En términos generales se diferencian dos grandes grupos basados en su capacidad para causar infecciones en el sistema gastrointestinal (*E. coli* intestinal patogénica, IPEC) o fuera del sistema gastrointestinal (*E. coli* extraintestinal patogénica, ExPEC). Dentro de IPEC se han clasificado en los siguientes subgrupos: *E. coli*

enteropatógena (EPEC), frecuente en diarrea neonatal; *E. coli* enterohemorrágica (EHEC), causante de colitis hemorrágica y síndrome hemolítico urémico; *E. coli* enterotoxigénica (ETEC), siendo la mayor causa de diarrea del viajero; *E. coli* enteroagregativa (EAEC), causante de episodios de diarrea aguda y de la diarrea crónica; *E. coli* difusiva adherente (DAEC) asociada a casos de diarrea acuosa a temprana edad; *E. coli* enteroinvasiva (EIEC), causante de disentería y de diarrea acuosa; *E. coli* adherente-invasiva (AIEC) asociada con la enfermedad inflamatoria intestinal. Por su parte, el grupo ExPEC incluye los siguientes subgrupos: *E. coli* uropatógena (UPEC), causa común de infecciones urinarias; *E. coli* causante de la meningitis neonatal (NMEC), siendo una de las principales causantes de la meningitis neonatal; *E. coli* asociada a septicemia (SEPEC), causante de bacteriemia y sepsis; *E. coli* patógena aviar (APEC), causante de infecciones respiratorias severas e infecciones sistémicas en aves; *E. coli* patógena mamaria (MPEC) causante de cuadros de mastitis (Pokharel et al., 2023).

Si atendemos a los agentes causantes de enfermedades intestinales, cada una de ellas presenta una serie de factores de virulencia que las definen. Así EPEC, se caracteriza por su capacidad de adherirse al epitelio intestinal y generar lesiones características tipo *attaching and effacing*, gracias a la presencia de la isla de patogenicidad LEE, que contiene el gen *aea* codificante de intimina, clave en el proceso. ETEC, produce la toxina termoestable (ST) y/o la toxina termolábil (LT), responsable de la hipersecreción intestinal y la consiguiente diarrea acuosa. EIEC, presenta el plásmido de virulencia pINV que le permite invadir celulares epiteliales, así como la isla genómica SHI codificante de las toxinas de Shiga y de diversos genes implicados en la disrupción celular. Por su parte, EAEC se caracteriza por la presencia del gen *aggR*, que regula la producción de fimbrias agregativas que le permite adherirse al hospedador, así como la enterotoxina de Shiga 1 y el autotransportador Sat que contribuyen al daño tisular. DAEC, queda

definido por su perfil difuso a la hora de unirse a las células epiteliales, mediado por adhesinas de la familia Afa/Dr. EHEC, se caracteriza por codificar la toxina de Shiga (Stx), además del gen *ehxA* codificante de enterohemolisina, una citotoxina que potencia el daño epitelial. Finalmente, AEIC se distingue por su capacidad de adherirse e invadir tanto enterocitos como macrófagos, destacando entre sus factores de virulencia la expresión de pili tipo 1 (FimH), que expresan en su superficie y que le confieren una gran habilidad para unirse a los enterocitos. Así como el gen *gipA*, relacionado con la resistencia al estrés oxidativo, siendo asociada a su capacidad para sobrevivir dentro de los macrófagos (Palmela et al., 2018; Sora et al., 2021).

Otro de los principales patógenos bacterianos asociados a cuadros diarreicos es *C. perfringens*. Esta bacteria se clasifica tradicionalmente en función de sus toxinas, ya que le confieren capacidad para causar diferentes síndromes. Tradicionalmente se definen 5 toxinotipos, en función de las toxinas mayores producidas (α , β , ϵ y ι). El toxinotipo A es el más frecuente, se caracteriza por la producción de la toxina mayor α y de diversas enzimas hidrolíticas, está asociado frecuentemente a diarreas en animales. El toxinotipo B, caracterizado por la presencia de las toxinas α , β y ϵ , siendo responsable de cuadros de enteritis hemorrágica. El toxinotipo C, que genera toxinas α y β , se vincula comúnmente con enteritis necrótica. Por su parte, el toxinotipo D, que produce las toxinas α y ϵ , está asociado con enterotoxemia neonatal. El toxinotipo E, con la presencia de las toxinas α y ι , característico en casos de enterotoxemia en terneros (Petit et al., 1999). Recientemente, dos nuevos toxinotipos han sido añadidos por Rood et al. (2018). El toxinotipo F, que engloba a aquellas cepas productoras de la enterotoxina CPE, pero no de la α , ϵ y ι , estas cepas se asocian principalmente con infecciones relacionadas con el uso de antibióticos y toxiinfecciones alimentarias. Finalmente, el toxinotipo G, caracterizado por la presencia de la

toxina formadora de poros NetB, junto con la toxina α , es responsable de enterocolitis necrótica en aves.

C. difficile es el tercer mayor agente bacteriano asociado a diarreas neonatales. Este microorganismo produce tres toxinas principales: la toxina A (TcdA), la toxina B (TcdB) y la toxina transferasa (CDT). Las toxinas TcdA y TcdB se unen a receptores específicos de la membrana celular, son internalizadas y alteran la organización del citoesqueleto celular, lo que provoca daños en la integridad de la mucosa intestinal. Por su parte, CDT induce la despolimerización de actina, aunque su función exacta a nivel celular aún no está completamente clara (Aktories et al., 2017). Se han identificado cepas causantes de toxiinfecciones con la presencia de una, dos o las tres toxinas, aquellas cepas que carecen de alguna de estas toxinas se consideran no toxigénicas (Weese, 2020).

A pesar de que algunas afecciones se asocian claramente a un agente etiológico único, es muy frecuente en el estudio de muchas patologías, que lleven asociado alteración en la composición normal de la microbiota. De este modo la enfermedad diarreica neonatal suele llevar asociada un incremento de la abundancia de unos grupos bacterianos sobre otros, estos desequilibrios se conocen por el término disbiosis (Hrncir, 2022). Una definición más completa es dada por algunos autores como Buttó & Haller (2016) que la definen “como una alteración en la función o estructura de la comunidad microbiana, que ocasiona una distorsión en la homeostasis huésped-microbio generando un estado de enfermedad en el hospedador”.

Son numerosos los artículos que han explorado la disbiosis, y su asociación con diversas patologías, tanto en humanos como en animales. En las primeras investigaciones no fue posible establecer una relación clara, debido a que los estudios se basaban en el recuento directo microbiológico, métodos que

carecen de la resolución necesaria para abordar la complejidad de la microbiota intestinal (German et al., 2003). Sin embargo, el desarrollo de las tecnologías de secuenciación, en particular la secuenciación del gen codificante del ARNr 16S como una técnica estandarizada, ha permitido caracterizar con mayor precisión la composición bacteriana y establecer asociaciones sólidas entre alteraciones en la microbiota y enfermedades como la enfermedad inflamatoria intestinal (IBD), la colitis granulomatosa, el síndrome del intestino irritable (IBS), así como con distintos cuadros de diarrea aguda (Suchodolski, 2016).

A la hora de determinar los perfiles bacterianos asociados a estados patológicos, resulta fundamental establecer lo que se consideraría una microbiota “normal” o “basal” en las diferentes especies animales. Esta tarea continúa siendo objeto de investigación, dada la elevada variabilidad interindividual, interespecie y la influencia de factores como la dieta, la edad, el entorno y el estado fisiológico del hospedador. No obstante, en el próximo apartado, se presentarán algunas nociones generales sobre la composición de la microbiota intestinal en las especies abordadas en este estudio, basadas en hallazgos recientes en este campo. El objetivo es proporcionar un contexto adecuado que permita interpretar los perfiles bacterianos asociados a enfermedad.

1.4. El estudio de la composición bacteriana digestiva en porcino y rumiantes

El tracto digestivo constituye el principal factor estructural determinante en la producción animal, siendo esta región de la economía orgánica la más estudiada en publicaciones científicas sobre microbiología animal (Forcina et al., 2022).

Las distintas especies de ganado presenta diferencias en sus composiciones intestinales, principalmente se diferencian rumiantes, con un

estomago compuesto dividido en varios compartimentos (retículo, rumen, omaso y abomaso), de desarrollo más lento y con equilibrios mayores en su microbiota, de aquellos animales monogástricos con un desarrollo más rápido (Forcina et al., 2022).

Es cierto que la mayoría de los estudios relacionados con la microbiota se han focalizado en el rumen. Ya que constituye el principal órgano productor de ácidos grasos volátiles constituyendo hasta el 80% de la energía del hospedador (McLoughlin et al., 2020). Aunque en los últimos años, ha aumentado el interés por el estudio integral de la microbiota intestinal. Esta perspectiva reconoce la relevancia de la composición bacteriana a lo largo de todo el intestino, otorgándole un papel fundamental para la salud y el rendimiento productivo.

Como es habitual en el ámbito de la investigación veterinaria, los estudios de microbiota intestinal han ido precedidos a avances relativos en investigación humana. Donde existen numerosos ejemplos, que evidencian el papel crucial de la microbiota en la salud. Destacado su papel en la obesidad (Gérard, 2016), diabetes (Caricilli & Saad, 2013), enfermedad inflamatoria intestinal (Caricilli & Saad, 2013), implicación en alteraciones cardiovasculares (Yoshida et al., 2018), esclerosis múltiple (Cossu et al., 2018) y desordenes en el sistema nervioso central (Tiwari et al., 2023). En un principio los estudios se enfocaban en buscar asociaciones entre microorganismos específicos y determinadas enfermedades. Sin embargo, cada vez es mayor el número de investigaciones que vinculan algunas enfermedades a alteraciones en la homeostasis de la microbiota normal, fenómeno conocido como disbiosis (Levy et al., 2017).

Tal como indica Levy et al. (2017), podemos encontrar tres diferentes tipos de disbiosis. El *“Boom de patobiontes”*, en la que miembros de la microbiota comensal que están en muy baja abundancia, tienen la capacidad de producir una enfermedad si se produce un incremento masivo de ellos. Es muy característico

el caso de la familia *Enterobacteriaceae*, estando asociado a enfermedad entérica (Baldelli et al., 2021). La “*Reducción de comensales*”, en este caso la situación es la opuesta, siendo la reducción de bacterias comensales la que define este grupo. Concretamente bacterias que juegan un papel importante en el metabolismo del hospedador, además de actuar como barrera natural a la proliferación de patógenos. Aquí tenemos el caso de la reducción de *Lactobacillus reuteri* y *Bacteroides fragilis*, relacionados con enfermedades inflamatorias, atribuidos a la reducción de metabolitos producto de ambos comensales y a la barrera natural que ejercen ante otros patógenos (Mu et al., 2018; F. Sun et al., 2019). Finalmente, “*Pérdida de diversidad*”, entendiendo el término diversidad desde el punto de vista del número de especies y la equidad que estas representan en cuanto a abundancia relativa, dentro de la comunidad microbiana. De modo que una disminución de la diversidad, se ve asociada con estados de enfermedad en el hospedador (Le Chatelier et al., 2013).

La caracterización de la microbiota de las diferentes especies, ha requerido ir acompañada de los avances tecnológicos. En un comienzo, los estudios se basaban en el aislamiento, pero esto supone que las bacterias sean capaces de crecer en un medio enriquecido. Generando el rápido crecimiento de una pequeña porción de la comunidad original, que inhibe al resto, impidiendo su detección (Deusch et al., 2015). Por lo que a la hora de estudiar las comunidades bacterianas en su conjunto se ha requerido de nuevos acercamientos. Destacando la secuenciación del gen ARNr 16S (16S). Que comenzó por los pioneros Carl Woese y George Fox en el uso del gen ARNr 16S para clasificar las bacterias metanogénicas (Fox et al., 1977), hasta el desarrollo de las modernas técnicas de secuenciación masiva que han llevado a la descripción de comunidades bacterianas completas sin necesidad de requerir al aislamiento (Church et al., 2020). La aplicación de los estudios basados en secuenciación 16S ha supuesto una auténtica revolución en ecología microbiana, especialmente en el área del

estudio de la composición bacteriana intestinal. Suponiendo en muchos casos un primer acercamiento a la hora de caracterizar las comunidades y que permite, estudios más dirigidos, con la secuenciación de genoma completo de aislados y caracterización fenotípica posterior (Purushothaman et al., 2022).

A pesar del gran potencial que supone el uso de la secuenciación 16S, presenta una importante limitación a la hora de establecer la microbiota bacteriana intestinal. Los estudios que han empleado esta técnica no alcanzan una resolución mayor a género en la mayoría de los casos (Poretsky et al., 2014). Atendiendo a esta limitación, los estudios de diversidad bacteriana a la hora de acercarse a la resolución de especie tienden a dos estrategias. La primera de ellas se basa en la combinación de la secuenciación 16S y el estudio mediante aislamiento bacteriano de grupos concretos, adaptando las condiciones de aislamiento al grupo estudiado. Por otro lado, el empleo de las técnicas de secuenciación metagenómica, con el ensamblado de genomas a partir de metagenomas (MAG) (Bergsten et al., 2020). Este estudio siguió el primer enfoque, dadas las dificultades asociadas a la eliminación de la contaminación por parte del hospedador y los altos costos que ello implica. En este contexto, la secuenciación del ARN 16S se considera una herramienta más adecuada y sobre todo más económica, para analizar simultáneamente un gran número de muestras de naturaleza diversa. Además, su implementación resulta más viable en condiciones de campo (McArdle & Kaforou, 2020).

1.4.1. Microbiota en ganado ovino

A pesar de que los estudios sobre la microbiota en ovinos aún son relativamente escasos, su importancia ha ido en aumento debido a la creciente evidencia sobre el papel clave que desempeña en la salud y productividad de estos animales (McLoughlin et al., 2020).

Atendiendo a los estudios de ARNr 16S podemos señalar a grandes rasgos que la microbiota intestinal presenta en ovino dos filos principales *Bacteroides* y *Firmicutes* constituyendo el 90 % de la composición bacteriana total. Dentro de estos filos, las clases dominantes son *Bacteroidia* y *Clostridia*, respectivamente. A nivel de orden, dentro del filo *Bacteroidetes*, predomina *Bacteroidales*, mientras que en el filo *Firmicutes* los órdenes más representativos son *Clostridiales*, *Eubacteriales* y *Lactobacillales*. En cuanto al nivel taxonómico de familia sobresalen *Ruminococcaceae* y *Lachnospiraceae*, seguido por *Prevotellaceae*, *Rikenellaceae*, y *Succinivibrionaceae*. Finalmente, entre los géneros bacterianos más abundantes destacan *Prevotella*, *Acinetobacter*, *Campylobacter*, *Bacteroides*, *Desulfovibrio*, *Oscillospira*, *Ruminococcus*, *Treponema*, *Fibrobacter* y *Succinivibrio* (Forcina et al., 2022).

Algunos autores han realizado algún acercamiento para intentar establecer la diversidad en la composición bacteriana intestinal a lo largo del tracto digestivo de ovino. Un ejemplo destacado es el estudio de Ma et al. (2022), encontraron una composición intestinal muy diferente entre el intestino delgado y grueso. Siendo las familias identificadas más abundantes en intestino grueso *Ruminococcaceae*, *Christensenellaceae*, *Lachnospiraceae*, *Rikenellaceae*, y *Akkermansiaceae* ocupando el 65% de la composición bacteriana total. Por su parte, en el intestino delgado *Burkholderiaceae*, *Ruminococcaceae* y *Saccharimonadaceae* fueron las familias dominantes. Recientemente un estudio ha determinado la composición estomacal, destacando en abomaso el género *Prevotella*, asociado con la capacidad para degradar la fibra vegetal y la producción de ácido propiónico (Y. Zhang et al., 2025).

Aunque se reconoce que la microbiota intestinal evoluciona a lo largo del tiempo, son escasos los autores que han abordado este proceso de manera detallada. En este contexto Huang et al. (2022), estudiaron la microbiota

bacteriana fecal mediante análisis 16S en corderos de la raza Hu, en China, a los 7, 21, 35 y 49 días tras el nacimiento. Pudiendo determinar variaciones entre los periodos muestreados, con una disminución acusada de familias y géneros como *Lachnospiraceae* y *Clostridium* a medida que avanzaba la edad de los corderos. Por el contrario, otros grupos bacterianos como *Bifidobacterium* y *Bacteroides* mostraron un incremento progresivo, lo que refleja una sucesión microbiana asociada al desarrollo fisiológico y cambios en la dieta durante las primeras semanas de vida. Concretamente estos dos últimos grupos se han identificado como bacterias probióticas y beneficiosas, debido a su potencial como agentes limitadores de otros grupos bacterianos (F. Zhang et al., 2020). En términos generales la diversidad bacteriana aumenta con la edad, siendo esto signo de estabilidad, aumentando el número de taxones, y disminuyendo la dominancia general de unos grupos sobre otros (Huang et al., 2022).

1.4.2. Microbiota en ganado bovino

La composición bacteriana gastrointestinal en bovino ha sido ampliamente estudiada especialmente en el rumen debido a su asociación con incrementos productivos (Zeineldin, Barakat, et al., 2018). Los principales filos presentes en el rumen atendiendo a las secuencias de GenBank son los *Firmicutes* y los *Bacteroidetes*, la predominancia de ambos grupos se asocia a con su importante papel en la degradación de la pared celular del tejido vegetal. Siendo la mayoría de las secuencias de *Firmicutes* asignadas a las clases *Clostridia*, *Bacilli*, y *Erysipelotrichi*. Como géneros principales destacan *Butyrivibrio*, *Acetivibrio*, *Ruminococcus*, *Succinivibrio*, *Pseudobutyrovibrio* y *Mogibacterium*. Por su parte, la mayor parte de las secuencias del filo *Bacteroides* son asignadas a las clases *Bacteroidia* y *Sphingobacteria*, con *Prevotella* como género más abundante (Zeineldin, Barakat, et al., 2018).

A los estudios del rumen, han sucedido estudios enfocados en caracterizar la microbiota intestinal de bovino. Este es el caso del estudio por Mao et al. (2015), donde se estudió la composición bacteriana hasta nivel de género, observando una variación notable entre los distintos segmentos. En el abomaso, los géneros más abundantes fueron *Ruminococcaceae*, *Butyrivibrio* y *Lachnospiraceae*; en duodeno, predominaron *Enterobacteriaceae*, *Butyrivibrio* y *Lachnospiraceae*; en el yeyuno, se identificaron como principales géneros *Enterobacteriaceae*, *Butyrivibrio* y *Acetitomaculum*; mientras que en el íleon destacaron *Peptostreptococcaceae*, *Enterobacteriaceae* y *Turicibacter*. En ciego, los géneros más representativos fueron *Peptostreptococcaceae*, *Enterobacteriaceae* y *Turicibacter*; en el colon, *Peptostreptococcaceae*, *Turicibacter* y *Enterobacteriaceae*; y en el recto, *Peptostreptococcaceae*, *Clostridium* y *Turicibacter*. Poniendo de manifiesto la complejidad y especificidad espacial de la microbiota a lo largo del tracto gastrointestinal de bovino.

Recientemente un estudio de Zhuang et al. (2024) han determinado la evolución temporal de la microbiota intestinal en terneros, empleando secuenciación 16S. Atribuyendo a los géneros *Achromobacter* y *Corynebacterium* como los dominantes en los neonatos, siendo sustituidos a los 7 días de edad por *Collinsella* y *Escherichia-Shiguella*. Posteriormente a los 35 días de edad *Bifidobacterium* y *Lactobacillus* constituyen los grupos más abundantes. Finalmente, *Blautia* y *Bacteroides* son los grupos mayoritarios a los 70 días de edad. Los autores señalan el papel crucial que representan *Bifidobacterium* para el crecimiento y el desarrollo normal del individuo, demostrando su uso como probiótico en ratones.

1.4.3. Microbiota en ganado caprino

Los estudios sobre ganado caprino son muy escasos, en parte debido al carácter recesivo que vive el sector (Dubeuf et al., 2004). A pesar de ello en un reciente estudio Wu et al. (2024) se han descrito los grupos bacterianos más abundantes presentes en su composición bacteriana fecal, a lo largo de su desarrollo. Estando mayoritariamente compuesta por los filos *Firmicutes*, *Proteobacteria* y *Bacteroidetes*, con variaciones a lo largo del tiempo. En los animales recién nacidos, *Proteobacteria* es el filo dominante, representando el 72,54 % de la comunidad; sin embargo, su prevalencia disminuye rápidamente tras el nacimiento, siendo reemplazada por *Firmicutes* y *Bacteroidetes*. En particular, *Firmicutes*, inicialmente minoritario, experimenta un incremento notable a partir de los 7 días de edad, alcanzando el 74,36 % del total de la microbiota a los 35 días.

Otros estudios se han focalizado en determinar la composición intestinal a lo largo del digestivo como los estudios de L. Wang et al. (2019). Señalando a *Prevotella* y *Bacteroidales* como los taxones mayoritarios en rumen y abomaso. Los autores señalan que la presencia de ambos taxones en altas proporciones en el rumen y abomaso puede deberse a su alta capacidad para degradar polisacáridos y proteínas complejas. En el yeyuno, los géneros predominantes fueron *Ruminococcus*, *Clostridiales* y *Butyrovibrio*, mientras que en el colon y el ciego destacaron *Ruminococcaceae* y *Clostridiales*. Los autores atribuyen a estos grupos bacterianos intestinales un importante papel en el metabolismo de los carbohidratos.

1.4.4. Microbiota en ganado porcino

A diferencia de los tres anteriores, el porcino es un animal monogástrico, lo que implica requerimientos nutricionales distintos a los de los rumiantes, como el ovino y el caprino. Esta diferencia fisiológica repercute directamente en la composición y dinámica de su microbiota intestinal. Al no poseer un sistema digestivo especializado en la fermentación de la fibra, como ocurre en los rumiantes, la comunidad bacteriana del tracto digestivo porcino presenta una estructura distinta (Hermann-Bank et al., 2015), adaptada a una digestión más eficiente de nutrientes fácilmente disponibles como almidones y proteínas.

Las diferencias composicionales bacterianas en cerdo adulto entre intestino delgado y grueso han sido descritas por W. Zhao et al. (2015). Estos identificaron como taxones más abundantes en intestino delgado: *Escherichia* (29,01%), *Acinetobacter* (20,22%), *Enterobacteriaceae* (15,04%) y *Psycrobacter* (6,63%), reflejando un perfil microbiano caracterizado por bacterias adaptadas a condiciones más aeróbicas y con un tránsito rápido. En contraste, en el intestino grueso se observó un predominio de bacterias anaerobias especializadas en la fermentación de compuestos complejos, destacando el orden *Clostridiales* (33,89 %) y la familia *Ruminococcaceae* (8,42 %). Estos resultados evidencian la diferenciación funcional y composicional de la microbiota a lo largo del sistema digestivo porcino.

A pesar de no tener un proceso de transformación digestivo tan acusado como en el caso de los rumiantes, se ha determinado una evolución de la composición bacteriana a lo largo de la edad. En especial durante el primer año de vida la microbiota se encuentra en constante evolución, partiendo de una escasa diversidad. Esta carencia de diversidad es una de las razones por las que los neonatos son más susceptibles a las infecciones (Luo et al., 2022). A nivel de género durante la primera semana de vida, *Bacteroides*, *Escherichia* y *Clostridium*

son los tres géneros más abundantes. A partir de la segunda semana, el género *Prevotella* se convierte en el tercer género más abundante, y aumenta de forma progresiva con la edad hasta convertirse en el género dominante tras 21 días de edad. Según Luo et al. (2022) este hecho puede deberse a las variaciones en la dieta que sufre el neonato. Los *Bacteroides* presentan una buena habilidad para descomponer diferentes fuentes de azúcares, ayudando al neonato a utilizar de forma más efectiva los carbohidratos derivados de la leche. En cambio, *Prevotella* está asociada con el incremento de carbohidratos más complejos, con una gran capacidad para metabolizar polisacáridos. Otros géneros como *Blautia*, *Paraprevotella*, *Oscillibacter*, *Roseburia*, *Ruminococcus*, *Oscillospira*, *Coprococcus*, *Faecalibacterium* y *Treponema* aumentan con la edad. Mientras que *Bacteroides*, *Parabacteroides*, *Fusobacterium*, *Lactobacillus*, *Anaerotruncus*, *Butyricimonas*, *Streptococcus*, *Clostridium* y *Escherichia* disminuyen (Luo et al., 2022; W. Zhao et al., 2015).

1.5. El concepto “One Health” en el contexto actual

El término “One Health” comenzó a utilizarse a finales de los años 90, ante la amenaza del virus de la influenza aviar H5N1, altamente patógeno. Con el fin de abordar el problema de manera multidisciplinar, entre los profesionales e instituciones relacionadas con la salud pública y animal, ofreciendo una solución integradora al problema (Mackenzie & Jeggo, 2019). Finalmente esta visión quedó coordinada por el denominado “tripartito” compuesto por la Organización Mundial de la Salud (OMS), la Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación y la Agricultura (FAO) y la organización mundial de la Sanidad Animal (OIE). Con tres líneas principales de actuación: la rabia, los virus zoonóticos de la influenza y la resistencia a los antibióticos. Actualmente, el término “One Health” se puede definir Adisasmito et al. (2022) como: “Un

enfoque unificado e integrador que pretende mantener un balance entre la salud humana, animal y de los ecosistemas. Reconociendo la estrecha relación existente entre la salud humana y animal, así como vegetal, estando todas estrechamente vinculados y siendo interdependientes las unas de las otras” (Adisasmito et al., 2022).

El término ha ganado gran relevancia en especial con la transmisión de enfermedades infecciosas desde los animales al ser humano, en el reporte “Asian Pacific strategy for emerging disease: 2010” se concluyó que el 60% de las enfermedades emergentes humanas eran zoonóticas. Este término hace referencia a cualquier enfermedad que es naturalmente transmisible desde animales a humanos o desde humanos a animales (Rahman et al., 2020). El concepto ha sido recientemente reforzado a consecuencia de la pandemia del COVID-19, que ha supuesto grandes pérdidas humanas y económicas a nivel global, lo que ha activado las alarmas sobre el impacto que pueden ejercer sobre nuestra civilización (Moriel et al., 2024).

A lo largo de los últimos 100 años desde el descubrimiento de los primeros antibióticos las resistencias a estos han incrementado de forma alarmante. Cada vez son más frecuentes las bacterias aisladas de centros hospitalarios con múltiples mecanismos de resistencia, las llamadas “superbacterias”. Esto dificulta su tratamiento y aumenta la mortalidad, así como los costes humanos (Moriel et al., 2024). El impacto de estas superbacterias, es considerado como un riesgo de primer nivel, la organización mundial de la salud (OMS), estima que en 2019 se dieron 5 millones de muertes asociadas a resistencia antimicrobiana (AMR). Los datos cada vez son más alarmantes siendo consideradas por gran parte de la comunidad científica con potencial para desencadenar una nueva pandemia en el futuro (Murray et al., 2022).

Las pandemias generalmente se asocian a virus, pero la historia nos indica lo contrario. Las pandemias bacterianas han marcado el curso de la historia, como es el caso de *Yersinia pestis* o *Vibrio cholerae* (BRUBAKER, 2002; Mutreja et al., 2011). *Y. pestis* es un agente zoonótico que se transmite de animales a humano a través de la picadura de las pulgas infectadas, así como contacto con material infectado o por inhalación. Se presenta en tres formas: bubónica, septicémica y neumónica respectivamente. La más común fue la bubónica, causando la muerte de alrededor de 100 millones de muertes en el imperio Romano (541-543 dC), entre 15 a 23.5 millones de muertes en Europa (1347-1351 dC) y alrededor de 12.5 millones en India (1898-1918 dC) (BRUBAKER, 2002).

En el caso del cólera, es una enfermedad diarreica causada por la contaminación de agua por *V. cholerae*. Este agente produce la toxina colérica, responsable de una fuerte diarrea y muerte por deshidratación. Durante 900 años el cólera se ha diseminado alrededor de todo el mundo desde su reservorio original en la India, en el río Ganges. Causando millones de muertes alrededor del mundo a través de 7 grandes pandemias coléricas, estando inmersos en la última de ellas actualmente (Mutreja et al., 2011).

Una serie de brotes bacterianos más recientes están alertando a las autoridades sanitarias en todo el mundo. Dentro de ellos destacan los causados por *E. coli* EHEC, agente etiológico de la colitis enterohemorrágica. Generando en Japón más de 8000 casos en 1996 y en Alemania su serotipo 0104:H4, más de 3000 casos en 2011 por intoxicación toxialimentaria. El alto número de casos se suma a las crecientes tasas de mortalidad pasando de 1.1. muertes cada 100.000 habitantes, frente a los 0,1 registrados entre 2001 y 2010 (Moriel et al., 2024). Quizás lo más alarmante sea el progresivo incremento de las AMR, uno de los principales ejemplos es la expansión de los estreptococos del grupo A resistentes a múltiples antibióticos. Actualmente presentan un carácter emergente, las

resistencias a antibióticos, siendo el 53% de los aislados resistentes a macrólidos, el 33% resistentes a la clindamicina, y el 58% resistentes a la tetraciclina. En China las resistencias a las fluoroquinonas, contándose en el 1,3% de los aislados clínicos de estreptococos del grupo A (Murray et al., 2022). Considerando estos suponen aproximadamente 800 millones de casos al año, estas resistencias se esperan que sean mucho mayores en el corto plazo.

A nivel porcentual los 10 principales agentes AMR, con mayores tasas de mortalidad son: *E. coli*, *Staphylococcus aureus*, *Klebsiella pneumoniae*, *Streptococcus pneumoniae*, *Acinetobacter baumannii*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Mycobacterium tuberculosis*, *Enterococcus faecium*, *Enterobacter spp* y el grupo B de *Streptococcus* (Moriel et al., 2024). Uno de los principales reservorios de estos patógenos, son los animales domésticos. Se considera que cerca del 60% de las infecciones humanas tienen origen en animales vertebrados, como el antrax, la tuberculosis, la brucelosis, la campilobacteriosis o la listeriosis. Esto es especialmente preocupante en las explotaciones ganaderas, siendo uno de sus principales orígenes de estas patologías (Rahman et al., 2020)

El uso de antibióticos en animales de granja, no se ha utilizado únicamente para tratar patologías concretas, sino que su uso como profiláctico ha sido muy extendido. Con un incremento en su uso cercano al 26% desde 2009 al 2015. Además, se ha reportado en numerosas ocasiones que muchas explotaciones están actuando como reservorios de AMR. Por ejemplo, un estudio en producción de carne de ave en Turquía identificó que 67,5% de los *S. aureus* aislados eran resistentes a la meticilina y el 85% a la batracina (Gundogan et al., 2005). Otro estudio en Estado Unidos, en granjas de ovino encontró que el 45% de los trabajadores fueron colonizados por una cepa de *S. aureus* resistente a la meticilina que a su vez estaba presente en los animales de la explotación, confirmando la contaminación cruzada (Smith et al., 2009). En general son

muchos los estudios que confirman esta transmisibilidad al humano y la necesidad de tomar medidas de control y prevención (Landers et al., 2012). El uso de antibióticos como profilácticos en veterinaria fue restringido en la Unión Europea a partir del 28 de enero de 2022, con la entrada en vigor del Reglamento (UE) 2019/6 sobre medicamentos veterinarios.

Aunque es uno de sus pilares, la estrategia One Health no se centra únicamente en las zoonosis, donde es evidente el daño que pueden ocasionar al ser humano, sino que también abarca aquellas enfermedades no transmisibles al hombre pero que afectan negativamente la salud y productividad animal. Estas enfermedades pueden provocar una disminución en la producción ganadera, reduciendo la calidad nutricional de los alimentos de origen animal y, en consecuencia, impactando la nutrición humana. Este aspecto es especialmente relevante en los países en vías de desarrollo, donde el ganado representa una fuente clave de nutrientes esenciales. Según la Organización Mundial de Sanidad Animal (WOAH), más del 20% de las pérdidas mundiales en la producción animal se atribuyen a enfermedades animales, lo que constituye una amenaza directa para los ingresos y la seguridad alimentaria de las comunidades rurales que dependen del ganado.

Sin embargo, la estrategia One Health aún se encuentra en fases tempranas de implementación y enfrenta numerosos desafíos para alcanzar una dimensión verdaderamente efectiva. Para lograrlo, es imprescindible fortalecer la colaboración y coordinación entre todos los sectores involucrados —salud humana, salud animal, salud ambiental, producción agropecuaria y sanidad pública—, promoviendo un enfoque integrador que permita anticiparse a las amenazas sanitarias, mejorar la eficiencia en la gestión de recursos y reducir los riesgos tanto para la salud global como para la seguridad alimentaria (Destoumieux-Garzón et al., 2018).

2. Objetivos

2. Objetivos

La presente tesis doctoral se constituye bajo el objetivo general de aportar una visión más amplia sobre el estudio de las diarreas neonatales en España y particularmente en la comunidad autónoma de Castilla y León. Con un especial énfasis en el potencial como herramienta clínica de la secuenciación masiva en el estudio de brotes diarreicos en explotaciones ganaderas de carácter intensivo. En el primer capítulo se estudia la principal enfermedad diarreica asociada a ovino neonato, para la caracterización de la microbiota intestinal asociada y el estudio de las principales vías de diseminación en las explotaciones ganaderas. Los dos capítulos posteriores, se centran en la resolución de dos brotes diarreicos, en los que se caracterizan nuevas formas de diseminación de patógenos diarreicos. Finalmente se describen los principales perfiles bacterianos encontrados en animales diarreicos en la comunidad de Castilla y León, para los cuatro subsectores productivos principales: ovino, bovino, porcino y caprino. Con un carácter general se proponen los siguientes objetivos:

1. Determinar perfiles composicionales bacterianos asociados a diarreas neonatales en Castilla y León
2. Identificar posibles vías de contaminación por bacterias diarreicas en explotaciones ganaderas
3. Desarrollar medidas de control y manejo eficientes en las explotaciones ganaderas afectadas por diarreas neonatales
4. Señalar el potencial de la secuenciación masiva, en la identificación y resolución de casos clínicos asociados a diarreas neonatales en explotaciones ganaderas

3. Material y Métodos

3. Material y Métodos

3.1. Materiales

3.1.1. Material para la toma de muestras

Debido a la naturaleza variable de las muestras empleadas en el trabajo se han empleado distintos materiales para el muestreo y transporte de las mismas. En la Tabla 1 se presentan los materiales y el objetivo de muestreo.

Tabla 1. Material empleado para la toma y transporte de muestras

Material	Objetivo
Transport Swab Amies (Deltalab)	Aislamiento bacteriano
Collection Swab (Deltalab)	Secuenciación 16S/Aislamiento de esporulados
Sample Bag (Whirl-Pak)	Muestreo de camas/Transporte de hisopos
Oxoid AnaeroGen (Thermo Scientific)	Generación de ambiente anaerobio
Corning Storage Bottle (Sigma-Aldrich)	Transporte de muestras de agua
Syringe PP/PE (Sigma-Aldrich)	Extracción de sangre
MF-Millipore Filter 0.22 µm (Merck)	Aislamiento bacteriano/16S
Microtubos de rosca (Deltalab)	Homogeneización de muestras para secuenciación del ARNr 16S
Zirconia Beads 1mm día (BioSpec)	Homogeneización de muestras para secuenciación ARNr 16S
Frasco espátula para heces (Deltalab)	Toma de heces

3.1.2. Medios de cultivo

A lo largo del presente trabajo se han empleado diversos medios de cultivo, selectivos y diferenciales, con el objeto del aislamiento y recuento de microorganismos. En la Tabla 2 se presentan los medios de cultivo empleados, así como su objetivo de uso.

Tabla 2. Medios de cultivo empleados en el desarrollo de la tesis doctoral

Medio de cultivo	Objetivo
MacConkey Agar (Oxoid)-MC	Aislamiento y recuento de coliformes
Tryptone Bile X-Glucuronide Medium (Oxoid)-TBX	Recuento de <i>E. coli</i>
Violet Red Bile Lactose Agar (Oxoid)-VRBL	Recuento de coliformes totales
Plate Count Agar (Oxoid)-PCA	Recuento de aerobios mesófilos
Brain Heart Infusion Broth (Oxoid)-BHI	Preparación de glicerizados y pellet para extracción ADN
Columbia Blood Agar Plates (Oxoid)-CBA	Aislamiento de patógenos animales
Yeast Extract Agar (Oxoid)-YEA	Recuento de microorganismos en agua
Kanamycin Aesculin Azide Agar (Oxoid)-KAA	Recuento de estreptococos
Clostridium difficile Selective Agar (Oxoid)-CLO Agar	Aislamiento de <i>C. difficile</i>
Clostridium difficile broth (Scharlau)- CLO	Enriquecimiento de <i>C. difficile</i>
Reinforced Clostridial Medium (Oxoid)- RCM	Recuento y aislamiento de Clostridia

3.1.3. Materiales utilizados para la aplicación de técnicas de biología molecular

3.1.3.1. Soluciones y tampones

A lo largo de la presente tesis doctoral se han empleado diversos tampones y enzimas comerciales, para desarrollar las diferentes técnicas de microbiología y biología molecular. En la Tabla 3 se enumeran las soluciones empleadas y su objetivo principal.

Tabla 3. Soluciones empleadas a lo largo de la tesis doctoral

Preparaciones celulares

Solución	Objetivo
Phosphate buffered saline (PBS) 1x (Sigma-Aldrich)	Reconstitución de pellet celulares
Peptone Saline Water (Scharlau)	Diluciones seriadas para recuentos bacterianos
Glicerol 80 % (Sigma-Aldrich)	Crioconservación bacteriana

PCR y Electroforesis

Solución	Objetivo
ReadyMix™ Taq PCR Reaction Mix with MgCl ² (Roche)	PCR
Agarosa 1% (Sigma-Aldrich) en TAE 1X (Thermo-Scientific)	Preparación de gel de agarosa
GelRed x100 DMSO (Sigma-Aldrich)	Tinción de gel de agarosa
6X DNA Loading Dye (Thermo-Scientific)	Tampón de carga
6X GeneRuler 100pb DNA Ladder (Thermo-Scientific)	Marcador de peso molecular
Nuclease Free Water (Sigma-Aldrich)	Preparación de diluciones de ADN y ajuste de concentración de PCR

Extracción de ADN bacteriano

Solución	Objetivo
Tris-EDTA buffer solution 1M (Sigma-Aldrich)	Extracción ADN de bacterias Gram +
Triton x100 (Sigma-Aldrich)	Extracción ADN de bacterias Gram +
Tween 20 (Sigma-Aldrich)	Extracción de ADN de bacterias Gram +
Lisozima from chicken egg White (Sigma-Aldrich)	Extracción ADN de bacterias Gram +
Ethyl alcohol, Pure (Sigma-Aldrich)	Lavado y precipitación de ADN
Trypsin (Sigma-Aldrich)	Extracción de DNA de bacterias Gram +
RNAase A (Qiagen)	Eliminación de ARN de la muestra
Nuclease Free Water (Sigma-Aldrich)	Preparación de soluciones y elución de ADN tras extracción

Preparación de librerías de amplicones ARNr 16S

Solución	Objetivo
2x KAPA HiFi HotStart ReadyMix (Roche)	Amplificación región V3-V4 para secuenciación 16S
DNA Size Selection and PCR Clean-Up kit, 60 ml (Cytiva)	Purificación de librerías
Ethyl alcohol, Pure (Sigma-Aldrich)	Purificación de librerías
Nuclease Free Water (Sigma-Aldrich)	Diluciones de ADN y preparación de solución de lavado
Nextera XT Index kit (Illumina)	Indexado
Buffer EB (Qiagen)	Elución de ADN purificado
MiSeq Reagent Kit v3_600-cycle (Illumina)	Secuenciación
PhiX Control v3 (Illumina)	Control de secuenciación
10 M NaOH (Sigma-Aldrich)	Desnaturalización de librerías

Preparación de librerías de genoma completo

Solución	Objetivo
Nextera XT DNA Library Preparation kit (Illumina)	Amplificación región V3-V4 para secuenciación ARNr 16S
Nextera XT Index kit v2 (Illumina)	Indexado
Ethyl alcohol, Pure (Sigma-Aldrich)	Purificación de librerías
Nuclease Free Water (Sigma-Aldrich)	Diluciones de ADN y preparación de solución de lavado
Buffer EB (Qiagen)	Elución de ADN purificado
MiSeq Reagent Kit v3_600-cycle (Illumina)	Secuenciación
PhiX Control Kit v3 (Illumina)	Control de secuenciación
10 M NaOH (Sigma-Aldrich)	Desnaturalización de librerías

3.1.3.2. Kits de extracción de ADN

Debido al empleo de la secuenciación masiva a lo largo del estudio se ha requerido la extracción de ADN de alta calidad, de bacterias de diferente naturaleza, Gram +, Gram – o esporulados. Así como de ADN ambiental, a partir de diversos medios de partida como heces, sangre o líquido articular. En la Tabla

4 se presentan los diferentes kits de extracción que se han empleado a lo largo del estudio y su objetivo.

Tabla 4. Kit de extracción de ADN empleados a lo largo del estudio.

Kit de extracción	Objetivo
DNeasy Blood and Tissue Kit (Qiagen)	Extracción de ADN de aislados bacterianos (Gram+ y Gram -), sangre, líquido articular e hisopo nasofaríngeo
QIAmp Fast DNA Stool Mini Kit (Qiagen)	Extracción de ADN bacteriano total en muestras fecales, contenido intestinal y paja
DNeasy PowerFood Microbial Kit (Qiagen)	Extracción de ADN bacteriano de muestras de calostro, leche y agua
NZYMicrobial gDNA Isolation kit (NZYtech)	Extracción de ADN de aislados esporulados

3.1.3.3. Cebadores

En el presente trabajo se han empleado diversos oligonucleótidos para su uso como cebadores de secuenciación y detección de grupos bacterianos concretos. Los cebadores empleados se describen en la Tabla 5.

Tabla 5. Cebadores empleados a lo largo del estudio

Kit de extracción	Secuencia	Objetivo
16S Forward (Klindworth et al., 2013)	5'-TCGTCGGCAGCGTCAGATGTGTATAAGAGACAGCCTACGGGNGGCWGCAG-3'	Amplificación región V3-V4
16S Reverse (Klindworth et al., 2013)	5'-GTCTCGTGGGCTCGGAGATGTGTATAAGAGACAGGACTACHVGGGTATCTAATCC-3'	Amplificación región V3-V4
P932 (Le Bourhis et al., 2005)	5'-GTGAAATGCGTAGAGATTAGGAA-3'	Identificación Clostridium spp
P930 (Le Bourhis et al., 2005)	5'-GATYYGCGATTACTAGYAACTC-3'	Identificación Clostridium spp

3.1.4. Instrumentos

En este apartado se enumeran los diferentes instrumentos empleados para el desarrollo de la tesis doctoral (Tabla 6).

Tabla 6. Instrumentos empleados para el desarrollo de la tesis doctoral

Agitadores y homogeneizadores

Marca comercial	Instrumento
Eppendorf	Agitador incubador Thermomixer comfort y Thermomixer compact. Agitador de placa MixMate
AES	Diluidor gravimétrico Dilumat 4
Novacyt	Pulsificador PUL200 Pulsifier II
MP BioMedicals	Homogeneizador por “bead bating” FastPrep-24 5G
Scientific Industries SI	Vortex Genie 2
Selecta	Agitador magnético con calefacción Agimatic-N

Instrumentos de medición

Marca comercial	Instrumento
Crison Instruments	pHmetro PH Basic 20
Sartorius	Balanza de alta precisión analítica Entris II Essential y balanza de precisión Secura26-1S
Scientific Industries SI	Vortex Genie 2
Invitrogen	Fluorómetro Qubit 3
Thermo-Scientific	Propipeta P1 y juego de pipetas ClipTips
Bioblocks Scientific	Contador de colonias Bioblocks 50971

Electroforesis

Marca comercial	Instrumento
Bio-Rad	Fuente de alimentación BioRad PowerPac HC y transiluminador Gel Doc XR+

Incubadores

Marca comercial	Instrumento
Thermo-Scientific	Incubador Heraus B20
Medcenter Einrichtungen GmbH	Estufa Incucell V
Don Whitley Scientific	Cámara anaeróbica Whitley DG250
Thermo-Scientific	Jarra de anaerobios 2,5 Litros

3. Material y Métodos

Control de temperatura

Marca comercial	Instrumento
Medcenter Einrichtungen GmbH	Estufa Incucell
Thermo-Scientific	Arcón ultracongelador (-80°C)
Scotsman	Máquina de hielo Scotsman
Applied Biosystems	Termociclador Veriti 96 Well
Raypa	Autoclave Raypa Steam

Centrifugas

Marca comercial	Instrumento
Eppendorf	Microcentrífuga 5424R y microcentrífuga 5417C. Centrífuga 5810R
Beckman Coulter	Ultracentrífuga Avanti J-301

Secuenciador

Marca comercial	Instrumento
Illumina	Secuenciador MiSeq y secuenciador MiniSeq

Servidores

Nombre de servidor	Especificaciones
Itaul4644	Sistema operativo: GNU/Linux Kernel: Red Hat Enterprise Linux 9 Arquitectura: 64 bits Procesador: Intel Xeon Silver 4110 @ 2.10 Ghz CPUs: 32 núcleos Tarjeta gráfica: Nvidia Quadro P4000 Memoria RAM: 250 GiB
Itaul4602	Sistema operativo: GNU/Linux Kernel: Red Hat Enterprise Linux 9 Arquitectura: 64 bits Procesador: Intel Xenon CPU-E5-2620-v4 @ 2.10 GHz CPUs: 32 núcleos Tarjeta gráfica: Nvidia GF119 [NVS 310] Memoria RAM: 125 GiB

Otros instrumentos

Marca comercial	Instrumento
EZ	Rampa de filtración EZ-Fit y bomba de vacío EZ-Stream
Telstar	Cabina de seguridad biológica tipo II y cabina de flujo laminar Mini-V/PCR

3.1.5. Bases de datos

Debido al enfoque del trabajo basando muchos de sus análisis en las tecnologías de secuenciación masiva. Ha requerido el uso de múltiples bases de datos públicas para los análisis bioinformáticos desarrollados. En la Tabla 7 se enumeran las distintas bases de datos empleadas.

Tabla 7. Bases de datos empleadas en los estudios de secuenciación

Base de datos	Descripción
Silva (https://www.arb-silva.de/)	Base de datos de secuencias de ARN ribosomal de alta calidad. Mantenido por Leibniz Institute DSMZ
NCBI RefSeq (https://www.ncbi.nlm.nih.gov/refseq/)	Base de datos de genomas, genes, transcritos y proteínas de referencia. Mantenido por National Center for Biotechnology Information
ResFinder Database (https://bitbucket.org/genomicepidemiology/resfinder_db/src/master/)	Base de datos curada que contiene genes de resistencia antimicrobianas. Mantenido por el Center for Genomic Epidemiology de la Universidad Técnica de Dinamarca
CARD (https://card.mcmaster.ca/)	Base de datos curada que contiene genes de resistencia a antibióticos. Mantenido por McMaster University de Canadá
PlasmidFinder Database (https://bitbucket.org/genomicepidemiology/plasmidfinder_db.git/src)	Base de datos curada que contiene replicones de plásmidos conocidos. Mantenido por el Center for Genomic Epidemiology de la Universidad Técnica de Dinamarca
VFDB (https://www.mgc.ac.cn/VFs/download.htm)	Base de datos curada que contiene secuencias de genes codificantes de factores de virulencia. Mantenido por el National Institute Pathogen Biology de China
SRA (https://www.ncbi.nlm.nih.gov/sra)	Base de datos de lecturas crudas de secuenciación. Mantenido por National Center for Biotechnology Information

GenBank (https://www.ncbi.nlm.nih.gov/genbank/)	Base de datos que almacena secuencias de ADN y ARN, incluyendo genomas completos, genes y datos de expresión génica. Mantenido por National Center for Biotechnology Information
pubMLST (https://pubmlst.org/)	Base de datos que contiene perfiles alélicos y secuencias asociadas utilizadas para la categorización y tipificación de organismos mediante MLST (Multi Locus Sequence Typing)
Kraken2-microbial (https://lomanlab.github.io/mockcommunity/mc_databases.html)	Base de datos que contiene genomas de referencia y k-mers asociados, para la clasificación taxonómica

3.2. Métodos

3.2.1. Muestreo

3.2.1.1. Área de estudio

Castilla y León es la región más extensa de España ocupando un área de 94.193 Km². Situada en el noroeste de España, su centro geográfico se sitúa en una latitud 41.833°N y longitud 4.750 W. Se encuentra dividida en 9 provincias Ávila, Burgos, León, Palencia, Salamanca, Segovia, Soria, Valladolid y Zamora. Con una altitud media de 700 metros sobre el nivel del mar, aunque presenta zonas montañosas superiores a los 2.000 metros. La región es bordeada por cordilleras montañosas, por el noroeste por la cordillera Cantábrica y el macizo Galaico-Leones, por el este con la cordillera Ibérica y por el sur con la cordillera central. Estas cordilleras montañosas generan en la región un clima mayormente continental con inviernos fríos, con temperaturas medias que varían 8,5°C a -0,5°C y veranos cálidos con medias máximas de 27°C y mínimas de 7,5°C. Aunque pueden llegar a máximas de 40°C en verano y mínimas de -12°C en invierno. En cuanto a las precipitaciones se limitan entre 500 a 1.000 litros por metros cuadrado al año. Alcanzando unos 2.000 litros por metro cuadrado en zonas

montañosas. Siendo la estación más lluviosa el invierno, sufriendo intensos periodos de sequía en verano (Font Tullot, 2000).

Las condiciones climáticas de la región en especial durante los meses de primavera-verano marcan el desarrollo de brotes diarreicos neonatales en ganado. Las causas no se han establecido en detalle, aunque se señala el incremento de la temperatura junto a la alta humedad que suelen presentar los entornos de explotación intensiva, favorecen el desarrollo de patógenos y la mortalidad asociada a deshidratación en los brotes diarreicos neonatales (Liang et al., 2021).

3.2.1.2. Colección de muestras y cepario

Contando con la colaboración de 35 explotaciones ganaderas ubicadas en la comunidad de Castilla y León, incluyendo una explotación de Madrid. Se han tomado un total de 1.317 muestras, con diferentes objetivos y naturaleza, las muestras se enumeran en la Tabla 8.

Tabla 8. Colección de muestras recopiladas a lo largo de la tesis doctoral

Tipo de muestra	Número	Capítulo
Agua	76	III
Calostros	56	I, II y III
Camas	49	I
Contenido intestinal	79	I
Derrames articulares	7	II
Desinfectante	3	I
Heces neonatales	28	IV
Heces de las madres	28	I
Hisopo ambiental con amies	10	I
Hisopo bucal con amies	71	I
Hisopo bucal seco	10	I
Hisopo rectal con amies	342	I
Hisopo rectal seco madres	15	I
Hisopo rectal seco	405	I y IV
Hisopo vaginal con amies	5	I
Hisopo vaginal seco	5	I
Leche	22	I, II y III
Meconio	1	I
Placentas	8	I
Sangre	83	I
Superficies	11	I
Tratamiento animal	3	I

A partir de las muestras tomadas se han analizado un total de 623 ambientes, aplicando secuenciación de amplicones *ARNr 16S*. La enumeración completa se presenta en la Tabla 9. Los análisis realizados y resultados se describen en los capítulos asociados.

Tabla 9. Ambientes analizados mediante secuenciación del *ARNr 16S*

Tipo de muestra	Número	Capítulo
Agua	7	III
Calostro	8	II y III
Camas	35	I
Contenido intestinal	73	I
Derrame articular	7	II
Heces madres	12	I
Hisopo bucal	5	I
Hisopo bucal madres	5	I
Hisopo rectal	450	I y IV
Hisopo rectal madres	5	I
Hisopo vaginal	5	I
Leche reconstituida	3	II y III
Placenta	8	I

A lo largo del presente trabajo se ha recopilado un cepario que cuenta con total de 1.272 aislados, de los cuales se secuenció el genoma completo de 389 de ellos. En la Tabla 10 se enumeran las diferentes especies identificadas tras la secuenciación de su genoma completo.

Tabla 10. Colección de especies secuenciadas a lo largo del desarrollo de la tesis doctoral

Especie	Número
<i>Absiella argi</i>	1
<i>Atlantibacter hermannii</i>	2
<i>Bacillus licheniformis</i>	3
<i>Bacillus subtilis</i>	1
<i>Citrobacter braakii</i>	1
<i>Citrobacter portuacalensis</i>	3
<i>Clostridioides difficile</i>	5
<i>Clostridium cadaveris</i>	5
<i>Clostridium perfringens</i>	5
<i>Clostridium tertium</i>	10
<i>Clostridium putrefaciens</i>	14
<i>Enterobacter cloacae</i>	1
<i>Enterobacter ludwigii</i>	2
<i>Enterobacter faecalis</i>	7
<i>Enterococcus faecium</i>	3
<i>Enterococcus hirae</i>	1
<i>Erysipelothrix rhusiopathiae</i>	1
<i>Escherichia coli</i>	273
<i>Escherichia fergusonii</i>	1
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	6
<i>Lactobacillus mucosae</i>	1
<i>Lactobacillus plantarum</i>	1
<i>Lactobacillus sp</i>	1
<i>Lysinibacillus sp. YS11</i>	1
<i>Mannheimia haemolytica</i>	4
<i>Paenibacillus cellulositrophicus</i>	1
<i>Paeniclostridium sordellii</i>	1
<i>Paraclostridium bifermentans</i>	14
<i>Providencia rettgeri</i>	3
<i>Providencia stuartii</i>	1
<i>Pseudomonas protegens</i>	1
<i>Pseudomonas sp. CFSAN084952</i>	2
<i>Pseudomonas sp. DTU12.3</i>	1
<i>Serratia liquenifaciens</i>	1
<i>Streptococcus dysgalactiae</i>	8
<i>Streptococcus pasteurianus</i>	3

3.2.1.3. Toma y conservación de muestras

Las muestras tras su toma se transportaron al laboratorio en frío, manteniendo una temperatura constante de 4°C. Las muestras empleadas para aislamiento y recuento se procesaron inmediatamente tras su llegada al laboratorio. Por su parte aquellas, destinadas a secuenciación del *ARNr 16S* se sometieron a diferentes tratamientos para su conservación como se detalla a continuación.

Los hisopos tras la toma de la muestra se cortaron por su extremo inferior y se introdujeron en microtubos de rosca (Deltalab), que contenían 1,5 g de Zirconia beads (BioSpec). Las muestras se transportan al laboratorio manteniendo una temperatura constante de 4°C. Finalmente se almacenan a -80°C hasta la extracción del ADN para secuenciación.

Las heces se tomaron empleando un tubo con paleta para heces (Deltalab), depositando aproximadamente 500 mg de material fecal en el tubo. Las muestras se transportaron al laboratorio refrigeradas a 4°C, donde se depositaron en tubos de rosca (Deltalab), que contenían 1,5 g de Zirconia beads (BioSpec). Posteriormente se conservaron a -80°C hasta la extracción del ADN para secuenciación.

Las placentas tomadas en las explotaciones se transportaron en bolsas Sample Bag (Whirl-Pak), a temperatura constante de 4°C. Tras su llegada al laboratorio se cortaron empleando un bisturí estéril depositando 500 mg de material placentario en tubo que contenía 1,5 g de Zirconia beads (BioSpec). Posteriormente se conservaron a -80°C hasta la extracción de ADN para secuenciación.

Para la toma de muestras de cama, se recogió aproximadamente 20 g de cama, tomando muestra de la superficie. Fueron depositadas en bolsas Sample Bag (Whirl-Pak), siendo transportadas hasta el laboratorio a 4°C. Para el estudio de anaerobios y esporulados, se trasladaron a su vez en condiciones limitantes de oxígeno, mediante el empleo de bolsas de anaerobiosis, Oxoid AnaeroGen (Thermo-Scientific). Las muestras de cama para secuenciación 16S y recuentos de aerobios, se diluyeron inmediatamente tras su llegada al laboratorio empleando un diluidor gravimétrico AES Dilumat 4 (AES). Preparando una dilución 1:10 a partir de 10 g de cama en peptona salina (Oxoid). La dilución se realizó en bolsas de plástico con filtro, posteriormente se homogeneizaron durante 2 minutos a temperatura ambiente mediante vibración empleando el homogeneizador PUL200 Pulsifier II (Novacyt). Se preparó un pellet a partir de 4 ml del homogeneizado filtrado, centrifugando a 4.000 rpm a 4°C durante 30 minutos. Los pellets se conservaron a -80°C hasta su procesamiento. El resto del homogeneizado se empleó para las técnicas de recuento microbiano. En el caso del recuento de esporulados, la dilución inicial se preparó empleando una probeta estéril, manteniendo en todo momento condiciones de anaerobiosis, gracias al trabajo en la cámara anaeróbica Whitley DG250 (Whitley Scientific).

En el caso de las muestras de agua, se almacenó 2 litros en botellas Corning Storage Bottle (Thermo-Scientific). Las muestras se transportaron refrigeradas a 4°C. Inmediatamente tras la llegada al laboratorio tanto en el caso de las técnicas de recuento como de extracción de ADN, se filtraron empleando una rampa de filtración EZ-Fit (EZ), previamente esterilizada y filtros de nitrocelulosa de 0,20µm de poro (Millipore). En el caso de recuentos se centrifugaron 100 ml de agua por muestra. Posteriormente se depositó la membrana empleando pinzas estériles en el medio empleado para el recuento. Por su parte, para secuenciación se filtró el agua hasta la saturación de la membrana (aproximadamente 1L). La

membrana se depositó empleando pinzas estériles, en microtubos con rosca de 2 ml (Deltalab), que contenían 1,5 g de Zirconia beads (BioSpec). Los filtros se conservaron a -80°C hasta la extracción del ADN.

Las muestras de calostro y leche se recogieron en tubos de 50 ml (Corning), manteniéndose en frío a 4°C hasta su llegada al laboratorio. Para almacenar las muestras hasta la extracción de ADN se realizó un pretratamiento, con el objetivo de obtener un pellet celular. Para ello se aplicó el método descrito en López-Enríquez et al. (2007). Tomando 25 ml por muestra, se añadió 3 ml Triton X100 (Sigma-Aldrich) agitando vigorosamente. Posteriormente se añadió Tripsina 1% p/v (Sigma-Aldrich) y se agitó manualmente. Las muestras se incubaron 30 min a 37°C en la estufa, agitando cada 10 minutos de incubación. Se centrifugó la mezcla a 3.500 rpm durante 30 minutos a temperatura ambiente. Se elimina el sobrenadante y se resuspendió el pellet resultante en 1ml de Tris-HCL 10 mM (Sigma-Aldrich). Transfiriendo la mezcla a eppendorf de 1,5 ml. Finalmente se centrifugó a 13.200 rpm y se descartó el sobrenadante. El pellet resultante se almacenó a -80°C hasta la extracción del ADN contenido en la muestra.

3.2.2. Técnicas de cultivo microbiológico

3.2.2.1. Aislamiento microbiológico

A lo largo del presente trabajo se ha requerido el aislamiento de microorganismos bacterianos de diversa naturaleza por ello se ha empleado diferentes condiciones de incubación y métodos de aislamiento.

Para muestras de naturaleza sólida, como heces, placentas o camas. Se diluyó la muestra original en un factor 1:10 en peptona salina (Scharlau), empleando el diluidor automático Dilumat 4 (AES) y bolsas con filtro.

Posteriormente se homogeneizaron 2 min en el homogeneizador Pulsifier II (Novacyt). Se tomaron 100 µl de la solución resultante y se extendió homogéneamente usando un asa de Drigalsky sobre el medio sólido empleado para el aislamiento. Para soluciones líquidas, tales como calostro, leche, sangre, agua o derrames articulares se tomaron sin diluir 100 µl de la solución y se extendió homogéneamente empleando un asa de Drigalsky. Los medios, tiempos y temperaturas de incubación variaron dependiendo del grupo bacteriano a aislar, en la Tabla 11 se presentan las condiciones de cultivo para los distintos grupos bacterianos.

Tabla 11. Condiciones de incubación de los distintos grupos bacterianos

Grupo bacteriano	Condiciones de incubación
Coliformes	Medio de cultivo: Agar MacConkey (Oxoid) Ambiente: Aerobiosis Temperatura: 37°C Tiempo de incubación: 24 horas Enriquecimiento: No
<i>Streptococcus sp</i>	Medio de cultivo: Columbia Blood Agar (Oxoid) Ambiente: Aerobiosis Temperatura: 37°C Tiempo de incubación: 24 horas Preenriquecimiento: No
<i>Clostridium sp</i>	Medio de cultivo: Reinforced Clostridial Medium (Oxoid) Ambiente: Anaerobiosis Temperatura: 37 °C Tiempo de incubación: 72 horas Preenriquecimiento: Si
<i>Clostridium perfringens</i>	Medio de cultivo: Columbia Blood Agar (Oxoid) Ambiente: Anaerobiosis Temperatura: 46°C Tiempo de incubación: 72 horas Preenriquecimiento: Si
<i>Clostridioides difficile</i>	Medio de cultivo: Clostridium difficile Selective Agar (Oxoid) Ambiente: Anaerobiosis Temperatura: 37°C Tiempo de incubación: 72 horas Preenriquecimiento: Si

Para el aislamiento de bacterias del género *Clostridium* y *Clostridioides* debido a las dificultades que presenta el aislamiento de especies de estos grupos

(Blanco et al., 2013). Se realizó una selección y preenriquecimiento de esporulados siguiendo las recomendaciones de Blanco et al. (2013) y Álvarez-Pérez et al. (2017), adecuando las condiciones para el aislamiento de *C. difficile*, *C. perfringens* y otras especies del género *Clostridium*. El hisopo o las heces (100 µl) se introdujo en un eppendorf con 1 ml de etanol al 70%, manteniendo la mezcla 20 minutos a temperatura ambiente, lo que realiza la primera selección de esporulados. Tras ello se adicionó 200 µl de la mezcla, para el aislamiento de *C. difficile* en caldo *Clostridium difficile* broth (Scharlau), incubando en anaerobiosis 7 días a 37°C. Por otro lado, se incubaron 200 µl de la mezcla en caldo BHI (Oxoid) a 37°C durante 72 horas para el crecimiento de esporulados mesófilos y 200 µl en medio BHI a 46°C durante 72 horas, para la selección de *C. perfringens*. Tras los periodos de incubación se mezclaron 2 ml de cada cultivo resultante con 2 ml de etanol absoluto, incubando durante 1 hora a temperatura ambiente y en agitación suave (200 rpm), para realizar la segunda selección de esporulados. La mezcla se centrifugó a 4.000 rpm durante 10 minutos en refrigeración a 4°C. Los precipitados resultantes se recogieron usando un hisopo y se sembraron en placas de *Clostridium difficile* Selective Agar (Oxoid), para la selección de *C. difficile*. Los precipitados para el aislamiento de *C. perfringens* se sembraron en Columbia Blood Agar (Oxoid) y se incubaron a 46°C en anaerobiosis. Finalmente, los pellets para aislamiento de *Clostridium* sp se incubaron a 37°C durante 72 horas en medio Reinforced Clostridial Medium (Oxoid).

3.2.2.2. Conservación de microorganismos

Las cepas aisladas se conservaron mediante su mezcla con glicerol a una concentración final del 20%. Para ello, se realizaron cultivos bacterianos en caldo BHI, estos se incubaron durante 24 horas, ajustando la temperatura de incubación al óptimo detallado en la Tabla 11. Tras la incubación se tomó 900 µl de cultivo

bacteriano y se mezcló con 300 µl de glicerol al 80% (Sigma-Aldrich) en criotubos de conservación (Deltalab). Mezclando inmediatamente antes de su conservación a -80°C.

3.2.2.3. Recuento microbiológico

Para el recuento microbiológico, se aplicó en todos los casos la técnica de diluciones decimales a partir del preparado líquido inicial. Tomando 1 ml de la muestra líquida (leche, calostro, agua) o de la dilución en peptona salina previamente preparada en el preprocesamiento de la muestra (Material y Métodos 3.2.1.3.). Se prepararon diluciones decimales en peptona salina hasta 10^{-8} , adicionando 1 ml de la dilución previa a 9 ml de peptona salina. Sembrando en todos los casos 1 ml de la dilución en profundidad. Cada dilución se realizó por triplicado, determinando el resultado como la media aritmética, junto a la desviación estándar de los tres recuentos por dilución. Los resultados se expresaron en UFC/ml o UFC/g en función de si la muestra de partida era sólida o líquida. Los medios empleados para el recuento se especifican en la Tabla 12, así como las condiciones de incubación que han sido empleadas.

Tabla 12. Medios selectivos y diferenciales empleados para el recuento microbiológico

Grupo bacteriano	Condiciones de incubación
Enterobacterias	Medio de cultivo: MC (Oxoid) Temperatura: 37°C Tiempo de incubación: 24 horas Concentración de oxígeno: Aerobiosis Morfología característica: Variada
<i>E. coli</i>	Medio de cultivo: TBX (Oxoid) Temperatura: 37°C Tiempo de incubación: 24 horas Concentración de oxígeno: Aerobiosis Morfología característica: Colonias azuladas
Coliformes	Medio de cultivo: VRBL (Oxoid) Temperatura: 37°C Tiempo de incubación: 24 horas Concentración de oxígeno: Aerobiosis Morfología característica: Colonias rojizas
Aerobios mesófilos	Medio de cultivo: PCA (Oxoid) Temperatura: 30°C Tiempo de incubación: 72 horas Concentración de oxígeno: Aerobiosis Morfología característica: Variada
Bacterias Hemolíticas	Medio de cultivo: CBA (Oxoid) Temperatura: 37°C Tiempo de incubación: 48 horas Concentración de oxígeno: Anaerobiosis Morfología característica: Halos de hemolisis
Aerobios mesófilos en agua	Medio de cultivo: YEA (Oxoid) Temperatura: 30°C Tiempo de incubación: 72 horas Concentración de oxígeno: Aerobiosis Morfología característica: Variada
Streptococos	Medio de cultivo: KAA (Oxoid) Temperatura: 37°C Tiempo de incubación: 24 horas Concentración de oxígeno: Aerobiosis Morfología característica: Colonias de color negro
Esporulados	Medio de cultivo: RCM (Oxoid) Temperatura: 37°C Tiempo de incubación: 72 horas Concentración de oxígeno: Anaerobiosis Morfología característica: Variada

En el caso de los recuentos para esporulados en cama se requieren de un pretratamiento para la selección de esporas. Inicialmente se pesó 10 g de cama, siendo esta diluida en peptona salina (Scharlau) empleando el diluidor

automático Dilumat 4 (AES), las muestras se homogeneizaron en bolsas plásticas con filtro. Se homogeneizaron las muestras durante 2 minutos en el pulsificador Pulsifier II (Novacyt). Se tomaron 4 ml de la solución resultante, se realizó una selección de los esporulados basada en choque térmico. Para ello se siguieron las indicaciones detalladas por Watterson et al. (2014), por las que a partir de 1 ml de muestra, esta se somete a un choque térmico a 80 °C durante 12 minutos, seleccionando los esporulados presentes en la muestra. Posteriormente se realizaron diluciones decimales en peptona salina (Scharlau). Sembrando en profundidad en medio RCM (Oxoid), e incubando a 37°C durante 72 horas en anaerobiosis. Las colonias resultantes se expresaron en UFC/g.

3.2.3. Técnicas de biología molecular

3.2.3.1. Extracción y purificación de ADN

Debido a la alta diversidad de las muestras procesadas, se han empleado diversos kits de extracción, para ajustarse a los requerimientos de pureza y calidad necesarios en función del tipo de muestra y el objetivo de secuenciación.

Las muestras de calostro, leche y agua, previamente conservadas a -80°C y pretratadas como se describe en el apartado 3.2.1.3. Se procesaron siguiendo el kit de extracción DNeasy PowerFood Microbial Mini Kit (Qiagen). Siguiendo las instrucciones de fabricante. A cada pellet o membrana se le adicionaron 450 µl de tampón de lisis MBL, transfiriendo la mezcla en un tubo PowerBeads. Las muestras se incubaron durante 10 minutos a 70°C. Estas se homogeneizaron en FastPrep en dos ciclos de 60 segundo a una velocidad de 6.0 m/segundos, con intervalos de pausa de 30 segundos. Los tubos se centrifugaron a 10.000 rpm durante 1 minuto. El sobrenadante obtenido se transfirió a un tubo estéril de 2 ml, al que se añadió 100 µl de solución IRS mezclando por vortex. Lo que permite

la eliminación de impurezas e inhibidores de PCR. La mezcla se incubó a 4°C durante 5 minutos y se centrifugó a 10.000 rpm durante 1 minuto. El sobrenadante se transfirió a un tubo limpio de 2 ml, donde se adicionaron 4 µl de RNAase A (Qiagen), incubando a temperatura ambiente durante 2 minutos, para eliminar el ARN residual. Se añadió 900 µl de solución de unión MR, esta contiene sales caotrópicas que permiten la adhesión del ADN a la membrana de sílice. Se cargó 650 µl del sobrenadante en la columna de sílice MB Spin Column, centrifugando a 10.000 rpm durante 1 minuto. Este paso se repitió hasta la elución de todo el lisado. La membrana se sometió a dos ciclos de lavado uno con 650 µl de solución PW centrifugando a 10.000 rpm durante 1 minuto y un segundo lavado con etanol absoluto adicionando 650 µl y centrifugando 10.000 rpm durante 2 minutos. Finalmente, la columna se acopló a un tubo de centrífuga de 1,5 ml, eluyendo el DNA adherido al filtro de la columna en 50 µl de solución de elución EB. Esta se centrifugó a 10.000 rpm durante 1 minuto. El ADN extraído se conservó a -20°C hasta la medición y preparación de las librerías de secuenciación.

Para la extracción de ADN a partir de muestras de heces, contenido intestinal, placentas, hisopos y camas, se siguió el kit de extracción de ADN QIAmp Fast DNA Stool Mini kit (Qiagen). Se añadió 1 ml de InhibitEX Buffer a cada muestra antes de su descongelación. Posteriormente, las muestras se homogeneizaron empleando FastPrep, 6 ciclos de 60 segundos a una velocidad de 4.0 m/segundo, con intervalos de pausa de 60 segundos. La suspensión se incubó durante 5 minutos a 95°C en agitación a 700 rpm. Después de este paso, los tubos se centrifugaron a máxima velocidad durante 1 minuto. Se transfirieron 400 µl del sobrenadante a tubos Eppendorf estériles de 1,5 ml, a los que se añadió 30 µl de proteinasa K y 200 µl de tampón de lisis AL, con el objetivo de degradar proteínas y lisar las membranas celulares. Las muestras se incubaron a 70°C en

agitación a 700 rpm durante 10 minutos. Tras la incubación se añadió 8 µl de RNAase A (Qiagen) y se incubaron 2 minutos a temperatura ambiente para eliminar residuos de ARN. Se adicionaron 400 µl de etanol absoluto y se cargaron 600 µl de la mezcla a las columnas de sílice QIAamp spin columns, estas se centrifugaron a máxima velocidad. Este paso se repitió hasta eluir todo el lisado. Las columnas se lavaron con 500 µl de la solución de lavado AW1, centrifugando la columna a máxima velocidad durante 1 minuto, seguido por un segundo lavado con la solución AW2, centrifugando durante 3 minutos a máxima velocidad. Para la elución del ADN, las columnas se acoplaron a tubos de centrífuga estériles de 1,5 ml, añadiendo 50 µl de tampón de elución ATE, incubando durante 1 minuto y centrifugando nuevamente 1 minuto a máxima velocidad. El ADN purificado se almacenó a -20°C hasta su uso en la preparación de librerías de secuenciación.

Para la extracción de ADN genómico bacteriano, así como ADN total de fluidos animales (sangre o líquido sinovial) se utilizó el kit DNeasy Blood and Tissue (Qiagen). Se centrifugaron 2 ml de cada cultivo puro o fluido animal en Eppendorf de 1,5 ml a 12.000 rpm. Los pellets resultantes, se sometieron a un tratamiento diferencial, según se tratase de bacterias Gram positivas y bacterias totales, o bacterias Gram negativas. En el caso de bacterias Gram positivas y totales, se resuspendieron los pellets en 180 µl de tampón de lisis previamente preparado (20 mg/ml lisozima, 20 mM TrisHCl, 2 mM EDTA, 1,2% Triton X-100 en una disolución de agua molecular), incubando durante 1 hora a 37°C con agitación a 700 rpm. Para las bacterias Gram negativas los pellets se resuspendieron en 180 µl del tampón de lisis ATL, mezclando mediante vortex. A ambos lisados tanto en el caso de Gram positivas y totales, así como Gram negativas se adicionó 20 µl de proteinase K (Qiagen), mezclando mediante vortex e incubando durante 30 minutos a 56°C con agitación a 700 rpm. Eliminando

residuos proteicos de la mezcla. A continuación, se añadieron 4 µl RNase A, mezclando mediante vortex. Se incubó durante 2 minutos a temperatura ambiente para eliminar residuos de ARN. Posteriormente se adicionaron a cada muestra 200 µl de etanol absoluto, mezclando nuevamente mediante vortex. El lisado obtenido se cargó en las membranas de sílice QiAamp Mini spin column, centrifugando a 8.000 rpm durante 1 minuto. Las columnas se lavaron con 500 µl de la solución AW1 y 500 µl de la solución AW2 centrifugando a 14.000 rpm durante 1 minuto y 3 minutos, respectivamente. Finalmente, las columnas se colocaron en tubos Eppendorf estériles de 1,5ml, eluyendo el DNA en 50 µl de tampón AE previamente calentado a 80°C. Las muestras de ADN se conservaron a -20°C hasta la preparación de las librerías de secuenciación.

3.2.3.2. PCR

Ha sido empleada para la comprobación de cepas del género *Clostridium spp* empleadas para secuenciación. La amplificación por PCR se basa en la síntesis de copias a partir de un fragmento de DNA, mediante el uso de una polimerasa termoestable y un par de cebadores específicos (Saiki et al., 1988).

Los cebadores empleados se describen en el apartado 3.1.3.4. La polimerasa, tampones, DMSO y dNTPs se incluyen en el kit ReadyMix™ Taq PCR Reaction Mix with MgCl₂ (Roche). Se preparó la mezcla a un volumen final de 20 µl por muestra, tal como se enumeran a continuación:

ReadyMix™ Taq PCR Reaction Mix with MgCl ₂ (Roche)	
Reactivo	μl/reacción
Buffer PCR II (10X)	2
dNTPs MIX (10mM)	0,4
MgCl ₂ (mM)	4,8
DNA polymerase (U/μl)	1
ADN molde (1ng/μl)	2,5
Primer P930F (10.000 nM)	1
Primer P932R (10.000 nM)	1
H ₂ O	8,1

La mezcla se sometió a 30 ciclos de amplificación con las siguientes condiciones, según el método descrito por Le Bourhis et al. (2005):

Fase	Temperatura	Tiempo
DESNATURALIZACIÓN	95°C	3 minutos
AMPLIFICACIÓN (x30)		
-Desnaturalización	94°C	20 segundos
-Hibridación	58°C	30 segundos
-Elongación	72°C	30 segundos
ELONGACIÓN	72°C	5 minutos

3.2.3.3. Electroforesis en gel de agarosa

Los geles se prepararon con agarosa al 2% (p/v) en tampón TAE 1X. La disolución de la agarosa se llevó a cabo mediante su calentamiento. Tras su disolución se adicionó el colorante GelRed (Sigma-Aldrich) a una concentración final 1X. La mezcla se vertió en un molde que se ajustase al número de muestras a analizar. Tras la solidificación, se añadió en un sistema de electroforesis horizontal (Mini-Sub Cell GT, Bio-Rad) y se cubrió con tampón TAE 1X. Cada muestra se mezcló con tampón de carga a una concentración final de 1X, esto proporcionó la densidad adecuada para facilitar su depósito al fondo de los pocillos, así como coloración, para su seguimiento durante la migración. Como marcador de peso molecular se empleó GeneRuler 100 pb DNA Ladder (Thermo-Scientific). La migración se realizó a 120V durante 30 minutos. Tras la separación de los fragmentos, las bandas se visualizaron mediante su exposición a radiación

ultravioleta en un transiluminador Gel Doc XR+ (Bio-Rad). La posición de las bandas de cada muestra respecto al marcador de peso molecular permitió estimar la longitud de cada fragmento de ADN.

3.2.3.4. Preparación de librerías para secuenciación

A lo largo de la presente tesis doctoral se prepararon dos tipos de librerías de secuenciación, cada una con un objetivo específico: por un lado, se generaron librerías de secuenciación de amplicones del gen del ARNr 16S para el estudio de la ecología bacteriana; por otro, se prepararon librerías para la secuenciación de genomas completos a partir de aislados bacterianos. A continuación, se describen ambos procedimientos, así como la metodología empleada para la carga de librerías en el secuenciador.

3.2.3.4.1. Librerías de amplicones del gen del ARNr 16S

Para los estudios de ecología bacteriana mediante secuenciación del *ARNr16S* se ha seguido el protocolo de referencia, 16S Metagenomic Sequencing Library Preparation Illumina (2013). Por el que se amplifica la región V3-V4 de la región codificante del ARNr 16S, empleando los cebadores descritos por Klindworth et al. (2013). Las muestras de ADN a secuenciar se preparan a una concentración de 5 ng/μl en agua de grado molecular (Nuclease Free Water, Sigma-Aldrich). Se prepararon alícuotas de los cebadores 16S Forward y 16S Reverse, a una concentración final de 1 μM cada uno. A continuación, se dispusieron las reacciones en placas de PCR de 96 pocillos según las condiciones especificadas a continuación:

Componente	μl/reacción
ADN (5ng/μl)	2,5
5 μl cebador Forward (1 μM)	5
5 μl cebador Reverse (1 μM)	5
2X KAPA HiFi HotStart Ready Mix	12,5

La placa se centrifugó a 1.000 g durante 1 minuto. A continuación, la placa se sometió a las siguientes condiciones en el termociclador:

Fase	Temperatura	Tiempo
DESNATURALIZACIÓN	95°C	3 minutos
AMPLIFICACIÓN (x25)		
-Desnaturalización	95°C	20 segundos
-Hibridación	55°C	30 segundos
-Elongación	72°C	30 segundos
ELONGACIÓN	72°C	5 minutos

Tras la amplificación, la placa de PCR se sometió a dos lavados consecutivos con etanol al 80%. Posteriormente la placa se centrifugó a 1.000x g a temperatura ambiente, para recolectar la condensación acumulada en la tapa. A continuación, se añadieron 20 µl de solución de unión del DNA Size Selection and PCR Clean-Up kit (Cytiva) a cada pocillo. La placa se selló y agitó a 1.800 rpm durante 2 minutos. La mezcla se incubó a temperatura ambiente durante 5 minutos permitiendo la adhesión de los amplicones a las partículas magnéticas. Se colocó en un soporte magnético durante 2 minutos para permitir la separación de las partículas del sobrenadante, el cual se retiró manteniendo la placa en el soporte magnético. Se añadieron 200 µl de etanol 80% a cada pocillo, incubando 30 segundos y retirando el sobrenadante. Este paso de lavado con etanol se repitió una vez más. Después del segundo lavado, la placa se dejó secar durante 10 minutos. A continuación, la placa se retiró del soporte magnético y se añadieron 52,5 µl de tampón de elución a cada pocillo. La placa se agitó a 1.800 rpm durante 2 minutos, y se colocó nuevamente en el soporte magnético 2 minutos adicionales. Finalmente se transfirieron 50 µl del sobrenadante, que contiene los amplicones purificados, a una nueva placa de PCR.

A continuación del lavado, las muestras se indexaron empleando el kit Nextera XT Index kit (Illumina). Para ello, se transfirieron 5 µl de cada amplificación a

una nueva placa, conservando el volumen restante a -20°C. En esta nueva placa, se añadió los siguientes volúmenes a cada reacción:

Componente	µl/reacción
Producto de PCR	5
5 µl Nextera XT Index Primer 1	5
5 µl Nextera XT Index Primer 2	5
2X KAPA HiFi HotStart Ready Mix	25
Nuclease-free water	10

A continuación de realizar la mezcla, la placa se sometió a las siguientes condiciones en el termociclador:

Fase	Temperatura	Tiempo
DESNATURALIZACIÓN	95°C	3 minutos
INDEXADO (x25)		
-Desnaturalización	95°C	20 segundos
-Hibridación	55°C	30 segundos
-Elongación	72°C	30 segundos
ELONGACIÓN	72°C	5 minutos

Tras el indexado la placa se centrifugó a 280x g durante 1 minuto para recoger la condensación en la tapa. Se adicionó a cada pocillo 56 µl de solución de unión del DNA Size Selection and PCR Clean-Up kit (Cytiva), agitando 30 segundos para unir los amplicones indexados a las partículas magnéticas. Tras ello se realizaron dos lavados con etanol al 80% tal como se indicó anteriormente. Los amplicones se resuspendieron en un volumen final de tampón de elución de 25 µl.

Posteriormente a la obtención de los amplicones indexados y lavados, se cuantificó cada muestra tal como se describe en el apartado. De cada reacción se preparó una dilución en Nuclease Free water (Sigma-Aldrich) a 4 nM, empleando la formula descrita a continuación:

$$\frac{ng/\mu l \times 10^6}{\frac{660g}{mol} \times \text{tamaño medio de la librería (bp)}} = \text{Molaridad (nM)}$$

De cada muestra se adicionaron 5 µl uniéndolas en un tubo eppendorf de 1,5 ml. El pool resultante se desnaturalizó y cargó a una concentración final de 20 pM, tal como se describe en el apartado 3.2.3.4.3.

3.2.3.4.2. Librerías de secuenciación de genoma completo

Para la secuenciación de genomas a partir de aislados puros, se empleó tecnología shoutgun, descrita en el protocolo Nextera XT DNA Library Prep (Illumina, 2023).

Se preparó una dilución de cada muestra a una concentración de 0.2 ng/µl en agua de grado molecular (Nuclease Free Water, Sigma-Aldrich). Para cada muestra a estudiar se mezcló en una placa de PCR de 96 pocillos, 10 µl la solución de tagmentación (Tagment DNA Buffer, TD) y 5 µl de cada dilución de ADN. La mezcla se sometió en el termociclador a una temperatura de 55°C durante 5 minutos, permitiendo la tagmentación y adición de adaptadores para el posterior indexado. Tras la incubación se enfría la muestra hasta los 10°C. Al alcanzar los 10°C inmediatamente se añaden 5 µl de tampón Neutralize DNA Buffer (ND), centrifugando a 280x g durante 1 minuto. Se dejó incubar 5 minutos a temperatura ambiente, permitiendo la inactivación de la transposasa. Posteriormente se procedió con la adición de los índices y adaptadores de secuenciación, mediante amplificación PCR. Para ello se preparó cada reacción con las siguientes condiciones:

Componente	µl/reacción
Nextera PCR Master Mix (NPM)	15
Nextera XT Index Primer 1	5
Nextera XT Index Primer 2	5

Tras adicionar la mezcla, se centrifugo la placa a 280x g para coleccionar todo en el fondo de la placa. A continuacion, la placa se sometio a una serie de ciclos de temperatura con el objetivo de adicionar los indices y adaptadores necesarios para generar los cluster durante la secuenciacion. Las condiciones se presentan a continuacion:

Fase	Temperatura	Tiempo
PRE-ELONGACIÓN	72°C	3 minutos
DESNATURALIZACIÓN	95°C	30 segundos
INDEXADO (x12)		
-Desnaturalización	95°C	10 segundos
-Hibridación	55°C	30 segundos
-Elongación	72°C	30 segundos
ELONGACIÓN	72°C	5 minutos
ENFRIAMIENTO	10°C	Mantener

Tras el indexado, la placa se centrifugó a 280 xg durante un minuto. Se procedió con el lavado del producto de PCR. Para ello, se adicionaron 30 µl de buffer de unión del DNA Size Selection and PCR Clean-Up kit (Cytiva) a cada pocillo. Lo que permite la unión de los fragmentos de ADN a las partículas magnéticas. La mezcla se agitó a 1.800 rpm durante 2 minutos, y se incubó a temperatura ambiente durante 5 minutos. La placa se colocó sobre un soporte magnético permitiendo la separación de las partículas magnéticas del sobrenadante residual. El sobrenadante se eliminó y se realizaron dos ciclos de lavado con etanol al 80%. Añadiendo 200 µl e incubando 30 segundos entre lavados. Tras retirar el etanol se dejó secar la placa durante 15 minutos a temperatura ambiente, para eliminar el etanol residual. La placa se retiró del soporte magnético y se adicionó 52.5 µl de tampón de elución Resuspension Buffer (RSB). Agitando la placa a 1.800 rpm durante 2 minutos e incubando 5 minutos a temperatura ambiente, liberando los fragmentos de ADN en el tampón de elución. Finalmente, la placa se colocó nuevamente en el soporte magnético 2

minutos y se retiraron 47 µl del sobrenadante a una nueva placa de PCR de 96 pocillos.

A partir de los productos de cada muestra se prepararon diluciones a una concentración de 4 nM. Las muestras se combinaron en un pool, añadiendo 5 µl de cada muestra en un tubo de centrifuga 1,5 ml. Posteriormente se calculó la molaridad resultante usando la siguiente formula, en el que el tamaño medio de los fragmentos es 660 pb:

$$\frac{ng/\mu l \times 10^6}{\frac{660g}{mol} \times average\ library\ (bp)} = Molarity\ (nM)$$

El pool final se desnaturalizó y preparó a una concentración final de 20 pM, según las condiciones indicadas en el apartado 3.2.3.4.3.

3.2.3.4.3. Desnaturalización y dilución de librerías para secuenciación

Las librerías para la secuenciación requieren de una etapa de desnaturalización y ajuste de concentración para la carga en el secuenciador. Se preparó una solución de NaOH (Sigma-Aldrich) a una concentración de 0.2 M, mezclando 2 µl de NaOH 10 M en 98 µl de agua de grado molecular (Nuclease Free Water, Sigma-Aldrich). En un tubo de centrifuga 1,5 ml con 5 µl del pool de la librería a secuenciar. Se incorporan 5 µl de solución 0,2 M NaOH previamente diluida. Al mismo tubo se adiciona 990 µl de tampón de hibridación HT1, manteniendo la librería desnaturalizada y ajustando el ADN a las condiciones necesarias para la hibridación con los oligonucleótidos de la flowcell. Para ajustar la carga en el secuenciador se incorpora un control de secuenciación PhiX (Illumina), que consiste en ADN genómico del bacteriófago PhiX174, que

presenta una alta diversidad de secuencias conocidas. Este es previamente desnaturalizado, mediante la adición de 2 µl de PhiX 10 mM (Illumina), 3 µl de tampón ETB y 5 µl de 0,2 M NaOH. A la mezcla resultante, se añaden 990 µl de tampón HT1 y esta mezcla se conserva a -20°C hasta su uso.

La mezcla de carga final se ajustó en función de la diversidad de bases de las librerías a secuenciar, añadiendo diferentes proporciones de control PhiX con el objetivo de compensar la baja diversidad que puede contener las secuencias. En el caso de secuenciación de genomas completos, se utilizó una mezcla compuesta por 594 µl de librería y 6 µl de PhiX 0,2 M, dada la alta diversidad que presentan este tipo de muestras. Para la secuenciación de amplicones 16S, caracterizada por su baja diversidad de bases, debido a la amplificación del mismo “tipo” de fragmento. Se empleó una mayor concentración de PhiX, mezclando 450 µl de librería con 150 µl de control PhiX 0,2 M. Se cargaron 600 µl de la mezcla en el cartucho de secuenciación MiSeq Reagent Kit v3_600-cycle.

3.2.4. Procesamiento bioinformático

3.2.4.1. Análisis de genomas completos

Tras la fase de secuenciación, el secuenciador Miseq (Illumina), ofrece las secuencias en formato fastq de lecturas crudas. Las secuencias fueron analizadas en dos servidores según los requerimientos de uso itaul4644 e itaul4602. Para el procesamiento de lecturas crudas y análisis posterior de los genomas se empleó el software de libre acceso Tormes v1.3.0 (Quijada et al., 2019), el flujo de trabajo seguido con dicho programa se describe a continuación.

Inicialmente se determinó la calidad de las secuencias crudas mediante el uso de FastQC (Andrews, 2010), acoplando todos los informes para cada muestra

en uno único mediante el uso del programa MultiQC (Ewels et al., 2016). Se eliminaron los adaptadores de Illumina, así como las secuencias de baja calidad basándose en el Phred score mediante el empleo de Trimomatic (Bolger et al., 2014). Tras la eliminación de los adaptadores, se recortaron 10 bases al inicio y 10 bases al final de cada lectura, siempre que las bases tuvieran un Phred score inferior a 10. Además, se aplicó un filtrado adicional mediante una ventana deslizante de 5 bases, recortando aquellas lecturas donde el promedio de calidad dentro de esta ventana fuera inferior a 20 (Phred score). Finalmente se eliminaron las secuencias cuya longitud era inferior a 36 nucleótidos.

A continuación, los genomas se ensamblaron empleando el software Spades (Bankevich et al., 2012) junto con la opción *--careful*. Una vez ensamblados los genomas se determinaron los distintos parámetros de calidad de ensamblado con el software QuAST (Mikheenko et al., 2018) y la cobertura media de secuenciación mediante el software BBMap (Bushnell, 2022). La especie se identificó empleando el software Kraken2 (Wood et al., 2019), una herramienta de clasificación basada en la división del genoma en k-mers y la comparación de dichos k-mers con la base de datos preentrenada de kraken, al asignar cada k-mer al ancestro común más cercano. Posteriormente se realizó la clasificación de los aislados por MLST, empleando el software mlst (Seemann, 2025), basándose en los esquemas de tipado de PubMLST (Jolley et al., 2018).

Se exploró la presencia de genes de resistencia a antibióticos a través de la base de datos RestFinder (Bortolaia et al., 2020) y CARD (Alcock et al., 2019) la presencia de replicones de plásmidos mediante la base de datos de plasmidFinder (Carattoli et al., 2014) y factores de virulencia a través de virulence factor database (B. Liu et al., 2019). La búsqueda en las bases de datos anteriormente citadas se realizó mediante el uso del software abricate (Seemann,

2020), que permite la descarga automatizada y la búsqueda mediante BLAST+ (Camacho et al., 2009). A continuación, se realizó la anotación y predicción de regiones codificantes a partir de los genomas ensamblados, utilizando el software Prokka (Seemann, 2021). Posteriormente, tras la anotación, se empleó el software Roary (Page et al., 2015) para llevar a cabo el análisis pangenómico a partir de los genes predichos.

3.2.4.2. Análisis de amplicones 16S

Una vez finalizada la secuenciación de amplicones 16S mediante el sistema MiSeq (Illumina), las lecturas crudas se procesaron siguiendo el flujo de trabajo descrito a continuación. Se realizó el control de calidad de las secuencias obtenidas empleando el software FastQC (Andrews, 2010) y se agruparon los informes para cada muestra empleando MultiQC (Ewels et al., 2016). Posteriormente se eliminaron los adaptadores de illumina, mediante el uso de Trimmomatic (Bolger et al., 2014). Las secuencias sin adaptadores se importaron al software QIIME2 (Bolyen et al., 2019), este constituye un entorno que incluye numerosos programas para el análisis de las lecturas de amplicones 16S. Tras la eliminación de adaptadores, los amplicones fueron recortados a un tamaño óptimo determinado a partir de los perfiles de calidad generados con MultiQC, Para ello, se empleó el algoritmo DADA2 (Callahan et al., 2016), implementado dentro del entorno QIIME2. Este procedimiento incluyó la eliminación de secuencias con más de dos errores esperados, la fusión de lecturas pareadas y la detección y eliminación de secuencias quiméricas. Finalmente, mediante DADA2 se llevó a cabo la inferencia de las variantes de secuencia de amplicones (ASV) de cada muestra. Las ASVs se definen como la unidad de análisis de diversidad microbiana, que representa una secuencia de ADN única, sin agruparlas por similitud como en los tradicionales OTUs, lo que ofrece una mayor precisión y

reproducibilidad, detectando variaciones de hasta un solo nucleótido (Callahan et al., 2017).

Los ASVs inferidos se clasificaron taxonómicamente mediante un clasificador entrenado específicamente para la región amplificada, para ello se usó la base de datos de SILVA 138 SSURef NR99 full-length (Quast et al., 2012), adaptada para su uso en QIIME2 y el algoritmo RESCRIPt (Robeson et al., 2020) incluido en el entorno de QIIME2. En primer lugar, se extrajeron las regiones correspondientes al par de cebadores empleados (16S Forward y 16S Reverse). Posteriormente, las secuencias recortadas fueron desreplicadas y se clasificaron mediante el algoritmo de clasificación Naive Bayes, que asignó las secuencias a la taxonomía correspondiente, dando como resultado una Tabla que contiene el número de lecturas para cada taxón identificado (ASV-table). Teniendo en cuenta la asignación taxonómica se eliminaron aquellas ASVs que formaban parte de taxones no deseados: mitochondria, chloroplast, eukaryota y unassigned

A continuación, a partir de la Tabla de las ASVs inferidas empleando QIIME2, se representaron curvas de alpha rarefacción para cada muestra. Aquellas muestras que no cubriesen la diversidad completa de la muestra se eliminaron. Finalmente se calcularon los índices de diversidad alfa Chao1, Simpson y Shannon, ajustando la profundidad de lecturas a la muestra con menor número en el análisis, permitiendo realizar comparaciones entre las muestras estudiadas.

3.2.5. Análisis estadístico y gráfico

Tras el análisis bioinformático de las muestras, los resultados de secuenciación se representaron y analizaron empleando el software estadístico R (R Core Team, 2024) y su entorno visual RStudio (Posit Team, 2024).

Tomando como punto de partida los resultados obtenidos tras la ejecución del software para el análisis de genomas completos, Tormes (Quijada et al., 2019). Se representó a través de mapas de calor la presencia-ausencia de los factores de virulencia, genes de resistencia a antibióticos y plásmidos, mediante el uso de la librería ggplot2 de R (Hadley Wickham, 2016). A continuación, se representaron la presencia-ausencia de los genes, así como su clasificación en Core, Soft-Core, Shell y Cloud, mediante el script *roary2svg.pl* disponible en el repositorio web del software Roary (Page et al., 2015).

Tras el análisis de las secuencias de amplicones 16S, se calculó la abundancia relativa de cada muestra como: lecturas asignadas a un taxon / lecturas totales. Posteriormente se calculó la abundancia relativa media para cada taxón a nivel de especie, género, familia, orden, clase y filo para cada muestra, esta conversión se realizó empleando la librería de R Tidyverse (Wickham et al., 2019). Los resultados se visualizaron mediante gráficos de barras utilizando la librería ggplot2 (Hadley Wickham, 2016), así como en formato “pie chart” empleando la librería plotly (Sievert, 2020). A continuación, se evaluaron las diferencias en la composición bacteriana entre grupos mediante el uso de la librería MicroberR (Bisanz, 2018). Para ello, se determinó la diversidad beta a través de un análisis de componentes principales (PCoA), utilizando distancias Bray-Curtis. Previamente las muestras fueron submuestreadas mediante rarefacción a una profundidad equivalente al menor número de lecturas presente entre ellas. La significancia estadística de la estructura observada en la matriz de distancias se evaluó mediante el análisis ADONIS (Permutational Multivariable Analysis of Variance). Finalmente, sobre el gráfico de coordenadas principales (PCoA), se trazaron elipses de confianza del 95% para facilitar la interpretación de la agrupación entre las muestras.

4. Resultados y Discusión

4. Resultados y discusión

Este epígrafe se ha estructurado en cuatro capítulos de carácter clínico y experimental, cada uno precedido por un resumen e introducción y seguido de metodología, resultados y discusión crítica de los resultados. Cada capítulo aborda:

- **Capítulo 1:** Estudio del síndrome de la boca mojada en corderos, con identificación de perfiles bacterianos y fuentes de contaminación.
- **Capítulo 2:** Análisis de la transmisión de *Streptococcus dysgalactiae* a través del sistema de ordeño y calostro.
- **Capítulo 3:** Investigación de un brote de *Streptococcus pasteurianus* y su relación con el sistema de distribución de agua.
- **Capítulo 4:** Caracterización regional de perfiles bacterianos asociados a diarreas neonatales en ovino, bovino, porcino y caprino.

4.1. Capítulo 1: El síndrome diarreico de la boca mojada etiología y factores ambientales

Summary

Background:

This chapter presents a study on the first documented cases of neonatal diarrhea in the Castilla y León region. The syndrome manifests within the first 6 to 12 hours after birth, characterized by diarrhea, loss of appetite, and lethargy, without any visible pathological lesions. According to existing references, the disease is likely associated with the rapid proliferation of an unidentified *E. coli* strain, which releases lipopolysaccharides from its cell wall. The exact contamination source and mechanisms of spread remain unknown. The significance of this neonatal diarrhea syndrome led to its investigation.

Objetives:

- To determine the bacterial profiles associated with Watery Mouth Syndrome.
- To genetically characterize the primary microbial agents involved in Watery Mouth Syndrome.
- To identify the main sources of contamination in livestock farms affected by Watery Mouth Syndrome.
- To establish effective control and disinfection measures aimed at reducing the incidence of the syndrome in affected farms.

Sampling:

Thirteen Assaf breed livestock farms (G1 to G13) were included in the study. Of these, twelve farms exhibited clinical signs consistent with Wet Mouth Syndrome, while one farm served as an asymptomatic control. A total of 337 samples were analyzed, comprising 166 rectal swabs, 5 buccal swabs, 85 intestinal content samples, 4 abomasum content samples, 25 feed samples, 10 colostrum samples, 5 maternal buccal swabs, and 5 vaginal swabs.

Results and Discussion:

Three major bacterial profiles were identified through 16S rRNA sequencing. In symptomatic animals, the most prevalent taxa were *Escherichia-Shigella* (36,72%) and *Clostridium* (28,52%). In asymptomatic animals—both prior to symptom onset and after recovery—*Escherichia-Shigella* and *Clostridium* accounted for 19.35% and 9.21%, and 22.82% and 18.96%, respectively. Dysbiosis was found to

emerge between 12 and 24 hours after birth, characterized by elevated levels of *Clostridium* and *Escherichia-Shigella*.

The distribution of these bacteria along the gastrointestinal tract—from the abomasum to the rectum—was also analyzed. *Escherichia-Shigella* was present throughout the intestinal tract, while *Clostridium* species showed higher abundance in the jejunum, ileum, and cecum.

Within the *Escherichia* genus, *E. coli* was dominant (110 out of 111 isolates), with sequence type ST-88 being the most prevalent. The most frequently detected toxin was EAST-1 (20%). Among *Clostridioides* species, 14 isolates were identified as *C. paraputrificum*, 5 as *C. cadaveris*, 5 as *C. perfringens*, and 10 as *C. tertium*. The most significant virulence factor detected was the *plc* gene, accompanied by accessory toxins such as Kappa, Mu, and Theta.

Finally, it was established that the highest bacterial load was found in straw bedding 48 hours before the onset of the lambing cycle, indicating this as the primary environmental contamination source.

4.1.1. Contextualización y justificación del estudio

Las afecciones diarreicas en producción intensiva de cordero generan grandes pérdidas económicas, ya que se asocian a pérdidas de peso, reducciones en el crecimiento, llegando en los casos más graves a la muerte del animal (Y. Zhang et al., 2021). Este capítulo se centra en el estudio de la principal afección diarreica neonatal en cordero, el síndrome de la boca mojada, este presenta una alta incidencia, según las publicaciones científicas más recientes afectando al 25% de los corderos a nivel, con unas tasas de mortalidad que ascienden al 80% (Angell & Duncan, 2020). El primer estudio sistemático que trató de definir el síndrome de la boca mojada fue llevado por R. O. Collins et al. (1985), sin anomalías hematológicas o bioquímicas entre los corderos estudiados. Se asoció la aparición del síndrome en parte debido al cambio en el modelo productivo hacia una explotación intensiva, las dificultades que acarrea esto al manejo, especialmente durante las primeras horas de vida del cordero donde requieren una mayor atención y cuidado, ha hecho del síndrome de la boca mojada la principal afección en cordero neonato (Eales et al., 1986; Zhong et al., 2022).

El síndrome aparece de forma temprana entre las 6 a 12 horas de vida del cordero, generando un cuadro clínico con diarrea, inapetencia y depresión, llegando a la muerte. El síndrome de la boca mojada recibe este nombre debido a que los corderos en estadios avanzados de la enfermedad, presentan un humedecimiento en el contorno de los labios, seguida por una fuerte salivación llegando incluso a gotear de forma continua. Por su parte los estudios anatómopatológicos no han mostrado lesiones en las vellosidades intestinales, aunque si se ha visto un meconio distendido con gas y saliva, junto con una retención en el meconio (R. Collins & Carson, 2022).

Tradicionalmente la enfermedad se ha asociado a una proliferación masiva de *E. coli*, seguida por una muerte de esta desencadenando una

endotoxemia con una liberación masiva de lipopolisacárido de la pared celular (LPS). El patotipo de *E. coli* causante de la enfermedad es aún desconocido y probablemente sea una cepa considerada no patógena (R. Collins & Carson, 2022). La hipótesis más aceptada sobre la enfermedad fue propuesta por Angell y Duncan (2020). Según los autores, el cordero durante las primeras etapas de vida presenta un estado inmunológico inmaduro. Este pasa de un ambiente relativamente estéril, el útero materno a un ambiente altamente contaminado en la granja, viéndose expuesto a una alta concentración bacteriana de origen fecal presente en el suelo. Generando una entrada oral de las bacterias, que se encuentran con un abomaso, cuyo pH es relativamente neutro hasta la primera toma de calostro, lo que facilita su entrada hacia los intestinos. Además, hay que señalar que durante las primeras horas de vida del cordero presenta un mecanismo de pinocitosis muy activo y una motilidad reducida, cuyo objetivo es introducir a la circulación sistémica una gran cantidad de moléculas beneficiosas de la madre como las inmunoglobulinas. De este mecanismo se valen *E. coli* para generar una bacteriemia, pasando al torrente sanguíneo, seguida por una muerte masiva de las mismas que lleva a una endotoxemia y un fallo sistémico en el cordero que conduce a su muerte.

Debido a la escasa información sobre la etiología de la enfermedad así su importancia para el sector ganadero se decidió estudiar este síndrome dándole un enfoque holístico, estudiando tanto los principales agentes bacterianos presentes en animales enfermos, así como los principales focos de contaminación a los que se ven sometidos.

4.1.2. Objetivos

El síndrome de la boca mojada es una de las afecciones diarreicas neonatales más relevantes en cordero aún desconocidas. Los estudios se han basado principalmente en técnicas de aislamiento microbiano, únicamente han podido establecer *E. coli* como el posible agente causal, sin identificar un patotipo concreto (Angell & Duncan, 2020; R. Collins & Carson, 2022; Eales et al., 1986). A lo largo de este capítulo se determinará los perfiles bacterianos intestinales presentes en animales enfermos, así como su temporalidad y distribución en el sistema digestivo. También se caracterizarán genotípicamente los patógenos más abundantes, para describir los principales factores de virulencia encontrados, así como determinar genotipos característicos asociados a la enfermedad.

Una vez identificados los principales agentes implicados, se estudiarán los principales focos de contaminación a los que se ven expuestos los animales en las explotaciones ganaderas, para limitar la exposición a estos y determinar medidas efectivas de control, reduciendo el uso de antibióticos.

Por lo tanto, se plantean los siguientes objetivos con el estudio:

1. Determinar los perfiles bacterianos asociados al síndrome de la boca mojada
2. Caracterizar genotípicamente los principales agentes implicados en el síndrome de la boca mojada
3. Identificar los principales focos de contaminación en las explotaciones ganaderas afectadas por el síndrome de la boca mojada
4. Determinar medidas de control y desinfección efectivas para reducir la incidencia en granjas afectadas

4.1.3. Muestreo

Se estudiaron 13 explotaciones ganaderas productoras de cordero Assaf colaboradoras con el estudio, 12 con presencia de boca mojada y 1 sin signos aparentes. Las explotaciones ganaderas se les ha otorgado un identificador con una letra de la G1 a la G13, siendo la G13 la granja control. Las explotaciones están distribuidas en la comunidad de Castilla y León, concretamente en Valladolid (G1) Zamora (G2, G3, G4, G5, G7, G8, G9, G10, G11, G12), Palencia (G6), León (G12). En total se han analizado 337 muestras, que se corresponden con: 166 hisopos rectales de corderos, 5 hisopos bucales de corderos, 85 muestras de contenido intestinal, 4 de abomaso en corderos vivos, 25 camas, 24 heces maternas en fase de parto, 8 placentas, 10 calostros, 5 hisopos bucales de las madres en parto y 5 vaginales de las madres. Intentando estudiar distintos aspectos relacionados con la patología y que se desarrollaran posteriormente. En la Tabla 12 se recoge el tipo de muestra y el objetivo asociado.

Tabla 12. Organización de las muestras por tipo, granja y objetivo. Cada granja se identifica con una letra: de la A a la O. Tipo de muestra: HR= Hisopo rectal, BS= Hisopo bucal, IC= Contenido intestinal, AB= Abomaso, CA= Cama, HM= Heces maternas, PL= Placenta, CA= Calostro, HV= Hisopo vaginal.

Objetivo de las muestras	ID granja	Número de muestras y tipo
Perfiles 16S rectales para boca mojada	G1-G13	66 HR
Perfiles 16S bucales para boca mojada	G1	5 HB
Perfiles 16S de la distribución temporal en boca mojada	G6	17 HR
Perfiles 16S de la distribución intestinal en boca mojada	G6	56 CI
Perfiles 16S de abomaso en animal vivo	G6	4 AB
Aislados <i>E. coli</i>	G1-G13	83 (72 HR y 11 CI)
Aislados de <i>Clostridium</i> y <i>Clostridioides</i>	G6	29 (11 HR y 18 CI)
Recuento en camas	G6	5 CA
Recuento en heces de las madres	G6	7 HM
Recuento de placentas	G6	3 PL
Recuento de calostros	G6	10 CA
Recuento de las camas durante la paridera	G6	11 CA
Perfiles 16S de las heces maternas	G1-G13	17 HM
Perfiles 16S de las placentas	G6	5 PL
Perfiles 16S vaginal de la madre	G6	5 HV
Perfiles 16S bucales de las madres	G6	5 HB
Perfiles 16S de las camas	G6	9 CA

4.1.4. Resultados

4.1.4.1. Perfiles bacterianos en la enfermedad de la boca mojada

Partiendo de un muestreo de 47 corderos enfermos, 5 corderos sanos y 11 corderos con la enfermedad pasada, se tomaron muestras mediante el uso de

hisopo rectal. En la Figura 3 se muestran las fases de evolución de la enfermedad en una de las explotaciones muestreadas (G6).



Figura 3. Fases de desarrollo del síndrome de boca mojada. (A) Corderos al inicio del cuadro diarreico. (B) Corderos durante el cuadro diarreico. (C) Corderos tras la resolución del cuadro diarreico.

Se realizó secuenciación de ARNr 16S para establecer los perfiles bacterianos presentes en las heces diarreicas de aquellos animales con el síndrome de la boca mojada. Tras la secuenciación, se clasificaron las secuencias taxonómicamente, identificando 169 taxones bacterianos a nivel de género y 1.893.844 lecturas en total.

A continuación, se realizó un análisis de coordenadas principales (PCoA), empleando distancias Bray Curtis, trazando elipses con un 95% de intervalo de confianza, el análisis se muestra en la Figura 4 A. Donde podemos ver una agrupación diferencial de los corderos, los corderos que presentan la enfermedad generan un grupo definido en el gráfico, en cambio aquellos que han superado la enfermedad o los corderos sanos presentan una mayor dispersión en el análisis de coordenadas principales.

Si atendemos a los perfiles bacterianos, se diferencian tres modelos definidos al representar el valor medio de las abundancias relativas para cada grupo bacteriano a nivel de género. Los corderos enfermos muestran el perfil representado en la Figura 4 B, los corderos sanos quedan representados en la Figura 4 C y los corderos recuperados, es decir que ya han superado la enfermedad, se representan en la Figura 4 D.

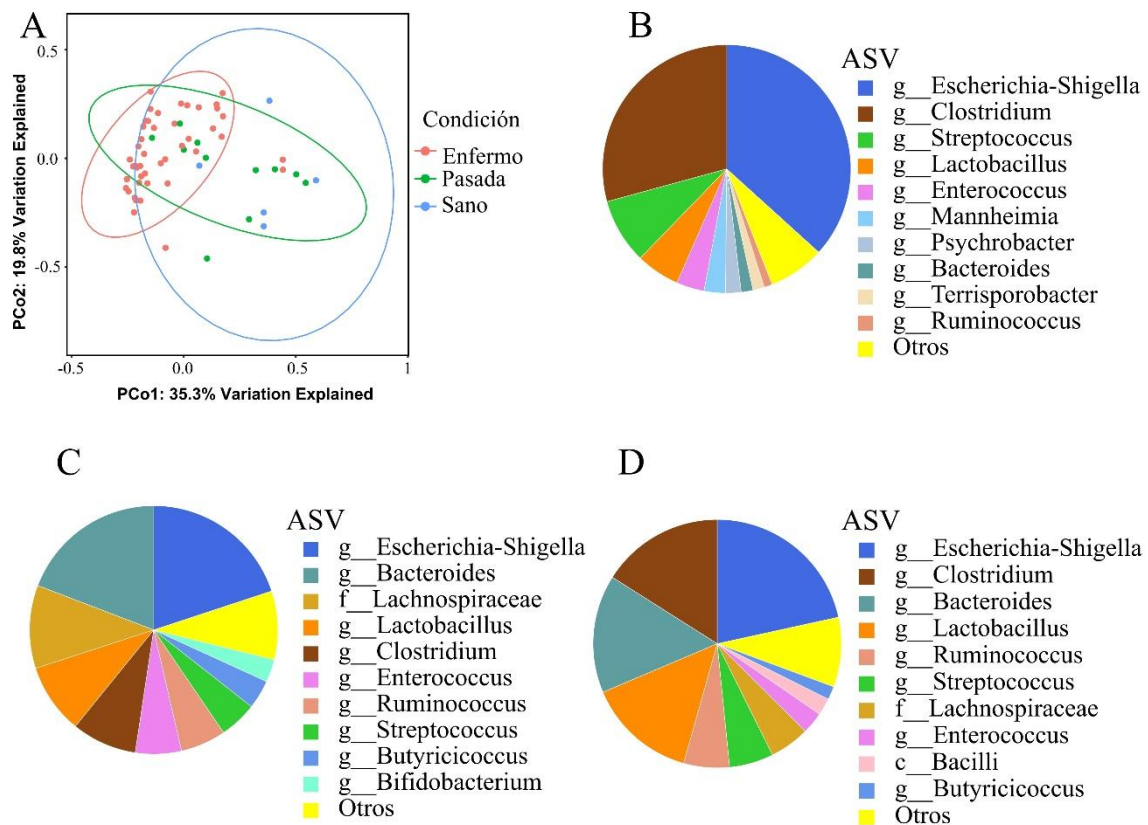


Figura 4. Estudio de la composición bacteriana a través de secuenciación del ARNr 16S en corderos sanos, enfermos y recuperados. A) Análisis de componentes múltiples PCoA basado en distancias Bray-Curtis. Abundancia relativa bacteriana para corderos enfermos B), en corderos sanos C) y en corderos recuperados D).

En la Tabla 13 se presentan las abundancias relativas de los 10 grupos más abundantes para cada subgrupo de corderos. Atendiendo a estos perfiles bacterianos, los corderos enfermos presentan como géneros más abundantes *Escherichia-Shigella* y *Clostridium* ocupando entre los dos grupos un 65,24% de la

composición bacteriana total, concretamente el grupo mayoritario es *Escherichia-Shigella* con un 36,72%, seguido por *Clostridium* con un 28,52%. Los corderos que ya han superado la enfermedad presentan un perfil distinto, con una reducción de *Escherichia-Shigella* con un 22,82% y *Clostridium* con un 18,96%, junto a la reducción de ambos grupos también aparece el género *Bacteroides* como tercer grupo más abundante ocupando un 13,64% y aumenta el grupo *Lactobacillus* con un 12,82%. Finalmente, en animales sanos, encontramos las menores abundancias relativas para *Escherichia-Shigella* con un 19,35%, como segundo grupo más abundante aparece *Bacteroides* con un 16,60%, seguido por *Lactobacillus* con un 10,98%. Por su parte el grupo *Clostridium* presenta una baja abundancia relativa en comparación con los grupos anteriores, con un 9,21%. Destacar la presencia de grupos probióticos como *Bifidobacterium* ocupando un 3% de la composición bacteriana total.

Tabla 13. Abundancia relativa de los 10 grupos más abundantes para corderos sanos, enfermos y recuperados. Código de ASVs: c (clase), f (familia) y g (género)

Enfermos	%	Pasada	%	Sanos	%
g__Escherichia-Shigella	36,73	g__Escherichia-Shigella	22,82	g__Escherichia-Shigella	19,35
g__Clostridium	28,52	g__Clostridium	18,96	g__Bacteroides	16,60
g__Streptococcus	9,08	g__Bacteroides	13,64	g__Lactobacillus	10,98
g__Lactobacillus	5,8	g__Lactobacillus	12,82	f__Lachnospiraceae	10,94
g__Enterococcus	3,82	g__Streptococcus	8,04	g__Clostridium	9,21
g__Mannheimia	2,96	g__Ruminococcus	5,41	g__Ruminococcus	6,13
g__Psychrobacter	1,87	f__Lachnospiraceae	4,85	g__Enterococcus	6,10
g__Bacteroides	1,74	g__Enterococcus	2,63	g__Streptococcus	5,11
g__Terrisporobacter	1,32	g__Butyricicoccus	1,69	g__Butyricicoccus	4,20
f__Clostridiaceae	0,95	c__Bacilli	1,42	g__Bifidobacterium	3,00

Adicionalmente a la composición bacteriana fecal, se estudió los perfiles bacterianos bucales en el síndrome de la boca mojada. Para ello se tomaron muestras de 5 corderos, dos de ellos al comienzo de los síntomas a las 10 h de

vida (WB1 y WB2), dos con el proceso empezado a las 24 h de vida (WB3 y WB4) y un cordero a la semana del nacimiento, con el proceso superado (WB5). Tras el análisis informático de las muestras se obtuvieron 333.017 lecturas y 164 taxones identificados ASVs a nivel de género. Los perfiles bacterianos se muestran en la Figura 5, donde se observa una variación en la composición bacteriana a diferentes horas del muestreo. De modo que los corderos a la aparición de los síntomas presentan como grupo más abundante *Bibersteinia* ocupando un 68,96% para WB1 y 93,22% para WB2, durante la enfermedad los grupos más abundante son *Mannheimia* y *Streptococcus* ocupando un 24,01% y 20,67% en WB3 y un 28,77% y 23,23% para WB4, respectivamente. Tras superar los síntomas la composición bacteriana queda dominada por *Pasteurella* ocupando un 31,21% de población total.

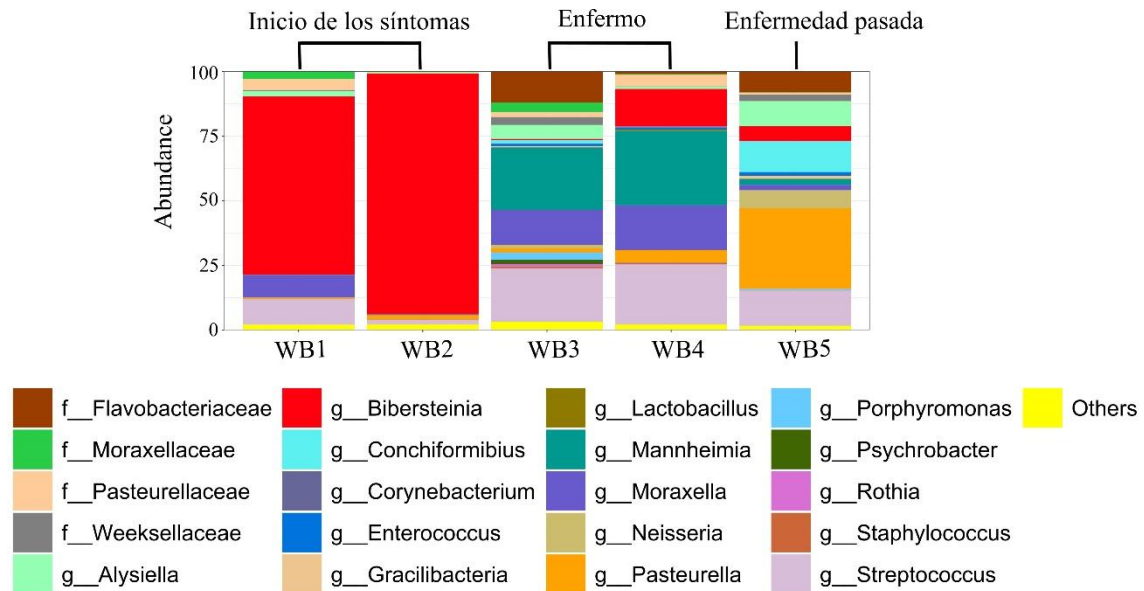


Figura 5. Perfiles bacterianos bucales a través de secuenciación del ARNr 16S. Para corderos al inicio de los síntomas (WB1 y WB2), en corderos enfermos (WB3 y WB4) y en corderos con la enfermedad pasada (WB5).

Uno de los objetivos con el estudio era establecer la temporalidad del síndrome, describiendo los cambios en la composición intestinal a lo largo del tiempo. Para ello se estudió la composición intestinal de 7 corderos (WT-1 a WT-7) entre las 0-12h de vida, de 7 corderos (WT-8 a WT-14) entre las 12-24h de vida y de 3 corderos (WT-15 a WT-17) entre las 24-26h de vida. Se realizó secuenciación del ARNr16S para determinar los perfiles bacteriológicos de las muestras tomadas, identificando 265 taxones y 466.243 lecturas a nivel de género. Dicha asignación taxonómica se sometió a un análisis de coordenadas (PCoA), y se trazaron elipses para un intervalo de confianza del 95%. Este análisis está representado en la Figura 6 A, podemos ver como se generan dos grupos, aquellos corderos entre 0-12h de vida, marcados en rojo y un segundo grupo con los corderos entre 12-24h de vida, marcados en verde. Por su parte, los corderos entre 24-36h de vida no forman un grupo definido debido a la alta variabilidad composicional que se describe a continuación. Destacar que los corderos WT6 y WT7 no agrupan con los corderos entre 0-12h de vida, aunque el cordero WT7 es próximo a aquellos que tienen entre 12-24h de vida.

En la Figura 6 B se representa la abundancia relativa de los 20 grupos más abundantes, las medias de dichas abundancias quedan recogidas en el Anexo I Tabla 1. En los corderos entre las 0-12h de vida, vemos tres perfiles bacterianos. En las muestras WT1 a WT5, encontramos un perfil bacteriano caracterizado por la alta diversidad representado por el grupo “Otros”, este engloba aquellas bacterias que no están entre los 20 grupos más abundantes. El género más abundante es *Staphylococcus* con un 28% de la composición bacteriana. En cambio, los corderos WT6 y WT7 presentan una composición diferencial, encontrando para WT6 una muy baja diversidad estando ocupada en su 92,31% por *Escherichia-Shiguella*, en cambio en WT7 encontramos como grupos más abundantes *Clostridium* con un 42,28%, seguido por *Escherichia-Shiguella* con un 35.78%. Los corderos entre las 12-24h de vida, presentan un perfil bacteriano muy

homogéneo, todas con el perfil característico de los animales con boca mojada visto previamente, estando constituida principalmente por dos grupos, siendo el más abundante el género *Clostridium* ocupando de media para el grupo un 44,41% de la composición bacteriana total y en segundo lugar *Escherichia-Shiguella* ocupando un 42,28%. Finalmente, los corderos entre 24-36h de vida se caracterizan por presentar una reducción de los géneros *Clostridium* y *Escherichia-Shiguella* ocupando de media para el grupo, un 33,24% y un 13,09% respectivamente, también presentan un incremento de otros grupos como *Lactobacillus* con un 22,06% o el género *Enterococcus* muy abundantes en WT17 ocupando un 31,02% de la composición bacteriana total.

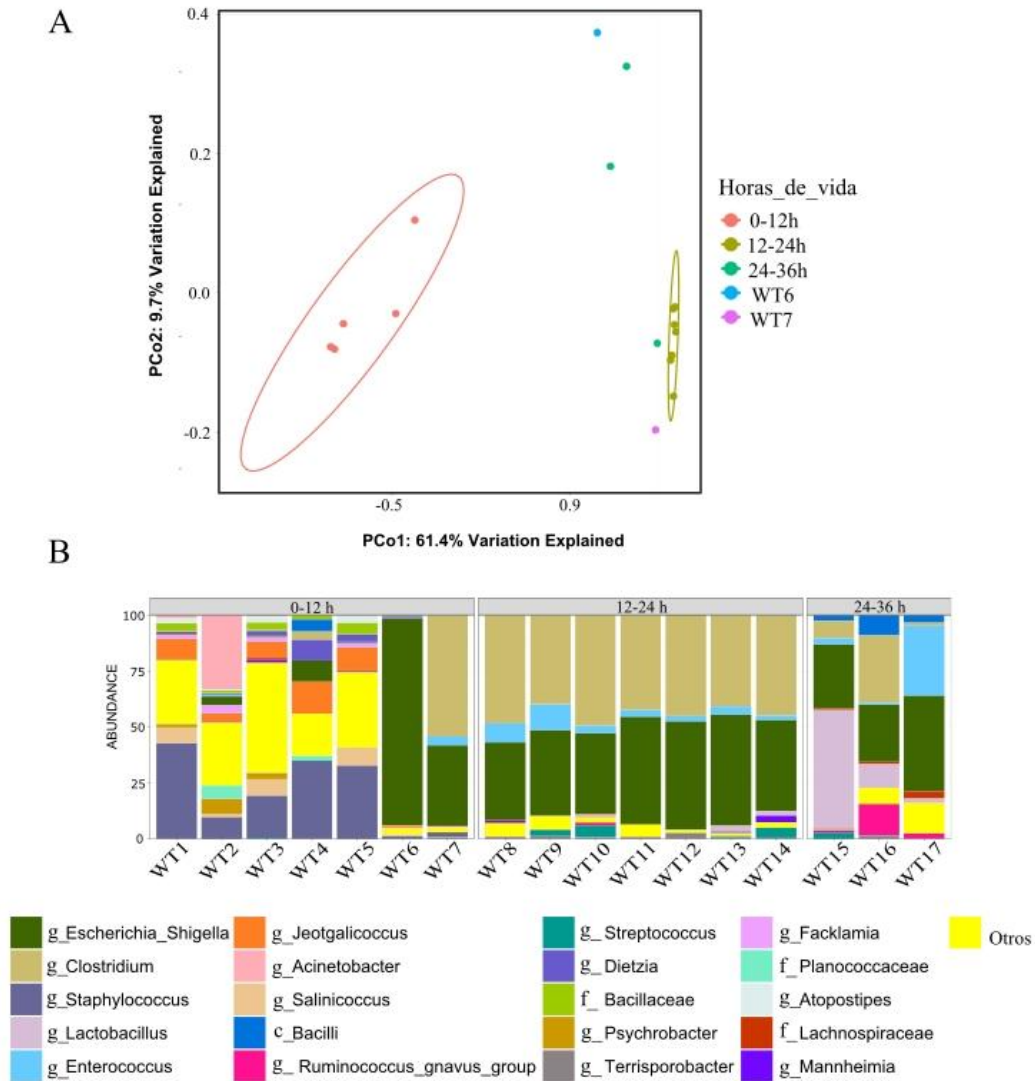


Figura 6. Estudio de la evolución temporal del síndrome de la boca mojada. A) Análisis de componentes múltiples PCoA basado en distancias Bray-Curtis, para corderos entre 0-12h de vida, 12-24h de vida, 24-36h de vida, WT6 y WT7. B) Abundancia relativa de los 20 ASVs más abundantes para los corderos WT1 a WT17.

Una vez determinada la evolución temporal, se procedió a determinar la distribución espacial de la microbiota a lo largo del digestivo. Para determinar si la disbiosis era específica de un punto concreto del digestivo o estaba generalizada a lo largo de este. Se optó por usar el sistema de paridera que presentaba una de las explotaciones colaboradoras (Granja G6).

Para estudiar la distribución espacial de la microbiota intestinal, se emplearon nueve corderos con signos característicos de boca mojada. Se tomaron muestras de contenido intestinal a lo largo del digestivo desde el abomaso hasta el recto. Se dio instrucción a los ganaderos para que todos los corderos fallecidos durante 24h se almacenaran inmediatamente a 4°C, hasta la toma de muestra.

Se realizó una necropsia por un experto veterinario, tomando muestra de contenido del abomaso, duodeno, yeyuno, íleon, ciego, colon y recto (Figura 7). En el cordero 5, dos muestras de yeyuno fueron tomadas, una más alejada del íleon (yeyuno-1) y otra más próxima (yeyuno-2), debido a la presencia de hemorragia en la segunda. Estas muestras se secuenciaron para estudiar la composición bacteriana a través del ARNr 16S.



Figura 7. Necropsia realizada a los corderos fallecidos con boca mojada. A) Cordero con los intestinos expuestos in situ. B) Intestinos aislados tras su extracción de la cavidad abdominal.

Tras la secuenciación y filtrado de las secuencias se obtuvieron 95 ASVs identificadas a nivel de género y 2.093.368 reads. La representación de las abundancias relativas a través del digestivo se muestra en la Figura 8. Siendo el género mayoritario *Escherichia-Shigella* con una distribución homogénea a lo largo del tracto intestinal. Por su parte en el abomaso, también aparece el grupo,

pero en menor proporción. Generalmente encontramos *Clostridium* acompañando a *Escherichia-Shigella*. De forma que *Escherichia-Shigella* y *Clostridium* ocupan respectivamente un 23,3% y 0,85% en abomaso, 57,45% y 8,3% en duodeno, 49,5% y 20,03% en yeyuno, 44,42% y 25,13% en íleon, 37,55% y 24,32% en ciego, 47,51% y 16,44% en colon y 51,49% y 16,57% en recto. El segundo grupo más prevalente es *Lactobacillus* en especial en los corderos 5 y 6. La abundancia relativa media se sitúa en 39,86 % en abomaso, 18,75% en duodeno, 11,13% en yeyuno, 5,65% en íleon, del 8,19% en ciego, 9,41% en colon y 9,32% en recto (Anexo-1, Tabla2).

Es de destacar que en el estudio del cordero 5, se identificaron diferencias composicionales entre el yeyuno-1 (sin hemorragia) y el yeyuno-2 (con hemorragia), donde *Clostridium* es el segundo grupo más abundante ocupando un 21,32% de la comunidad bacteriana total (Anexo-1, Tabla2).

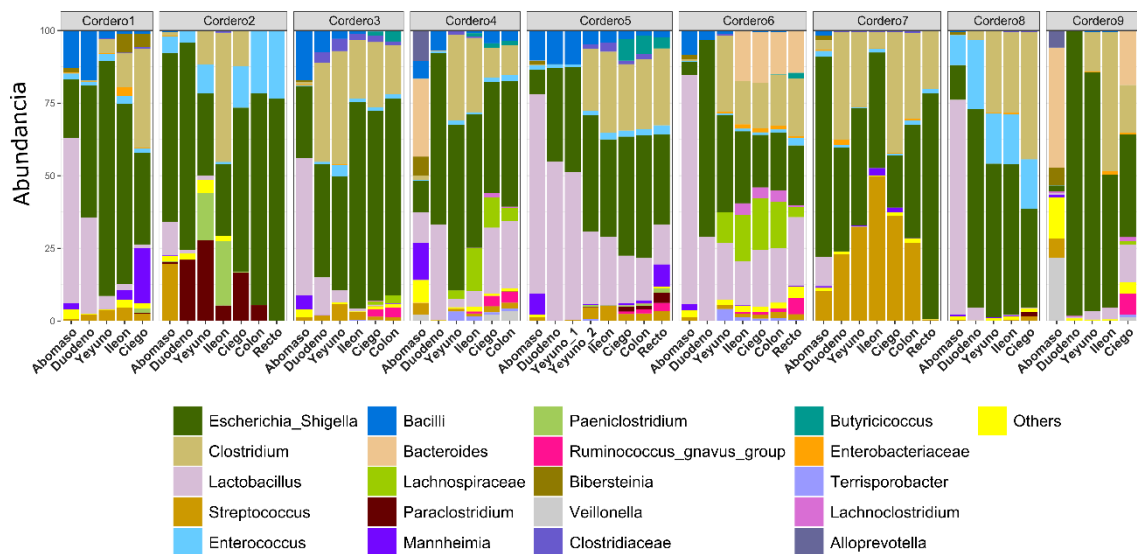


Figura 8. Estudio de la distribución composicional bacteriana a lo largo del digestivo en nueve corderos afectados por el síndrome de la boca mojada (Cordero1 a Cordero9).

Una vez determinados los perfiles temporales y espaciales de la enfermedad, se estudió su entrada al individuo. Según la hipótesis establecida por Angel y Duncan en 2020, el abomaso debido a que presenta en las primeras

horas de vida un pH relativamente neutro, permitiría el paso de una gran cantidad de bacterias. Para corroborar la presencia de bacterias en el abomaso, se tomó contenido abomasal de cuatro corderos. Para ello, se empleó una sonda y se aspiró el contenido directamente de corderos en vida. La muestra fue recogida justo después de la primera toma de calostro en tres corderos (WA1-WA3) y tras varias tomas en otro de los corderos (WA4). Se extrajo el ADN de estas muestras y se secuenciaron obteniendo tras el cribado de las secuencias, 165.568 lecturas y 58 ASVs fueron identificadas a nivel de género.

En la Figura 9, se puede observar cómo después de la primera toma de calostro (WA1-WA3), aparece el grupo *Escherichia-Shigella* como uno de los 20 más abundantes, aunque con proporciones variables entre las muestras (7,47% en WA1, 60,78% en WA2 y 9,42% en WA3). El perfil bacteriológico tras varias tomas de calostro (WA4) es muy diferente con un porcentaje mucho menor, ocupando solo 2,68% de la composición bacteriana total y en este caso, el género *Bacteroides* pasa a ser el más abundante, ocupando un 46,88% de la composición bacteriana total. *Clostridium* aparece en su mayor proporción en el cordero WA2, ocupando este un 10% de la composición bacteriana total. Específicamente en el cordero WA2 donde se presenta el mayor porcentaje de *Escherichia-Shigella* siendo del 60,78%.

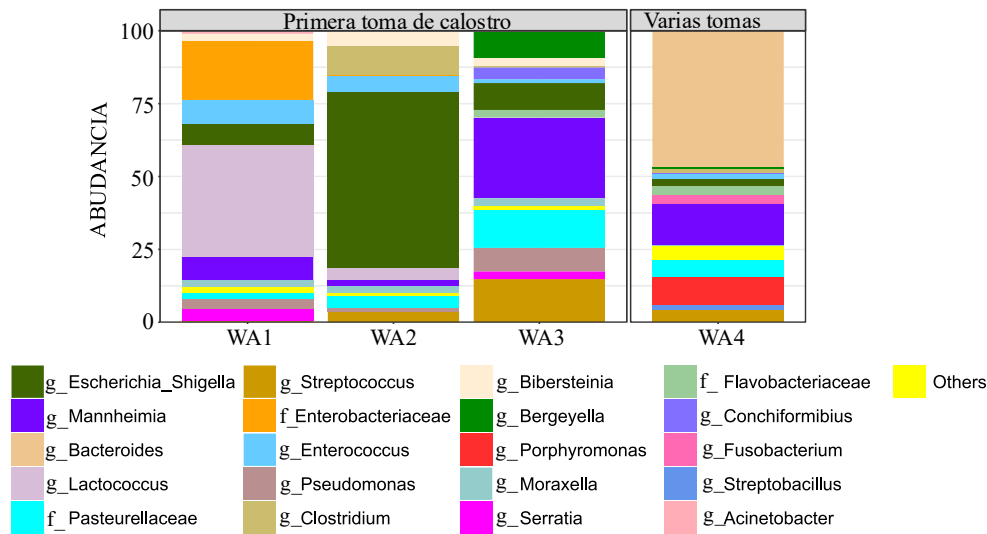


Figura 9. Abundancia relativa de los 20 grupos más abundantes en contenido abomasal de corderos vivos (WA1-WA2-WA3) y tras varias tomas de calostro (WA4).

4.1.4.2. Identificación de los componentes de *Escherichia-Shigella* y *Clostridios* en corderos con boca mojada

A través del estudio de los perfiles bacterianos mediante secuenciación del ARNr16S se estableció *Escherichia-Shigella* y *Clostridium* como los grupos más abundantes a nivel intestinal. Por ello se tomaron, a partir de 12 explotaciones colaboradoras 83 muestras intestinales de corderos con síntomas compatibles con el síndrome de la boca mojada. Concretamente, 72 hisopos rectales y 11 muestras de contenido intestinal, estas últimas mediante la realización de una necropsia a corderos que habían muerto con síntomas compatibles con la enfermedad. Obteniendo 111 aislados por cultivo en medio MacCONKEY, la información referente a estos aislados queda recogida en el Anexo 2, Tabla 5. Todos los aislados fueron secuenciados y se analizó su genoma bioinformáticamente empleando la pipeline TORMES con sus valores por defecto (Quijada et al., 2019).

De los 111 aislados estudiados, 101 fueron clasificados por Kraken2 como parte del grupo *Escherichia-Shigella*, como se presenta en el Anexo I, Tabla 5. De forma adicional se caracterizaron los aislados mediante multilocus sequencing typing (MLST), empleando los dos esquemas disponibles para *E. coli* en GenBank, el esquema de Achtman y el esquema de Pasteur. El MLST más común para el sistema Achtman fue el ST-88, estando presente en el 12% de las muestras. Para el sistema Pasteur fue el ST-66, presente en un 9% de los aislados de *E. coli* identificados.

Se identificaron 188 factores de virulencia distintos mediante la base de datos Virulence Factor Database (VFDB) para *E. coli*. La toxina más frecuentemente identificada fue la toxina termoestable EAST-1, codificada en el gen *astA*. Siendo detectado en el 20% de los aislados de *E. coli* identificados (Anexo II, Figura 1). En menor proporción se encontraron otros genes relacionados con la síntesis de toxinas, el gen *hlyA* codificante de la hemolisina alfa en 5 de los aislados, el gen *senB* codificante de la enterotoxina senB en uno de los aislados, el gen *stx1B* codificante de la toxina de Shiga I presente en 4 de los aislados, *stx2A* codificante de la toxina de Shiga A presente en 3 aislados, *stx2B* codificante de la toxina de Shiga 2B presente en 3 aislados, *stxA* codificante de la toxina de Shiga A presente en 4 aislados. Toxinas frecuentemente relaciones con diarreas no-sanguinolentas (Matussek et al., 2017).

En el aislamiento de esporulados se obtuvieron un total de 53 aislados, mediante el procesamiento de 11 hisopos rectales y 18 muestras de contenido intestinal, tomadas de corderos con síntomas compatibles con el síndrome de la boca mojada.

Los genomas de estos aislados se identificaron empleando el clasificador Kraken-2, incluido en la pipeline Tormes. Como se expone en el Anexo I, Tabla 6, fueron identificados 14 *Clostridium putrefaciens*, 14 *Paraclostridium bifermentans*,

10 *Clostridium tertium*, 5 *Clostridium perfringens*, 5 *Clostridium cadaveris* y 5 *Clostridioides difficile*. Se estudio la presencia de algún genotipo concreto que caracterizase las cepas de Clostridios relacionados con la boca mojada. Mediante MLST usando todos los esquemas existentes para cada una de las especies identificadas. Pero no se pudo determinar ningún MLST característico a excepción del ST-11 presente en todos los aislados de *C. difficile*.

Dentro de las cepas de *C. perfringens* el factor de virulencia más característico fue el gen plc que codifica para la alfa-toxina de *C. perfringens*, estando presente en 4 de los 5 aislados secuenciados de *C. perfringens*. La presencia de esta toxina define el patotipo A, como se muestra en el Anexo II, Figura 2-A, un gran número de toxinas accesorias fueron identificadas en conjunción con la Alpha-toxina, incluyendo la Kappa-toxina, la Mu-toxina, la sialidasa, y la Theta-toxina.

Por su parte el patotipo de *C. difficile* queda definido por 2 toxinas de alto peso molecular, la toxina A y la toxina B. Siendo la más importante la toxina B a la hora de producir la sintomatología característica (Lyras et al., 2009). En el caso de los *C. difficile* aislados todos presentan el gen toxB, codificante de la toxina B. A su vez dos de los aislados contenían el gen tox A, codificante de la toxina A. Como se muestra en el Anexo II, Figura 2-B.

En el resto de los aislados no se pudo identificar toxinas a través de la base de datos VFDB, aunque esto puede deberse a que los factores de virulencia de grupos como *C. putrefaciens*, *C. cadaveris*, *C. tertium* y *P. bifermentans*, que no representan un peligro en individuos sanos, están pobremente identificados. Aunque se ha determinado su potencial como patógenos en individuos inmunodeprimidos y neonatos (Kiu et al., 2017; Schade et al., 2006; Tappe et al., 2005; H. Zhao et al., 2022).

4.1.4.3 Estudio de los puntos de contaminación

Tras determinar las principales bacterias presentes en animales enfermos, así como su distribución espacial y temporal. Se procedió a identificar las principales fuentes de contaminación bacteriana, a la que se veían sometidos estos corderos. Para ello se tomaron muestras de los primeros contactos del neonato con su entorno. Se decidió muestrear; el conducto del parto, la cama, el calostro (o primera leche) y las placentas.

Se tomaron 5 muestras de camas en diferentes áreas de la explotación G6, de la zona de preparto (B1), de las dos zonas de parto (B2 y B3), una muestra de la zona donde se encuentran los corderos entre 24-36h de vida (B4) con la enfermedad y una en donde se encuentran los corderos ente 24-36h de vida (B5) sin la afección. Seguidamente se analizaron otras posibles fuentes de contaminación: las heces de madres en embarazo (F1 a F7), tres placentas, incluyendo 2 frescas P1 y P3 y una deshidratada P2. Además, se analizó la contaminación de los calostros, al ser este uno de los primeros contactos que tiene el animal con el entorno, concretamente un calostro no pasteurizado (C1) de la granja G6 y otros 9 calostros de las granjas A, B y C, con tres replicas por granja (C2-C10).

A la hora de analizar estas muestras, los recuentos se realizaron empleando medio MC para coliformes y medio SD para anaerobios mesófilos a 37 y 30 °C respectivamente. Los recuentos se realizaron por triplicado, y quedan recogidos en el Anexo I, Tabla 6.

Los mayores niveles de contaminación se encontraron en la cama, concretamente en la zona de paridera alcanzando el valor máximo de 3.87×10^8 UFC/g para coliformes totales y 7.67×10^8 UFC/g para anaerobios mesófilos. En cuanto a las heces maternas, las cargas bacterianas son similares a anteriores

estudios reportados, con valores máximos de 3.14×10^4 UFC/g para coliformes y 3.87×10^7 en anaerobios mesófilos (Moriarty et al., 2011). Las placentas tampoco presentaron valores muy altos con unas cargas bacterianas máximas para coliformes de $3,61 \times 10^3$ UFC/g, en cambio para anaerobios mesófilos alcanzaron valores de $6,00 \times 10^6$ UFC/g. Por su parte el calostro pasteurizado, no mostró contaminación bacteriana, pudiendo descartar su implicación en el síndrome.

Al determinar la cama como el foco de contaminación con mayor carga bacteriana, a la que se ven expuestos los corderos. Se estudio la evolución de los aerobios mesófilos, coliformes totales y *E. coli*, en la cama a lo largo de la paridera. Los valores se representan en la Figura 10.

Se tomaron 5 muestras de cama a lo largo de la paridera, a partir de la granja G6 para aerobios mesófilos, coliformes totales y *E. coli* los valores fueron respectivamente, $9,65 \times 10^8$, $3,64 \times 10^5$, $8,88 \times 10^5$ UFC/ml en la cama antes de la limpieza (LB-1). En la cama recién puesta (LB-2), los valores bajan a $1,53 \times 10^6$, $9,33 \times 10^3$ y <1 UFC/ml respectivamente. Tras 48h del encamado (LB-3), se produce el mayor incremento en la carga bacteriana con valores cercanos a los de partida con $8,03 \times 10^8$, $1,88 \times 10^6$ y $3,88 \times 10^6$ UFC/g para aerobios mesófilos, coliformes totales y *E. coli*. Posteriormente los resultados se mantuvieron relativamente estables a lo largo de la paridera.

Para complementar el estudio de la evolución de la carga bacteriana a lo largo de la paridera se tomaron nuevamente de la explotación G6, 6 muestras de cama a lo largo de la paridera, para estudiar tanto anaerobios mesófilos como esporulados totales. Las muestras tras su toma se transportaron en condiciones de anaerobiosis hasta su procesamiento. En el caso del estudio de esporulados las muestras fueron sometidas a selección por choque térmico tal como se detalla en el apartado 3.2.2.1. de Material y Métodos. Se obtuvieron en cama recién colocada los valores de $1,67 \times 10^5$ y $4,55 \times 10^2$ UFC/g (ABL-1) para anaerobios

mesófilos y esporulados respectivamente. Tras 48h la cama experimenta el mayor incremento en ambos grupos, con valores de $4,85 \times 10^7$ y $4,06 \times 10^5$ UFC/g respectivamente. Tras este incremento los valores se mantuvieron relativamente estables.

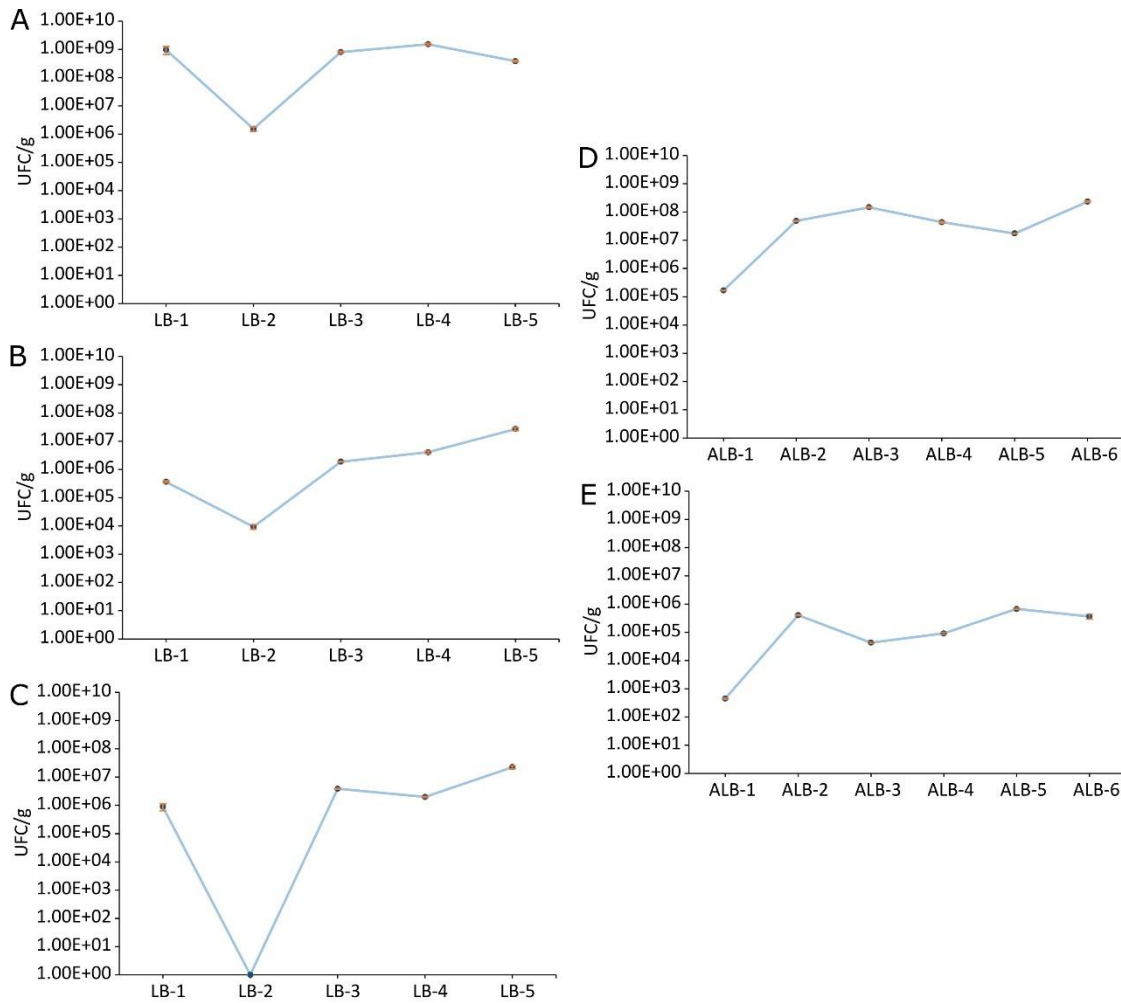


Figura 10. Carga bacteriana a lo largo de la paridera en la explotación G6. En condiciones de aerobiosis (LB): A) Aerobios mesófilos, B) coliformes totales, C) *E. coli*. Antes de la retirada de la cama (LB-1), cama limpia (LB-2), 48h tras colocar nueva cama (LB-3), 1 semana (LB-4) y 4 semanas (LB-5). Recuento de anaerobios durante la paridera (ABL): D) Anaerobios mesófilos y E) esporulados. En cama recién colocada (ABL-1), 48h tras la limpieza (ABL-2), 1 semana (ABL-3), 2 semanas (ABL-4), 3 semanas (ABL-5) y 4 semanas (ABL-6). Las barras de error en color naranja representan la desviación estándar de las medias.

Los resultados de la carga bacteriana se complementaron con estudios de la composición bacteriana, de las fuentes de contaminación a las que se ven expuestos los corderos durante sus primeras horas de vida. A través de secuenciación del ARNr 16S con dos explotaciones colaboradoras con el proyecto, concretamente la explotación G1 y G6, ambas afectadas por el síndrome de la boca mojada. De la explotación G1 se tomaron 12 muestras de heces de madres (MF1 a MF12) y de la explotación G6, 5 muestras (MF13-MF17). En total se obtuvieron unas 855.234 lecturas y 409 ASVs identificadas a nivel de género para las heces maternas. Las abundancias relativas medias se presentan en el Anexo I, Tabla 7.

En general la abundancia relativa en las heces maternas era altamente diversa, no se encontró una dominancia clara de unos grupos sobre otros (Figura 11 A). Específicamente el grupo más abundante fue la familia Lachnospiraceae, y el género *Bacteroides*, ocupando el 7,61% y 6,32% de la composición bacteriana total. También se encontraron diferencias entre las granjas estudiadas con diferentes patrones entre ellas. En la granja G1 los taxones dominantes fueron Lachnospiraceae y los *Bacteroides* con un 9,23% y 7,78% respectivamente. En cambio, en la granja G6, *Arcanobacterium* y *Porhyromonas* fueron los dominantes con un 12,28% y un 8,56 % de la composición bacteriana total. *Escherichia-Shigella* y *Clostridium* presentaron una baja proporción en ambas granjas respectivamente con un 0,34% y un 0,41% en la granja G1 y un 0,23% y 1,65% en la granja G6.

Debido al contacto estrecho de la madre con los corderos se estudió la composición bacteriana bucal de las madres, ya que es muy habitual entre los comportamientos de cuidado parental, el lamer al recién nacido (Dwyer, 2014). Por ello se tomaron 5 hisopos bucales de madres en la granja G6, obteniendo 855.234 lecturas y 409 ASVs identificadas a nivel de género. Como se presenta en la Figura 11 B la composición bacteriana bucal, presentó una baja proporción en

los grupos *Escherichia-Shigella* y *Clostridium* con un 0,20% y un 0,30% respectivamente. Aunque si se detectaron proporciones mayores para otros grupos patógenos como son *Streptococcus*, *Bibersteinia* y *Manhemia* con una abundancia relativa del 15,83%, 14,11% y 7,69% respectivamente. Señalando esta como un posible foco de contaminación para los neonatos.

Para determinar la composición bacteriana de las placentas se colectaron de la granja G6, 5 placentas: 3 placentas frescas y 2 secas. Se realizó secuenciación del ARNr16S obteniendo 36.939 lecturas y 191 ASVs identificas a nivel de género. Al estudiar la composición bacteriana, la proporción del género *Clostridium* y *Escherichia-Shigella* era muy baja, con una media de 0,31% y 0,83% respectivamente en placentas frescas. En el caso de placentas secas, no se encontraron lecturas para ambos grupos. También se identificaron diferencias en cuanto a las placentas frescas y secas, en sus grupos más abundantes, siendo en las frescas *Jeotgaliococcus* con un 11,97% y *Corynacterium* con un 8,45%. En cambio, en placentas secas los grupos *Psychrobacter* y *Jeotgaliococcus* fueron los dominantes con un 29,63% y un 18,76% respectivamente (Figura 11 C)

Debido al corto periodo que sucede a la aparición de los síntomas, también se estudió la composición bacteriana vaginal, de las madres antes del parto. Para ello se tomaron de la granja G6, 5 muestras a partir de hisopo vaginal de madres 1 semana antes del parto (VS1-VS5), a los que se le aplicó secuenciación del ARNr16S, obteniendo 202.051 lecturas y 187 ASVs fueron identificadas a nivel de género. Los datos mostraron como en los casos anteriores, que la proporción de *Clostridium* y de *Escherichia-Shigellam* era baja, con un 0,01% y un 0,25% respectivamente. Los grupos más abundantes fueron *Streptobacillus* con un 30,34%, *Fusobacterium* con un 10,85% y *Histophilus* con un 9,95% de la composición bacteriana total (Figura 11 D).

colocarla (Z). En la Figura 12 se determina que las mayores diferencias composicionales ocurren entre Z y ZA0, es decir tras dos horas del encamado la comunidad bacteriana tiende a estabilizarse y presenta escasas variaciones entre los tiempos de muestreo. Además, es muy similar entre ambas zonas muestreadas. El perfil muestra como el grupo *Escherichia-Shigella* aparece con su máxima abundancia tras 48h de encamado ocupando un 3,7% de la composición bacteriana total, con una abundancia relativa media para la zona de 1,27%. Por su parte el grupo *Clostridium* no se detectó en ZA1, ZA2, ZA3, Z, ZB1, ZB2, ZB3 y ZB4, con una abundancia media de 0,03% para ZA.

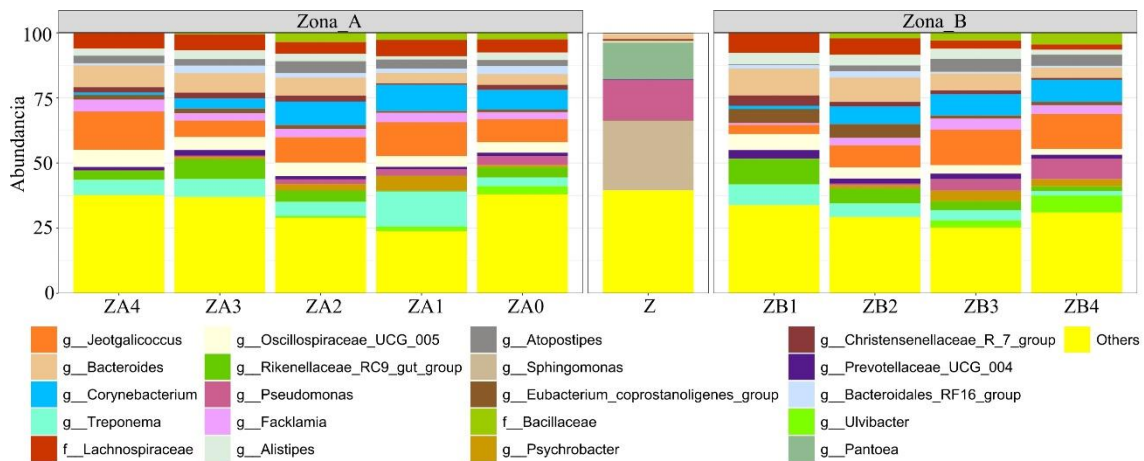


Figura 12. Abundancia relativa de los 20 grupos más abundantes a lo largo de un ciclo de paridera. En dos establos, Zona A y Zona B.

4.1.4.4. Medidas para el control del síndrome de la boca mojada

Teniendo en cuenta la información obtenida a lo largo del estudio, se aplicaron una serie de medidas en una de las explotaciones con el objetivo de reducir la incidencia de la enfermedad. Estas se focalizaron en reducir la carga bacteriana en la cama, ya que se determinó como el principal factor contaminante. Así como medidas para reducir la entrada de bacterias vía oral-

fecal, durante las primeras horas de vida, ya que se considera el momento con un mayor riesgo de infección.

4.1.4.4.1. Tratamiento de la cama

Se ensayaron dos soluciones comerciales, Dominated liquid (IOMLÁN) y Manure Pro (LALLEMAND). Ambas basadas en el mecanismo de exclusión competitiva, por el que las bacterias contenidas en la solución crecen sobre el medio a tratar el desarrollo de bacterias patógenas. Este tipo de soluciones han sido ampliamente utilizadas en el tratamiento animal impidiendo la colonización intestinal de bacterias patógenas, como *Campilobacter jejuni* (Szott et al., 2022), *E. coli* (Harvey et al., 2005) o *C. difficile* (Songer et al., 2007), También son numerosos los ejemplos que se emplean para reducir la carga bacteriana ambiental, en especial relativas al suelo, para la reducción de *E. coli* (Jiang & Wang, 2024), y otros patógenos como *Listeria monocytogenes* o *Salmonella enterica* (van Elsas et al., 2012; H. Wang et al., 2023).

En ambas soluciones Dominated liquid (IOMLÁN) y Manure Pro (LALLEMAND), se testó su eficacia en laboratorio. En el caso de Dominated liquid (IOMLÁN) la solución estaba preparada y lista para su uso. En el caso de Manure Pro (LALLEMAND), se presenta en polvo, que se diluyó en agua siguiendo las indicaciones del fabricante 15L/kg. Cinco gotas de 10 µl de cada una de las soluciones se aplicó sobre un cultivo de *E. coli* (aislado de animales con síntomas de boca mojada) y se incubó a 37°C durante 24h. Como se muestra en el Anexo 2 Figura 3, Dominated liquid (IOMLÁN), generó halos de inhibición de 2 cm de diámetro sobre 7 de los 9 aislados de *E. coli* probados. En el caso de Manure Pro (LALLEMAND), no ejerció inhibición en ninguno de los 9 aislados estudiados.

Debido a la eficacia de la solución Dominated liquid (IOMLÁN), “in vitro”. Se realizó un ensayo “in vivo” con el objetivo de determinar su eficacia a la hora de reducir la contaminación en la cama a lo largo de la paridera. Se testó en una parcela de 300 m², dentro de ella se marcó un espacio de 54 m² dentro del cual se tomó una muestra antes de la limpieza del recinto, 48h tras la limpieza del recinto, al inicio de la paridera, a la semana y a las dos semanas del inicio de los partos. Aplicando medio litro de Dominated liquid (IOMLÁN) tras la retirada de la cama, una vez por semana, hasta la finalización del estudio. En la Figura 13 se comparan los resultados de aerobios mesófilos, coliformes totales y *E. coli*, entre la parcela donde se aplicó la solución, con una parcela de iguales características sin aplicar Dominated liquid (IOMLÁN). En ambos ensayos se alcanzan valores del orden de 10¹⁰UFC/g para aerobios mesófilos, de 10⁷ UFC/g para coliformes totales y de 10⁷ UFC/g tras 48h de la retirada de la cama. No detectando un efecto significativo en la carga bacteriana para los grupos estudiados al aplicar la solución bacteriana.

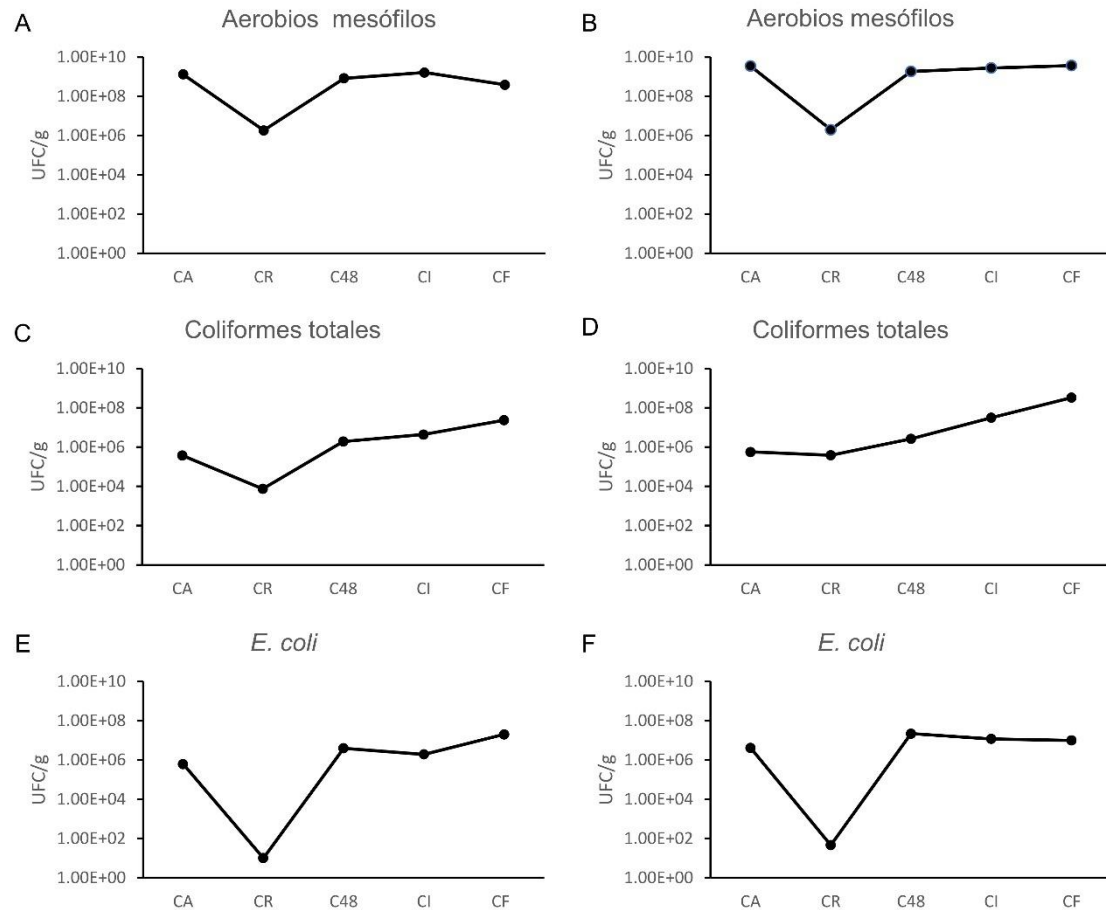


Figura 13. Recuentos para aerobios mesófilos, coliformes totales y *E. coli*, respectivamente. En una parcela sin aplicar Dominated liquid (IOMLÁN): A, C y E. En una parcela en la que se aplica Dominated Liquid (IONLÁN): B, D y F.

Ante la ineficacia de las soluciones basadas en exclusión competitiva, se testó la aplicación de altas concentraciones de amonio cuaternario, ya que ha demostrado la reducción de la carga bacteriana en numerosos estudios. Siendo ampliamente utilizado en la desinfección de las jaulas, de aves de corral (White et al., 2018). Así como en explotaciones de bovino y ovino, donde se aplican de forma rutinaria en la desinfección de las cuadras (Small et al., 2007).

Para ello, se prepararon dos parcelas de 54 m², en una de ellas se aplicó medio litro de amonio cuaternario al 5% por metro cuadrado, dos veces por semana (martes y jueves), a lo largo de todo un proceso de paridera. Y la otra parcela se dejó sin tratar. Se tomaron muestras de cama en 6 momentos concretos:

cama antes de sacar el estiércol (T1); paja recién colocada (T2); cama tras 48h del encamado (T3); cama al inicio de la paridera (T4); cama una semana desde el inicio de la paridera (T5); y cama tras dos semanas desde el inicio de la paridera (T6).

Como se observa en la Figura 14, la aplicación del amonio cuaternario no redujo la carga bacteriana alcanzando el orden 10^9 para aerobios mesófilos, 10^7 para coliformes totales y 10^6 para *E. coli*.

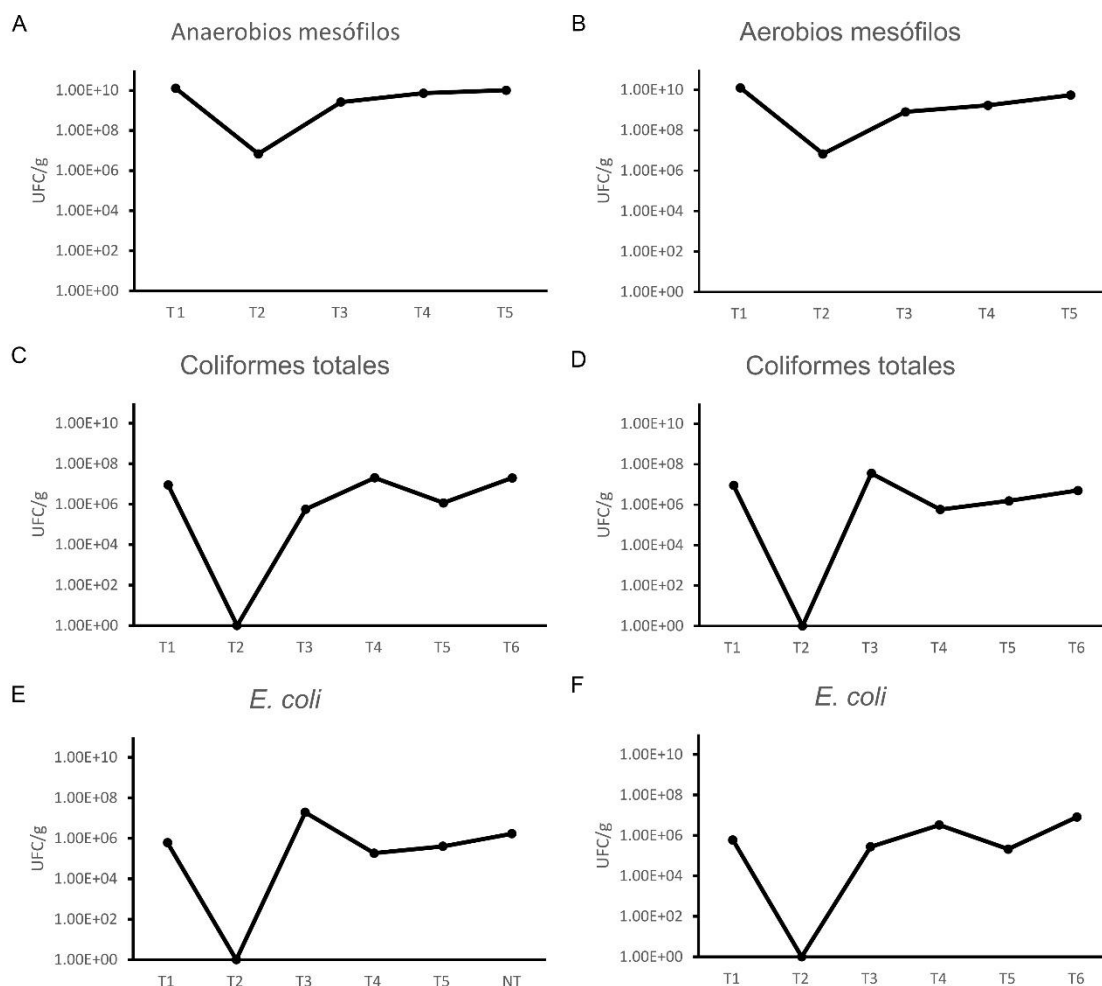


Figura 14. Recuentos para aerobios mesófilos, coliformes totales y *E. coli*, respectivamente. En una parcela sin aplicar amonio cuaternario al 5%: A, C y E. En una parcela en la que se aplicó amonio cuaternario al 5%: B, D y F.

También se estudió el efecto sobre la carga bacteriana en el suelo tras retirar la paja, antes y después de la limpieza de este con amonio cuaternario. En este caso los valores bajaron desde $2,55 \times 10^8$ a $3,39 \times 10^6$ UFC/m² para aerobios mesófilos, de $1,92 \times 10^5$ a $1,00 \times 10$ UFC/m² para coliformes totales y de $1,13 \times 10^5$ UFC/m² a $1,00 \times 10$ UFC/m² para *E. coli*. De acuerdo a los recuentos se determinó que el amonio cuaternario ejerció efecto en el suelo, pero no en la cama.

4.1.4.4.2. Tratamiento del cordero

Ante la ineficacia de las medidas aplicadas a la cama, se abarco otro campo de trabajo, poniendo el punto de mira en el cordero.

Teniendo en cuenta la hipótesis propuesta por Angell & Duncan (2020), debido a las condiciones de pH relativamente neutro que presentan los corderos antes de la primera toma de calostro. Un gran volumen de bacterias entraría vía oral, y no se verían inhibidas por la acidez estomacal. Esta hipótesis se encuentra en concordancia con la secuenciación de ARNr 16S, del contenido abomasal de corderos recién nacidos donde se identificó como grupos mayoritarios *Escherichia-Shigella* y *Clostridium* (ver apartado 4.1.4.4.1). Una estrategia probada para reducir la carga de bacterias sensibles al pH como *E. coli*, *Clostridioides difficile* o *Clostridium perfringens*, es la adición de ácidos orgánicos en el agua de bebida. Con buenos resultados en granjas de pollos de engorde en la reducción de coliformes (Mikkelsen et al., 2009). Así como en otras especies animales como porcino, donde no solo reducen organismos causantes de diarrea como *E. coli* o *C. perfringens*, si no que contribuyen a la aparición de bacterias acidófilas como el género *Lactobacillus* con un carácter probiótico (Knarreborg et al., 2002).

Con el objetivo de reducir el pH abomasal previo a la primera ingesta de calostro, se decidió aplicar Selko ph (Trow Nutrition) que contiene una solución

de ácido fórmico, propiónico y láctico, tras su mezcla con agua debe bajar el pH a 5,5 o inferior. Se testó una mezcla de dicha solución según las indicaciones del fabricante con medio de cultivo Müller-Hilton (0,5L/1000L). Se tomó una medida del pH del medio de cultivo, contando este con una acidez de 5,3. Se testó sobre un aislado de *E. coli* de un cordero afectado por boca mojada (M29.1.H6-MS10418), previamente identificado y secuenciado. Para ello se incubó el aislado M29.1.H6 a 37°C en 5ml de medio LB, 24h. Se realizaron diluciones decimales del cultivo (10^9 UFC/ml) y se sembraron 100 μ l de cada dilución decimal, en placas de Müller-Hilton con el ácido orgánico. Como resultado se produjo una inhibición del crecimiento bacteriano de 10^6 UFC/ml en aquellas placas con la solución de ácido orgánico.

Debido a la eficacia en la inhibición bacteriana de la solución de ácidos orgánicos. En la granja G6, durante un periodo de paridera, se probó sobre 25 corderos neonatos, justo antes de su primera toma de calostro la solución de ácidos orgánicos preparada en agua destilada. Se les dio mediante biberón 0,250 l de la dilución de ácido orgánico a cada cordero, posteriormente se les alimentó con el calostro. Los corderos tras 12h de vida, manifestaron la sintomatología característica de boca mojada (decaimiento, diarrea y salivación excesiva).

4.1.5. Discusión

Los perfiles bacterianos fecales identificados tras el análisis de los corderos afectados mostraron como dos grupos: *Escherichia-Shigella* (35,67%) y *Clostridium* (28,82%) ocupaban el 64,49% de la composición bacteriana total. En cambio, en aquellos que no manifestaron los síntomas y tras su recuperación, los porcentajes fueron menores 19,35% y 9,21% para *Escherichia-Shigella*, y 22,82% y 18,96% para *Clostridium* respectivamente. Además, aparecen otros grupos como mayoritarios,

concretamente *Bifidobacterium* o los *Bacteroides*, siendo considerados como bacterias beneficiosas para la microbiota (Sharma et al., 2021; Tan et al., 2019). La presencia de ambos grupos *Escherichia-Shigella* y *Clostridium* en altas proporciones se relaciona con casos de alteraciones de “homeostasis bacteriana”, desplazando otras bacterias comensales o beneficiosos como *Ruminococcus sp* o *Bacteroides sp*. Esta pérdida de equilibrio bacteriano es a lo que se conoce como “disbiosis” (Zeineldin, Aldridge, et al., 2018). La presencia de *Escherichia-Shigella* y *Clostridium*, fue recurrente a lo largo del estudio. Ocupando altos porcentajes en los corderos entre las 12-24hr de vida y también ampliamente distribuidos a lo largo del tracto digestivo, especialmente desde el duodeno al recto.

El estudio de la temporalidad del síndrome permitió establecer el perfil de colonización en Boca mojada. Comenzando con una microbiota diversa entre las 0-12h de vida, sin la dominancia de unos grupos sobre otros. Siendo reemplazada entre las 12-24h de vida por un incremento en los grupos *Escherichia-Shigella* y *Clostridium*, que coincide con la aparición de los síntomas. Ambos grupos se reducen a las 24-36h de vida, apareciendo grupos considerados comensales y beneficiosos para la salud intestinal como los *Lactobacillus*. Esos cambios rápidos de la composición bacteriana, podrían deberse al cambio de un ambiente aerobio a un ambiente anaerobio. Inicialmente predominan géneros preferiblemente aerobios estrictos como *Salinicoccus*, *Dietzia*, *Acinetobacter* o *Psychrobacter* y aerobios facultativos como *Staphylococcus* o *Jeotgaliococcus*. La reducción de oxígeno podría verse favorecida por el crecimiento masivo de grupo *Escherichia*, adecuando el ambiente para el crecimiento de *Clostridium*, al ser este anaerobio estricto. Finalmente, entre las 24-36h de vida, otros anaerobios estrictos se establecen en la comunidad bacteriana como *Ruminococcus* o *Lachnospiraceae*, junto con anaerobios facultativos como los *Enterococcus* o bacterias aerotolerantes como el género *Lactococcus*. Donde el cordero WT6 podría corresponder a un estado intermedio, marcado por el crecimiento masivo de *Escherichia*, que

actuaría consumiendo todo el oxígeno permitiendo el desarrollo de anaerobios estrictos como *Clostridium*. Esta sucesión bacteriana de un ambiente aerobios a un ambiente anaerobio ha sido descrita anteriormente por Nagpal et al. (2017) y por Bäckhed et al. (2015), pero en periodos de tiempo más extensos. Actualmente no se conoce con detalle el motivo de esta variación, aunque se atribuye a una hipotética concentración inicial de oxígeno que se reduce debido al consumo microbiológico combinando con reacciones químicas de oxidación, como la oxidación lipídica (Friedman et al., 2018).

El estudio de la composición bacteriana a lo largo del digestivo en corderos afectados por el síndrome de la boca mojada mostró como el taxón *Escherichia-Shigella* se encuentra como uno de los grupos más abundantes a lo largo del digestivo. Por el contrario, el taxón *Clostridium*, presentaba una distribución más acotada, con alta abundancia relativa en yeyuno (20,02%), ileon (25,13%) y ciego (24,32%) pero baja en abomaso (0,85%). En un estudio previo Zhuang et al. (2020), describieron el taxón *Escheria-Shigella*, como uno de los más abundantes en yeyuno y colon de animales sanos. Pero con proporciones mucho menores, ocupando el 22,10% en yeyuno y el 39,14% en colon. El género *Clostridium* en este estudio no era un grupo dominante, por el contrario, el género *Lactobacillus* si representaba un grupo mayoritario, ocupando un 70,55% de la composición bacteriana total en yeyuno.

El análisis del contenido abomasal antes de la primera toma de calostro mediante secuenciación 16S. Permitió determinar, el abomaso como una “puerta de entrada”, de los taxones *Escherichia-Shigella* y *Clostridium*. Apoyando la teoría de la contaminación oral-fecal antes de la primera toma de calostro, propuesta por Angell & Duncan (2020). En cambio, tras varias tomas de calostro y por lo tanto con un abomaso de pH más ácido, los taxones *Escherichia-Shigella* y *Clostridium* dejan de ser abundantes, siendo sustituidos por otros grupos más tolerantes a la

acidez como los géneros *Bacteroides* o *Porphyromonas* (Falagas et al., 1997; Takahashi et al., 1997).

La composición de los taxones *Escherichia-Shigella* y *Clostridium*, fue caracterizada empleando secuenciación de genoma completo de aislados de ambos taxones. Identificando dentro del grupo *Escherichia-Shigella*, *E. coli* como la especie más abundante. En el caso de *Clostridium*, se encontró una mayor variabilidad, identificando las especies *C. paraputrificum*, *P. bifermentans*, *C. cadaveris*, *C. perfringens*, *C. tertium* y *C. difficile*.

Anteriormente, se consideraba únicamente *E. coli* como agente implicado en el síndrome de la boca mojada (Angell & Duncan, 2020), en concreto como indican los autores “el síndrome de la boca mojada, se debe a una endotoxemia asociada a un patotipo desconocido de *E. coli*, considerado como no patógeno”. En el presente trabajo se determinó *Clostridium* como el segundo género más abundante a nivel gastrointestinal en corderos con boca mojada. Su rol como agente etiológico de diarreas neonatales es ampliamente conocido, en especial los causados por *C. perfringens* y *C. difficile* (Keessen et al., 2011; Kiu & Hall, 2018). También se enumeran casos en los que la reducción de bacterias comensales o probióticas, como *Ruminococcus sp* o *Lactobacillus sp* causando episodios diarreicos en cordero (Zeineldin, Aldridge, et al., 2018).

Se determinó la composición bacteriana de los ambientes con los que tenía contacto el cordero tras su nacimiento, señalando: el tracto vaginal, la cama, las heces maternas, la boca de las madres (ya que realiza tareas de cuidado y acicalamiento), las placentas (al quedar en el suelo) y el calostro. El estudio de estos ambientes mediante secuenciación del ARNr 16S permitió identificar *Escherichia-Shigella* y *Clostridium*, en todos los ambientes, con la mayor abundancia relativa en la cama para *Escherichia-Shigella* y en las heces maternas en el caso de *Clostridium*. En cada uno de los ambientes estudiados se

identificaron otros géneros patógenos, como es el caso de la boca en las madres, donde *Bibersteinia* y *Manhemmia* fueron los grupos más abundantes, ambos asociados a afecciones respiratorias en cordero (Sahay et al., 2020). En el caso de las placentas, se estudiaron placentas frescas y secas, en ambas destaca la abundancia relativa del género *Psychrobacter*. Este se considera un patógeno oportunista asociado a casos graves de bacteriemia, donde pueden ser especialmente graves debido a la presencia de un sistema inmune inmaduro (Joanna María et al., 2016). También hay que destacar la presencia de *Histophilus sp* en el tracto vaginal de las madres de corderos con boca mojada. Este agente se encuentra asociado a casos de aborto en ovino (Serrano et al., 2020). Así como *Fusobacterium* asociado también a esterilidad y aborto (Boye et al., 2006). En el caso de la cama también cabe señalar la alta abundancia del género *Treponema*, siendo este la principal causa de dermatitis digital ovina, patógeno que es especialmente preocupante ya que tiene un carácter emergente desde 1997, cuando fue descrito en Reino Unido el primer caso (Duncan et al., 2014).

Basado en la literatura se considera la contaminación fecal en la cama como la mayor fuente de ambos patógenos *Escherichia sp* y *Clostridium sp* (Fairbrother & Nadeau, 2006). Tras estudiar la carga bacteriana, los mayores valores en coliformes y aerobios mesófilos se dieron en la cama. Siendo incluso superior la concentración de coliformes en la cama, que en las heces maternas. Estos resultados están en concordancia con las publicaciones de Bradley et al., 2018 y W. R. Ward et al., 2002. Que determinan la cama como un medio ideal para el crecimiento bacteriano, por lo que su limpieza y desinfección deben ser uno de los principales factores a tener en cuenta a la hora de diseñar medidas preventivas en las explotaciones ganaderas afectadas por el síndrome de la boca mojada.

El estudio de la evolución de la carga bacteriana a lo largo de la paridera permitió establecer que tan solo 48h tras la puesta de nueva cama los valores en todos los grupos estudiados (aerobios mesófilos, coliformes, *E. coli*, anaerobios mesófilos y esporulados) son iguales o superiores a los de antes de la retirada de esta. Por lo que, habría que poner un especial foco a los momentos inmediatamente posteriores a la adición de nueva cama, a la hora de aplicar métodos de desinfección.

Los tratamientos con soluciones basadas en exclusión competitiva, mostraron resultados dispares frente a aislados de *E. coli* “in vitro”. Con una inhibición frente al crecimiento de 7 de los 10 aislados de *E. coli* en el caso de Dominated liquid, pero en el caso de Manure Pro esta no ejerció un efecto sobre los aislados estudiados. Cuando se trasladó el tratamiento con Dominated liquid a una paridera “real”, no se detectó un efecto significativo sobre la carga bacteriana. Resultados similares han sido descritos anteriormente en granjas de ovino, donde la aplicación de bacterias probióticas a la cama puede ser incluso contraproducente, facilitando el crecimiento de bacterias patógenas (Corrêa et al., 2012). La aplicación de amonios cuaternarios sobre la cama tampoco mostró un efecto en la reducción de la carga. Lo que nos señala la cama como un ambiente realmente complejo para tratar, especialmente debido a los aportes continuos de materia fecal por parte de las madres.

Ante la ineficiencia de los tratamientos basados en competencia bacteriana y amonios cuaternarios, sería interesante abordar otros acercamientos como la aplicación de bacteriófagos, que están ofreciendo buenos resultados en la desinfección en distintas factorías cárnicas (Gildea et al., 2022).

La reducción del pH abomasal empleando ácidos orgánicos, no mostró un efecto “in vivo”, pero sí “in vitro” donde produjo una reducción de la carga de

E. coli de 10^6 UFC/ml. En futuros estudios se propone cuantificar el pH abomasal del cordero, para determinar si se produce una reducción efectiva de este.

A pesar de haber determinado los principales perfiles bacterianos asociados al síndrome de la boca mojada, también sería interesante dotar al estudio de un carácter cuantitativo mediante la combinación de los resultados vistos. Con otras técnicas como PCR cuantitativa o recuentos directos, con el objetivo de determinar cuáles son los números de los principales grupos encontrados en animales con boca mojada.

4.1.6 Conclusions

- The rectal bacterial composition of animals affected by Watery Mouth Disease is primarily composed of two taxa: *Escherichia-Shigella* (36,72%) and *Clostridium* (28,52%).
- Within the *Escherichia-Shigella* group, 100 *E. coli* isolates and 1 *E. fergusonii* isolate were identified from the 101 samples analyzed in sick lambs. The most frequent sequence type was ST-88 (12%), and the most prevalent toxin was EAST-1 (20%).
- Within the *Clostridium* group, 14 *Clostridium paraputrificum*, 10 *Clostridium tertium*, 5 *Clostridium perfringens*, and 5 *Clostridium cadaveris* were identified in sick lambs. The most significant virulence factor detected was the *plc* gene, present in 4 isolates, which encodes the alpha-toxin. A large number of accessory toxins genes were detected, including Kappa, Mu, and Theta.
- *Escherichia-Shigella* and *Clostridium* showed their highest abundance between 12 and 24 hours of life, coinciding with the onset of clinical symptoms.
- *Escherichia-Shigella* was one of the most abundant groups along the entire digestive tract (from the abomasum to the rectum). *Clostridium* was among the most abundant taxa from the duodenum to the rectum.

- Bedding was identified as the environment with the highest bacterial load of mesophilic aerobes, coliforms, mesophilic anaerobes, and spore-forming bacteria. The greatest increase in bacterial counts occurred 48 hours after bedding was placed.
- Treatments based on bacterial competition and the use of quaternary ammonium compounds had no effect on bacterial load during the lambing period.
- The presence of *Escherichia-Shigella* and *Clostridium* was detected in the abomasum before the first intake of colostrum in lambs affected by Wet Mouth Syndrome. However, the application of organic acids to lower the pH proved ineffective.

4.1.7. Related Research Article

Journal:

Veterinary Microbiology. JCR (2023): 2.4. Veterinary Sciences: Q1. Doi: <https://doi.org/10.1016/j.vetmic.2025.110542>

Title:

Aetiology and environmental factors of the Watery Mouth Disease associated with neonatal diarrhoea in lambs

Autors:

Álvaro Cañete-Reyes, Jorge Gutierrez-Gonzalez, Lauren V. Alteio, David Rodríguez-Lázaro and Marta Hernández

Abstract:

Watery Mouth Disease is the main disease in neonatal lambs, causing great economic losses. Despite this, the cause of the condition remains poorly understood. Therefore, we have analysed the main bacteria found in sick animals, their intestinal and temporal distribution, as well as the main sources of contamination. Twelve different farms were sampled, from which 331 samples were taken in total. From these samples, 184 environments were analyzed using 16S rRNA amplicon sequencing, 164 isolates were identified by whole genom sequencing and 35 bacterial counts were performed. The dominant bacterial groups at the rectal level were *Escherichia-Shigella* (36%) and *Clostridium* (29%), with a homogeneous distribution along the digestive tract and a maximum abundance ranging between 12 and 24 hours of lamb life. Within *Escherichia-Shigella*: *Escherichia coli* and *Escherichia fergusonii* and within *Clostridium*: *Clostridium perfringens*, *Clostridium cadaveris*, *Clostridium tertium* and *Clostridium paraputricum* were identified as the main isolates present in sick animals. The high presence of *Clostridium* strains, especially potentially pathogenic species like *C. perfringens* in sick animals, point out *Clostridium* as a new important protagonist of watery mouth disease and the need of their inclusion in future studies. In particular, bedding was established as the main microbial contaminating factor, reaching the highest increase 48 hours after removal and cleaning of the lambing area (i.e. 8.03×10^8 , 1.88×10^6 , 3.88×10^6 , 4.85×10^7 and 4.00×10^5 CFU/g for mesophilic aerobes, coliforms, *E. coli*, mesophilic anaerobes and sporulates, respectively). These results highlight the need to increase cleanliness in bedding to reduce the presence of these bacteria.

4.2. Capítulo 2: Sistemas de ordeño y la manipulación del calostro como agentes para la propagación de *Streptococcus dysgalactiae* causante de poliartritis y diarrea en ovino neonato

Summary

Background:

Streptococcus dysgalactiae is a significant animal pathogen frequently associated with polyarthrititis and diarrhea in lambs across multiple countries. It is classified into two subspecies: *Streptococcus dysgalactiae* subsp. *dysgalactiae* (SDSD), which primarily affects animals, and *Streptococcus dysgalactiae* subsp. *equisimilis* (SDSE), which is more commonly associated with human infections. SDSD is particularly notable for its genomic plasticity and zoonotic potential, possessing the ability to cross species barriers and infect humans under certain conditions.

This study focuses on a farm located in Segovia, Spain, dedicated to both milk and lamb production, with approximately 3,000 adult sheep. An outbreak on the farm affected around 40% of the lamb population, initially presenting as diarrhea within the first 12 hours after birth, followed by joint pain within two to three days. By day 10, affected lambs exhibited clear signs of joint effusion. Despite treatment with erythromycin (0.3 cc/day) and the anti-inflammatory Nixyvet, clinical symptoms continued to worsen, suggesting a poor therapeutic response and underscoring the need for further investigation into the causative agent and its antimicrobial resistance profile.

Objetives:

- To identify and characterize *S. dysgalactiae* as the causative agent of the outbreak, with special emphasis on its virulence factors and associated resistance genes
- To determine the main route of contamination associated with *S. dysgalactiae* on the studied farm.
- To implement appropriate management measures to mitigate the incidence of *S. dysgalactiae* in both dairy and lamb production farms.

Sampling:

A total of 29 samples were collected from a farm in the province of Segovia following two previous episodes of polyarthritis and diarrhea. The sampling took place over two lambing cycles between January and March and included five water samples, 16 colostrum samples, three milk samples, four joint fluid samples, and one blood sample.

Results and Discussion:

Using 16S rRNA sequencing of joint fluid samples, *S. dysgalactiae* was identified as the causative agent of polyarthritis, representing 99.96% of the bacterial population in treated lambs and 42.97% in untreated lambs. The administration of streptomycin led to a worsening of clinical signs. Whole genome sequencing of isolates obtained from joint fluid and blood confirmed *S. dysgalactiae* sequence type ST454 as the etiological agent and enabled the identification of key virulence genes: *fpb54* (fibronectin-binding protein), *hasC* (immune evasion), and *sagA* (encoding streptolysin S, a toxin associated with tissue damage).

Analysis of colostrum handling during milking also revealed *S. dysgalactiae* as one of the dominant bacterial groups in the milk collection tank, as determined by 16S sequencing, highlighting this as a major contamination point. Furthermore, bacterial counts exceeded the threshold of 100,000 CFU/ml, positioning the milking system as a significant vector for bacterial dissemination. Following the implementation of improved hygiene measures, including effective pasteurization and rapid cooling of colostrum, the incidence of infection decreased to 22%, and subsequently to 15% over the next two lambing cycles.

4.2.1. Contextualización y justificación del caso

El manejo en las explotaciones ganaderas es un problema habitual, en especial en la producción láctea. El incremento en los tamaños medios de las explotaciones con un mayor número de animales por granja hace que se opte por mecanismos automatizados de ordeño. A pesar de las ventajas que ofrecen, en relación con su eficiencia, suponen un reto a la hora de combatir con la contaminación ambiental (Stefan & Baraitareanu, 2024). Por ejemplo, favoreciendo la formación de biofilm, muy difícil de eliminar en sistemas automatizados donde es complejo el acceso manual, siendo un foco importante de contaminación por organismos patógenos (Latorre et al., 2010). Uno de los patógenos más frecuentes es *S. dysgalactiae*, al verse asociado a mamitis, lo que es muy común en este tipo de producciones ganaderas.

S. dysgalactiae es identificado como uno de los principales patógenos en animales, en particular en ovino, donde es señalado como una de las principales causas de poliartritis. Concretamente es la principal causa de poliartritis en cordero neonato en Inglaterra y Gales, además es frecuente en los brotes de poliartritis en Nueva Zelanda, Australia y en España (Heikkilä et al., 2018; Mørk et al., 2007).

La enfermedad típicamente actúa sobre corderos por debajo de las cuatro semanas de edad, manifestando estos fiebre y pérdida de apetito (Watkins & Sharp, 1998). Los números referentes a la afección son difíciles de determinar debido a una alta variabilidad a nivel local entre las explotaciones afectadas. De forma general se estima que las tasas de mortalidad media ascienden al 19 %, con un rango muy variable desde el 0 al 75 % entre explotaciones (Rutherford et al., 2015). Pero lo más preocupante son los retrasos en el crecimiento que esta genera, causando importantes pérdidas económicas. Como indica Nicholas & Loria (2014), se ha probado una importante reducción en el tamaño de los coderos afectados

por poliartritis por *S. dysgalactiae*. La reducción en la tasa de crecimiento asciende hasta 54,4g/día, lo que se suma a su vez a los costes ocasionados por el tratamiento de los corderos afectados (Ridler et al., 2019).

Son escasos los estudios que han intentado determinar las fuentes primarias de contaminación por *S. dysgalactiae*. Aunque se señalan por consenso, la pobre desinfección de las cuadras antes del nacimiento, las heridas causadas por el crotal y el corte del rabo como factores principales (Lloyd et al., 2016 ; Smistad et al., 2020). Otros autores han señalado la importancia de la mala higiene durante la asistencia al parto y el uso de tubos gástricos para alimentación como factores de riesgo (Rutherford et al., 2015). Muchas explotaciones optan por el uso de antibióticos como medida profiláctica, lo que supone un reto a la reducción en el uso de antibióticos en el ámbito ganadero exigida en nuestro país. Contenida en el Reglamento UE 2019/6, por el que se establece el marco de actuación para un uso sostenible de antibióticos en especies de interés ganadero.

S. dysgalactiae se divide en dos subespecies *Streptococcus dysgalactiae subs dysgalactiae* (SDSD) y *Streptococcus dysgalactiae subs equisimilis* (SDSE). SDSE causa infecciones en humano similares a *Streptococcus pyogenes* (He et al., 2023). SDSE aunque no es frecuente en animales cuenta con potencial zoonótico, reportando casos de transmisión cruzada entre especies animales, causando múltiples afecciones como septicemia, endocarditis o meningitis (He et al., 2023).

Por otro lado, SDSD, genera un amplio rango de enfermedades, en una gran variedad de hospedadores. En ovino y bovino es común en casos de mastitis, siendo una de sus causas principales. Además, en ovino se considera la principal causa de poliartritis (Lundberg et al., 2014; Stefańska et al., 2025). En porcino es común los casos de artritis, endocarditis y meningitis (Oh et al., 2020). También son frecuentes las afecciones en acuicultura, siendo un importante

patógeno en casos de streptococcosis (Van Doan et al., 2022). A pesar de ser un patógeno considerado estrictamente animal, se han reportado casos en humanos asociados con afecciones musculares (Chennapragada et al., 2018; He et al., 2023; Jordal et al., 2015; Park et al., 2012). Además, se ha confirmado experimentalmente su capacidad para invadir distintas líneas celulares humanas, como los queratinocitos (Alves-Barroco et al., 2019).

El estudio de la genómica asociada a este grupo bacteriano muestra una gran plasticidad y capacidad para adaptarse a diferentes hospedadores, parte de esta plasticidad es atribuida a que un gran número de sus factores de virulencia se localizan junto a elementos genéticos móviles (Porcellato et al., 2021). El estudio metagenómico de los aislados humanos ha demostrado una clara especialización del patógeno al humano, al igual que ocurre con el resto de especies. Además, se han trazado su asociación con casos identificados con explotaciones ganaderas, por lo que autores como Koh et al. (2020) lo señalan con un alto potencial emergente en humano.

Aunque no es frecuente, SDSD, especialmente en neonatos también se ha asociado a diarreas y septicemia en terneros (Fecteau et al., 2009; Garcia et al., 2022). Además de ser una especie frecuentemente aislada del tracto gastrointestinal en humano, pudiendo enmarcarse dentro de las diarreas neonatales (Jensen & Kilian, 2012).

Su marcado carácter emergente en humano, así como la escasez de información referente al tratamiento y control epidemiológico de este. Hizo que se dedicase una porción del presente trabajo en el estudio de un caso práctico asociado a poliartritis y diarrea aguda en ovino neonato. Concretamente se trabajó con una explotación ganadera centrada en ovino de la raza Assaf, de la provincia de Segovia. Esta se centra en la explotación de leche de ovino y carne de ternero. Cuenta con una media de 3.000 ovejas adultas, para producción de

leche y cordero. La explotación sufrió tres episodios en sucesivas parideras de diarrea y poliartritis. Los episodios afectaban al 40% de los corderos de media, comenzando con una diarrea a las 12h de vida que continuaba con dolor articular tras 2-3 días de vida. Lo que impedía mamar de forma independiente, al cordero, el cual sufría una severa deshidratación debido a la diarrea. Tras 10 días de vida mostraban claros signos de líquido articular, con un agravamiento de los síntomas, lo que resultaba en muerte por inanición. Los corderos fueron tratados con eritromicina 0,3 cc/día y antiinflamatorio nixyvet 0,3 ml/día. Los signos clínicos empeoraron manifestando un incremento del debilitamiento general en los corderos tratados.

4.2.2. Objetivos

SDSD se ha definido tradicionalmente como un patógeno estrictamente animal. Pero el creciente número de casos, así como la gran plasticidad de su genoma y la capacidad de invadir células humanas (Alves-Barroco et al., 2019; Porcellato et al., 2021). Hace necesario su control y estudio, con el objetivo de reducir las vías de transmisión a humano, principalmente en explotaciones ganaderas relacionados con la producción de leche donde son especialmente frecuentes, asociadas a casos de mastitis y poliartritis (Lundberg et al., 2014). Un aspecto que ha sido desatendido, son sus principales vías de transmisión en especial la vía oral de entrada, donde el consumo de calostro es esencial durante las primeras horas del neonato (Farooq et al., 2024). Por lo que, ante el presente caso, se propuso caracterizar genotípicamente al patógeno causante del brote, determinando sus principales genes de resistencia a antibióticos y factores de virulencia, así como identificar los focos de contaminación ambiental en la explotación. Empleando un nuevo enfoque mediante el uso de la secuenciación

masiva, como herramienta de control epidemiológico con el fin último de reducir el uso de antibióticos y desarrollar medidas de control y desinfección eficaces en las explotaciones afectadas por problemas similares. Reduciendo en última instancia la exposición del humano al patógeno. Para ello se enumeran los siguientes objetivos:

1. Identificar y caracterizar *S. dysgalactiae* como agente causal del brote. Poniendo un especial énfasis a sus factores de virulencia y genes de resistencia asociados
2. Determinar la principal vía de contaminación asociadas a *S. dysgalactiae* en la explotación estudiada
3. Implementar medidas de manejo adecuadas para mitigar la incidencia de *S. dysgalactiae* en explotaciones de producción láctea

4.2.3. Muestreo

A lo largo de dos periodos de paridera comprendidos entre mes de enero y marzo, se tomaron 29 muestras. Concretamente 5 muestras de agua, 16 muestras de calostro, 3 muestras de leche, 4 muestras de líquido articular y 1 muestra de sangre. A cada una se le realizaron diferentes ensayos que se presentan en la Tabla 14.

Tabla 14. Organización de las muestras por objetivo, número y tipo

Objetivo de las muestras	Número	Tipo de muestra
Identificar y caracterizar el patógeno asociado al brote	4	Líquido articular
Identificar y caracterizar el patógeno asociado al brote	1	Sangre
Determinar el origen de la contaminación por estreptococo	5	Agua
Determinar el origen de la contaminación por estreptococo	12	Calostro
Determinar el origen de la contaminación por estreptococo	3	Leche
Seguimiento de la carga bacteriana, tras las medidas de control implementadas	4	Calostro

4.2.4. Resultados

4.2.4.1. Identificación y caracterización del patógeno

Para la identificación del agente etiológico del brote de poliartritis y diarrea en los corderos. Se tomaron muestras de líquido articular de 4 corderos con 20 días de vida. Los corderos se identificaron por su crotal como c-5022, c-5191, c-4968 y c-5109. Los corderos c-5022 y c-5191, fueron tratados con el antibiótico eritromicina 0,3 cc/ml y antiinflamatorio nixyvet 0,3 ml/día. Desde el decimo día coincidiendo con la aparición del líquido en las articulaciones hasta el día de la toma de la muestra. Ambos corderos tratados, mostraron un empeoramiento de la sintomatología, con una mayor debilidad muscular, reportada por el veterinario asociado a la explotación.

Las muestras de líquido articular se almacenaron en viales de 1,5 ml y fueron transportadas en refrigeración hasta el laboratorio para su procesamiento.

Se extrajo el DNA contenido en las muestras, empleando el kit DNeasy Blood and Tissue (Qiagen). Tras el filtrado de las secuencias posterior a la secuenciación se obtuvieron 57.829 lecturas y 87 taxones fueron identificados a nivel de género.

El género más abundante identificado en los 4 corderos estudiados fue *Streptococcus* (Anexo I, Tabla 9). Presentando una abundancia relativa en los corderos no tratados de 5,26% para c-4968 y 44,95% para c-5109. Por el contrario, en los corderos tratados dicho género ocupaba el 100% de las lecturas identificadas. Como se muestra en la Figura 15, únicamente se identificó la especie *S. dysgalactiae* dentro del género, ocupando el 99,96% para c-5022, 100% para c-5191 y 42,97% para c-5109. Señalando *S. dysgalactiae* como agente etiológico de la poliartritis.

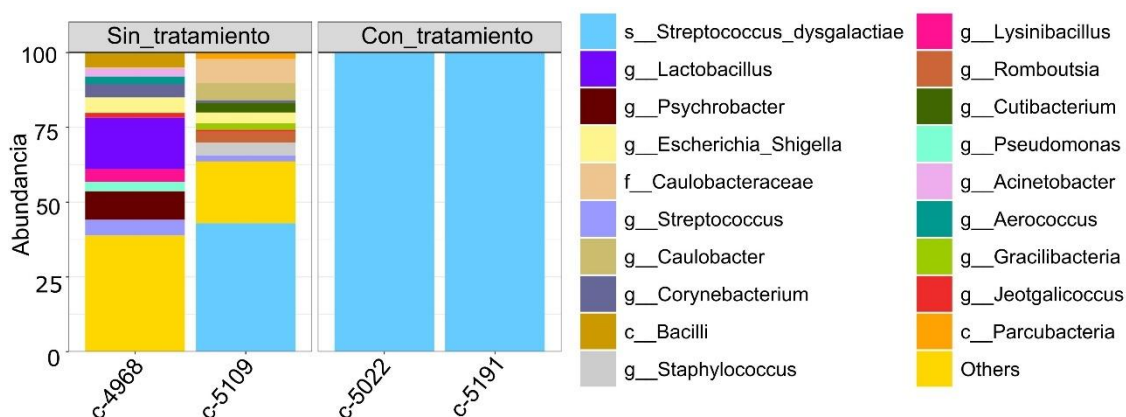


Figura 15. Abundancia relativa de los 19 grupos más abundantes en derrames articulares a nivel de especie. Para los corderos c-4968 y c-5109, sin tratamiento antibiótico y para los corderos c-5022 y c-5191, sin tratamiento antibiótico.

Para la caracterización de *S. dysgalactiae*, se tomaron 100 µl del líquido articular de cada cordero y se inocularon en placas de agar sangre durante 24h a 37°C. Tres de los cuatro corderos mostraron un crecimiento masivo de *S. dysgalactiae* concretamente los corderos c-5109, c-5022, y c-5191. Todas las colonias presentaban la morfología típica de *S. dysgalactiae*: colonias circulares,

con bordes definidos y beta hemolíticas (Xie et al., 2024). Confirmando la presencia de bacteriemia en los corderos afectados.

Se tomaron 8 colonias, 2 de cada muestra de líquido articular y una del cultivo de sangre. Se extrajo su genoma empleando el kit Blood and Tissue (Qiagen). Se secuenció su genoma. Tipificando el MLST, determinando los genes de resistencia a antibióticos y los principales factores de virulencia de cada uno de los aislados.

Tras la secuenciación y cribado se obtuvieron 610.897 lecturas medias por genoma, con una cobertura media de 69.75X. Los aislados secuenciados fueron identificados mediante el software Kraken-2 como *S. dysgalactiae*. Todos los aislados fueron tipificados como ST454, según el esquema Pasteur, pertenece al *S dysgalactiae subs dysgalactiae* (Xu et al., 2021).

En cuanto a la presencia de factores de virulencia, se identificaron tres genes codificantes de factores de virulencia en los aislados: el gen *fpb54* codificante de la proteína Fbp54, del grupo de adhesión de VFDB (Kreikemeyer et al., 2004); el gen *hasC* codificante de la enzima UTP-glucosa-1-fosfatasa uridililtransferasa, pertenece al grupo de modulación del sistema inmune en VFDB (Bisno et al., 2003); y el gen *sagA*, codificante de la estreptolisina S, del grupo VFDB de las exotoxinas (Mitchell, 2003).

En cuanto a la resistencia a antibióticos se identificó el gen *erm(B)_18*, a partir de base de datos de RestFinder, este contribuye a la resistencia a la clidamixina, eritromicina, lincomicina, pristamicina_IA, quinupriscina y virginiamicina (Chen et al., 2021); el gen *tet(O)_3* que se relaciona con resistencia a la doxiciclina, minociclina y tetraciclina (Widdowson et al., 1996). Ambos presentes en los ocho aislados secuenciados.

El análisis pangenómico de los 8 aislados por Roary muestra una gran estabilidad en el genoma, presentando una proporción muy baja de genes accesorios siendo esta del 1,2% y del 0,6% para genes únicos (Figura 15). Lo que nos indica un genoma cerrado o casi cerrado, característico de brotes infecciosos, donde el patógeno se multiplica de forma clonal (Dewar et al., 2024; Tettelin et al., 2008).

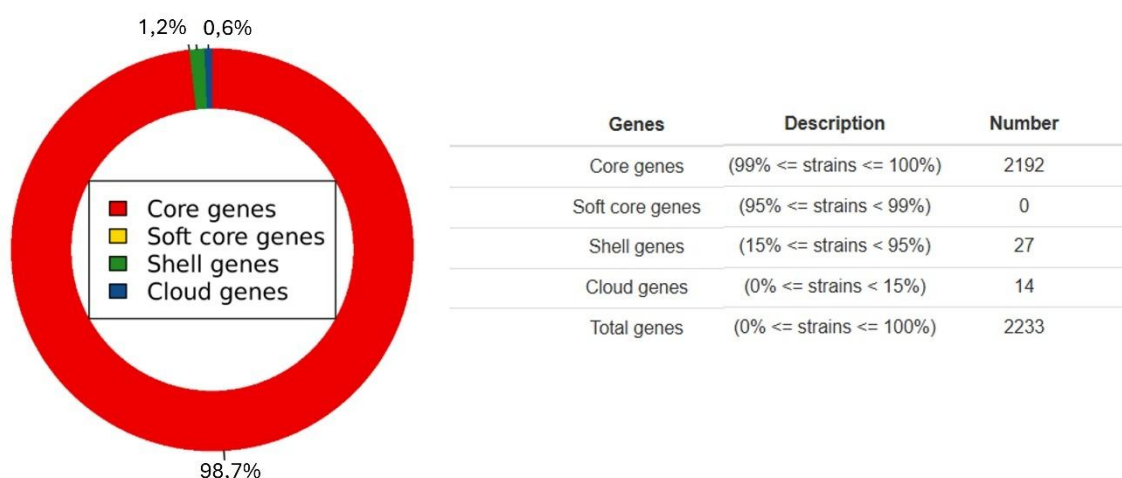


Figura 16. Resultados del análisis pangenómico con Roary del genoma de los 8 aislados de *S. dysgalactiae* originarios de tres animales con meningoencefalitis secuenciados. Se presentan los datos para los genes presentes entre el: 99%-100% (Core genes); 95%-99% (Soft core genes); 15%-95% (Shell genes); 0%-15% (Cloud genes); 0%-100% (Total genes).

4.2.4.2. Estudio de los focos de contaminación asociados al brote

Debido a la naturaleza de la explotación ganadera, donde se ordeñaban de forma automatizada a la mitad del ganado para la producción de leche y posteriormente las madres para la producción de calostro. Se estudió una nueva posible vía de contaminación oral a partir de la toma de calostro, esta vía fue sugerida por Lacasta et al. (2008).

Para ello se tomaron muestras de calostro a lo largo de su manipulación hasta la toma por parte del cordero en cuatro procesos de extracción y

manipulación de calostro (Figura 17). Estos se llevaron a cabo días consecutivos. De cada proceso de extracción se tomó: una muestra de calostro tras pasar por el sistema de ordeño automatizado de la granja, referida como calostro fresco (CF); una muestra de calostro tras su pasteurización y enfriamiento, referida como calostro pasteurizado (CP); y una muestra de calostro conservado en botellas a 4°C, durante 24h justo antes de su administración al cordero, referida como calostro en botella (CB).

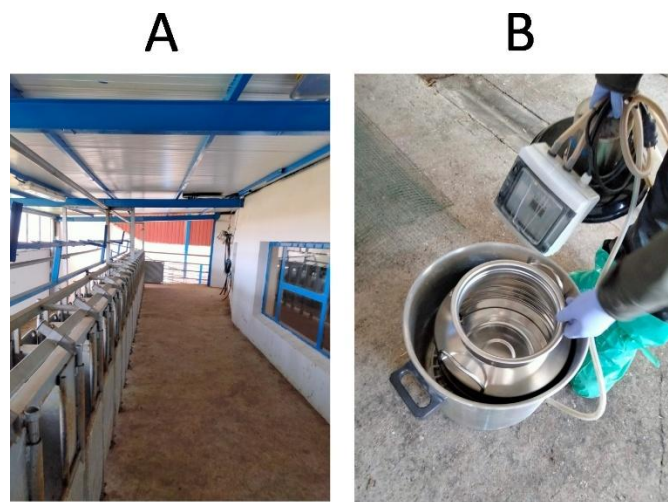


Figura 17. Sistema de ordeño y manipulación de calostro. A) Sala de ordeño. B) Sistema de Pasteurización empleado para calostro.

A partir de las muestras tomadas se realizó un recuento de aerobios mesófilos, en medio PCA (Oxoid). Los límites de contaminación en calostro ovino no han sido establecidos, por lo que se tuvieron en cuenta los valores dados por Hyde et al. (2020) en bovino, que establecen el límite de contaminación en calostro en >100.000 UFC/ml. Debido al reducido tamaño del cordero en comparación al ternero, los niveles se consideraron más bajos. Como se representa en la Figura 18 A, los valores de aerobios mesófilos se acercan al límite para CF en los cuatro procesos de extracción. Tras la pasteurización y

enfriamiento se reducen los niveles ligeramente. Finalmente, tras su conservación refrigerado 24h, la carga bacteriana supera los niveles de partida.

Debido a los elevados números determinados en el calostro, se testaron factores ambientales que tuvieran un contacto directo con este. Concretamente se midió la contaminación en los sistemas de extracción automatizados. El sistema implementado en la explotación ordeñaba primero la mitad de su ganado para producción de leche de consumo (400 ovejas) y tras estas las madres para la obtención del calostro, empleando el mismo sistema automatizado. Justo antes de iniciar la extracción del calostro, durante tres días consecutivos se tomó una muestra de leche de producción, tras pasar por todo el sistema de extracción, tomada directamente del tanque de leche (TL). Como se muestra en la Figura 18 B, en los tres días muestreados, los niveles de aerobios mesófilos se situaron cercanos a 1×10^5 UFC/ml. Presentando un perfil muy similar a lo encontrado en el caso de los calostros, por lo que el empleo del mismo sistema de extracción para leche y calostro se determinó como un importante punto de contaminación.

Otro factor estudiado, fue el sistema de distribución de agua. En este caso el agua de suministro (AS), antes de su tratamiento por la granja fue analizada para determinar la contaminación por aerobios mesófilos antes del tratamiento. A continuación, se determinó la carga de aerobios mesófilos en el agua tras su tratamiento (AT). En ambos casos, como se muestra en la Figura 18 C, los niveles se situaban por debajo de 100 UFC/ml, límite establecido según la legislación española para el humano (RD.140/2003). Lo que llevó a descartar esta fuente como un importante factor de contaminación para la explotación.

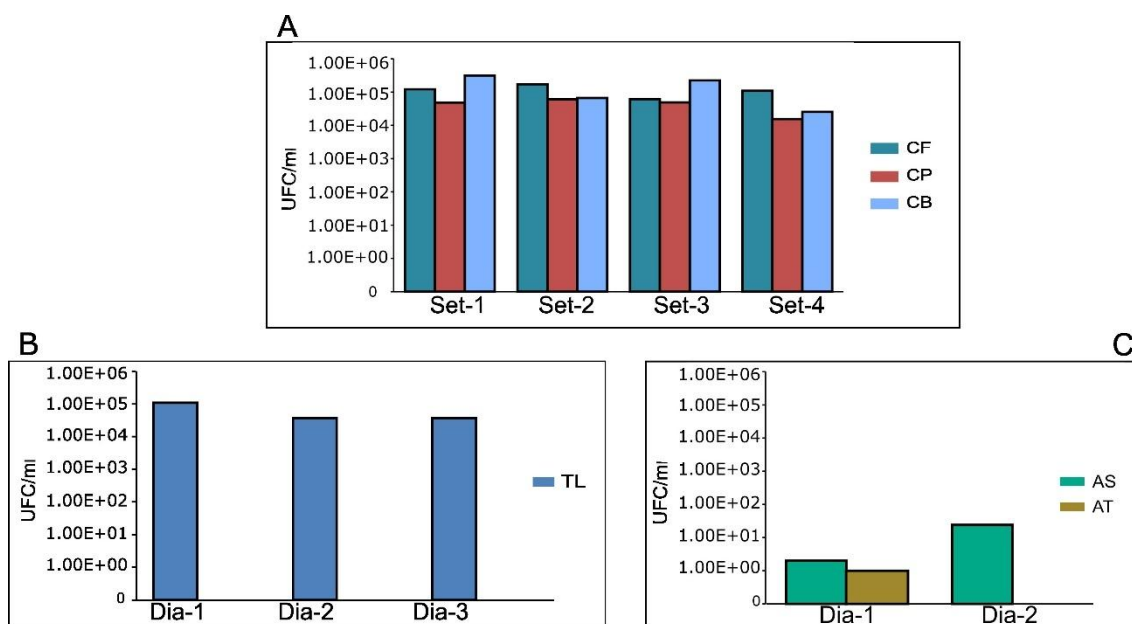


Figura 18. Recuentos microbiológicos para el estudio de los focos de contaminación. A) Recuento de aerobios mesófilos en 4 procesos de extracción y tratamiento del calostro (Set-1, Set-2, Set-3 y Set-4), para calostro fresco (CF), calostro pasteurizado (CP) y calostro conservado a 4°C (CB). B) Recuento de aerobios mesófilos en la leche de producción, durante tres días consecutivos (Dia-1, Dia-2 y Dia-3). C) Recuentos para aerobios mesófilos en el agua del suministro (AS) y en el agua tratada (AT).

Tras determinar la carga bacteriana en calostro y leche, se estudió la composición bacteriana, con el fin de identificar la presencia de grupos patógenos en CF, CP y LT. Para ello se extrajo el ADN empleando el kit DNAeasy PowerFood Microbial kit (Qiagen) y se prepararon las librerías y secuenciaron para el análisis del ARNr16S. Se obtuvieron un total de 100.288 lecturas y 60 taxones fueron identificados. El género más abundante fue *Pseudomonas* ocupando el 93,66% de la composición bacteriana total (AnexoI, Tabla10). Como se muestra en la Figura 19, tras la exclusión del género *Pseudomonas*, se visualiza *Streptococcus* como uno de los nueve géneros más abundantes en CP y LT. A nivel de especie se identificó *S. dysgalactiae* en la LT, lo que señala la presencia del patógeno en la leche de producción y por tanto la contaminación en sistema de ordeño automatizado.

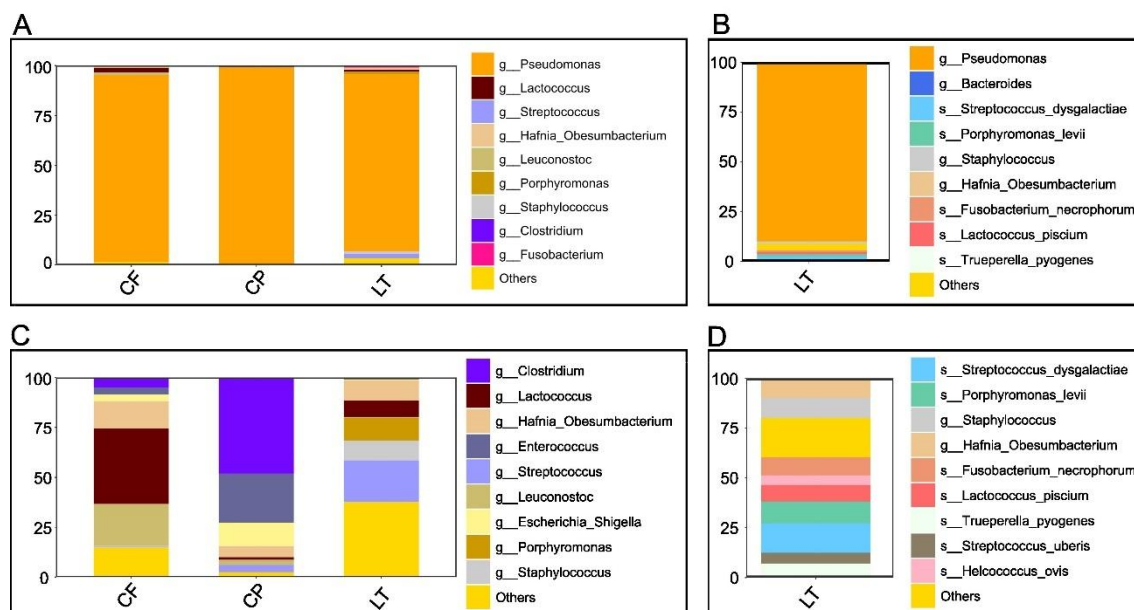


Figura 19. Abundancia relativa de los 9 grupos más abundantes mediante secuenciación ARNr 16S. A) Identificación a nivel de género para CF, CP y LT. B) Identificación a nivel de especie para LT. C) Identificación a nivel de especie, excluyendo las lecturas para *Pseudomonas*, en CF, CP y LT. D) Identificación a nivel de especie excluyendo las lecturas para *Pseudomonas* en LT.

Tras la identificación de *S. dysgalactiae* en los sistemas de ordeño, la granja implementó dos medidas tratando de corregir el problema. La primera de ellas fue el cambio en el orden de ordeño, ordeñando primero a las madres para la producción de calostro y posteriormente al resto del ganado. Además, debido a la ineficacia determinada por la pasteurización, se sustituyó el antiguo pasteurizador de inmersión que empleaba la explotación, por un pasteurizador con mezclador y mantenimiento de la temperatura en refrigeración a 4°C. La explotación reportó una completa eliminación del problema en sucesivas parideras por lo que se dio por concluido el caso.

4.2.5. Discusión

Tradicionalmente se ha considerado las principales vías de contaminación por *S. dysgalactiae*, la pobre desinfección de la nave, el crotal y el corte de la

cola (Lloyd et al., 2016; Rutherford et al., 2015; Smistad et al., 2020). En el presente estudio se ofrece una cuarta vía, la contaminación mediante la toma del calostro. Lacasta et al. (2008), ya habían sugerido la existencia de esta nueva vía, al aislar el patógeno en calostro de una de las madres con cordero poliartrítico. La identificación de *S. dysgalactiae* en la LT, señala la presencia de madres con mastitis subclínica entre las madres de producción, lo que contaminaría en última instancia el sistema de ordeño y los calostros. *S. dysgalactiae* es común como patógeno oportunista de las glándulas mamarias, este es especialmente difícil de detectar en algunos casos al no presentar manifestaciones clínicas evidentes, facilitando la contaminación de la leche o calostro (Botrel et al., 2010; Østerås et al., 2006).

El estudio de la carga bacteriana en FC, PC y BC, mostró altos niveles de contaminación, acercándose en todos los casos a los niveles límite para ovino que se establecieron en <100.000 UFC/ml. Esto mostró la ineficiencia de los sistemas de pasteurización, recibiendo los corderos una alta carga bacteriana en sus primeras horas de vida. Destaca la alta abundancia relativa del género *Pseudomonas*. Este se emplea como indicador de deterioro del calostro (Meng et al., 2017), además, algunas especies como *Pseudomonas aeruginosa*, son patógenos oportunistas causantes graves infecciones toxialimentarias, desencadenando casos de meningitis, enterocolitis y neumonía (X. Li et al., 2023). Este género bacteriano es especialmente difícil de eliminar, debido a su alta capacidad para formar biofilm (Tuon et al., 2022), la formación de biofilm puede actuar como protector para otros patógenos como las especies del género *Streptococcus*, dificultando su eliminación del entorno (Marks et al., 2014). La presencia del género *Streptococcus* en CF y CP, sugiere la contaminación cruzada desde el sistema de ordeño al calostro, lo que finalmente desencadena en la entrada del patógeno vía oral al cordero. Lo que hizo a la explotación implementar nuevas medidas de manejo, como el cambio del orden de ordeño y

mejora en el sistema de pasteurización, que resultaron efectivas para mitigar el problema.

La secuenciación masiva se empleó para la identificación y caracterización del patógeno. Mediante secuenciación del ARNr 16S, se pudo determinar el agente causal de la poliartritis, como *S. dysgalactiae* en el líquido articular, además permitió identificar cambios en las dinámicas de las comunidades bacterianas ante la aplicación de un determinado tratamiento. La aplicación de eritromicina generó en los corderos tratados, un incremento de la abundancia relativa del género *Streptococcus* en detrimento del resto de taxones bacterianos identificados en los corderos sin el tratamiento. Este hecho probablemente se deba a la presencia del gen *erm(B)*, este gen es el que más frecuentemente se asocia con la resistencia a dicho antibiótico (Shen et al., 2021; Smistad et al., 2021; S. Zhang et al., 2018).

Los ocho aislados obtenidos, se identificaron como ST454, este ST es característico de SDSD. Siendo el más frecuente en casos de poliartritis en Noruega (Smistad et al., 2021). Así como el más frecuente en mastitis bovina en China (Shen et al., 2021). Por lo que su capacidad para contaminar leche y generar poliartritis ha sido confirmada.

En cuanto a sus factores de virulencia, fueron identificados tres de ellos: *fpb54*, *hasC* y *sagA*. El gen *fpb54*, codifica para la proteína de unión a la fibronectina, lo que proporciona capacidad para unirse de forma efectiva a varios tipos celulares (Shen et al., 2021). Además, se relaciona con la invasión de las células endoteliales, otorgando capacidad para generar endocarditis (Courtney et al., 1996). El gen *hasC* codifica para la UTP-glucosa-1-fosfato uridiltransferasa. Esta forma parte del operón *has*, que codifica para la capsula. Esto permite a las bacterias evadir la fagocitosis por neutrófilos, actividad que ha sido reportada en *S. pyogenes* y en otros estreptococos como *Streptococcus uberis* (Bisno et al., 2003;

P. N. Ward et al., 2001). El resto de componentes del operón *has* no han sido identificados, pudiendo desempeñar este gen una función diferente a la previamente descrita en la literatura. También se identificó el gen *sagA* codificante de la estreptolisina S, esta toxina se ha descrito con capacidad para generar daño celular, lisando una gran cantidad de células como: los eritrocitos, plaquetas o los neutrófilos. Lo que conduce al decremento de la actividad del sistema inmune. Esta toxina proporciona también capacidad para eliminar las uniones intracelulares, permitiendo la invasión intracelular y la bacteriemia (Alves-Barroco et al., 2021). La presencia de estos tres factores de virulencia proporcionaría a las bacterias capacidad para producir toxinas, evadir el sistema inmune e invadir tejidos, por lo tanto contaría con las herramientas para producir un brote bacteriano en la explotación.

4.2.6. Conclusions

- This study identifies, for the first time, the milking system as a source of contamination leading to *Streptococcus dysgalactiae* infection in neonatal lambs
- The findings highlight the importance of implementing efficient pasteurization and proper disinfection protocols in the milking system as essential control measures
- The causative agent was identified as *S. dysgalactiae* MLST 454, and its main virulence factors and antibiotic resistance genes were characterized
- These results suggest that oral transmission of *S. dysgalactiae* through contaminated colostrum may play a significant role in neonatal infections, a factor that has not been previously considered in similar outbreaks

4.2.7. Related Research Article

Journal:

BMC Veterinary Research. JCR (2023): 2.3. Veterinary Sciences: Q1. *Manuscript accepted for publication*

Title:

Milking Systems and Colostrum Handling as an Agent for the Spread of Polyarthritic Streptococcus dysgalactiae Strains in Sheep Farms: Case Report.

Autors:

Álvaro Cañete-Reyes, Jorge Gutierrez-Gonzalez, Lauren V. Alteio, David Rodríguez-Lázaro and Marta Hernández

Abstract:

Background: Streptococcus dysgalactiae is the main cause of neonatal polyarthritis in sheep and is also an important agent in ovine mastitis. However, the main sources of contamination by this pathogen have not been studied in depth.

Case Presentation: A polyarthritis outbreak in 2-3-day-old lambs with an incidence rate of 40% was reported in a sheep farm focused on sheep's milk and lamb's meat. The problem persisted over three consecutive lambing cycles. The pathogen was identified as S. dysgalactiae by 16S rRNA sequencing of joint fluid. Its genome was isolated and sequenced as S. dysgalactiae MLST 454. The main antibiotic resistance genes and virulence factors were determined. The water supply, milking system, and pasteurisation efficiency were tested by standard plate count methods as well as 16S rRNA sequencing techniques. High levels of contamination were found in the milking system and colostrum, with the presence of Streptococcus spp. and S. dysgalactiae. The implementation of enhanced pasteurization and more rigorous decontamination of the milking system were sufficient to control the problem on the farm.

Conclusions: This study reveals the role of the milking system contamination in facilitating the spread of bacteria, such as S. dysgalactiae and provides evidence for the existence of an oral pathway of infection via colostrum.

4.3. Capítulo 3: Sistema de distribución de agua como difusor de *Streptococcus pasteurianus* causante de diarrea y meningitis en ovino

Summary

Background:

Streptococcus gallolyticus subsp. *pasteurianus* is an emerging pathogen frequently associated with cases of meningitis and bacteremia. Initial reports of the disease involved neonates—both human and animal—presenting with diarrhea. In this study, we investigated an outbreak of *S. pasteurianus* that began on a farm in Palencia in September. The farm housed approximately 1,600 Assaf breed sheep. Affected lambs, around 28 days old, initially presented with diarrhea, which later progressed to neurological symptoms. The outbreak resulted in a mortality rate of 13.6%. Following antibiotic treatment with amoxicillin, the mortality rate was reduced to 8.75%.

Objetives:

- To identify and characterize *S. pasteurianus* as the causative agent of the outbreak, with special emphasis on its virulence factors and associated resistance genes.
- To determine the main routes of contamination associated with *S. pasteurianus* on the studied farm.
- To implement appropriate management measures to mitigate the incidence of *S. pasteurianus* on the farm.

Sampling:

A total of 46 samples were analyzed from a farm in Palencia affected by an outbreak caused by *Streptococcus pasteurianus*. The samples included 3 isolates obtained from encephalic swabs, 29 water samples, 4 colostrum samples, and 2 milk samples.

Results and Discussion:

Streptococcus gallolyticus subsp. *pasteurianus* was confirmed as the causative agent of meningitis. Genomic analysis of three isolates from meningeal tissue revealed 98.27% gene similarity, indicating they belonged to the same strain. The pathogen was also detected by 16S rRNA sequencing in formula milk given to 28-day-old

lambs, accounting for 11.89% of the bacterial population in the female pen and 17.89% in the male pen. Group D *Streptococcus* was identified in the water supply, with bacterial counts of 1.42×10^3 CFU/mL in the male area and 5×10^5 CFU/mL in the female area. 16S sequencing showed *S. pasteurianus* represented 2.81% of the total microbial population in water.

Despite corrective measures, high bacterial loads persisted, with Group D *Streptococcus* reaching 7.30×10^1 CFU/mL in water and 1.73×10^4 CFU/mL in colostrum. A full inspection of the water system identified nine contamination points, which were treated with 3% peracetic acid, successfully reducing *Streptococcus* counts to 0 CFU/mL.

Colostrum pasteurization was also evaluated. Bacterial counts rose from 9.90×10^1 CFU/mL (manual extraction) to 8.37×10^3 and 2.09×10^4 CFU/mL after mechanical milking and ambient cooling. Group D *Streptococcus* increased from 0 to 6.63×10^2 CFU/mL. In contrast, rapid cooling by freezing colostrum at -20°C post-pasteurization reduced mesophilic counts to 3.00 CFU/mL and *Streptococcus* to 0 CFU/mL.

The combined interventions—water system sanitation and rapid colostrum cooling—reduced the outbreak incidence to 3% and mortality to 0%, effectively bringing the outbreak under control.

4.3.1. Contextualización y justificación del caso

Un grupo patógeno, ampliamente conocido en el campo de la medicina y veterinaria es el grupo *S. bovis* este incluye bacterias principalmente comensales encontradas frecuentemente en el tracto digestivo animal y humano. El grupo queda conformado por dos biotipos, el biotipo I, caracterizado por la fermentación de manitol y el biotipo II, que a su vez se divide en II/1 que incluye aquellas que fermentan el almidón y el glucógeno, pero no producen B-galactosidasa, mientras que las cepas del biotipo II/2 no fermentan el almidón ni el glucógeno, pero producen B-glucuronidasa y B-galactosidasa. Dentro del grupo *S. bovis* los principales patógenos son *S. gallolyticus sub gallolyticus* (formalmente *S. bovis* biotipo I), *S. gallolyticus sub pasteurianus* (formalmente *S. bovis* biotipo II/2) y *Streptococcus infantarius* (formalmente *S. bovis* biotipo II/1) (Sheng et al., 2014). Entre ellas recientemente destaca *S. gallolyticus sub pasteurianus* al presentar un carácter emergente, especialmente asociado a casos de bacteriemia y endocarditis, infecciones del tracto urinario, septicemia, meningitis en neonatos, infecciones intrauterinas en madres, así como problemas gastrointestinales (Y. Li et al., 2019). Una de las asociaciones que han hecho poner el punto de mira de la comunidad científica en este patógeno es su posible relación con el cáncer de colon. Son numerosos los casos que señalan esta posible relación de *S. gallolyticus sub pasteurianus* (Marmolin et al., 2016). Han sido reportados casos en los que la afección comienza como una diarrea neonatal, seguida de una bacteriemia y meningitis posterior (J. Li et al., 2023).

A pesar de que recientemente está ganando importancia en el ser humano, su potencial como patógeno en animales de explotación ganadera es conocido hace décadas. Siendo inicialmente descritos en terneros como patógenos oportunistas (SASAKI et al., 2004). Actualmente se están realizando esfuerzos para caracterizar sus genomas, describiendo sus principales factores de

virulencia y genes de resistencia a antibióticos. Un reciente estudio desarrollado por S. Wang et al. (2025), ha estudiado el genoma de 45 aislados alrededor del mundo, tanto humanos como animales, y determinó que todos ellos podían ser considerados como cepas multirresistentes al presentar resistencia a al menos a cuatro clases de antibióticos. Los autores resaltaron los riesgos como especie bacteriana emergente en los próximos años.

Este carácter emergente, así como su potencial zoonótico y su asociación con la diarrea neonatal, hizo que se destinase una parte de la presente tesis doctoral a su estudio mediante la resolución de un caso práctico. Concretamente se trabajó en un brote asociado a *S. pasteurianus*, que comenzó en Palencia, en el mes de septiembre de 2022. La explotación está centrada en la producción de leche de oveja y cordero lechal, raza Assaf, contando con un número aproximado de 1.600 cabezas de ganado. Los corderos tras 28 días de edad presentaban diarrea explosiva, que continuaba con el desarrollo de síntomas neurológicos. La tasa de mortalidad ascendía al 13,6%, lo que suponía unas grandes pérdidas económicas para la explotación. El brote se repitió en la paridera inmediatamente posterior, en esta ocasión siguiendo las indicaciones del veterinario asociado a la explotación se administró tratamiento antibiótico, concretamente amoxoil retard (amoxicilina), justo tras desarrollar los síntomas (tras 28 días del nacimiento). Lo que redujo la tasa de mortalidad al 8,57%. Bajo estas premisas se desarrolló el presente estudio.

4.3.2. Objetivos

S. pasteurianus se encuadra como uno de los agentes bacterianos con carácter emergente dentro de las diarreas neonatales tanto en sanidad humana como animal. Lo que fomentó su estudio a través de un caso práctico, con una de

las explotaciones colaboradoras. Por ello se propuso confirmar el patógeno asociado al brote diarreico, caracterizar genómicamente dicho aislado, determinando sus principales factores de virulencia, así como genes de resistencia a antibióticos. Así como estudiar la posible contaminación ambiental, con el fin último de reducir la incidencia del brote, aplicando medidas de control y desinfección eficaces y evitando en última instancia la aplicación de antibióticos que fomenten la aparición de resistencias. Para ello, se ha empleado la secuenciación masiva, dotando de un carácter holístico a todo estudio y mostrando su potencial como herramienta de control epidemiológico.

Para ello se proponen los siguientes objetivos:

1. Identificar y caracterizar *S. pasteurianus* como agente causal del brote. Poniendo un especial énfasis a sus factores de virulencia y genes de resistencia asociados
2. Determinar las principales vías de contaminación asociadas a *S. pasteurianus* en la explotación estudiada
3. Implementar medidas de manejo adecuadas para mitigar la incidencia de *S. pasteurianus* en la explotación estudiada

4.3.3. Muestreo

A lo largo de 4 meses se tomaron muestras en la explotación con diferentes objetivos, tal como se presenta en la Tabla 15. Se analizaron 46 muestras en total, que se corresponden con: 3 aislados obtenidos mediante hisopo a partir de material encefálico, 29 muestras de agua, 4 muestras de calostro y 2 muestras de la leche de fórmula empleada para alimentar a los corderos.

Tabla 15. Organización de las muestras por objetivo, número y tipo

Objetivo de las muestras	Número	Tipo de muestra
Identificar y caracterizar el patógeno asociado al brote	3	Hisopo encefálico
Determinar el origen de la contaminación por estreptococo	2	Agua
Determinar el origen de la contaminación por estreptococo	2	Leche de fórmula
Seguimiento de la carga bacteriana, tras las medidas de control implementadas	9	Agua
Identificar contaminación en calostro	2	Calostro
Estudio la carga bacteriana lo largo de todo el suministro de agua	15	Agua
Identificar métodos más efectivos para el tratamiento del calostro	8	Calostro
Vigilancia de la evolución de la contaminación en el agua tras finalizar el estudio	5	Agua

4.3.4. Resultados

4.3.4.1. Identificación y caracterización del patógeno

Durante la segunda aparición del brote, se realizó una necropsia de tres corderas con sintomatología neurológica. Las muestras fueron analizadas por el experto veterinario asociado a la explotación, determinando una meningoencefalitis purulenta en las tres corderas estudiadas. En la Figura 20 se muestran fotografías de la necropsia realizada.

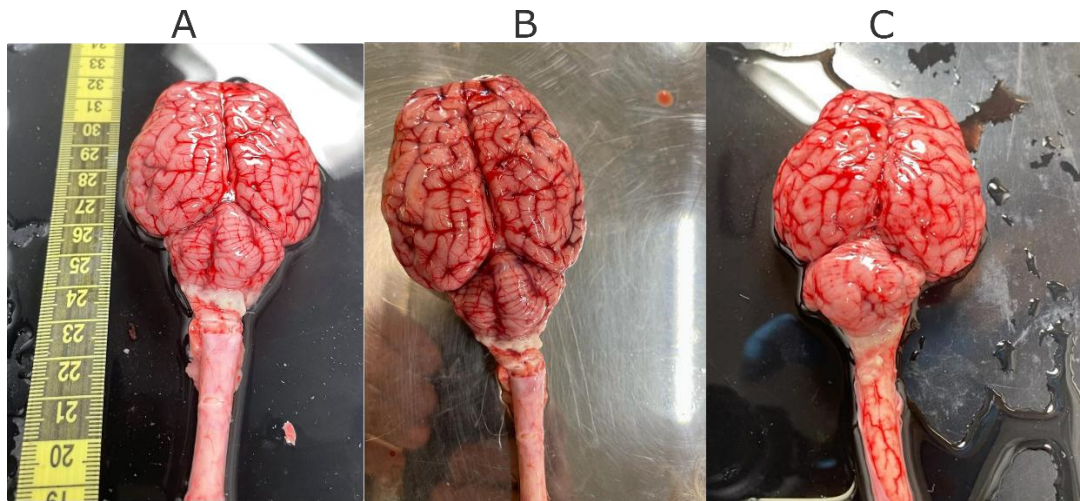


Figura 20. Necropsia del encéfalo de tres corderas (A, B y C), diagnosticadas con meningoencefalitis purulenta.

Se tomaron mediante hisopo con medio AMIES muestras de cada una de las corderas. A partir de los cuales se aislaron 3 cepas, una de cada cordera, en medio Agar Sangre (Oxoid), con una incubación a 37°C durante 24h. Se extrajo el DNA de los tres aislados empleando el Kit Blood and Tissue (Qiagen). Se secuenció el genoma completo de los tres aislados empleando un secuenciador Miseq (Illumina) y los genomas se ensamblaron y analizaron empleando la pipeline automatizada Tormes (Quijada et al., 2019).

Los tres aislados fueron identificados a nivel de especie empleando el clasificador Kraken2, concretamente *S. gallolyticus sub. pasteurianus*. Se determinó el ST más proximo empleando la herramienta mlst (Seemann, 2025). Los tres aislados presentaron mayor similitud con el ST 234 bajo el esquema *Streptococcus bovis/equinus* complex (sbsec). Este se basa en 10 genes constitutivos, concretamente coincide con 6 de los 10 genes estudiados, los resultados se presentan en el Anexo I, Tabla 8.

Se estudió la presencia de genes de resistencia a antibióticos empleando las bases de datos ResFinder, CARD y ARG-ANNOT (Bortolaia et al., 2020; Gupta et al., 2014; McArthur et al., 2013). Pudiendo identificar, en los tres

aislados secuenciados el gen *tet(M)* mediante las tres bases de datos, siendo este un gen de resistencia a la doxiciclina, minociclina y tetraciclina.

Se analizaron los factores de virulencia, a partir de la base de datos VFDB (B. Liu et al., 2022). Pero no se identificó ningún factor de virulencia conocido. Esto es debido a que concretamente de *S. gallolyticus sub pasteurianus*, aún no se han caracterizado sus factores de virulencia. A pesar de los esfuerzos que se están poniendo para intentar predecirlos mediante homología con otras especies de estreptococos, sus factores de virulencia no quedan recogidos en una base de datos común, además todos los factores predichos son preliminares ya que requieren de análisis fenotípicos asociados (S. Wang et al., 2022).

Posteriormente se analizó el pan genoma de los tres aislados secuenciados, mediante el programa Roary, contenido en la pipeline Tormes (Page et al., 2015; Quijada et al., 2019). Como se representa en la Figura 21, la cantidad de genes compartidos por los tres aislados fue muy alta (Core genes) del 98,27%, por su parte los genes accesorios representaron únicamente el 1,72 % del total. Lo que indica una baja variabilidad entre los tres aislados estudiados, presentando un pan genoma cerrado o casi cerrado. Característico de casos de brotes bacterianos, en los que se produce una multiplicación clonal del patógeno (Tettelin et al., 2008).

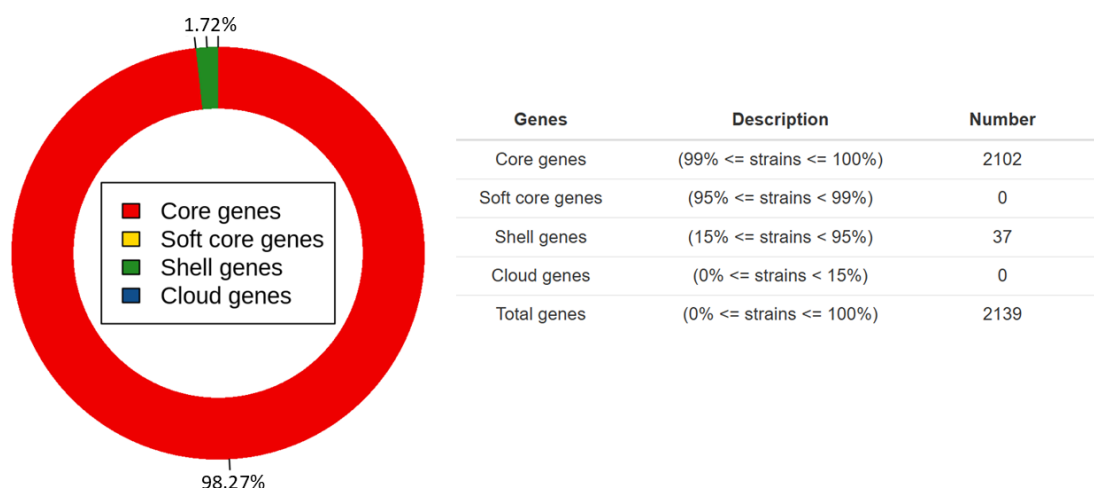


Figura 21. Resultados del análisis pangenómico con Roary del genoma de los tres aislados de *S. gallolyticus subs pasteurianus* originarios de tres animales con meningoencefalitis secuenciados. Se presentan los datos para los genes presentes entre el: 99%-100% (Core genes); 95%-99% (Soft core genes); 15%-95% (Shell genes); 0%-15% (Cloud genes); 0%-100% (Total genes).

4.3.4.2. Estudio de los focos de contaminación asociados al brote

Se analizaron las dos principales posibles fuentes de contaminación oral-fecal con las que tenían contacto los corderos. Estudiando mediante secuenciación del ARNr 16S la composición bacteriana de la leche de formula y del agua tanto del bebedero de los corderos afectados, como aquella empleada para reconstituir la leche de formula. Se detectó la presencia del género *Streptococcus* en las muestras tomadas de leche de fórmula, tanto en la parcela de las hembras (11,89%) como en la de los machos (17,46%), Nodrizas_H y Nodrizas_M respectivamente. De igual modo se analizó la presencia del género *Streptococcus* en el agua que se emplea para reconstituir la leche de formula, ocupando en esta un 0,14% de la composición bacteriana total (Figura 22 A). Los resultados anteriores se combinaron con un estudio cuantitativo mediante recuento de estreptococos del grupo D de Lancefield, empleando el medio selectivo y diferencial kanamicina aesculina azida (KAA, OXOID). Por el que se determinaron valores de $1,42 \times 10^3$ UFC/ml y de 5×10^5 UFC/ml en Nodrizas_M y en

Nodrizza_H respectivamente. En el caso del agua (Nodrizza_D) se obtuvo 2,81 UFC/ml para estreptococos del grupo D (Figura 20 C). También se estudió la carga de aerobios mesófilos, obteniendo unos valores de $3,45 \times 10^4$ UFC/ml y $3,40 \times 10^6$ UFC/ml para Nodrizza_H y Nodrizza_M, para leche de formula. En el caso del agua los valores obtenidos fueron de $4,35 \times 10^3$ UFC/ml (Figura 22 B).

De acuerdo con la legislación vigente en España, no existen unos valores de referencia establecidos para las carga bacteriana máxima en agua ni en leche para consumo animal. A pesar de ello se suelen tomar como referencia valores establecidos para humanos, siendo estos de 100 UFC/ml para aerobios mesófilos y de 0 UFC/ml estreptococos del grupo D, en el caso de la leche se sitúan en $<1 \times 10^5$ UFC/ml para aerobios mesófilos y 0 UFC/ml para estreptococos del grupo D (McGuirk & Collins, 2004; Šlosárková et al., 2021; Stewart et al., 2005).

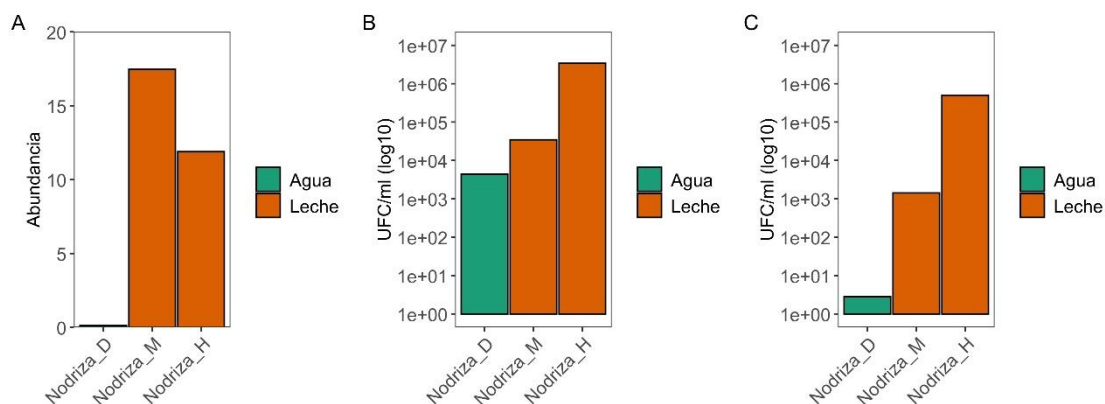


Figura 22. Estudio de la contaminación en agua (Nodrizza_D) y leche de formula (Nodrizza_M y Nodrizza_H), de los corderos afectados por *S. pasteurianus*. A) Abundancia relativa del género *Streptococcus* a través de secuenciación 16S. B) UFC/ml para Aerobios mesófilos. C) UFC/ml para estreptococos de grupo D.

Debido a la alta carga bacteriana encontrada en el agua que alimenta ambos mezcladores de leche de formula (Nodrizza_M y Nodrizza_H). Se determinó este como un posible foco de contaminación, identificando el

mecanismo de tratamiento de agua como inefectivo. Debido a ello, el personal de la explotación tomó una medida del pH que presentaba el agua encontrando un valor anormalmente alto, lo que indicaba inefectividad del tratamiento aplicado.

Tras corregir los problemas en el agua el brote bacteriano se volvió a repetir en la siguiente paridera, pero se adelantó la aparición de la sintomatología a los 10 días de nacimiento. En esta etapa temprana, el cordero solo consume calostro, por lo que no presenta un consumo directo de agua. Pero el agua se emplea en la limpieza de los biberones y depósitos de leche de la granja. Para determinar si el tratamiento corregido estaba resultando efectivo se tomaron 2 muestras de agua y 2 muestras de calostro. Concretamente se analizó el agua justo antes de entrar en la explotación, tomada desde la fuente de origen (Entrada_agua) y agua desde el depósito que alimenta las nodrizas (Nodrizas_D). Además, se tomó una muestra de las dos reservas de calostro congelado que empleaba la granja (Calostro_A y Calostro_B). Mediante secuenciación del ARNr16S se detectó la presencia del género *Streptococcus* en el agua tanto antes como después del tratamiento, así como en el calostro (Figura 23 A). De igual forma se obtuvieron valores para aerobios mesófilos de $5,18 \times 10^1$, $6,64 \times 10^3$, $2,23 \times 10^3$ y $1,59 \times 10^2$ UFC/ml para la Entrada_agua, Nodrizas_D, Calostro_A y Calostro_B respectivamente (Figura 23 B). En el caso de los estreptococos del grupo D, se obtuvieron los valores de $1,00 \times 10^1$, $7,30 \times 10^1$, $1,73 \times 10^4$ y $2,00 \times 10^2$ UFC/100ml para la Entrada_agua, Nodrizas_D, Calostro_A y Calostro_B (Figura 23 C).

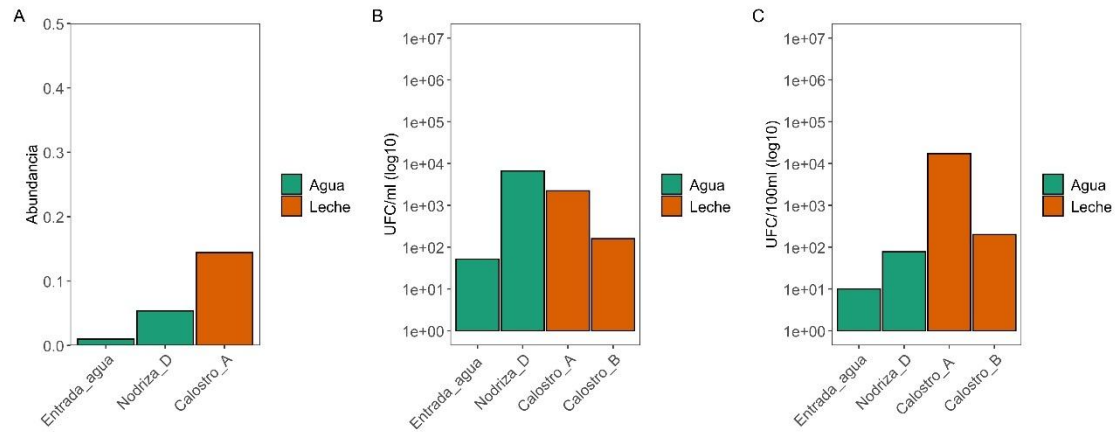


Figura 23. Estudio de la contaminación en agua y calostro. Para agua: entrada del agua a la explotación (Entrada_agua) y depósito de agua tratada que alimenta las nodrizas (Nodriz_D). Para calostro: dos muestras Calostro_A y Calostro_B A) Abundancia relativa del género *Streptococcus* a través de secuenciación 16S. B) UFC/ml para Aerobios mesófilos. C) UFC/100ml para estreptococos de grupo D.

Debido a la continuada presencia de estreptococos en la explotación, y la ineficiencia que supuso la corrección en el peróxido. Se decidió realizar un tratamiento de desinfección mecánica empleando ácido paracético al 3% en todos los puntos con alta concentración bacteriana en el circuito de agua de la explotación. Para ello se realizó un estudio integral de todo el circuito de agua con el objetivo de determinar los puntos a tratar. Concretamente se tomaron 15 muestras de agua, de los siguientes puntos: Entrada de agua (A1), Depósito de agua principal de la explotación (A2), Depósito de la sala de ordeño-1 (A3), Depósito de la sala de ordeño-2 (A4), Bebedero de la sala de ordeño-1 (A5), Bebedero de la sala de ordeño-2 (A6), Depósito de la zona de embarazo (A7), Bebedero zona de embarazo (A8), Depósito zona de parto (A9), Bebedero zona de parto (A10), Depósito general de zona de nodrizas (A11), Depósito de nodriza zona de machos (A12), Agua de mezcla nodriza zona de machos (A13), Depósito de nodriza zona de hembras (A14) y Agua de mezcla nodriza zona de hembras (A15).

Se tomaron como medidas estandarizadas los valores establecidos por McGuirk & Collins (2004) de 100 UFC/ml para aerobios mesófilos y de 0 UFC/ml estreptococos del grupo D. Encontrándose por encima de estos valores las puntos A3, A4, A5, A6, A7, A8, A9, A10, A11 para aerobios mesófilos (Figura 24 A). En el caso de estreptococos del grupo D, las áreas A5, A6, A7, A8, A9, A10, A13, A14 y A15 (Figura 22 C). Estas áreas fueron tratadas con ácido paracético al 3%. Tras una semana del ensayo se tomó nuevamente una muestra del depósito de nodriza de hembras (A17) y se comparó con la primera muestra tomada al inicio del estudio (A16). Como se muestra en la Figura 24 B y D, los valores se redujeron notablemente, entre A16 y A17, desde 4.35×10^3 al inicio del estudio a 1.03×10^2 UFC/ml en el caso de aerobios mesófilos y de 2.81×10^2 a 0 UFC/100ml en el caso de estreptococos del grupo D.

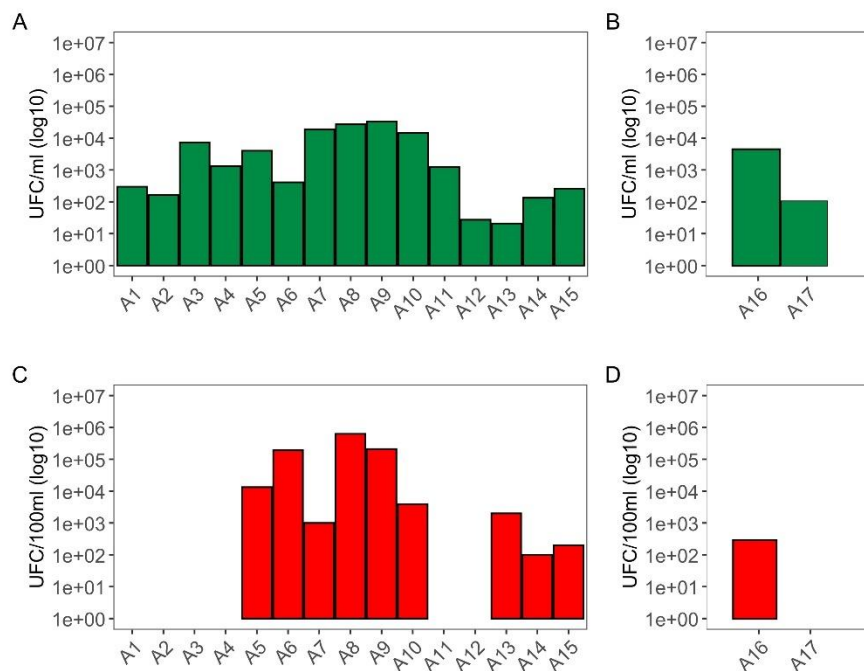


Figura 24. Estudio integral de la contaminación en el suministro de agua, para aerobios mesófilos (verde) y estreptococos del grupo D (rojo). A y C) A lo largo de todo el circuito de agua, A1-A15. B y D) Evolución de la carga bacteriana entre el primer muestreo de la nodriza (A16) y tras aplicar el tratamiento (A17).

Al estudio de la contaminación en el agua, le sucedió un estudio para determinar la evolución de la carga bacteriana en el calostro, a través del proceso de pasteurizado. La explotación empleaba un pasteurizador por inmersión con agitación. Tras la pasteurización del calostro, este se dejaba enfriar a temperatura ambiente durante 10-15 minutos. Para realizar el estudio se tomaron 6 muestras de calostro de dos lotes de días consecutivos C1 y C2. Concretamente C1.1 (calostro extraído a mano), C1.2 (calostro tras pasar por el sistema de ordeño), C1.3 (calostro tras pasteurizar y enfriar), C2.1 (calostro extraído a mano), C2.2 (calostro tras pasar por el sistema de ordeño) y C2.3 (calostro tras pasteurizar y enfriar). Obteniendo unos valores en el recuento para aerobios mesófilos de: $9,90 \times 10^1$ en C1.1; $8,37 \times 10^3$ en C1.2; $2,09 \times 10^4$ en C1.3; $3,00 \times 10^2$ en C2.1, $1,98 \times 10^4$ en C2.2 y $1,00 \times 10^3$ en C2.3 UFC/ml. Siendo para estreptococos del grupo D: 0,00 en C1.1; 1,00 en C1.2; $6,63 \times 10^2$ en C1.3; 0,00 en C2.1; $2,36 \times 10^2$ en C2.2; y $1,00 \times 10^1$ en C2.3 UFC/ml. La contaminación aumentaba tras la extracción por el sistema de ordeño y la pasteurización posterior no resultaba efectiva para reducir la carga bacteriana a niveles óptimos para el cordero (Anexo II, Figura 4A y C). Probablemente debido a el largo tiempo de enfriamiento que el calostro pasaba a temperatura ambiente hasta su conservación en el refrigerador.

Debido a la ineficacia de la pasteurización y en especial a los largos tiempos de enfriamiento posterior. Se testó un enfriamiento rápido, en el que se sitúa el calostro en botellas de cristal y se depositó en un congelador a -20°C . Tras la congelación del calostro este se descongeló a 4°C (CR) y se tomó una muestra para comparar con la misma muestra de calostro, pero enfriada a temperatura ambiente (CL). Los valores para aerobios mesófilos se situaron en $8,18 \times 10^3$ UFC/ml para CL y de 3,00 UFC/ml para CR (Anexo II, Figura 4 B). En el caso de los estreptococos del grupo D, se obtuvo 8,18 UFC/ml CL y de 0,00 UFC/ml CR (Anexo II, Figura 4 D). Determinando el papel del enfriamiento como una pieza clave en el correcto manejo del calostro.

La correcta desinfección del sistema de agua junto con el nuevo manejo del calostro, con un enfriamiento a -20°C . Permitió reducir los niveles de incidencia del brote en los corderos a un 3%, y la tasa de mortalidad al 0%. Tras esta reducción se dio por concluido el caso.

4.3.5. Discusión

La confirmación del patógeno como *S. gallolyticus sub pasteurianus* mediante su aislamiento a partir del tejido encefálico de tres corderas afectadas por meningoencefalitis, permitió asociar el brote a dicho patógeno. *S. pasteurianus* es citado en la bibliografía como un patógeno emergente, anteriormente considerado como un patógeno menor (J. Li et al., 2023). Esto dificulta su comparativa con las bases de datos al ser limitada la información referente a este patógeno. Debido a la imposibilidad para determinar su ST, únicamente identificando 6 de los 10 genes constitutivos para el perfil recogido en pubMLST, se optó por el estudio comparativo de las cepas a través de su pangenoma. Presentado un genoma cerrado o casi cerrado, con una cantidad de genes compartidos por los tres aislados muy alta cercana al 100%. Esta baja diversidad supone una ventaja a la hora de combatir el patógeno, ya que indica una baja plasticidad en el genoma, generalmente asociada a la baja presencia de elementos móviles como plásmidos, islas genómicas o transposones (Tettelin et al., 2008).

En cuanto a genes de resistencia a antibióticos se identificó el gen *tet(M)*, en los tres aislados. Este actúa mediante un mecanismo de protección ribosomal, reduciendo el espectro de acción de las tetraciclinas (Bryan et al., 2004). Son numerosos los reportes que indican el creciente aumento de la resistencia a este grupo de antibióticos en especial en producción ganadera. Programas de monitoreo como el noruego “Monitoring of Antimicrobial Resistance and

Antibiotic Usage in Animals”. Han reportado las tetraciclinas como la principal resistencia identificada para estreptococos aislados en granjas de producción de leche, relacionados con brotes infecciosos. También el programa Frances RESAPATH ha determinado que la resistencia a tetraciclinas sigue una tendencia creciente en los últimos años (Haenni et al., 2018). Este caso continúa dicha tendencia, además apoya la idea de que especies anteriormente no consideradas relevantes desde el punto de vista clínico, con un carácter emergente como *S. gallolyticus sub pasteurianus* también presentan dichas resistencias de forma habitual.

Las medidas de dispersión de *S. gallolyticus subs pasteurianus* son aún desconocidas. La mayoría de los estudios en ganado se han centrado en el bovino y en especial los grupos B y C-G de Lancefield con *Streptococcus agalactiae* y *Streptococcus dysgalactiae* como principales representantes (Kabelitz et al., 2021). Esto hace que la identificación del patógeno en el sistema de distribución de agua, así como los tratamientos aplicados sobre esta, un primer acercamiento en el objetivo de dilucidar estos focos y su posible tratamiento.

A pesar de los notables beneficios que suponen en explotación ganadera, la pasteurización del calostro. Presentan una serie de importantes dificultades, debido a la imposibilidad de incrementar la temperatura por encima de los 60 °C. Ya que a temperaturas superiores se produce una reducción significativa de las inmunoglobulinas. Siendo el tratamiento más habitual calentar el calostro a 60°C durante 60 min, lo que reduce notablemente la carga bacteriana (Armengol & Fraile, 2016). A esto se suma la necesidad de un rápido enfriamiento posterior para mantener las condiciones nutricionales del calostro, así como limitar el crecimiento bacteriano (Abdelsattar et al., 2022). A pesar de ello, son escasos los estudios donde se han realizado cuantificaciones del impacto real del tratamiento de enfriamiento a -20°C en condiciones de campo. En el presente trabajo se

identificó una acusada reducción en el número medio de aerobios mesófilos, así como en el de estreptococos del grupo D si comparamos con el calostro enfriado a temperatura ambiente. Sugiriendo la eficiencia de un enfriamiento rápido frente al enfriamiento tradicional a temperatura ambiente.

A pesar de las posibilidades que ofrece la secuenciación masiva en el control epidemiológico, hay que destacar que en un caso como el actual. Donde nos encontramos ante un patógeno de carácter emergente, es de vital importancia ampliar los estudios fenotípicos, para caracterizar a nivel genotípico y fenotípico dichos patógenos. Con el objetivo de enriquecer la información contenida en las bases de datos públicas, facilitando su vigilancia y control por parte de las autoridades sanitarias.

4.3.6 Conclusions

- *S. gallolyticus subsp. pasteurianus* was identified in the brain tissue of all three lambs studied
- *S. gallolyticus subsp. pasteurianus* showed low genetic diversity in the pangenome analysis, indicating limited genomic plasticity
- The *tet(M)* gene, associated with tetracycline resistance, was detected in all three isolates
- The genus *Streptococcus* was identified as one of the most abundant bacterial groups in the farm's water distribution system
- Rapid colostrum cooling was found to be a key factor influencing the final bacterial contamination level in colostrum

4.4. Capítulo 4: Caracterización de las diarreas neonatales en rumiantes y porcino**Summary****Background:**

Neonatal diarrhoea is a leading cause of mortality in livestock. Opportunistic bacteria from the Enterobacteriaceae family begin colonizing newborn animals within the first hours of life. In the livestock industry, this condition results in substantial economic losses, with mortality rates reaching up to 50% in some production systems. One of the main challenges in studying the bacterial microbiota involved is the considerable variability between regions, influenced by environmental factors, diet, geography, and management practices. For this reason, various researchers have sought to identify specific diarrhoeal bacterial profiles that are characteristic of particular regions in cattle, pigs, sheep, and goats. Importantly, understanding these profiles not only provides insights into animal health and farm management but also holds relevance for public health. Several of the bacterial strains associated with livestock diarrhoea have zoonotic potential, meaning they can be transmitted to humans either directly, through contact with animals, or indirectly, through the food chain and the environment. Therefore, characterizing these diarrhoeal profiles is essential not only for improving livestock health and productivity but also for informing strategies to mitigate the risks of bacterial transmission to human populations.

Objetives:

- Identify the fecal bacterial composition in neonatal diarrhoea cases in sheep, pigs, cattle, and goats at the regional level
- Describe the fecal bacterial composition in animals affected by neonatal diarrhoea at different stages of their development
- Characterize the identified bacterial communities

Sampling:

This study was conducted in collaboration with 35 livestock farms across Castilla y León, covering five provinces (León, Palencia, Salamanca, Segovia, Valladolid, and Zamora), as well as one additional farm from the province of Madrid. Between July 2021 and October 2023, all cases of neonatal diarrhoea reported on these farms were monitored. In total, 380 rectal swab samples were collected and preserved at -80°C until DNA extraction and processing. Of these, 154 samples were from sheep, 147 from pigs, 75 from cattle, and 4 from goats.

Results and Discussion:

The four livestock subsectors (ovine, porcine, caprine, and bovine) displayed distinct bacterial communities, as confirmed by PERMANOVA analysis, which showed they form independent groups. Alpha diversity indices were consistently low across all species, reflecting very low richness and evenness in their microbial communities.

In the ovine (sheep) samples, the main bacterial taxa by age group were: *Escherichia-Shigella* (44.43%), *Clostridium sensu stricto* 1 (19.85%), and *Streptococcus* (7.83%) in newborns (0–12 h); *Escherichia-Shigella* (39.74%), *Clostridium sensu stricto* 1 (28.11%), and *Streptococcus* (6.60%) in intermediate neonates (12 h–1 d); *Escherichia-Shigella* (38%), *Clostridium sensu stricto* 1 (12.18%), and *Lactobacillus* (10.90%) in late neonates (1–2 d); and *Escherichia-Shigella* (25.10%), *Lactococcus* (12.54%), and *Bacteroides* (11.79%) in young lambs (2–15 d).

In the bovine (cattle) samples, the dominant genera shifted over time: *Escherichia-Shigella* (13.12%), *Lactobacillus* (12.78%), and *Pseudomonas* (8.35%) in calves aged 0–12 h; *Escherichia-Shigella* (29.43%), *Lactobacillus* (9.30%), and *Clostridium sensu stricto* 1 (6.65%) in 12 h–1 d; *Escherichia-Shigella* (19.56%), *Lactobacillus* (12.78%), and *Bacteroides* (10.02%) in 2–15 d; *Lactobacillus* (16.60%), *Escherichia-Shigella* (10.95%), and *Enterococcus* (9.88%) in 15 d–1 month; and *Escherichia-Shigella* (22.43%), *Lactobacillus* (10.47%), and *Bacteroides* (8.48%) in 1–2 months.

The porcine (pig) samples showed a distinct microbial profile, with *Lactobacillus* (46.53%), *Escherichia-Shigella* (21.59%), and *Prevotella* (4.31%) dominating in piglets aged 0–12 h; *Escherichia-Shigella* (9.64%), *Prevotella* (8.44%), and *Alloprevotella* (5.90%) in 12 h–1 d; *Lactobacillus* (24.31%), *Escherichia-Shigella* (13.60%), and *Fusobacterium* (10.19%) in 1–2 d; *Lactobacillus* (19.09%), *Fusobacterium* (11.67%), and *Bacteroides* (7.83%) in 2–15 d; *Bacteroides* (11.75%), *Escherichia-Shigella* (7.60%), and *Prevotella* (4.79%) in 15 d–1 month; *Prevotella* (18.10%), *Lactobacillus* (5.91%), and *Clostridium sensu stricto* 1 (4.67%) in 1–2 months; and *Lactobacillus* (16.41%), *Prevotella* (12.73%), and *Megamonas* (11.52%) in 2–5 months.

Finally, in the caprine (goat) samples, only one dominant taxon was observed: *Escherichia-Shigella*, which accounted for 51% of the total bacterial population.

These findings highlight clear differences in bacterial composition across species, age groups, and production sectors, emphasizing the importance of species-specific and age-specific approaches when addressing neonatal diarrhoea in livestock.

4.4.1. Contextualización y justificación del estudio

La diarrea neonatal es una de las principales causas de mortalidad en niños, contabilizándose los casos en más de medio millón de muertes en niños con edad inferior a 5 años (Z. Wang et al., 2023). Otras de sus implicaciones para el neonato es el retraso en su crecimiento, malnutrición y la aparición de problemas cognitivos (Khalil et al., 2018).

Durante los últimos años un gran número de análisis epidemiológicos se han realizado en el contexto de las diarreas. Identificando grupos bacterianos causantes como *Shigella spp*, *Salmonella spp* y *E. coli* (Lanata et al., 2013). Estas bacterias generalmente habitan en la microbiota intestinal, pueden desencadenar diarrea al cambiar las condiciones del ambiente intestinal, lo que genera una activación de las señales de inflamación y en consecuencia la activación del sistema inmune del huésped (Z. Wang et al., 2023). Generalmente el tracto gastrointestinal tiene una alta diversidad de microorganismos, como bacterias, hongos, protozoos, y virus. Estas comunidades se mantienen en equilibrio con relaciones simbióticas y competitivas, promoviendo una estabilidad entre los componentes, inhibiendo posibles patógenos y participando en el procesamiento y absorción de nutrientes complejos (Y. Li et al., 2021).

Las comunidades gastrointestinales se consideran como un componente más de la salud humana. De modo que su alteración se asocia a diversas patologías, como ciertos tipos de cáncer, enfermedades metabólicas, o alteraciones cognitivas, y en muchos casos con condiciones crónicas. La composición bacteriana intestinal es altamente diversa y dinámica durante los primeros días del neonato, viéndose influenciada por múltiples factores, como la geografía, las condiciones durante el parto, la lactancia y el estado nutricional del neonato, entre otros (Chung The & Le, 2022).

La diarrea neonatal temprana, durante las primeras horas del neonato, suele llevar asociada una reducción en la riqueza y diversidad. Las diarreas constantes, eliminan buena parte de la microbiota, lo que desencadena a una reducción en términos de alfa diversidad. Facilitando el establecimiento de microorganismos anaerobios facultativos de crecimiento rápido (“fast-growers”). Siendo las proteobacterias, comúnmente componentes del grupo Enterobacteriaceae/*E. coli* y los estreptococos, los grupos más abundantes durante las primeras fases de vida del neonato, pudiendo ocupar valores por encima del 80% en la abundancia relativa fecal (Pop et al., 2014). Este incremento en microorganismos de crecimiento rápido se atribuye en parte a la oxigenación del entorno. Generando la desaparición de los comensales obligados anaerobios como los géneros *Blautia*, *Prevotella*, *Faecalibacterium*, *Lachnospiraceae* o *Ruminococcaceae* (David et al., 2015).

En humano The et al. (2018) han establecido 4 principales enterotipos asociados a la diarrea neonatal, cada uno asociado a la dominancia de un taxón específico: *Bifidobacterium*, *Bacteroides*, *Streptococcus* y *Escherichia*. Aunque otros autores señalan una mayor variabilidad entre los enterotipos identificado nuevos enterotipos donde predominan *Vibrio* o *Aeromonas* como grupos principales (Chung The & Le, 2022)

En animales de producción ganadera especialmente en bovino, donde las diarreas neonatales se ha establecido como críticas para la productividad del sector. Contando con tasas de mortalidad mayores al 50% a nivel mundial. La literatura sugiere que la composición intestinal se asocia con el estatus de salud de los animales, de modo que ciertos perfiles bacterianos hacen más susceptible al animal a desarrollar una patología intestinal asociada a diarrea. Dichos perfiles no están del todo claros, aunque algunos autores como Kim et al. (2021), señalan que el incremento de ciertos grupos patógenos como *Escherichia* o *Salmonella*,

junto con la reducción de los *Bacteroides* producen una desregulación composicional que hace más susceptible al animal a desarrollar una patología intestinal asociada a diarrea. Los perfiles son muy variables, especialmente influenciados por el ambiente concreto donde se desarrolla el animal: tipo de alimentación, la geografía o el manejo. Por ello, algunos autores han intentado esclarecer los perfiles concretos que presentan en regiones específicas. Destaca el caso de China donde se han estudiado los perfiles asociados a las razas más importantes en el país, siendo este el caso para bovino (Kim et al., 2021), porcino (Yang et al., 2017), caprino (Zhuang et al., 2020) u ovino (H. Guo et al., 2024). La importancia de esclarecer estos perfiles, no solo se debe a las importantes pérdidas económicas que suponen las diarreas neonatales, también al riesgo de transmisión de muchos de estos patógenos al humano. Un reciente estudio ha trazado la conexión entre la composición microbiológica en ovino y en personal de una explotación, así como interconexiones mutuas referentes al resistoma (J. Sun et al., 2020).

Los perfiles bacterianos asociados a diarrea neonatal en España y en especial en Castilla y León han sido pobremente estudiados. Teniendo en cuenta sus importantes implicaciones a nivel económico y sanitario, esto hace que una parte de la presente tesis doctoral se haya destinado a determinar dichos perfiles y su evolución a lo largo del tiempo.

4.4.2. Objetivos

La composición microbiológica se identifica como un marcador de salud en el animal, contribuyendo o facilitando la aparición de diarrea. Por lo que el conocimiento de los perfiles microbiológicos que presentan estos organismos, dotan de información valiosa a la hora de identificar la patología o diseñar

soluciones clínicas, para los individuos afectados. Se propone a lo largo del presente capítulo, caracterizar los perfiles bacterianos dominantes en brotes de diarrea neonatal animal, en la Comunidad de Castilla y León y Madrid. Para ello se presentan los siguientes objetivos:

- Identificar la composición bacteriana fecal en las diarreas neonatales en ovino, porcino, bovino y caprino a nivel regional.
- Describir la composición bacteriana fecales en animales afectados por diarrea neonatal en diferentes etapas de su desarrollo
- Caracterizar las comunidades bacterianas identificadas

4.4.3. Muestreo

Para el presente estudio se ha contado con la colaboración de 35 explotaciones ganaderas. A lo largo de Castilla y León, distribuidas en 5 provincias (León, Palencia, Salamanca, Segovia, Valladolid y Zamora), además se contó con la colaboración de una explotación ganadera de la provincia de Madrid.

Se ha realizado un seguimiento de todos los casos relativos a diarreas neonatales acontecidos en las 35 explotaciones colaboradoras desde julio de 2021 a octubre de 2023, en total se tomaron 380 muestras de hisopo rectal. Las muestras 310 de animales diarreicos, 56 animales sanos y 14 de animales tras 24 horas de superar el episodio diarreico. Para la toma de la muestra se han empleado hisopo rectal y se han conservado a -80°C hasta la extracción y procesamiento del ADN.

En la Tabla 16 se resume la distribución de las muestras, de animales con sintomatología compatible con diarrea por especie y rango de edad. La distribución de las muestras por provincia se presenta en la Figura 21.

Tabla 16. Distribución de muestras por rango de edad. Para los 4 subsectores productivos estudiados (Ovino, Porcino, Bovino y Caprino).

Edad	Nº-Ovino	Nº-Porcino	Nº-Bovino	Nº-Caprino
[0h-12h]	42	1	11	0
(12h-1d]	71	8	3	0
(1d-2d]	25	7	0	0
(2d-1m]	11	89	44	4
(1m-2m]	0	40	16	0
(2m-1a]	5	2	1	0

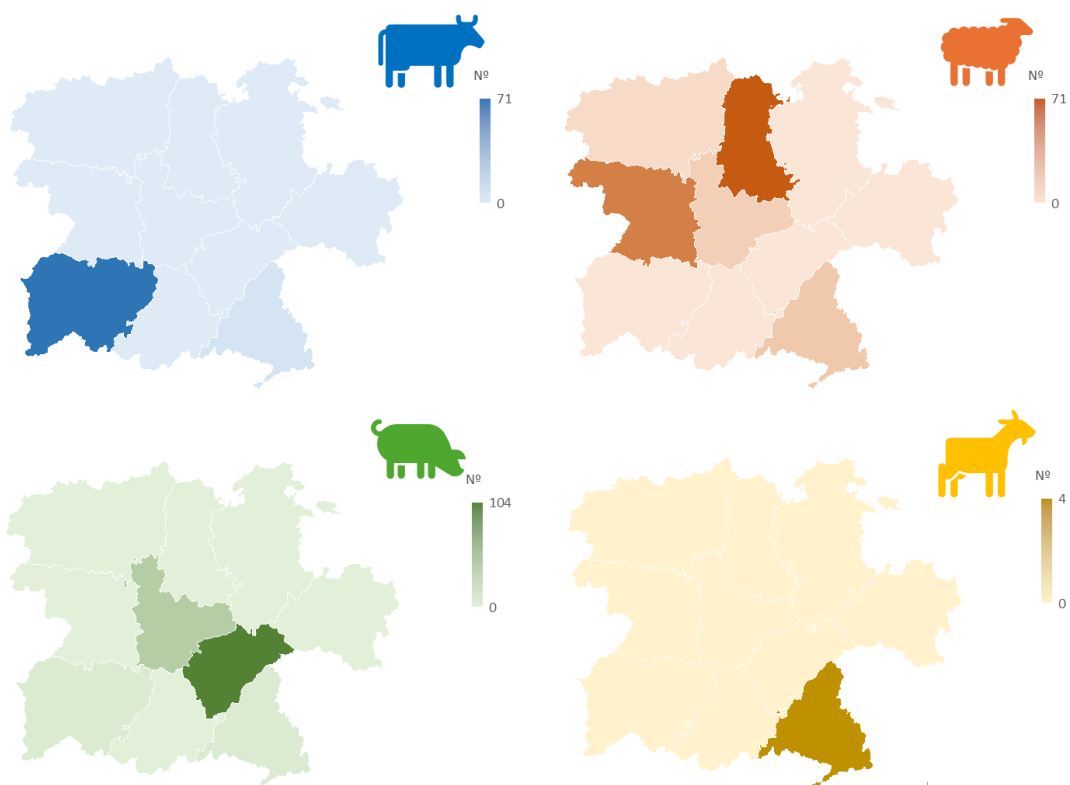


Figura 21. Distribución de muestras por provincia. Para los 4 subsectores productivos estudiados (Bovino, Ovino, Porcino y Caprino).

4.4.4. Resultados

4.4.4.1. Determinación de ASVs y análisis de la diversidad microbiana por especie

Se recolectaron un total de 380 muestras de hisopado rectal de animales que presentaban signos clínicos de diarrea, para el análisis de las muestras fueron agrupadas según rangos de edad concretamente: de 0 a 12 horas de vida (recién nacido), de 12 horas a 1 día (neonato temprano), de 1 a 2 días (neonato intermedio), de 2 días a 1 mes (neonato tardío), de 1 a 2 meses (lactante), de 2 a 5 meses (cría), de 5 meses a 1 año (cría tardía). Se extrajo el ADN contenido en las muestras, empleando el kit DNeasy Blood and Tissue (Qiagen). A partir de este se prepararon librerías para secuenciación del ARNr16S. 46 muestras fueron eliminadas del análisis ya que presentaron un número de lecturas inferior a 10.000 lecturas. En total tras el filtrado y procesamiento de las secuencias se obtuvieron 17.542.118 lecturas, 18.541 ASVs asociadas, aunque con una alta dominancia 56 ASVs ocupan el 50% del total.

Para asegurar que la cobertura de secuenciación era suficiente para cubrir la totalidad de la diversidad bacteriana en las muestras estudiadas se aplicaron curvas de rarefacción junto con el estimador Goods coverage (GOOD, 1953) a cada muestra y se realizó la media para cada especie animal estudiada. Como se presenta en la Figura 26 A, todas las muestras alcanzan la estabilización por debajo de las 10.000 lecturas establecidas como límite mínimo para el estudio. En el caso de la media por especie (Figura 26 B), de igual modo se alcanzó la estabilización en las 4 especies estudiadas. Acorde a estos resultados la cobertura de secuenciación se determinó como suficiente para cubrir la diversidad contenida en las muestras.

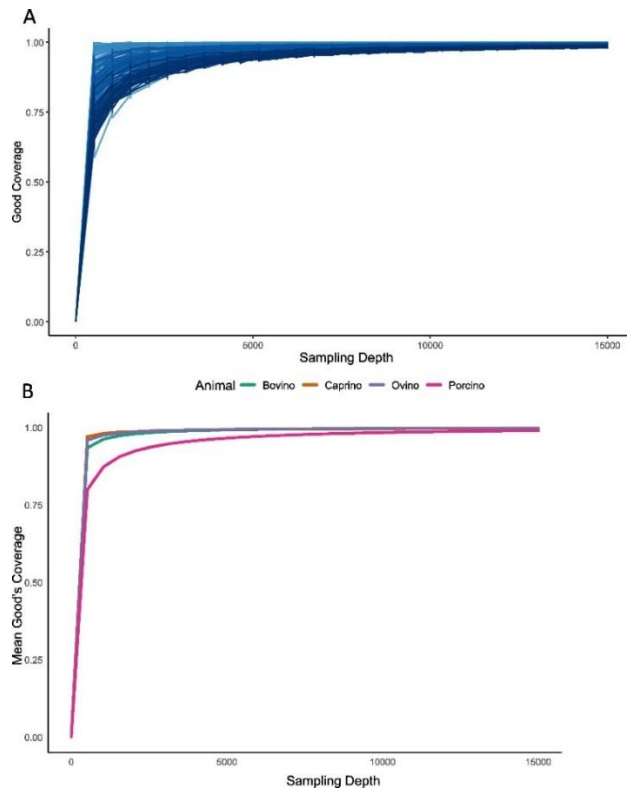


Figura 26. A) Curvas de rarefacción para cada muestra analizada, representadas en función del estimador Goods coverage. B) Curvas de rarefacción representando el valor promedio del estimador Goods coverage agrupado por especie animal.

A continuación, se realizó un análisis de coordenadas principales (PCoA), utilizando distintas métricas de disimilitud: Bray-Curtis, Jaccard, Unweighted UniFrac y Weighted UniFrac. Para facilitar la visualización de los grupos por especie, se incorporaron elipses de confianza del 95% alrededor de los centroides de cada cada grupo animal. El resultado del análisis se muestra en la Figura 27. Mostrando separación de los grupos para las métricas Bray-Curtis, Jaccard y Unweighted UniFrac, en especial entre porcino y el resto de hospedadores.

Para evaluar estadísticamente la influencia del hospedador en la composición microbiana fecal, también se realizó un análisis PERMANOVA (adonis2) utilizando las matrices de distancia calculados (Bray-Curtis, Jaccard,

Unweighted UniFrac y Weighted UniFrac). Este reveló diferencias estadísticamente significativas en la composición bacteriana por especies ($p < 0.001$) para las distintas métricas de disimilitud empleadas.

En conjunto, los análisis de diversidad beta mediante PCoA, complementados con las pruebas estadísticas de PERMANOVA, demostraron que el microbioma fecal difiere significativamente entre las especies animales estudiadas. Con una discrepancia mayor al emplear métricas sensibles a la presencia/ausencia de taxones (Jaccard y Unweighted UniFrac) y a las variaciones en abundancias relativas (Bray-Curtis), aunque menos clara en el caso de Weighted UniFrac, lo que sugiere una alta similitud filogenética entre los taxones dominantes. La contribución de la especie fue sustancial con valores de R^2 (0.18-0.27), a pesar de que en algunas representaciones no se observaron separaciones visualmente marcadas, los resultados estadísticos confirmaron diferencias consistentes (Anexo I, tabla 11).

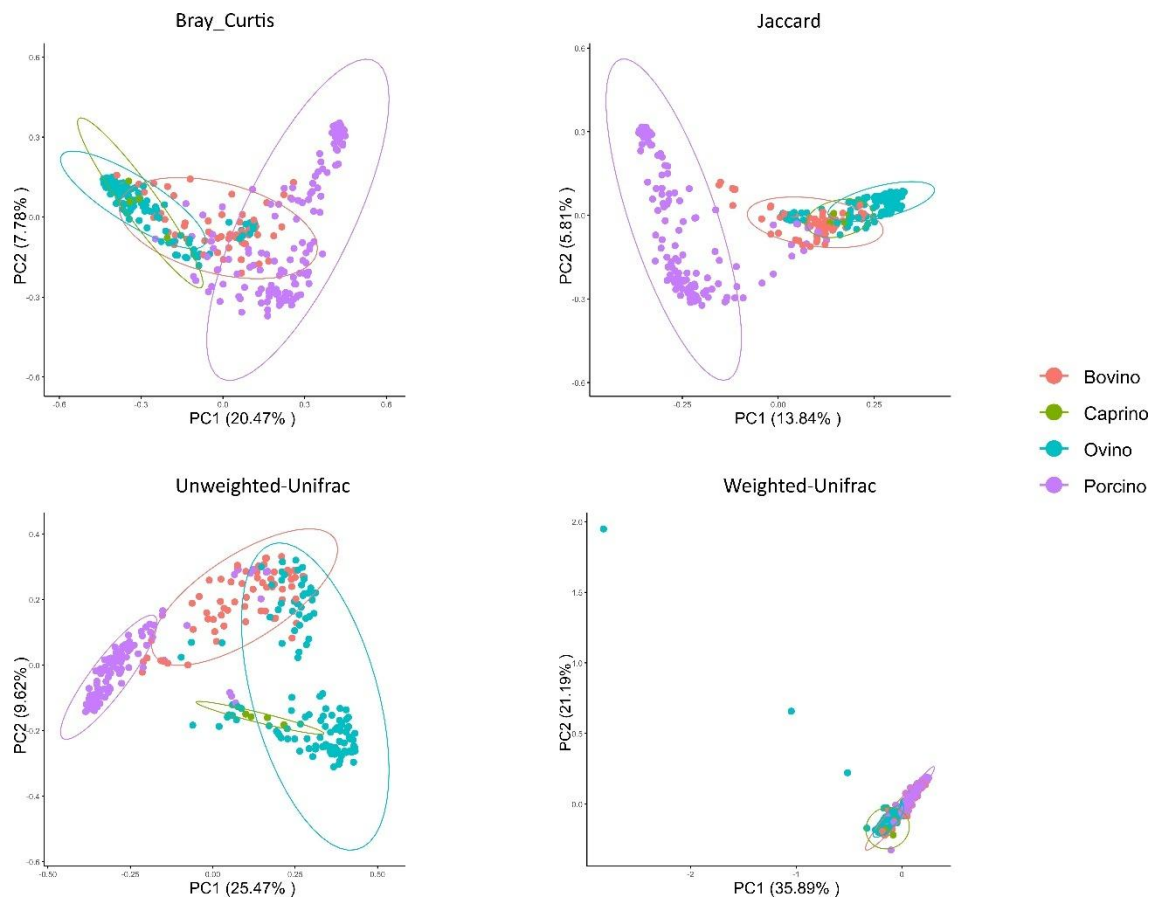


Figura 27. Análisis de componentes múltiples PcoA en función de la matriz de distancias según Bray_Curtis, Jaccard, Unweighted-Unifrac y Weighted-Unifrac. Para las 4 especies animales estudiadas bovino, caprino, ovino y porcino.

Tras determinar la existencia de una composición bacteriana diferencial entre los distintos hospedadores afectados por diarrea neonatal, se procedió a analizar cada uno de ellos de manera independiente, con la finalidad de caracterizar la composición bacteriana neonatal asociada a cada uno de ellos.

4.4.4.2. Estudio de la composición bacteriana en ovino

Las muestras procedentes de animales con diarreicos a estudiar se dividieron en grupos según rangos de edad. En el caso de cordero se estudiaron a través de hisopo rectal: 4 corderos recién nacidos [0h] antes de la aparición de

diarrea; 27 neonatos tempranos (0h-12h); 54 corderos con sintomatología diarreica, neonatos intermedios (12h-1d]; 6 corderos neonatos tardíos (1d-2d] y 8 corderos lactantes (2m-15d]. Pertenecientes a 5 regiones distintas (León, Valladolid, Palencia, Zamora y Madrid noroeste).

Tras el proceso de filtrado de las secuencias, se obtuvo un total de 5.490.796 lecturas. A partir de estos datos, se calculó la diversidad alfa para cada rango de edad utilizando los índices de diversidad Chao1, Shannon y Simpson (Figura 28). El rango de edad que presentó la mayor riqueza y diversidad correspondió a los neonatos recién nacidos [0 h]. Posteriormente, se observó un descenso en la diversidad y riqueza, reflejado principalmente en los índices de Chao1 y Shannon, en los neonatos tempranos (0–12 h), coincidiendo con la aparición de la diarrea en este grupo. Estos resultados reflejan que la comunidad bacteriana asociada a la diarrea presenta una riqueza de especies baja, evidenciada por los valores bajos del índice Chao1, y una diversidad general baja en términos de riqueza y equidad, reflejada en el índice Shannon.

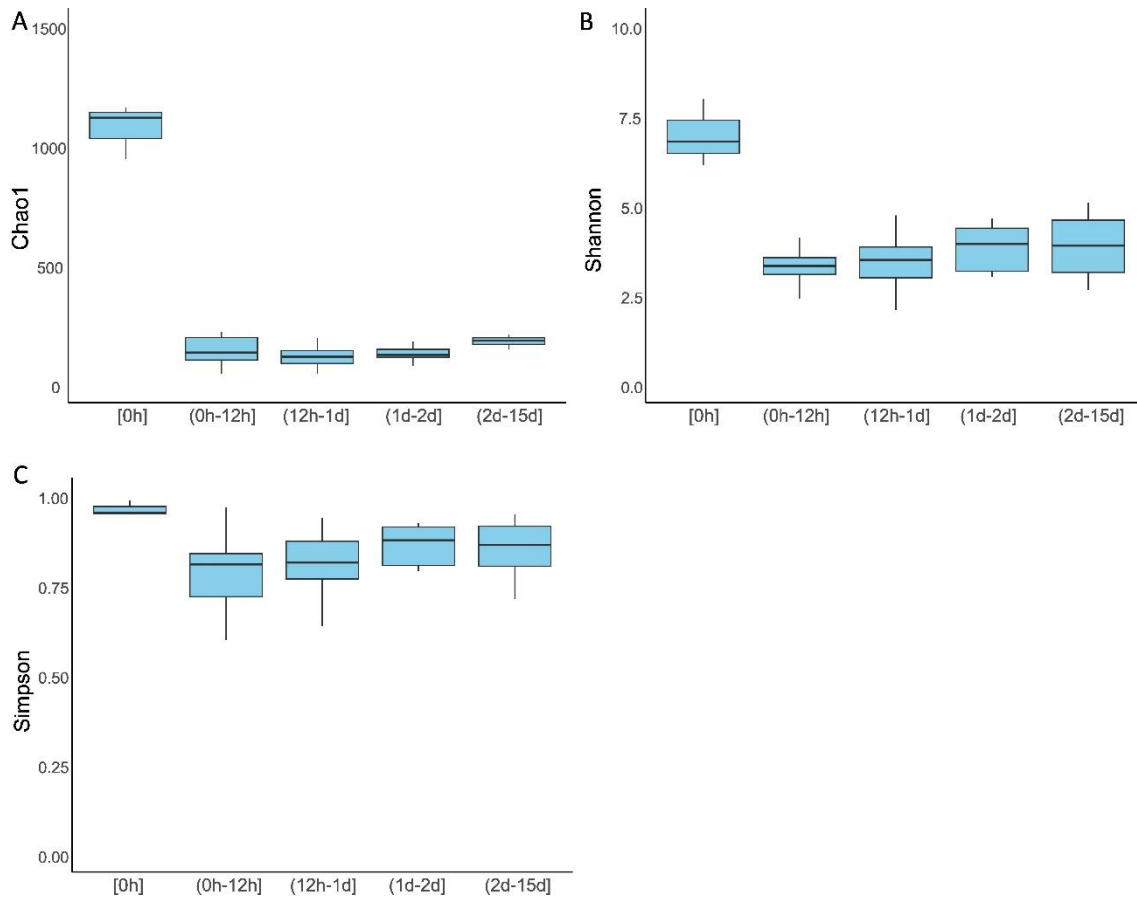


Figura 28. Boxplots de los valores de alfa diversidad según los rangos de edad evaluados en ovinos neonatos con diarrea. A) Índice Chao1. B) Índice Shannon. C) Índice Simpson.

A continuación, se realizó un análisis de coordenadas principales (PCoA) utilizando diferentes métricas de disimilitud: Bray-Curtis, Jaccard, Unweighted UniFrac y Weighted UniFrac. Para facilitar la visualización de los grupos según el rango de edad, se incorporaron elipses de confianza al 95 % alrededor de los centroides de cada grupo. Los resultados del análisis se presentan en la Figura 29. El análisis muestra únicamente con la métrica de Jaccard una cierta separación entre los grupos de edad, mientras que con las demás métricas empleadas (Bray-Curtis, Unweighted UniFrac y Weighted UniFrac) no se aprecia una diferenciación clara entre grupos. Estos resultados evidencian que las comunidades microbianas fecales en los neonatos diarreicos son, en términos generales, homogéneas entre los diferentes grupos de edad. No obstante, la

separación observada con Jaccard, al basarse únicamente en la presencia/ausencia de ASVs, sugiere que existen pequeñas diferencias composicionales entre los grupos, aunque estas no se reflejan a nivel de abundancias relativas ni de estructura filogenética general.

Para evaluar estadísticamente la influencia de la edad en la composición microbiana fecal diarreica, también se realizó un análisis Adonis (PERMANOVA) utilizando las matrices de distancia calculados (Bray-Curtis, Jaccard, Unweighted UniFrac y Weighted UniFrac). Este reveló diferencias estadísticamente significativas en la composición bacteriana por especies ($p < 0.001$) para las distintas métricas de disimilitud empleadas a excepción de Weighted UniFrac (Anexo I, tabla 12).

El análisis Adonis (PERMANOVA) realizado en ovinos diarreicos mostró que las composiciones de bacterianas para los diferentes rangos de edad explican el 16 % de la variación en la abundancias relativas (Bray-Curtis, $R^2 = 0.16$, $p = 0.001$), el 12 % de la variación basada únicamente en presencia/ausencia (Jaccard, $R^2 = 0.12$, $p = 0.001$), y el 13 % de la variación considerando presencia/ausencia junto a relaciones filogenéticas (Unweighted UniFrac, $R^2 = 0.13$, $p = 0.001$). Sin embargo, al aplicar Weighted UniFrac (que incorpora abundancia y filogenia), las diferencias entre grupos de edad no resultaron significativas ($R^2 = 0.12$, $p = 0.09$). Siendo consistentes con los resultados obtenidos en el análisis de coordenadas principales (PCoA), donde únicamente la métrica Jaccard mostró separación por grupos de edad. En conjunto estos resultados sugieren, que, aunque existen diferencias composicionales finas entre los rangos de edad, las comunidades bacterianas en ovinos diarreicos mantienen una estructura general y una distribución de abundancias relativamente homogéneas.

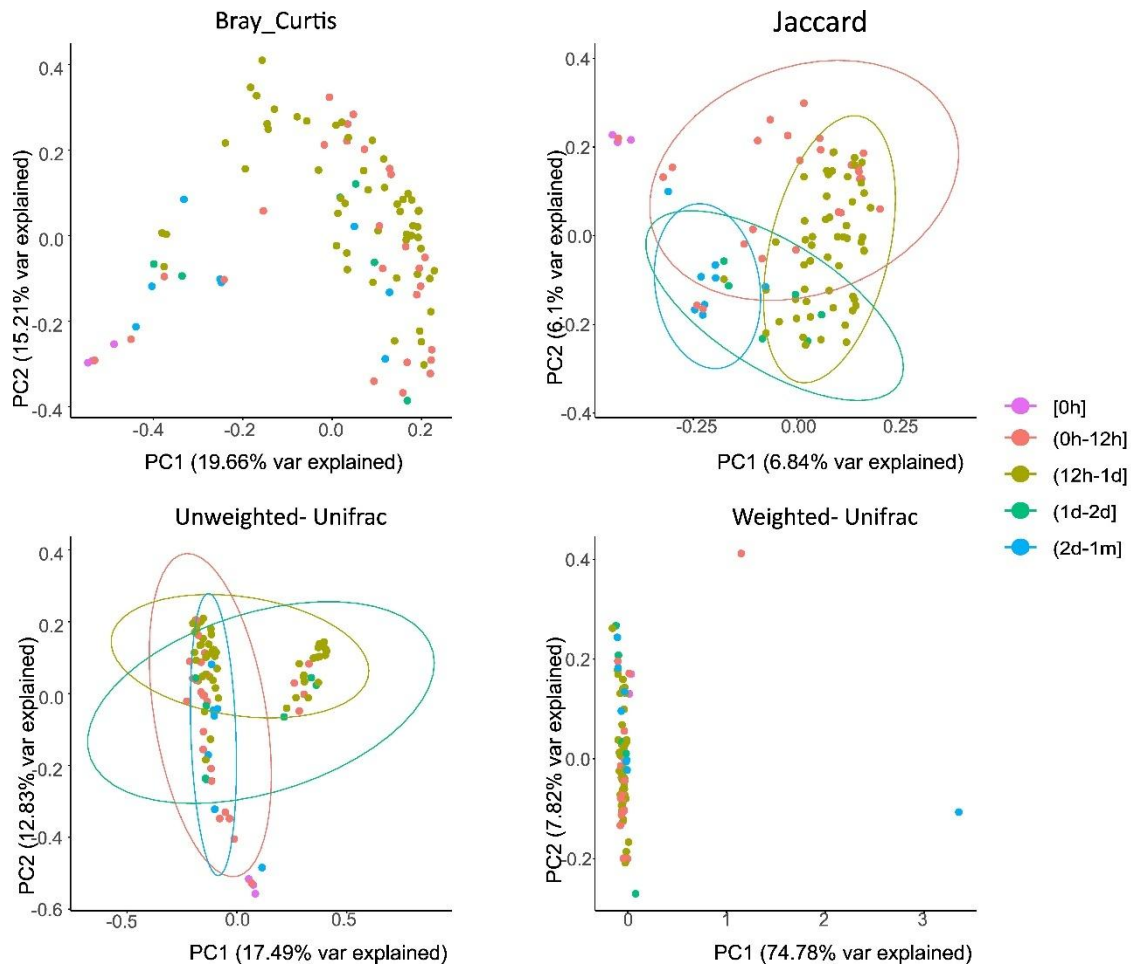


Figura 29. Análisis de componentes múltiples PcoA en función de la matriz de distancias según Bray_Curtis, Jaccard, Unweighted-Unifrac y Weighted-Unifrac. Para los rangos de edad estudiados en ovino diarreico.

Empleando la base de datos Silva (Quast et al., 2012), se clasificaron taxonómicamente las ASVs identificadas para ovino hasta el nivel de género, determinando los perfiles bacterianos en ovinos neonatales diarreicos según los rangos de edad establecidos (Anexo I, tabla 13). A pesar de la homogeneidad general observada en las muestras según los análisis de diversidad alfa y beta, se normalizaron los datos para cada granja estudiada, obteniendo los perfiles medios de los géneros bacterianos más abundantes por rango de edad, con el objetivo de reducir la variabilidad entre explotaciones y ofrecer una visión representativa de los perfiles microbianos de ovinos diarreicos en la región.

Como se muestra en la Figura 30, los grupos bacterianos más abundantes en los distintos rangos de edad fueron: en neonatos tempranos (0–12 h], *Escherichia-Shigella* (44,43 %), *Clostridium_sensu_stricto_1* (19,85 %) y *Streptococcus* (7,83 %); en neonatos intermedios (12 h–1d], *Escherichia-Shigella* (39,74 %), *Clostridium_sensu_stricto_1* (28,11 %) y *Streptococcus* (6,60 %); en neonatos tardíos (1–2 días), *Escherichia-Shigella* (38 %), *Clostridium_sensu_stricto_1* (12,18 %) y *Lactobacillus* (10,90 %); y en lactantes (2–15 días], *Escherichia-Shigella* (25,10 %), *Lactococcus* (12,54 %) y *Bacteroides* (11,79 %).

A nivel general, los géneros predominantes en las comunidades microbianas de ovinos neonatales diarreicos fueron *Escherichia-Shigella*, *Clostridium_sensu_stricto_1*, *Streptococcus*, *Lactobacillus* y *Bacteroides*. Se observó una tendencia hacia una mayor abundancia de *Escherichia-Shigella*, *Clostridium_sensu_stricto_1* y *Streptococcus* en las fases más tempranas, y un aumento relativo de *Bacteroides* y *Lactobacillus* en fases más avanzadas (Anexo II, Figura 5)

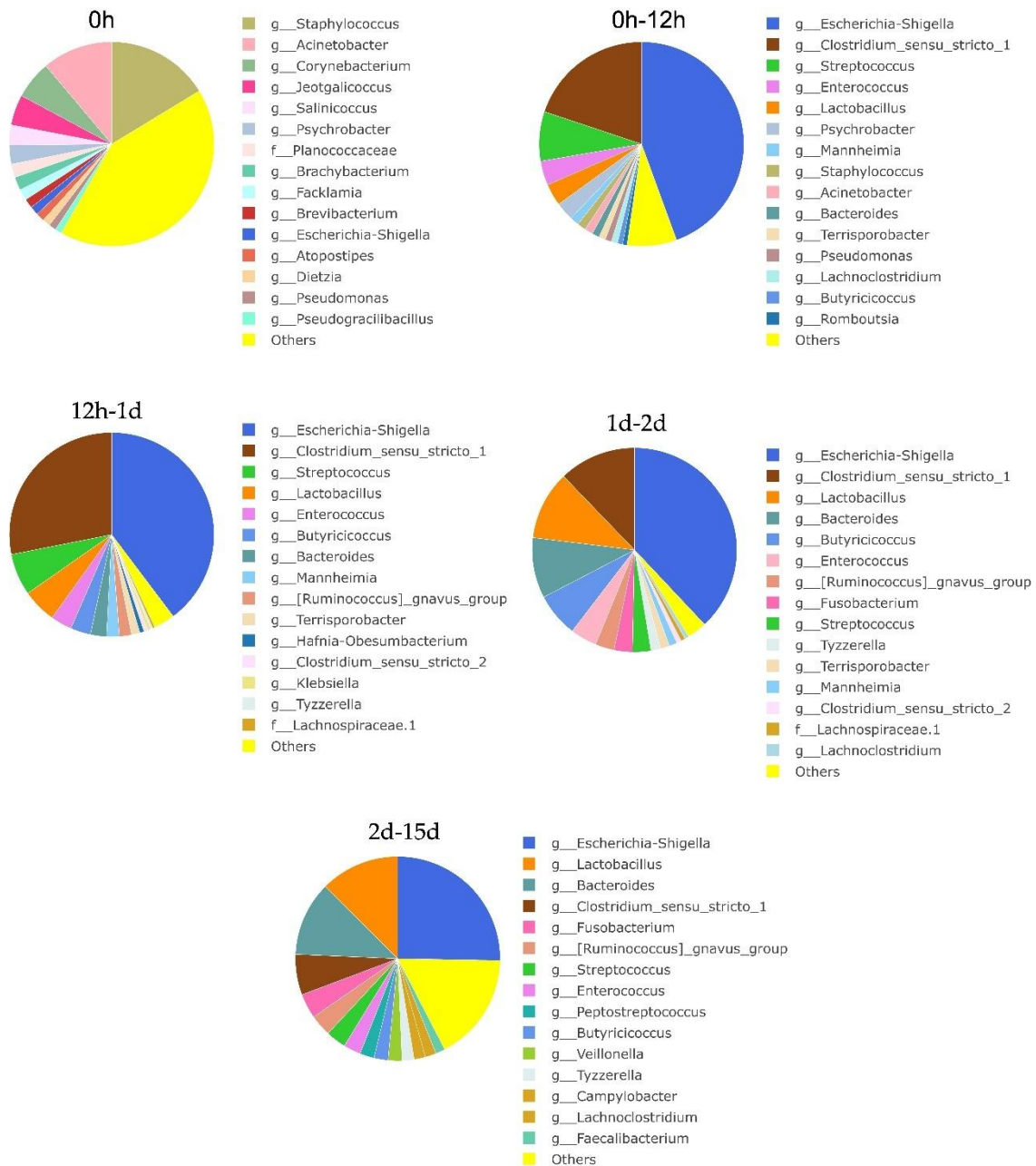


Figura 30. Perfiles bacterianos para abundancia relativa media en distintos rangos de edad, en ovino diarreico neonato.

4.4.4.3. Estudio de la composición bacteriana en bovino

En el caso de bovino se estudiaron a través de hisopo rectal: 11 terneros entre las 0 horas a 12 horas de vida [0h-12h], 3 entre las 12 horas y un día (12h-

1d], 12 entre los 2 días y los 15 días (2d-15d], 18 entre los 15 días y 1 mes de vida (15d-1m] y 12 terneros entre 1 mes y 2 meses de vida (1m-2m).

Tras el proceso de filtrado de las secuencias, se obtuvieron un total de 2.612.910 lecturas, que permitieron identificar 3.466 ASVs. Sin embargo, se observó una fuerte dominancia en la comunidad, ya que los 20 ASVs más abundantes concentraron el 50 % del total de las lecturas.

A partir de estos datos, se calculó la diversidad alfa para cada rango de edad utilizando los índices Chao1, Shannon y Simpson. Como se presenta en la Figura 31, los resultados mostraron que no existen grandes diferencias en los valores de diversidad entre los distintos rangos de edad, indicando una homogeneidad general en la estructura de las comunidades.

En conjunto, los valores de diversidad obtenidos para todos los rangos de edad fueron bajos. Esto se reflejó en los bajos valores del índice Chao1, especialmente si se considera el alto número total de ASVs identificados, lo que sugiere una riqueza efectiva limitada. De manera similar, el índice Shannon presentó valores moderados, evidenciando una diversidad general baja en términos tanto de riqueza como de equidad. Por su parte, el índice Simpson arrojó valores cercanos a uno, lo que se atribuye a su sensibilidad frente al alto número de ASVs de baja abundancia presentes en la comunidad, los cuales elevan el valor del índice de forma artificial.

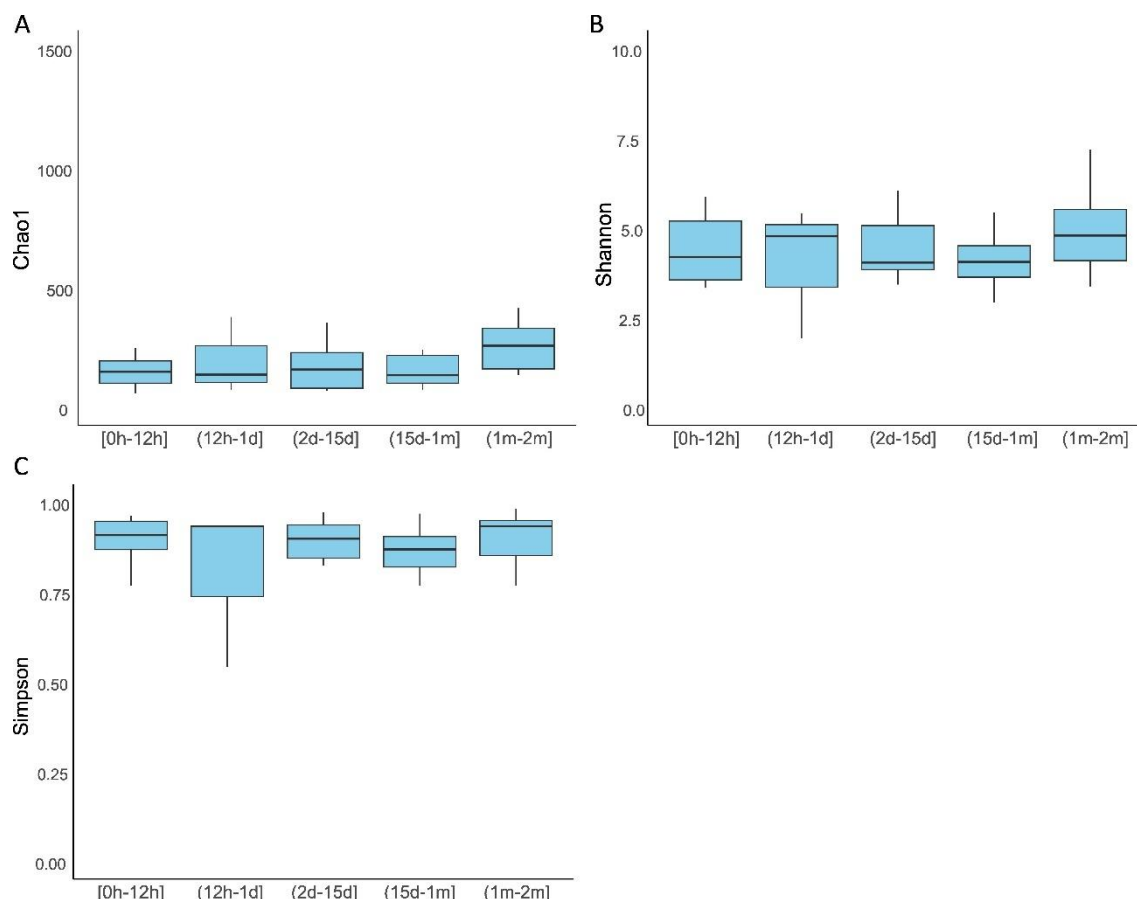


Figura 31. Boxplots de los valores de alfa diversidad según los rangos de edad evaluados en bovinos neonatos con diarrea. A) Índice Chao1. B) Índice Shannon. C) Índice Simpson.

Posteriormente, se realizó un análisis de coordenadas principales (PCoA), utilizando diferentes métricas de disimilitud: Bray-Curtis, Jaccard, Unweighted UniFrac y Weighted UniFrac. El análisis no evidencia un patrón claro de agrupamiento según los rangos de edad. Esto sugiere que no existen comunidades bacterianas claramente diferenciadas entre los distintos grupos de edad (Figura 32).

Para evaluar si la edad influencia la composición microbiana de bovino diarreico de forma estadística, se realizó un análisis Adonis (PERMANOVA) utilizando las matrices de disimilitud calculadas (Bray-Curtis, Jaccard, Weighted UniFrac, Unweighted UniFrac), los resultados se presentan en el Anexo I, tabla 12. Estos revelaron diferencias estadísticamente significativas en la estructura de

las comunidades bacterianas entre los grupos analizados, con valores de R^2 entre 0,092 (Bray-Curtis) y 0,13 (Unweighted UniFrac), y p-valores que alcanzaron significancia en todas las métricas empleadas. Sin embargo, el tamaño del efecto fue modesto, indicando que las variables analizadas explican únicamente entre el 9 % y el 13 % de la variación total, no formando grupos claramente diferenciados en función de la edad.

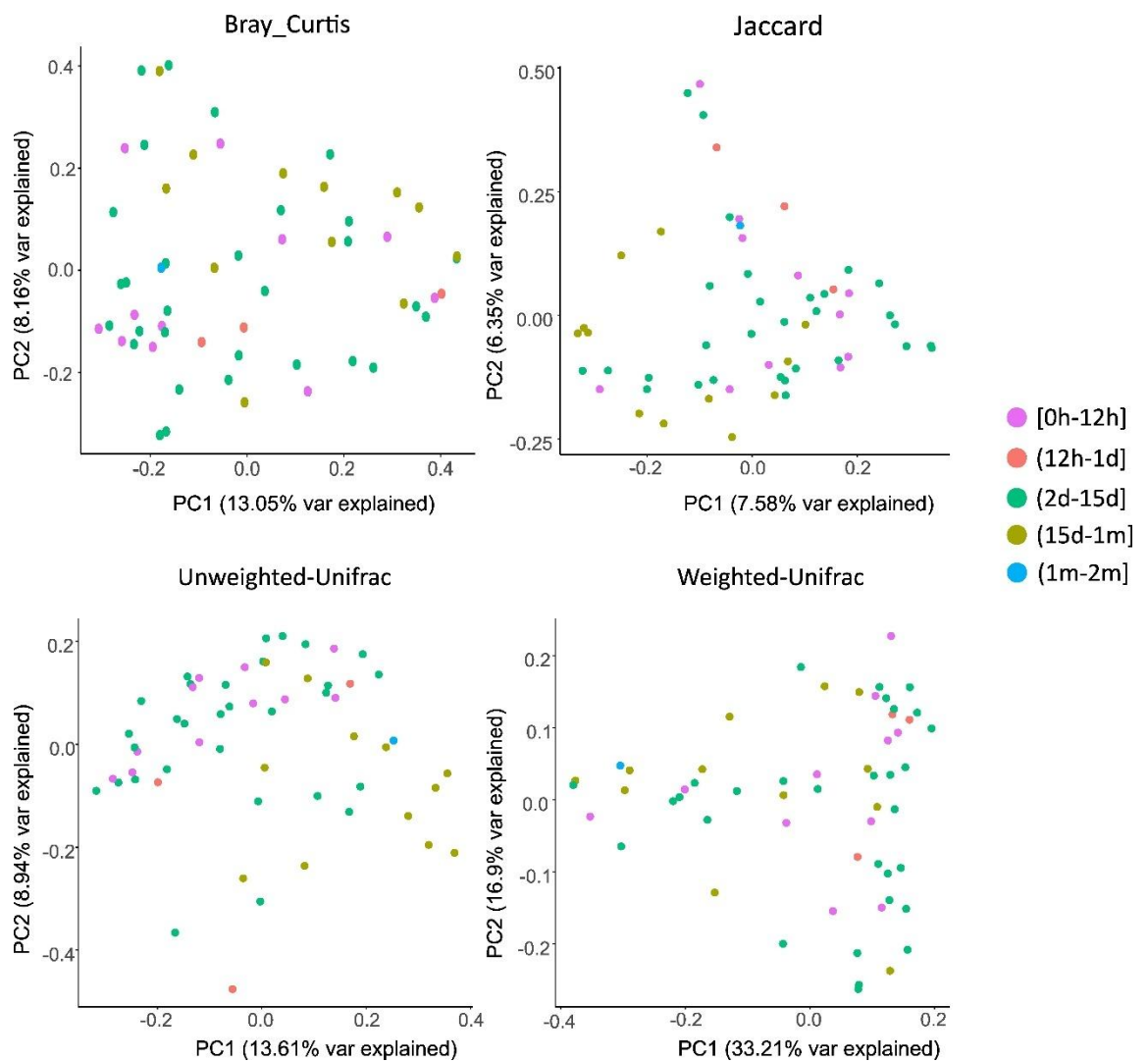


Figura 32. Análisis de componentes múltiples PcoA en función de la matriz de distancias según Bray_Curtis, Jaccard, Unweighted-Unifrac y Weighted-Unifrac. Para los rangos de edad estudiados en bovino diarreico.

Posteriormente, se clasificaron taxonómicamente los ASVs identificados en bovino empleando la base de datos Silva (Quast et al., 2012). Permitiendo determinar los perfiles bacterianos hasta nivel de género para cada uno de los rangos de edad estudiados (Anexo I, tabla 14). Los datos se normalizaron para cada granja estudiada, dando como resultado los perfiles medios de los géneros bacterianos más abundantes por rango de edad. Para dar una visión global a los grupos bacterianos más abundantes en la región.

Como se presenta en la Figura 33, los grupos más abundantes a lo largo de los distintos rangos de edad fueron: en ternero [0h-12h], *Escherichia-Shigella* (13,12%), *Lactobacillus* (12,78%) y *Pseudomonas* (8,35%); en ternero de (12h-1d], *Escherichia-Shigella* (29,43%), *Lactobacillus* (9,30) y *Clostridium_sensu_stricto_1* (6,65%); en ternero de (2d-15d], *Escherichia-Shigella* (19,56%), *Lactobacillus* (12,78%) y *Bacteroides* (10,02%); en ternero de (15d-1m], *Lactobacillus* (16,60%), *Escherichia-Shigella* (10,95%) y *Enterococcus* (9,88%); en ternero de (1m-2m], *Escherichia-Shigella* (22,43%), *Lactobacillus* (10,47%) y *Bacteroides* (8,48%).

Los grupos más abundantes a nivel general fueron *Escherichia-Shigella*, *Lactobacillus*, *Pseudomonas*, *Clostridium_sensu_stricto_1*, *Bacteroides* y *Enterococcus*. Determinando una cierta homogeneidad entre los distintos rangos de edad, aunque con cambios en algunos grupos como el taxon *Clostridium_sensu_stricto_1* siendo más abundante entre las 12 horas y los 15 días de vida, o el taxón *Enterococcus* predominando entre las 12 horas y el mes de vida. Estos resultados señalan que, a pesar de ciertas variaciones en las proporciones relativas de los géneros dominantes, la composición general de las comunidades microbianas se mantiene relativamente homogénea entre los rangos de edad evaluados bajo la condición diarreica (Anexo II, Figura 6).

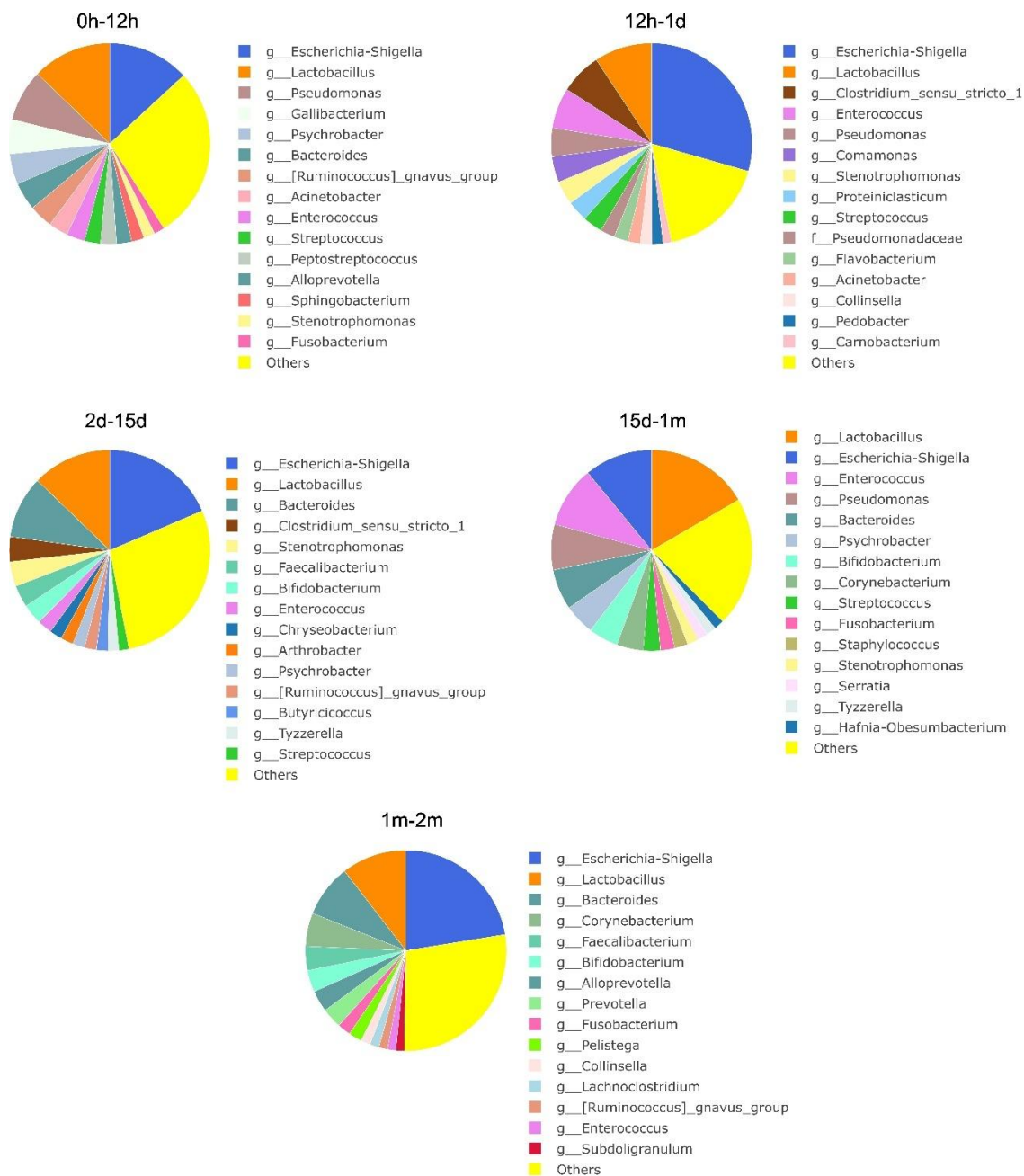


Figura 33. Perfiles bacterianos para abundancia relativa media en distintos rangos de edad, en bovino diarreico neonato.

4.4.4.4. Estudio de la composición bacteriana en porcino

A partir de las muestras tomadas de porcino diarreico neonato, se estudiaron en total: 1 lechón de 0 horas a 12 horas de vida [0h-12h]; 8 lechones de 12 horas a 1 día (12h-1d); 7 entre 1 día y 2 días (1d-2d); 4 entre 2 días y 15 días

(2d-15d]; 78 de 15 días a 1 mes (15d-1m]; 40 desde 1 mes a 2 meses (1m-2m]; finalmente 2 lechones de 2 meses a 5 meses (2m-5m].

Tras el filtrado de las secuencias, en total se obtuvieron 6.842.577 de lecturas, permitiendo identificar 8.709 ASVs asociados. Aunque con una dominancia de unos sobre otros, ocupando 88 ASVs el 50% de las lecturas totales.

A partir de las ASVs identificadas, se calculó la diversidad alfa para cada rango de edad estudiado, para ello se utilizaron los índices de Chao1, Shannon y Simpson. La Figura 34, muestra los resultados para los distintos rangos de edad estudiados, mostrando diferencias entre ellos.

En conjunto, la diversidad y riqueza se reduce de forma acusada en los lechones diarreicos de entre 1 día y 2 días respecto al tiempo inmediatamente anterior, aunque con una tendencia es creciente a partir de este punto. A pesar de ello teniendo en cuenta que fueron identificados 8.709 ASVs, la riqueza determinada por el índice de Chao es en general moderadamente baja para todos los rangos de edad estudiados. El índice Shannon muestra unos valores moderados, evidenciando dominancia de unos grupos, pero no tan acusada como en los otros hospedadores estudiados (ovino y bovino). El índice de Simpson arroja valores cercanos a uno, probablemente debido a la alta sensibilidad que tiene frente al alto número de ASVs con baja abundancia presentes en la comunidad, los cuales elevan su valor.

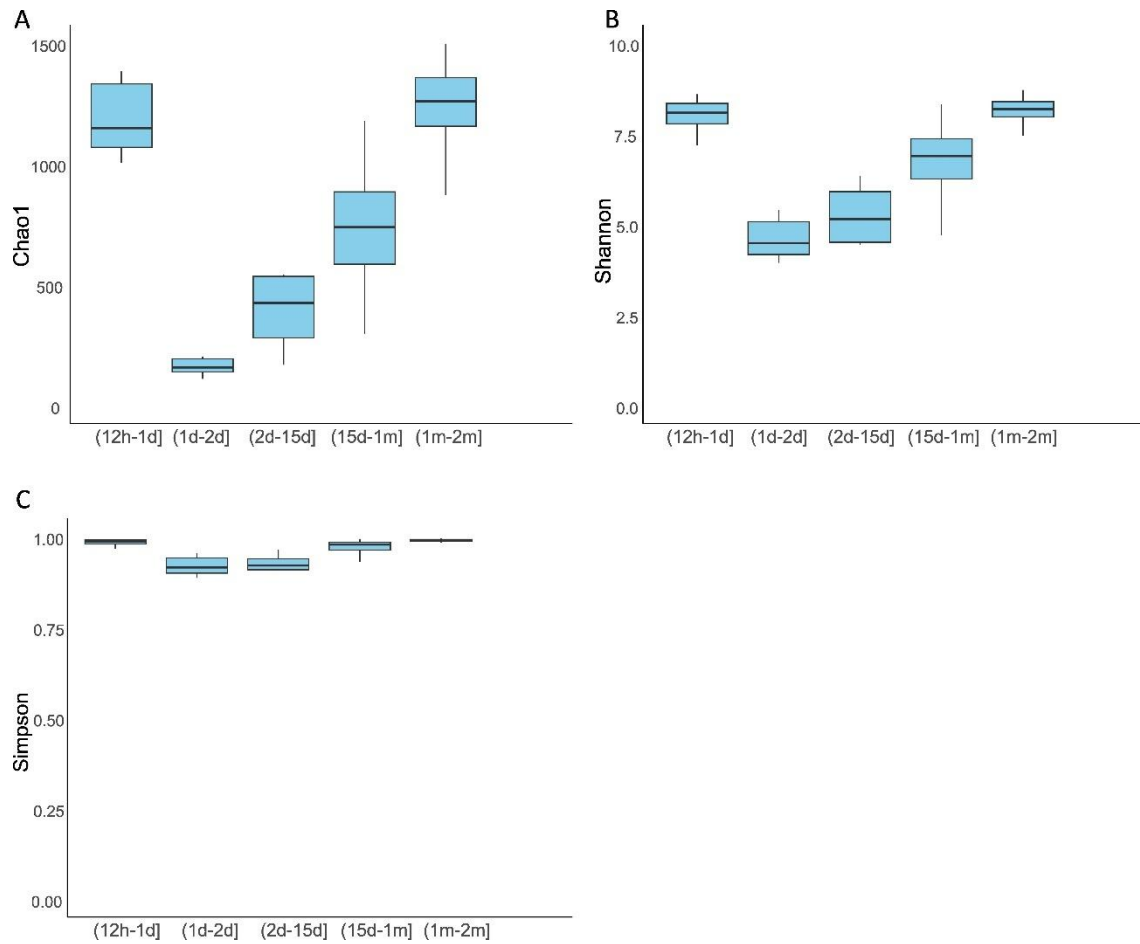


Figura 34. Boxplots de los valores de alfa diversidad según los rangos de edad evaluados en porcino neonato con diarrea. A) Índice Chao1. B) Índice Shannon. C) Índice Simpson.

A continuación, se representó un análisis de coordenadas principales (PCoA) utilizando distintas métricas de disimilitud: Bray-Curtis, Jaccard, Unweighted UniFrac y Weighted UniFrac. Para facilitar la visualización de los grupos por rangos de edad, se añadieron elipses de confianza al 95% alrededor de los centroides de los grupos (Figura 35). El análisis mostró una separación clara entre los grupos para cada una de las métricas estudiadas. Estos resultados evidencian que las comunidades bacterianas rectales en porcinos diarreicos son variables según la edad, mostrando diferencias tanto en la composición general (reflejada por la métrica de Jaccard), como en la abundancia relativa (destacada

por las distancias Bray-Curtis) y en la estructura filogenética (capturada por las métricas UniFrac).

Para evaluar estadísticamente, la diferencias en las comunidades bacterianas de porcino diarreico en diferentes edades, se acompañó el resultado del PcoA con un análisis Adonis (PERMANOVA), utilizando las matrices de distancias calculadas (Bray-Curtis, Jaccard, Unweighted UniFrac, Weighted UniFrac). El resultado señaló diferencias estadísticamente significativas en la composición bacteriana de porcino diarreico entre los diferentes grupos de edad (AnexoI, Tabla 12).

Los resultados del análisis Adonis (PERMANOVA) revelaron diferencias estadísticamente significativas en la estructura de las comunidades bacterianas entre los grupos analizados, con valores de R^2 de 0,27 para Bray-Curtis, 0,23 para Jaccard, 0,32 para Unweighted UniFrac y 0,41 para Weighted UniFrac. Estas divergencias entre las comunidades bacterianas de animales diarreicos están fuertemente influenciadas por la edad, llegando a explicar hasta el 41% de la variación observada cuando se consideran conjuntamente la filogenia y las abundancias relativas (como refleja la métrica Weighted UniFrac).

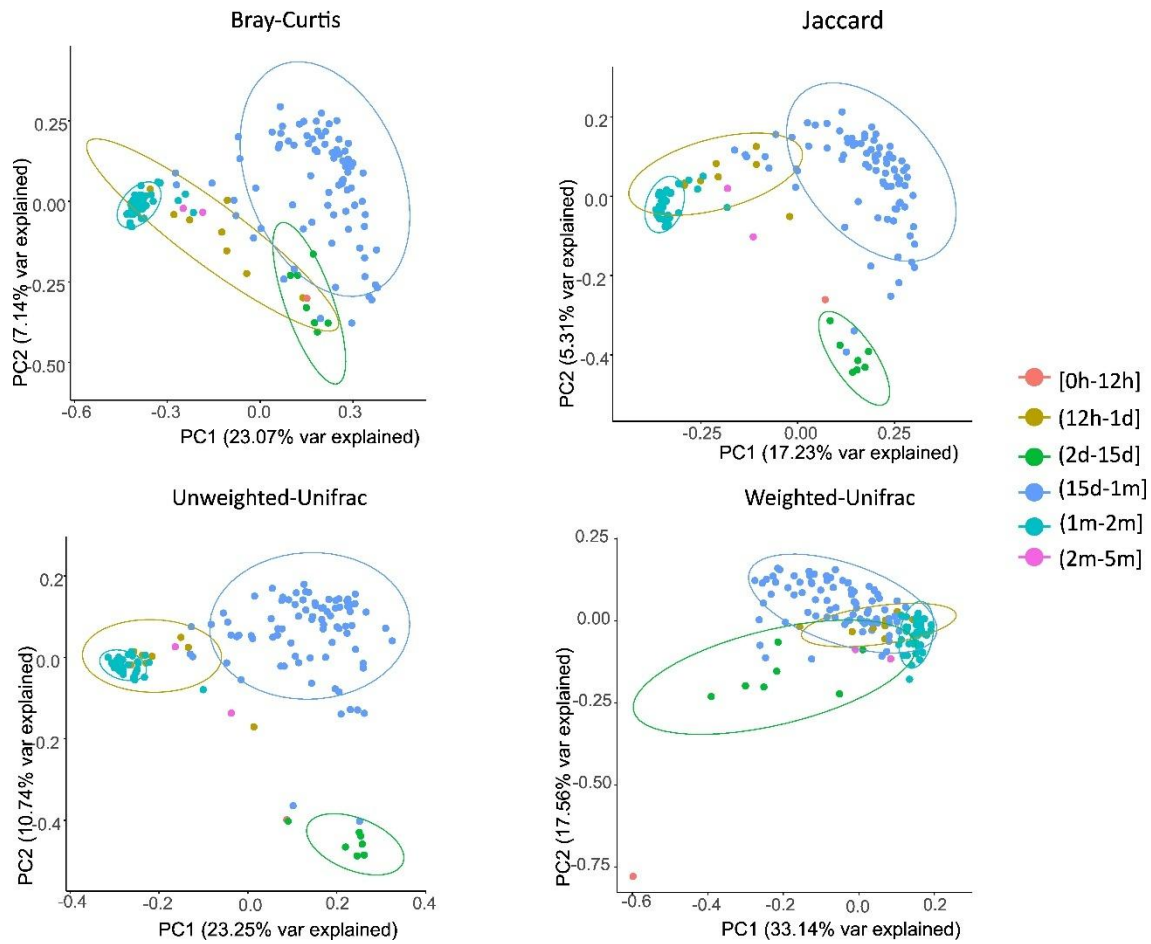


Figura 35. Análisis de componentes múltiples PcoA en función de la matriz de distancias según Bray_Curtis, Jaccard, Unweighted-Unifrac y Weighted-Unifrac. Para los rangos de edad estudiados en porcino diarreico.

Posteriormente, se clasificaron taxonómicamente las ASVs identificadas en porcino diarreico mediante la base de datos para ARNr 16S Silva (Quast et al., 2012). Lo que permitió determinar los taxones más abundantes hasta nivel de género para cada uno de los rangos de edad estudiados (Anexo I, tabla 15). Los datos se normalizaron por explotación estudiada, dando como resultados los perfiles bacterianos hasta nivel de género más abundantes en porcino diarreico para cada rango de edad.

Como se representa en la Figura 36, los grupos más abundantes en los distintos rangos de edad fueron: en porcino diarreico de [0h-12h], *Lactobacillus*

(46,53%), *Escherichia-Shigella* (21,59%), *Prevotella* (4,31%); en porcino de (12h-1d], *Escherichia-Shigella* (9,64%), *Prevotella* (8,44%) y *Alloprevotella* (5,90%); en porcino de (1d-2d], *Lactobacillus* (24,31%), *Escherichia-Shigella* (13,60%) y *Fusobacterium* (10,19%); en porcino de (2d-15d], *Lactobacillus* (19,09%), *Fusobacterium* (11,67%) y *Bacteroides* (7,83%); en porcino de (15d-1m], *Bacteroides* (11,75%), *Escherichia-Shigella* (7,60%) y *Prevotella* (4,79%); en porcino de (1m-2m], *Prevotella* (18,10%), *Lactobacillus* (5,91%) y *Clostridium_sensu_stricto_1* (4,67%); en porcino de (2m-5m], *Lactobacillus* (16,41%), *Prevotella* (12,73%) y *Megamonas* (11,52%).

En porcino, los perfiles microbianos muestran diferencias marcadas entre los distintos rangos de edad estudiados, indicando que cada rango de edad presenta un perfil bacteriano característico y distintivo. A diferencia de lo observado en otros hospedadores, estas diferencias no siguen una tendencia clara o progresiva a lo largo de las edades, sino que reflejan una alta variabilidad entre los grupos analizados (Anexo II, Figura 7)

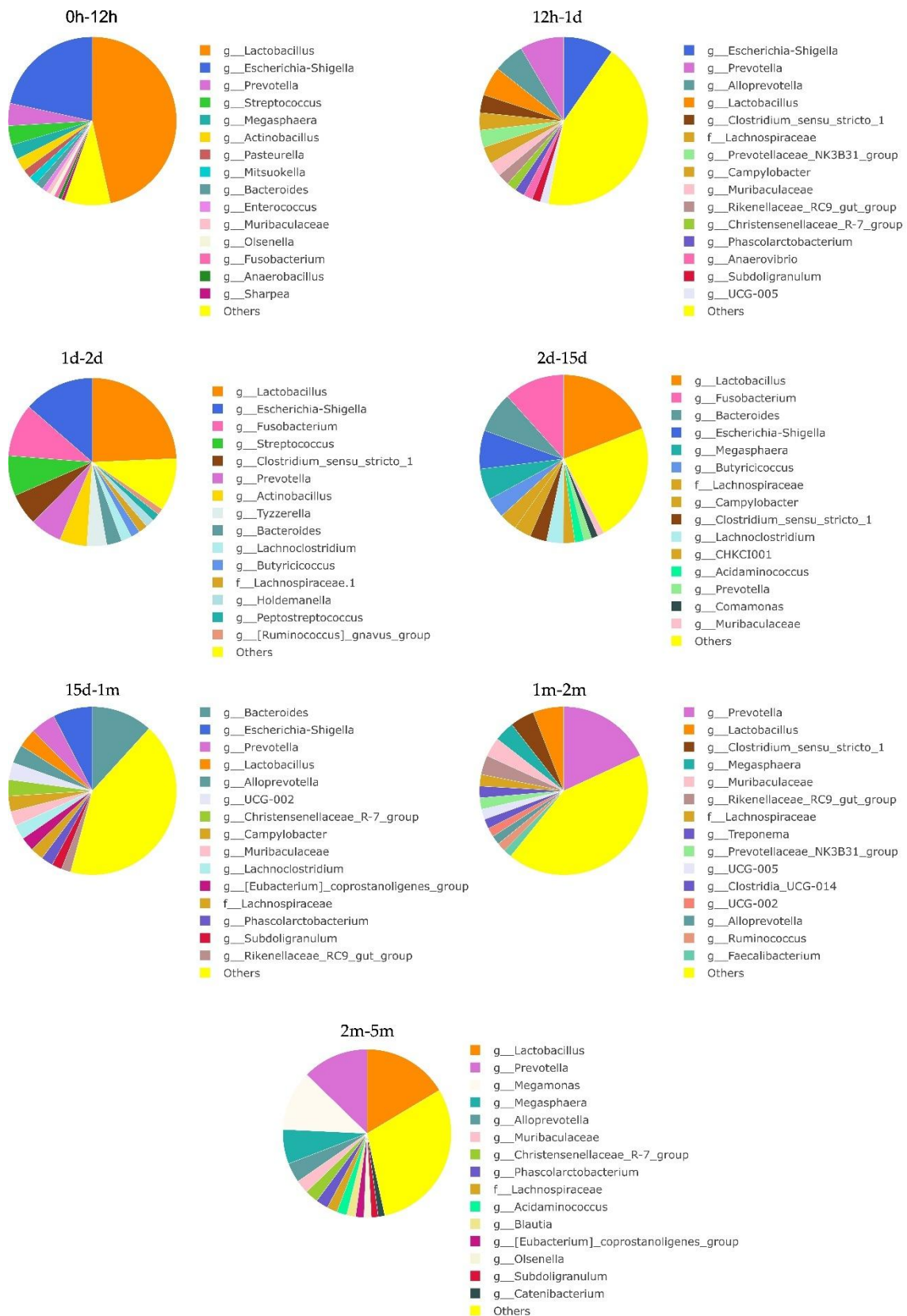


Figura 36. Perfiles bacterianos para abundancia relativa media en distintos rangos de edad, en porcino diarreico neonato.

4.4.4.5. Estudio de la composición bacteriana en caprino

En el caso de caprino se estudiaron únicamente 4 carneros con síntomas de diarrea: de 3 a 7 días de edad por lo que se incluyeron dentro del rango de edad (2d-15d].

Tras el proceso de filtrado de secuencias, se obtuvieron un total de 324.423 lecturas totales, a partir de las que se identificaron 545 ASVs. Aunque presentaban una fuerte dominancia, únicamente 19 ASVs ocupaban el 90% de las lecturas totales.

A partir de los datos obtenidos, se calcularon los índices de diversidad alfa para los distintos rangos de edad estudiados, utilizando los índices de Chao1, Shannon y Simpson. Como se presenta en la Figura 37, los valores obtenidos para el índice Chao1 fueron bajos en relación con el número total de ASVs identificados, lo que refleja una riqueza reducida. De manera similar, el índice de Shannon mostró valores moderadamente bajos. Por su parte, el índice de Simpson presentó valores cercanos a 0,75, considerados moderadamente altos; sin embargo, al igual que en los otros hospedadores analizados, este resultado se relaciona con la presencia de un elevado número de ASVs de baja abundancia, dado que este índice es particularmente sensible a estas y no reflejando necesariamente la diversidad general.

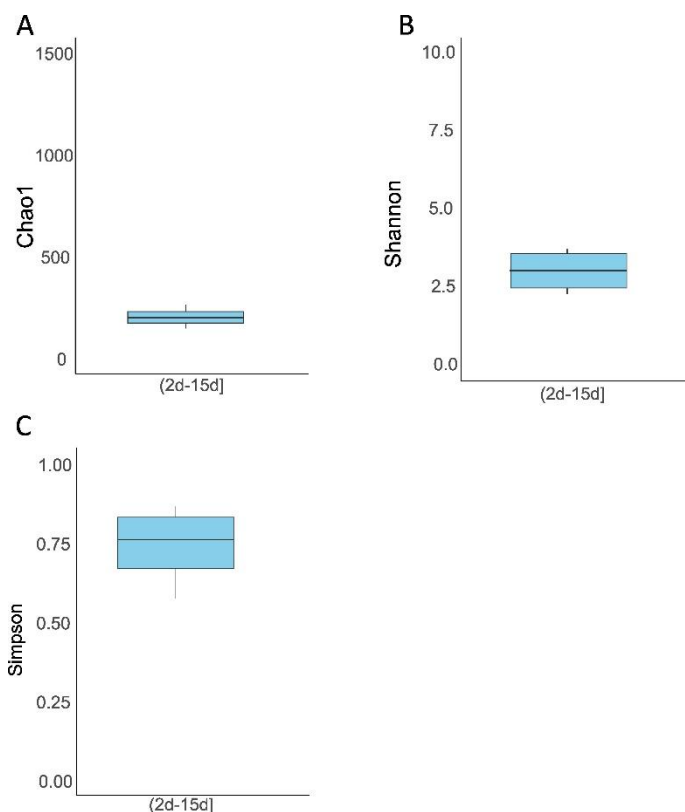


Figura 37. Boxplots de los valores de alfa diversidad evaluados en caprino neonato con diarrea. A) Índice Chao1. B) Índice Shannon. C) Índice Simpson.

A continuación, se clasificaron taxonómicamente los ASVs identificados en caprino, usando como referencia la base de datos Silva (Quast et al., 2012). Esto permitió determinar los perfiles bacterianos hasta nivel de género para los cuatro cabritos estudiados (Anexo I, tabla 15).

Como se representa en la Figura 38, los taxones más abundantes de acuerdo con las abundancias relativas medias para los cuatro cabritos estudiados fueron: *Escherichia-Shigella* ocupando el 50,98% de la abundancia relativa total, *Bacteroides* ocupando un 15,05%, *Lactobacillus* ocupando un 12,33% y *Clostridium_sensu_stricto_1* ocupando un 10,86% de la composición bacteriana total. Estos cuatro taxones ocuparon cerca del 90% de la composición bacteriana total, mostrando una fuerte dominancia sobre el resto de taxones identificados (Anexo I, tabla 16).

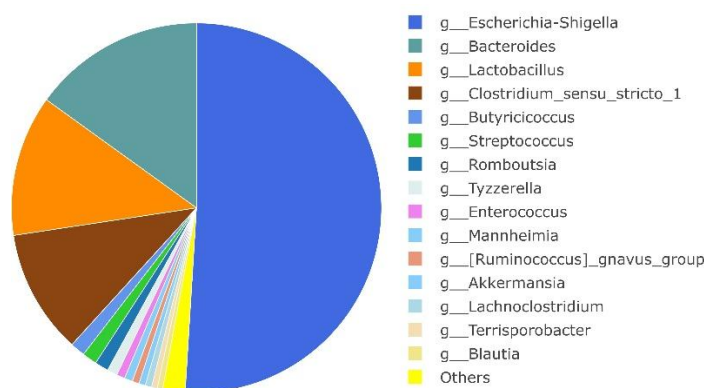


Figura 38. Perfil bacteriano para abundancia relativa media en caprino neonato diarreico.

4.4.5. Discusión

El análisis de las comunidades bacterianas en los cuatro hospedadores estudiados (ovino, porcino, bovino y caprino) reveló una clara separación en las métricas de beta diversidad (Bray-Curtis, Jaccard y Unweighted UniFrac), lo que respalda la existencia de comunidades microbianas diferenciadas entre los distintos hospedadores. Este hallazgo sugiere que los perfiles de composición bacteriana bajo condiciones de diarrea neonatal son específicos de cada especie hospedadora. Es importante destacar que la separación fue particularmente marcada entre el grupo de los rumiantes (ovino, bovino y caprino) y el porcino. Esta diferenciación en la composición bacteriana ha sido ampliamente documentada en la literatura y se atribuye a divergencias anatómicas, fisiológicas y ambientales entre los hospedadores (Chen et al., 2017; J. Guo et al., 2020). En particular, las diferencias se acentúan entre el porcino, un animal monogástrico con un sistema digestivo más simple y una maduración bacteriana a su vez más rápida, y los rumiantes, cuyo aparato digestivo es más complejo y alberga bacterias especializadas en la fermentación de polisacáridos vegetales (J. Guo et al., 2020; Jami et al., 2013).

La comunidad bacteriana de ovino diarreico en este estudio, ha mostrado para los rangos de edad estudiados una riqueza en cuanto a número de especies y diversidad general baja, reflejada en los valores de los índices de Chao1 y Shannon moderadamente bajos. Estos hallazgos coinciden con los resultados reportados por (Zhong et al., 2022) en corderos de la raza Hu en China, donde los autores observaron unos índices de Chao1 y Shannon significativamente reducidos, indicando una baja complejidad y equidad en la composición bacteriana intestinal en corderos diarreicos. Cabe señalar una alta diversidad en los tres índices para corderos recién nacidos antes del desarrollo de los síntomas [0h], este hecho ha sido descrito por otros autores como Song et al. (2017), que señalan altos índices de diversidad en Chao y Shannon antes del primer encalostrado en terneros, en colon, ciego y recto.

El análisis Adonis (PERMANOVA) reveló diferencias composicionales estadísticamente significativas entre los distintos grupos de edad, reflejando perfiles microbianos diferenciados a lo largo del desarrollo. Este patrón también se evidenció en el análisis de las abundancias relativas, donde los perfiles diarreicos en corderos neonatos mostraron como taxones dominantes a *Escherichia-Shigella*, *Streptococcus* y *Clostridium_sensu_stricto_1*. La colonización temprana por *Escherichia-Shigella* y *Streptococcus* ha sido previamente reportada durante las primeras 12 horas de vida, siendo identificados como patógenos oportunistas en yeyuno (Zhu et al., 2021). Por su parte, las altas abundancias de *Clostridium_sensu_stricto_1* se han asociado a estados de disbiosis intestinal (Abdelbary et al., 2022). En corderos diarreicos de mayor edad (1-2 días y 2-15 días), se detectó un incremento en la abundancia de *Bacteroides*, un taxón típicamente asociado a una microbiota intestinal saludable (Bi et al., 2019). Sin embargo, los perfiles obtenidos en este estudio mostraron una menor proporción de *Bacteroides* en comparación con estudios previos en corderos sanos, donde este grupo puede representar hasta un 40 % en corderos de tres días de edad (Bi et al.,

2019). Finalmente, la aparición de *Lactobacillus* como uno de los grupos más abundantes en los corderos diarreicos coincide con lo reportado por otros autores, quienes también han señalado su presencia elevada durante procesos diarreicos (Zhong et al., 2022).

En el caso del bovino, se observó una baja diversidad alfa según los índices de Chao1 y Shannon, lo que indica una reducida riqueza y equidad en las composiciones bacterianas. Este patrón ha sido previamente reportado Zeineldin et al. (2018) quienes describieron una disminución significativa de estos índices en terneros diarreicos en comparación con terneros sanos. Además, la composición bacteriana se mostró relativamente homogénea entre los distintos rangos de edad analizados, lo que sugiere que la condición diarreica impide observar la maduración típica de la microbiota intestinal en terneros, donde los géneros anaerobios facultativos suelen ser progresivamente reemplazados por anaerobios estrictos durante las primeras semanas de vida (Meale et al., 2017). Este efecto homogeneizador de la diarrea ha sido señalado por varios autores, incluyendo Gomez et al. (2022) , quienes indicaron que en terneros diarreicos persisten elevadas abundancias de anaerobios facultativos, reflejando un retraso en la transición microbiológica hacia una microbiota adulta. A lo largo del rango de edades estudiado, los taxones más abundantes identificados en los terneros diarreicos fueron *Escherichia-Shigella*, *Lactobacillus*, *Clostridium_sensu_stricto_1* y *Enterococcus*. Es importante destacar que los géneros *Escherichia-Shigella* y *Clostridium_sensu_stricto_1* han sido previamente reportados como altamente abundantes en casos de diarrea hemorrágica en terneros, actuando como marcadores de disbiosis intestinal (Zeineldin, Aldridge, et al., 2018). Asimismo, la alta presencia de *Enterococcus* y *Lactobacillus* ha sido descrita como característica de terneros neonatos con diarrea entre los 3 y 10 días de vida (Gomez et al., 2022).

En el caso del porcino, los análisis de diversidad y riqueza, evaluados mediante los índices de Chao1 y Shannon, mostraron perfiles diferenciales entre los distintos rangos de edad. Se observaron valores particularmente altos en neonatos durante las primeras horas de vida, los cuales disminuyeron drásticamente tras las primeras 24 horas, para luego incrementar progresivamente con la edad. Este patrón ya ha sido señalado por Kong et al. (2022) , quienes atribuyen el pico inicial de diversidad a la colonización por microbiota vaginal materna, la cual es reemplazada paulatinamente por bacterias intestinales más especializadas, aumentando la diversidad conforme avanza el desarrollo del animal.

Asimismo, se identificaron perfiles composicionales bacterianos característicos para cada rango de edad, este refleja en parte la rápida evolución que presenta la microbiota porcina durante los primeros meses de vida. Saladrigas-García et al. (2022) describen estos cambios, destacando una transición desde colonizadores tempranos como *Escherichia-Shigella*, *Clostridium_sensu_stricto_1* y *Fusobacterium*, cuya abundancia disminuye progresivamente en favor de géneros como *Bacteroides* y *Lactobacillus*, más especializados en el metabolismo de la leche materna (Frese et al., 2015). Otro cambio relevante se produce tras el destete y la introducción de una dieta sólida rica en cereales (alrededor del primer mes de vida), momento en el cual la microbiota experimenta una transformación drástica, con un notable incremento del taxón *Prevotella*, acompañado de otros grupos como *Rikenellaceae RC9 gut group* (Saladrigas-García et al., 2022) . Si bien estas transiciones son consistentes con los rangos de edad descritos en este estudio, un rasgo diferenciador en lechones diarreicos respecto a lo observado en lechones sanos en estudios previos es el mantenimiento, a lo largo de las distintas fases, de colonizadores tempranos asociados a disbiosis intestinal, tales como *Escherichia-Shigella*(J. Sun et al., 2019), *Clostridium_sensu_stricto1* (Sampath et al., 2022) y *Fusobacterium* (S. Liu et al.,

2015) . Este mantenimiento prolongado de estos taxones podría tener implicaciones importantes para la salud intestinal, la eficiencia digestiva y el desarrollo inmunológico del animal, limitando su capacidad para establecer una microbiota adulta funcional y resiliente como ya ha sido reportado por otros autores (Gresse et al., 2017; Pluske et al., 2018).

En el caso del caprino, aunque el número de individuos incluidos en el estudio fue limitado (únicamente cuatro cabritos con sintomatología diarreica entre los 3 y 7 días de edad), los resultados mostraron una diversidad bacteriana notablemente baja, donde solo 19 ASVs concentraron el 90% de las lecturas totales. Esta baja diversidad ha sido previamente reportada como un indicador claro de disbiosis asociada a cuadros diarreicos en cabritos (X. Wang et al., 2023). Dentro de la composición bacteriana, el taxón *Escherichia-Shigella* destacó como el más abundante, con una abundancia relativa media del 50,98%, lo cual concuerda con los hallazgos de Cao et al. (2025), quienes lo señalan como el principal bioindicador de diarrea bacteriana en cabritos en China. No obstante, debido al reducido número de cabritos analizados en este estudio, es importante interpretar estos resultados con cautela, reconociendo la necesidad de estudios adicionales con tamaños muestrales más amplios.

En términos generales, este capítulo pretende ofrecer un acercamiento inicial a la caracterización de las diarreas neonatales en ovino, bovino, porcino y caprino en la región, describiendo los grupos bacterianos más abundantes en animales diarreicos a lo largo de la etapa neonatal. Este trabajo busca servir como punto de partida para futuros estudios, resaltando la importancia de caracterizar específicamente las comunidades microbianas locales, dado que factores como la geografía, la alimentación y el clima influyen significativamente en la composición de la microbiota.

No obstante, se debe destacar que se debe caracterizar también la microbiota de animales sanos en cada uno de los subsectores productivos en la región, lo cual permitiría evaluar con mayor precisión las alteraciones asociadas a la diarrea neonatal. Los resultados presentados en este capítulo destacan el enorme potencial que tiene la secuenciación masiva para describir comunidades bacterianas complejas y abren la puerta a emplear los perfiles bacterianos como bioindicadores de diarrea neonatal. Esto no solo representa un avance en el conocimiento científico, sino que también ofrece la posibilidad de desarrollar herramientas de biovigilancia aplicables a nivel regional, con implicaciones directas para la salud animal y la productividad de los sistemas ganaderos locales.

4.4.6. Conclusions

- Distinct compositional profiles were observed in the bacterial communities of diarrheic sheep, cattle, pigs, and goats, with particularly pronounced differences between ruminants and pigs.
- The bacterial communities of diarrheic neonatal sheep, cattle, pigs, and goats exhibited low species richness and evenness, as indicated by the Chao1 and Shannon diversity indices.
- In diarrheic neonatal sheep, the bacterial communities were dominated by *Escherichia-Shigella*, *Clostridium_sensu_stricto_1*, *Lactobacillus*, and *Bacteroides*
- In diarrheic neonatal cattle, the dominant taxa included *Escherichia-Shigella*, *Lactobacillus*, *Pseudomonas*, *Clostridium_sensu_stricto_1*, *Bacteroides*, and *Enterococcus*.
- In neonatal goats aged 3 to 7 days, the bacterial composition was characterized by a dominance of *Escherichia-Shigella*, accounting for 51% of the total community.

- In pigs, the bacterial communities showed considerable variability across age groups, with a persistent presence of early colonizers such as *Escherichia-Shigella*, *Clostridium_sensu_stricto_1*, and *Fusobacterium* throughout the neonatal period.

5. Conclusions

5. Conclusions

- Neonatal diarrhea in sheep, pigs, goats, and cattle is characterized by the dominance of specific bacterial taxa over others, typically accompanied by low species richness and evenness.
- The most abundant bacterial taxon in diarrheic neonatal sheep, pigs, goats, and cattle is *Escherichia-Shigella*. In sheep, it is accompanied by *Bacteroides*, *Lactobacillus* and *Clostridium*; in cattle, by *Lactobacillus*, *Pseudomonas*, *Clostridium* and *Bacteroides*; and in pigs, by *Fusobacterium* and *Clostridium*.
- The “watery mouth” diarrheic syndrome, as the principal diarrheic condition in neonatal sheep, is defined by the abundance of *Escherichia-Shigella* and *Clostridium*, with *Escherichia coli* and *Clostridium paraputrificum* identified as the dominant species.
- Farm management practices, particularly regarding bedding, milking systems, and water distribution systems, have been identified critical control points for minimizing the risk and ensuring the prevention of neonatal diarrhea outbreaks in intensive livestock production systems.
- High-throughput sequencing has been established as a valuable tool for the identification, characterization, and biosurveillance of bacterial communities associated with neonatal dysbiotic profiles.

Bibliografía

Bibliografía

- Abdelbary, M. M. H., Hatting, M., Bott, A., Dahlhausen, A., Keller, D., Trautwein, C., & Conrads, G. (2022). The oral-gut axis: Salivary and fecal microbiome dysbiosis in patients with inflammatory bowel disease. *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology*, 12. <https://doi.org/10.3389/fcimb.2022.1010853>
- Abdelsattar, M. M., Rashwan, A. K., Younes, H. A., Abdel-Hamid, M., Romeih, E., Mehanni, A.-H. E., Vargas-Bello-Pérez, E., Chen, W., & Zhang, N. (2022). An updated and comprehensive review on the composition and preservation strategies of bovine colostrum and its contributions to animal health. *Animal Feed Science and Technology*, 291, 115379. <https://doi.org/10.1016/j.anifeedsci.2022.115379>
- Adisasmitho, W. B., Almuhairei, S., Behraves, C. B., Bilivogui, P., Bukachi, S. A., Casas, N., Cedié, Becerra, N., Charron, D. F., Chaudhary, A., Ciacci Zanella, J. R., Cunningham, A. A., Dar, O., Debnath, N., Dungu, B., Farag, E., Gao, G. F., Hayman, D. T. S., Khaita, M., Koopmans, M. P. G., ... Zhou, L. (2022). One Health: A new definition for a sustainable and healthy future. *PLOS Pathogens*, 18(6), e1010537. <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1010537>
- Aktories, K., Schwan, C., & Jank, T. (2017). *Clostridium difficile* Toxin Biology. *Annual Review of Microbiology*, 71(1), 281-307. <https://doi.org/10.1146/annurev-micro-090816-093458>
- Alcock, B. P., Raphenya, A. R., Lau, T. T. Y., Tsang, K. K., Bouchard, M., Edalatmand, A., Huynh, W., Nguyen, A.-L. V., Cheng, A. A., Liu, S., Min, S. Y., Miroshnichenko, A., Tran, H.-K., Werfalli, R. E., Nasir, J. A., Oloni, M., Speicher, D. J., Florescu, A., Singh, B., ... McArthur, A. G. (2019). CARD 2020: antibiotic resistance surveillance with the comprehensive antibiotic resistance database. *Nucleic Acids Research*. <https://doi.org/10.1093/nar/gkz935>
- Álvarez-Pérez, S., Blanco, J. L., Harmanus, C., Kuijper, E. J., & García, M. E. (2017). Prevalence and characteristics of *Clostridium perfringens* and *Clostridium difficile* in dogs and cats attended in diverse veterinary clinics from the Madrid region. *Anaerobe*, 48, 47-55. <https://doi.org/10.1016/j.anaerobe.2017.06.023>
- Alves-Barroco, C., Caço, J., Roma-Rodrigues, C., Fernandes, A. R., Bexiga, R., Oliveira, M., Chambel, L., Tenreiro, R., Mato, R., & Santos-Sanches, I. (2021). New Insights on *Streptococcus dysgalactiae* subsp. *dysgalactiae* Isolates. *Frontiers in Microbiology*, 12. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2021.686413>
- Alves-Barroco, C., Roma-Rodrigues, C., Raposo, L. R., Brás, C., Diniz, M., Caço, J., Costa, P. M., Santos-Sanches, I., & Fernandes, A. R. (2019). *Streptococcus dysgalactiae* subsp. *dysgalactiae* isolated from milk of the bovine udder as emerging pathogens: In vitro and in vivo infection of human cells and zebrafish as biological models. *MicrobiologyOpen*, 8(1). <https://doi.org/10.1002/mbo3.623>
- Andrews, S. (2010). *FastQC: A Quality Control Tool for High Throughput Sequence Data* (0.12.1).
- Angell, J., & Duncan, J. (2020). Watery mouth disease in neonatal lambs: a systematic literature review. *Livestock*, 25(2), 94-103. <https://doi.org/10.12968/live.2020.25.2.94>

- Armengol, R., & Fraile, L. (2016). Colostrum and milk pasteurization improve health status and decrease mortality in neonatal calves receiving appropriate colostrum ingestion. *Journal of Dairy Science*, 99(6), 4718-4725. <https://doi.org/10.3168/jds.2015-10728>
- Bäckhed, F., Roswall, J., Peng, Y., Feng, Q., Jia, H., Kovatcheva-Datchary, P., Li, Y., Xia, Y., Xie, H., Zhong, H., Khan, M. T., Zhang, J., Li, J., Xiao, L., Al-Aama, J., Zhang, D., Lee, Y. S., Kotowska, D., Colding, C., ... Wang, J. (2015). Dynamics and Stabilization of the Human Gut Microbiome during the First Year of Life. *Cell Host & Microbe*, 17(5), 690-703. <https://doi.org/10.1016/j.chom.2015.04.004>
- Baldelli, V., Scadaferri, F., Putignani, L., & Del Chierico, F. (2021). The Role of Enterobacteriaceae in Gut Microbiota Dysbiosis in Inflammatory Bowel Diseases. *Microorganisms*, 9(4), 697. <https://doi.org/10.3390/microorganisms9040697>
- Bankevich, A., Nurk, S., Antipov, D., Gurevich, A. A., Dvorkin, M., Kulikov, A. S., Lesin, V. M., Nikolenko, S. I., Pham, S., Prjibelski, A. D., Pyshkin, A. V., Sirotkin, A. V., Vyahhi, N., Tesler, G., Alekseyev, M. A., & Pevzner, P. A. (2012). SPAdes: A New Genome Assembly Algorithm and Its Applications to Single-Cell Sequencing. *Journal of Computational Biology*, 19(5), 455-477. <https://doi.org/10.1089/cmb.2012.0021>
- Barrington, G. M., Gay, J. M., & Evermann, J. F. (2002). Biosecurity for neonatal gastrointestinal diseases. *Veterinary Clinics of North America: Food Animal Practice*, 18(1), 7-34. [https://doi.org/10.1016/S0749-0720\(02\)00005-1](https://doi.org/10.1016/S0749-0720(02)00005-1)
- Bergsten, E., Mestivier, D., & Sobhani, I. (2020). The Limits and Avoidance of Biases in Metagenomic Analyses of Human Fecal Microbiota. *Microorganisms*, 8(12), 1954. <https://doi.org/10.3390/microorganisms8121954>
- Bi, Y., Cox, M. S., Zhang, F., Suen, G., Zhang, N., Tu, Y., & Diao, Q. (2019). Feeding modes shape the acquisition and structure of the initial gut microbiota in newborn lambs. *Environmental Microbiology*, 21(7), 2333-2346. <https://doi.org/10.1111/1462-2920.14614>
- Bisanz, J. (2018). *MicrobeR (Version 0.3) [Software]* (0.3). <https://jbisanz.github.io/MicrobeR/>
- Bisno, A., Brito, M., & Collins, C. (2003). Molecular basis of group A streptococcal virulence. *The Lancet Infectious Diseases*, 3(4), 191-200. [https://doi.org/10.1016/S1473-3099\(03\)00576-0](https://doi.org/10.1016/S1473-3099(03)00576-0)
- Blanco, J. L., Álvarez-Pérez, S., & García, M. E. (2013). Is the prevalence of *Clostridium difficile* in animals underestimated? *The Veterinary Journal*, 197(3), 694-698. <https://doi.org/10.1016/j.tvjl.2013.03.053>
- Bolger, A. M., Lohse, M., & Usadel, B. (2014). Trimmomatic: a flexible trimmer for Illumina sequence data. *Bioinformatics*, 30(15), 2114-2120. <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btu170>
- Bolyen, E., Rideout, J. R., Dillon, M. R., Bokulich, N. A., Abnet, C. C., Al-Ghalith, G. A., Alexander, H., Alm, E. J., Arumugam, M., Asnicar, F., Bai, Y., Bisanz, J. E., Bittinger, K., Brejnrod, A., Brislawn, C. J., Brown, C. T., Callahan, B. J., Caraballo-Rodríguez, A. M., Chase, J., ... Caporaso, J. G. (2019). Reproducible, interactive, scalable and extensible microbiome

- data science using QIIME 2. *Nature Biotechnology*, 37(8), 852-857.
<https://doi.org/10.1038/s41587-019-0209-9>
- Bortolaia, V., Kaas, R. S., Ruppe, E., Roberts, M. C., Schwarz, S., Cattoir, V., Philippon, A., Allesoe, R. L., Rebelo, A. R., Florensa, A. F., Fagelhauer, L., Chakraborty, T., Neumann, B., Werner, G., Bender, J. K., Stingl, K., Nguyen, M., Coppens, J., Xavier, B. B., ... Aarestrup, F. M. (2020). ResFinder 4.0 for predictions of phenotypes from genotypes. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 75(12), 3491-3500. <https://doi.org/10.1093/jac/dkaa345>
- Botrel, M.-A., Haenni, M., Morignat, E., Sulpice, P., Madec, J.-Y., & Calavas, D. (2010). Distribution and Antimicrobial Resistance of Clinical and Subclinical Mastitis Pathogens in Dairy Cows in Rhône-Alpes, France. *Foodborne Pathogens and Disease*, 7(5), 479-487.
<https://doi.org/10.1089/fpd.2009.0425>
- Boye, M., Aalbæk, B., & Agerholm, J. S. (2006). *Fusobacterium necrophorum* determined as abortifacient in sheep by laser capture microdissection and fluorescence in situ hybridization. *Molecular and Cellular Probes*, 20(6), 330-336.
<https://doi.org/10.1016/j.mcp.2006.03.006>
- Bradley, A. J., Leach, K. A., Green, M. J., Gibbons, J., Ohnstad, I. C., Black, D. H., Payne, B., Prout, V. E., & Breen, J. E. (2018). The impact of dairy cows' bedding material and its microbial content on the quality and safety of milk – A cross sectional study of UK farms. *International Journal of Food Microbiology*, 269, 36-45.
<https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2017.12.022>
- BRUBAKER, R. (2002). *Yersinia pestis*. En *Molecular Medical Microbiology* (pp. 2033-2058). Elsevier. <https://doi.org/10.1016/B978-012677530-3/50315-9>
- Bryan, A., Shapir, N., & Sadowsky, M. J. (2004). Frequency and Distribution of Tetracycline Resistance Genes in Genetically Diverse, Nonselected, and Nonclinical *Escherichia coli* Strains Isolated from Diverse Human and Animal Sources. *Applied and Environmental Microbiology*, 70(4), 2503-2507. <https://doi.org/10.1128/AEM.70.4.2503-2507.2004>
- Bushnell. (2022). *BBMap* (v39.01).
- Buttó, L. F., & Haller, D. (2016). Dysbiosis in intestinal inflammation: Cause or consequence. En *International Journal of Medical Microbiology* (Vol. 306, Número 5, pp. 302-309). Elsevier GmbH. <https://doi.org/10.1016/j.ijmm.2016.02.010>
- Callahan, B. J., McMurdie, P. J., & Holmes, S. P. (2017). Exact sequence variants should replace operational taxonomic units in marker-gene data analysis. *The ISME Journal*, 11(12), 2639-2643. <https://doi.org/10.1038/ismej.2017.119>
- Callahan, B. J., McMurdie, P. J., Rosen, M. J., Han, A. W., Johnson, A. J. A., & Holmes, S. P. (2016). DADA2: High-resolution sample inference from Illumina amplicon data. *Nature Methods*, 13(7), 581-583. <https://doi.org/10.1038/nmeth.3869>
- Camacho, C., Coulouris, G., Avagyan, V., Ma, N., Papadopoulos, J., Bealer, K., & Madden, T. L. (2009). BLAST+: architecture and applications. *BMC Bioinformatics*, 10(1), 421.
<https://doi.org/10.1186/1471-2105-10-421>

- Cao, P. P., Hu, C. L., Li, M. J., An, Y. H., Feng, X., Ma, X. H., Wang, D. Z., Song, Z. H., Ji, G. S., Yang, D., Ma, Q., Yang, W. F., Dong, J. N., Zhang, H. R., Ma, Y., & Ma, Y. F. (2025). 16S rRNA and metabolomics reveal the key microbes and key metabolites that regulate diarrhea in Holstein male calves. *Frontiers in Microbiology*, 15. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2024.1521719>
- Carattoli, A., Zankari, E., García-Fernández, A., Voldby Larsen, M., Lund, O., Villa, L., Møller Aarestrup, F., & Hasman, H. (2014). *In Silico* Detection and Typing of Plasmids using PlasmidFinder and Plasmid Multilocus Sequence Typing. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 58(7), 3895-3903. <https://doi.org/10.1128/AAC.02412-14>
- Caricilli, A., & Saad, M. (2013). The Role of Gut Microbiota on Insulin Resistance. *Nutrients*, 5(3), 829-851. <https://doi.org/10.3390/nu5030829>
- Chen, L., Huang, J., Huang, X., He, Y., Sun, J., Dai, X., Wang, X., Shafiq, M., & Wang, L. (2021). Horizontal Transfer of Different erm(B)-Carrying Mobile Elements Among Streptococcus suis Strains With Different Serotypes. *Frontiers in Microbiology*, 12. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2021.628740>
- Chen, L., Xu, Y., Chen, X., Fang, C., Zhao, L., & Chen, F. (2017). The Maturing Development of Gut Microbiota in Commercial Piglets during the Weaning Transition. *Frontiers in Microbiology*, 8. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2017.01688>
- Chennapragada, S. S., Ramphul, K., Barnett, B. J., Mejias, S. G., & Lohana, P. (2018). A Rare Case of Streptococcus dysgalactiae Subsp. Dysgalactiae Human Zoonotic Infection. *Cureus*. <https://doi.org/10.7759/cureus.2901>
- Chung The, H., & Le, S.-N. H. (2022). Dynamic of the human gut microbiome under infectious diarrhea. *Current Opinion in Microbiology*, 66, 79-85. <https://doi.org/10.1016/j.mib.2022.01.006>
- Church, D. L., Cerutti, L., Gürtler, A., Griener, T., Zelazny, A., & Emler, S. (2020). Performance and Application of 16S rRNA Gene Cycle Sequencing for Routine Identification of Bacteria in the Clinical Microbiology Laboratory. *Clinical Microbiology Reviews*, 33(4). <https://doi.org/10.1128/CMR.00053-19>
- Collins, R., & Carson, A. (2022). Watery mouth disease in lambs. *Veterinary Record*, 190(1), 28-29. <https://doi.org/10.1002/vetr.1347>
- Collins, R. O., Eales, F. A., & Small, J. (1985). Observations on watery mouth in newborn lambs. *British Veterinary Journal*, 141(2), 135-140. [https://doi.org/10.1016/0007-1935\(85\)90142-3](https://doi.org/10.1016/0007-1935(85)90142-3)
- Corrêa, É. K., Ulguim, R. R., Corrêa, L. B., Castilhos, D. D., Bianchi, I., Gil-Turnes, C., & Lucia, T. (2012). Addition of Bacillus sp. inoculums in bedding for swine on a pilot scale: Effect on microbial population and bedding temperature. *Bioresource Technology*, 121, 127-130. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2012.06.033>
- Cossu, D., Yokoyama, K., & Hattori, N. (2018). Bacteria–Host Interactions in Multiple Sclerosis. *Frontiers in Microbiology*, 9. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2018.02966>

- Courtney, H. S., Dale, J. B., & Hasty, D. I. (1996). Differential effects of the streptococcal fibronectin-binding protein, FBP54, on adhesion of group A streptococci to human buccal cells and HEP-2 tissue culture cells. *Infection and Immunity*, 64(7), 2415-2419. <https://doi.org/10.1128/iai.64.7.2415-2419.1996>
- David, L. A., Weil, A., Ryan, E. T., Calderwood, S. B., Harris, J. B., Chowdhury, F., Begum, Y., Qadri, F., LaRocque, R. C., & Turnbaugh, P. J. (2015). Gut Microbial Succession Follows Acute Secretory Diarrhea in Humans. *mBio*, 6(3). <https://doi.org/10.1128/mBio.00381-15>
- Destoumieux-Garzón, D., Mavingui, P., Boetsch, G., Boissier, J., Darriet, F., Duboz, P., Fritsch, C., Giraudoux, P., Le Roux, F., Morand, S., Paillard, C., Pontier, D., Sueur, C., & Voituron, Y. (2018). The One Health Concept: 10 Years Old and a Long Road Ahead. *Frontiers in Veterinary Science*, 5. <https://doi.org/10.3389/fvets.2018.00014>
- Deusch, S., Tilocca, B., Camarinha-Silva, A., & Seifert, J. (2015). News in livestock research — use of Omics -technologies to study the microbiota in the gastrointestinal tract of farm animals. *Computational and Structural Biotechnology Journal*, 13, 55-63. <https://doi.org/10.1016/j.csbj.2014.12.005>
- Dewar, A. E., Hao, C., Belcher, L. J., Ghoul, M., & West, S. A. (2024). Bacterial lifestyle shapes pangenomes. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 121(21). <https://doi.org/10.1073/pnas.2320170121>
- Domínguez Martín, R. (2001). *Las transformaciones del sector ganadero en España (1940-1985)*.
- Doron, S., & Gorbach, S. L. (2008). Bacterial Infections: Overview. En *International Encyclopedia of Public Health* (pp. 273-282). Elsevier. <https://doi.org/10.1016/B978-012373960-5.00596-7>
- Dubeuf, J.-P., Morand-Fehr, P., & Rubino, R. (2004). Situation, changes and future of goat industry around the world. *Small Ruminant Research*, 51(2), 165-173. <https://doi.org/10.1016/j.smallrumres.2003.08.007>
- Duncan, J. S., Angell, J. W., Carter, S. D., Evans, N. J., Sullivan, L. E., & Grove-White, D. H. (2014). Contagious ovine digital dermatitis: An emerging disease. *The Veterinary Journal*, 201(3), 265-268. <https://doi.org/10.1016/j.tvjl.2014.06.007>
- Dwyer, C. M. (2014). Maternal behaviour and lamb survival: from neuroendocrinology to practical application. *Animal*, 8(1), 102-112. <https://doi.org/10.1017/S1751731113001614>
- Eales, F., Small, J., Gilmour, J., Donachie, W., FitzSimons, J., & Dingwall, W. (1986). A field study of watery mouth: clinical, epidemiological, biochemical, haematological and bacteriological observations. *Veterinary Record*, 119(22), 543-547. <https://doi.org/10.1136/vr.119.22.543>
- Ewels, P., Magnusson, M., Lundin, S., & Käller, M. (2016). MultiQC: summarize analysis results for multiple tools and samples in a single report. *Bioinformatics*, 32(19), 3047-3048. <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btw354>

- Fairbrother, J. M., & Nadeau, E. (2006). Contaminación de animales por *Escherichia coli* en la finca. *Revue Scientifique et Technique de l'OIE*, 25(2), 555-569. <https://doi.org/10.20506/rst.25.2.1682>
- Falagas, M. E., McDermott, L., & Snyderman, D. R. (1997). Effect of pH on in vitro antimicrobial susceptibility of the *Bacteroides fragilis* group. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 41(9), 2047-2049. <https://doi.org/10.1128/AAC.41.9.2047>
- Farooq, U., Ahmed, S., Liu, G., Jiang, X., Yang, H., Ding, J., & Ali, M. (2024). Biochemical properties of sheep colostrum and its potential benefits for lamb survival: a review. *Animal Biotechnology*, 35(1). <https://doi.org/10.1080/10495398.2024.2320726>
- Fecteau, G., Smith, B. P., & George, L. W. (2009). Septicemia and Meningitis in the Newborn Calf. *Veterinary Clinics of North America: Food Animal Practice*, 25(1), 195-208. <https://doi.org/10.1016/j.cvfa.2008.10.004>
- Font Tullot, I. (2000). *Climatología de España y Portugal*. Universidad de Salamanca.
- Forcina, G., Pérez-Pardal, L., Carvalheira, J., & Beja-Pereira, A. (2022). Gut Microbiome Studies in Livestock: Achievements, Challenges, and Perspectives. En *Animals* (Vol. 12, Número 23). MDPI. <https://doi.org/10.3390/ani12233375>
- Fox, G. E., Magrum, L. J., Balch, W. E., Wolfe, R. S., & Woese, C. R. (1977). Classification of methanogenic bacteria by 16S ribosomal RNA characterization. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 74(10), 4537-4541. <https://doi.org/10.1073/pnas.74.10.4537>
- Frese, S. A., Parker, K., Calvert, C. C., & Mills, D. A. (2015). Diet shapes the gut microbiome of pigs during nursing and weaning. *Microbiome*, 3(1), 28. <https://doi.org/10.1186/s40168-015-0091-8>
- Friedman, E. S., Bittinger, K., Esipova, T. V., Hou, L., Chau, L., Jiang, J., Mesaros, C., Lund, P. J., Liang, X., FitzGerald, G. A., Goulian, M., Lee, D., Garcia, B. A., Blair, I. A., Vinogradov, S. A., & Wu, G. D. (2018). Microbes vs. chemistry in the origin of the anaerobic gut lumen. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 115(16), 4170-4175. <https://doi.org/10.1073/pnas.1718635115>
- Gamazo Chillón, J. C. (2022). Evolución de la actividad agropecuaria en el siglo XXI de acuerdo con los datos del censo agrario. *Revista Española de Estudios Agrosociales y Pesqueros*, 1, 18-48. <https://doi.org/10.24197/reeap.1.2022.18-48>
- Garcia, J., Pempek, J., Hengy, M., Hinds, A., Diaz-Campos, D., & Habing, G. (2022). Prevalence and predictors of bacteremia in dairy calves with diarrhea. *Journal of Dairy Science*, 105(1), 807-817. <https://doi.org/10.3168/jds.2020-19819>
- Gérard, P. (2016). Gut microbiota and obesity. *Cellular and Molecular Life Sciences*, 73(1), 147-162. <https://doi.org/10.1007/s00018-015-2061-5>
- German, A. J., Day, M. J., Ruau, C. G., Steiner, J. M., Williams, D. A., & Hall, E. J. (2003). Comparison of Direct and Indirect Tests for Small Intestinal Bacterial Overgrowth and Antibiotic-Responsive Diarrhea in Dogs. *Journal of Veterinary Internal Medicine*, 17(1), 33-43. <https://doi.org/10.1111/j.1939-1676.2003.tb01321.x>

- Gildea, L., Ayariga, J. A., & Robertson, B. K. (2022). Bacteriophages as Biocontrol Agents in Livestock Food Production. *Microorganisms*, 10(11), 2126. <https://doi.org/10.3390/microorganisms10112126>
- Gomez, D. E., Li, L., Goetz, H., MacNicol, J., Gamsjaeger, L., & Renaud, D. L. (2022). Calf Diarrhea Is Associated With a Shift From Obligated to Facultative Anaerobes and Expansion of Lactate-Producing Bacteria. *Frontiers in Veterinary Science*, 9. <https://doi.org/10.3389/fvets.2022.846383>
- GOOD, I. J. (1953). THE POPULATION FREQUENCIES OF SPECIES AND THE ESTIMATION OF POPULATION PARAMETERS. *Biometrika*, 40(3-4), 237-264. <https://doi.org/10.1093/biomet/40.3-4.237>
- Gresse, R., Chaucheyras-Durand, F., Fleury, M. A., Van de Wiele, T., Forano, E., & Blanquet-Diot, S. (2017). Gut Microbiota Dysbiosis in Postweaning Piglets: Understanding the Keys to Health. *Trends in Microbiology*, 25(10), 851-873. <https://doi.org/10.1016/j.tim.2017.05.004>
- Gundogan, N., Citak, S., Yucel, N., & Devren, A. (2005). A note on the incidence and antibiotic resistance of *Staphylococcus aureus* isolated from meat and chicken samples. *Meat Science*, 69(4), 807-810. <https://doi.org/10.1016/j.meatsci.2004.10.011>
- Guo, H., Cui, J., Li, Q., Liang, X., Li, J., Yang, B., Kalds, P., Chen, Y., & Yang, Y. (2024). A multi-omic assessment of the mechanisms of intestinal microbes used to treat diarrhea in early-weaned lambs. *mSystems*, 9(2). <https://doi.org/10.1128/msystems.00953-23>
- Guo, J., Li, P., Zhang, K., Zhang, L., Wang, X., Li, L., & Zhang, H. (2020). Distinct Stage Changes in Early-Life Colonization and Acquisition of the Gut Microbiota and Its Correlations With Volatile Fatty Acids in Goat Kids. *Frontiers in Microbiology*, 11. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2020.584742>
- Gupta, S. K., Padmanabhan, B. R., Diene, S. M., Lopez-Rojas, R., Kempf, M., Landraud, L., & Rolain, J.-M. (2014). ARG-ANNOT, a New Bioinformatic Tool To Discover Antibiotic Resistance Genes in Bacterial Genomes. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 58(1), 212-220. <https://doi.org/10.1128/AAC.01310-13>
- Hadley Wickham. (2016). *ggplot2: Elegant Graphics for Data Analysis* (978.^a-3.^a-319.^a-24277.^a-4.^a ed.). Springer-Verlag New York. <https://ggplot2.tidyverse.org>
- Haenni, M., Lupo, A., & Madec, J.-Y. (2018). Antimicrobial Resistance in *Streptococcus* spp. *Microbiology Spectrum*, 6(2). <https://doi.org/10.1128/microbiolspec.ARBA-0008-2017>
- Harvey, R. B., Anderson, R. C., Genovese, K. J., Callaway, T. R., & Nisbet, D. J. (2005). Use of competitive exclusion to control enterotoxigenic strains of *Escherichia coli* in weaned pigs. *Journal of Animal Science*, 83(suppl_13), E44-E47. https://doi.org/10.2527/2005.8313_supplE44x
- He, C.-H., Feng, S.-F., Chen, S.-X., Han, D.-K., He, T.-R., Cao, J.-W., & Mai, H.-Q. (2023). *Streptococcus dysgalactiae* subsp. *dysgalactiae* presents with progressive weakness in limbs: a case report and literature review. *BMC Infectious Diseases*, 23(1), 192. <https://doi.org/10.1186/s12879-023-08190-3>

- Heikkilä, A.-M., Liski, E., Pyörälä, S., & Taponen, S. (2018). Pathogen-specific production losses in bovine mastitis. *Journal of Dairy Science*, 101(10), 9493-9504. <https://doi.org/10.3168/jds.2018-14824>
- Heinemann, C., Leubner, C. D., Hayer, J. J., & Steinhoff-Wagner, J. (2021). Hygiene management in newborn individually housed dairy calves focusing on housing and feeding practices. *Journal of Animal Science*, 99(1). <https://doi.org/10.1093/jas/skaa391>
- Hermann-Bank, M. L., Skovgaard, K., Stockmarr, A., Strube, M. L., Larsen, N., Kongsted, H., Ingerslev, H.-C., Mølbak, L., & Boye, M. (2015). Characterization of the bacterial gut microbiota of piglets suffering from new neonatal porcine diarrhoea. *BMC Veterinary Research*, 11(1), 139. <https://doi.org/10.1186/s12917-015-0419-4>
- Hrncir, T. (2022). Gut Microbiota Dysbiosis: Triggers, Consequences, Diagnostic and Therapeutic Options. *Microorganisms*, 10(3), 578. <https://doi.org/10.3390/microorganisms10030578>
- Huang, Y., Wang, G., Li, C., Wang, W., Zhang, X., Wang, X., Zhang, D., Chen, Z., Cui, P., & Ma, Z. (2022). Periodical Changes of Feces Microbiota and Its Relationship with Nutrient Digestibility in Early Lambs. *Animals*, 12(14), 1770. <https://doi.org/10.3390/ani12141770>
- Hyde, R. M., Green, M. J., Hudson, C., & Down, P. M. (2020). Quantitative Analysis of Colostrum Bacteriology on British Dairy Farms. *Frontiers in Veterinary Science*, 7. <https://doi.org/10.3389/fvets.2020.601227>
- Illumina. (2013). *16S Metagenomic Sequencing Library Preparation* (# 15044223 Rev. B).
- Illumina. (2023). *Nextera XT DNA Library Prep Product Documentation* (# 15031942 v07).
- Jami, E., Israel, A., Kotser, A., & Mizrahi, I. (2013). Exploring the bovine rumen bacterial community from birth to adulthood. *The ISME Journal*, 7(6), 1069-1079. <https://doi.org/10.1038/ismej.2013.2>
- Jensen, A., & Kilian, M. (2012). Delineation of *Streptococcus dysgalactiae*, Its Subspecies, and Its Clinical and Phylogenetic Relationship to *Streptococcus pyogenes*. *Journal of Clinical Microbiology*, 50(1), 113-126. <https://doi.org/10.1128/JCM.05900-11>
- Jiang, X., & Wang, J. (2024). Biological Control of *Escherichia coli* O157:H7 in Dairy Manure-Based Compost Using Competitive Exclusion Microorganisms. *Pathogens*, 13(5), 361. <https://doi.org/10.3390/pathogens13050361>
- Joanna María, O.-A., José Miguel, S.-C., Fabiola, G.-A., Elizabeth, G.-D., Araceli, R.-C., Patricia, A.-P., Claudia, W.-A., Maribel, G.-V., Gloria, L.-Á., Adda Jeanette, G.-C., José Alberto, D.-Q., Alfonso, M.-T., & José Ernesto, R.-G. (2016). Fatal *Psychrobacter* sp. infection in a pediatric patient with meningitis identified by metagenomic next-generation sequencing in cerebrospinal fluid. *Archives of Microbiology*, 198(2), 129-135. <https://doi.org/10.1007/s00203-015-1168-2>
- Jolley, K. A., Bray, J. E., & Maiden, M. C. J. (2018). Open-access bacterial population genomics: BIGSdb software, the PubMLST.org website and their applications. *Wellcome Open Research*, 3, 124. <https://doi.org/10.12688/wellcomeopenres.14826.1>

- Jordal, S., Glambek, M., Oppegard, O., & Kittang, B. R. (2015). New Tricks from an Old Cow: Infective Endocarditis Caused by *Streptococcus dysgalactiae* subsp. *dysgalactiae*. *Journal of Clinical Microbiology*, 53(2), 731-734. <https://doi.org/10.1128/JCM.02437-14>
- Kabelitz, T., Aubry, E., van Vorst, K., Amon, T., & Fulde, M. (2021). The Role of *Streptococcus* spp. in Bovine Mastitis. *Microorganisms*, 9(7), 1497. <https://doi.org/10.3390/microorganisms9071497>
- Keessen, E. C., Gaastra, W., & Lipman, L. J. A. (2011). *Clostridium difficile* infection in humans and animals, differences and similarities. *Veterinary Microbiology*, 153(3-4), 205-217. <https://doi.org/10.1016/j.vetmic.2011.03.020>
- Khalil, I. A., Troeger, C., Rao, P. C., Blacker, B. F., Brown, A., Brewer, T. G., Colombara, D. V, De Hostos, E. L., Engmann, C., Guerrant, R. L., Haque, R., Houpt, E. R., Kang, G., Korpe, P. S., Kotloff, K. L., Lima, A. A. M., Petri, W. A., Platts-Mills, J. A., Shultz, D. A., ... Mokdad, A. H. (2018). Morbidity, mortality, and long-term consequences associated with diarrhoea from *Cryptosporidium* infection in children younger than 5 years: a meta-analysis study. *The Lancet Global Health*, 6(7), e758-e768. [https://doi.org/10.1016/S2214-109X\(18\)30283-3](https://doi.org/10.1016/S2214-109X(18)30283-3)
- Kim, E.-T., Lee, S.-J., Kim, T.-Y., Lee, H.-G., Atikur, R. M., Gu, B.-H., Kim, D.-H., Park, B.-Y., Son, J.-K., & Kim, M.-H. (2021). Dynamic Changes in Fecal Microbial Communities of Neonatal Dairy Calves by Aging and Diarrhea. *Animals*, 11(4), 1113. <https://doi.org/10.3390/ani11041113>
- Kiu, R., Caim, S., Alcon-Giner, C., Belteki, G., Clarke, P., Pickard, D., Dougan, G., & Hall, L. J. (2017). Preterm Infant-Associated *Clostridium tertium*, *Clostridium cadaveris*, and *Clostridium paraputrificum* Strains: Genomic and Evolutionary Insights. *Genome Biology and Evolution*, 9(10), 2707-2714. <https://doi.org/10.1093/gbe/evx210>
- Kiu, R., & Hall, L. J. (2018). An update on the human and animal enteric pathogen *Clostridium perfringens*. *Emerging Microbes & Infections*, 7(1), 1-15. <https://doi.org/10.1038/s41426-018-0144-8>
- Klindworth, A., Pruesse, E., Schweer, T., Peplies, J., Quast, C., Horn, M., & Glöckner, F. O. (2013). Evaluation of general 16S ribosomal RNA gene PCR primers for classical and next-generation sequencing-based diversity studies. *Nucleic Acids Research*, 41(1), e1-e1. <https://doi.org/10.1093/nar/gks808>
- Knarreborg, A., Miquel, N., Granli, T., & Jensen, B. B. (2002). Establishment and application of an in vitro methodology to study the effects of organic acids on coliform and lactic acid bacteria in the proximal part of the gastrointestinal tract of piglets. *Animal Feed Science and Technology*, 99(1-4), 131-140. [https://doi.org/10.1016/S0377-8401\(02\)00069-X](https://doi.org/10.1016/S0377-8401(02)00069-X)
- Koh, T. H., Binte Abdul Rahman, N., & Sessions, O. M. (2020). Comparative genomic analysis of *Streptococcus dysgalactiae* subspecies *dysgalactiae*, an occasional cause of zoonotic infection. *Pathology*, 52(2), 262-266. <https://doi.org/10.1016/j.pathol.2019.09.016>
- Kong, Q., Zhang, W., An, M., Kulyar, M. F.-A., Shang, Z., Tan, Z., Xu, Y., Li, J., & Liu, S. (2022). Characterization of Bacterial Microbiota Composition in Healthy and Diarrheal Early-

- Weaned Tibetan Piglets. *Frontiers in Veterinary Science*, 9. <https://doi.org/10.3389/fvets.2022.799862>
- Kreikemeyer, B., Oehmcke, S., Nakata, M., Hoffrogge, R., & Podbielski, A. (2004). Streptococcus pyogenes Fibronectin-binding Protein F2. *Journal of Biological Chemistry*, 279(16), 15850-15859. <https://doi.org/10.1074/jbc.M313613200>
- Lacasta, D., Ferrer, L. M., Ramos, J. J., Loste, A., & Bueso, J. P. (2008). Digestive pathway of infection in Streptococcus dysgalactiae polyarthritidis in lambs. *Small Ruminant Research*, 78(1-3), 202-205. <https://doi.org/10.1016/j.smallrumres.2008.06.001>
- Lanata, C. F., Fischer-Walker, C. L., Olascoaga, A. C., Torres, C. X., Aryee, M. J., & Black, R. E. (2013). Global Causes of Diarrheal Disease Mortality in Children <5 Years of Age: A Systematic Review. *PLoS ONE*, 8(9), e72788. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0072788>
- Landers, T. F., Cohen, B., Wittum, T. E., & Larson, E. L. (2012). A Review of Antibiotic Use in Food Animals: Perspective, Policy, and Potential. *Public Health Reports*®, 127(1), 4-22. <https://doi.org/10.1177/003335491212700103>
- Latorre, A. A., Van Kessel, J. S., Karns, J. S., Zurakowski, M. J., Pradhan, A. K., Boor, K. J., Jayarao, B. M., Houser, B. A., Daugherty, C. S., & Schukken, Y. H. (2010). Biofilm in milking equipment on a dairy farm as a potential source of bulk tank milk contamination with Listeria monocytogenes. *Journal of Dairy Science*, 93(6), 2792-2802. <https://doi.org/10.3168/jds.2009-2717>
- Le Bourhis, A.-G., Saunier, K., Doré, J., Carlier, J.-P., Chamba, J.-F., Popoff, M.-R., & Tholozan, J.-L. (2005). Development and Validation of PCR Primers To Assess the Diversity of Clostridium spp. in Cheese by Temporal Temperature Gradient Gel Electrophoresis. *Applied and Environmental Microbiology*, 71(1), 29-38. <https://doi.org/10.1128/AEM.71.1.29-38.2005>
- Le Chatelier, E., Nielsen, T., Qin, J., Prifti, E., Hildebrand, F., Falony, G., Almeida, M., Arumugam, M., Batto, J.-M., Kennedy, S., Leonard, P., Li, J., Burgdorf, K., Grarup, N., Jørgensen, T., Brandslund, I., Nielsen, H. B., Juncker, A. S., Bertalan, M., ... Pedersen, O. (2013). Richness of human gut microbiome correlates with metabolic markers. *Nature*, 500(7464), 541-546. <https://doi.org/10.1038/nature12506>
- Levy, M., Kolodziejczyk, A. A., Thaïss, C. A., & Elinav, E. (2017). Dysbiosis and the immune system. *Nature Reviews Immunology*, 17(4), 219-232. <https://doi.org/10.1038/nri.2017.7>
- Li, J., Yan, C., Wei, D., & Gong, X. (2023). Streptococcus gallolyticus Subspecies pasteurianus Meningitis in an Infant with Hypothyroidism and Diarrhea. *Infection and Drug Resistance*, Volume 16, 6217-6223. <https://doi.org/10.2147/IDR.S425637>
- Li, X., Gu, N., Huang, T. Y., Zhong, F., & Peng, G. (2023). Pseudomonas aeruginosa: A typical biofilm forming pathogen and an emerging but underestimated pathogen in food processing. *Frontiers in Microbiology*, 13. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2022.1114199>
- Li, Y., Chen, X., Zhang, Z., Wang, L., Wang, J., Zeng, J., Yang, J., & Lu, B. (2019). Microbiological and clinical characteristics of Streptococcus gallolyticus subsp. pasteurianus infection in China. *BMC Infectious Diseases*, 19(1), 791. <https://doi.org/10.1186/s12879-019-4413-5>

- Li, Y., Xia, S., Jiang, X., Feng, C., Gong, S., Ma, J., Fang, Z., Yin, J., & Yin, Y. (2021). Gut Microbiota and Diarrhea: An Updated Review. *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology*, 11. <https://doi.org/10.3389/fcimb.2021.625210>
- Liang, M., Ding, X., Wu, Y., & Sun, Y. (2021). Temperature and risk of infectious diarrhea: a systematic review and meta-analysis. *Environmental Science and Pollution Research*, 28(48), 68144-68154. <https://doi.org/10.1007/s11356-021-15395-z>
- Liu, B., Zheng, D., Jin, Q., Chen, L., & Yang, J. (2019). VFDB 2019: a comparative pathogenomic platform with an interactive web interface. *Nucleic Acids Research*, 47(D1), D687-D692. <https://doi.org/10.1093/nar/gky1080>
- Liu, B., Zheng, D., Zhou, S., Chen, L., & Yang, J. (2022). VFDB 2022: a general classification scheme for bacterial virulence factors. *Nucleic Acids Research*, 50(D1), D912-D917. <https://doi.org/10.1093/nar/gkab1107>
- Liu, S., Zhao, L., Zhai, Z., Zhao, W., Ding, J., Dai, R., Sun, T., & Meng, H. (2015). Porcine Epidemic Diarrhea Virus Infection Induced the Unbalance of Gut Microbiota in Piglets. *Current Microbiology*, 71(6), 643-649. <https://doi.org/10.1007/s00284-015-0895-6>
- Lloyd, J., Kessell, A., Barchia, I., Schröder, J., & Rutley, D. (2016). Docked tail length is a risk factor for bacterial arthritis in lambs. *Small Ruminant Research*, 144, 17-22. <https://doi.org/10.1016/j.smallrumres.2016.07.018>
- López-Enríquez, L., Rodríguez-Lázaro, D., & Hernández, M. (2007). Quantitative Detection of *Clostridium tyrobutyricum* in Milk by Real-Time PCR. *Applied and Environmental Microbiology*, 73(11), 3747-3751. <https://doi.org/10.1128/AEM.02642-06>
- Luepke, K. H., Suda, K. J., Boucher, H., Russo, R. L., Bonney, M. W., Hunt, T. D., & Mohr, J. F. (2017). Past, Present, and Future of Antibacterial Economics: Increasing Bacterial Resistance, Limited Antibiotic Pipeline, and Societal Implications. *Pharmacotherapy*, 37(1), 71-84. <https://doi.org/10.1002/phar.1868>
- Lundberg, Å., Nyman, A., Unnerstad, H. E., & Waller, K. P. (2014). Prevalence of bacterial genotypes and outcome of bovine clinical mastitis due to *Streptococcus dysgalactiae* and *Streptococcus uberis*. *Acta Veterinaria Scandinavica*, 56(1), 80. <https://doi.org/10.1186/s13028-014-0080-0>
- Luo, Y., Ren, W., Smidt, H., Wright, A.-D. G., Yu, B., Schyns, G., McCormack, U. M., Cowieson, A. J., Yu, J., He, J., Yan, H., Wu, J., Mackie, R. I., & Chen, D. (2022). Dynamic Distribution of Gut Microbiota in Pigs at Different Growth Stages: Composition and Contribution. *Microbiology Spectrum*, 10(3). <https://doi.org/10.1128/spectrum.00688-21>
- Lyras, D., O'Connor, J. R., Howarth, P. M., Sambol, S. P., Carter, G. P., Phumoonna, T., Poon, R., Adams, V., Vedantam, G., Johnson, S., Gerding, D. N., & Rood, J. I. (2009). Toxin B is essential for virulence of *Clostridium difficile*. *Nature*, 458(7242), 1176-1179. <https://doi.org/10.1038/nature07822>
- Ma, Y., Deng, X., Yang, X., Wang, J., Li, T., Hua, G., Han, D., Da, L., Li, R., Rong, W., & Deng, X. (2022). Characteristics of Bacterial Microbiota in Different Intestinal Segments of Aohan Fine-Wool Sheep. *Frontiers in Microbiology*, 13. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2022.874536>

- Mackenzie, J. S., & Jeggo, M. (2019). The One Health Approach—Why Is It So Important? *Tropical Medicine and Infectious Disease*, 4(2), 88. <https://doi.org/10.3390/tropicalmed4020088>
- Mao, S., Zhang, M., Liu, J., & Zhu, W. (2015). Characterising the bacterial microbiota across the gastrointestinal tracts of dairy cattle: membership and potential function. *Scientific Reports*, 5(1), 16116. <https://doi.org/10.1038/srep16116>
- Marks, L. R., Reddinger, R. M., & Hakansson, A. P. (2014). Biofilm Formation Enhances Fomite Survival of *Streptococcus pneumoniae* and *Streptococcus pyogenes*. *Infection and Immunity*, 82(3), 1141-1146. <https://doi.org/10.1128/IAI.01310-13>
- Marmolin, E. S., Hartmeyer, G. N., Christensen, J. J., Nielsen, X. C., Dargis, R., Skov, M. N., Knudsen, E., Kemp, M., & Justesen, U. S. (2016). Bacteremia with the bovis group streptococci: species identification and association with infective endocarditis and with gastrointestinal disease. *Diagnostic Microbiology and Infectious Disease*, 85(2), 239-242. <https://doi.org/10.1016/j.diagmicrobio.2016.02.019>
- Matussek, A., Jernberg, C., Einemo, I.-M., Monecke, S., Ehricht, R., Engelmann, I., Löfgren, S., & Mernelius, S. (2017). Genetic makeup of Shiga toxin-producing *Escherichia coli* in relation to clinical symptoms and duration of shedding: a microarray analysis of isolates from Swedish children. *European Journal of Clinical Microbiology & Infectious Diseases*, 36(8), 1433-1441. <https://doi.org/10.1007/s10096-017-2950-7>
- McArdle, A. J., & Kaforou, M. (2020). Sensitivity of shotgun metagenomics to host DNA: abundance estimates depend on bioinformatic tools and contamination is the main issue. *Access Microbiology*, 2(4). <https://doi.org/10.1099/acmi.0.000104>
- McArthur, A. G., Waglechner, N., Nizam, F., Yan, A., Azad, M. A., Baylay, A. J., Bhullar, K., Canova, M. J., De Pascale, G., Ejim, L., Kalan, L., King, A. M., Koteva, K., Morar, M., Mulvey, M. R., O'Brien, J. S., Pawlowski, A. C., Piddock, L. J. V., Spanogiannopoulos, P., ... Wright, G. D. (2013). The Comprehensive Antibiotic Resistance Database. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 57(7), 3348-3357. <https://doi.org/10.1128/AAC.00419-13>
- McGuirk, S. M., & Collins, M. (2004). Managing the production, storage, and delivery of colostrum. *Veterinary Clinics of North America: Food Animal Practice*, 20(3), 593-603. <https://doi.org/10.1016/j.cvfa.2004.06.005>
- McLoughlin, S., Spillane, C., Claffey, N., Smith, P. E., O'Rourke, T., Diskin, M. G., & Waters, S. M. (2020). Rumen Microbiome Composition Is Altered in Sheep Divergent in Feed Efficiency. *Frontiers in Microbiology*, 11. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2020.01981>
- Meale, S. J., Li, S. C., Azevedo, P., Derakhshani, H., DeVries, T. J., Plaizier, J. C., Steele, M. A., & Khafipour, E. (2017). Weaning age influences the severity of gastrointestinal microbiome shifts in dairy calves. *Scientific Reports*, 7(1), 198. <https://doi.org/10.1038/s41598-017-00223-7>
- Meng, L., Zhang, Y., Liu, H., Zhao, S., Wang, J., & Zheng, N. (2017). Characterization of *Pseudomonas* spp. and Associated Proteolytic Properties in Raw Milk Stored at Low Temperatures. *Frontiers in Microbiology*, 8. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2017.02158>

- Merlot, E., Quesnel, H., & Prunier, A. (2013). Prenatal stress, immunity and neonatal health in farm animal species. *Animal*, 7(12), 2016-2025. <https://doi.org/10.1017/S175173111300147X>
- Mikheenko, A., Prjibelski, A., Saveliev, V., Antipov, D., & Gurevich, A. (2018). Versatile genome assembly evaluation with QUAST-LG. *Bioinformatics*, 34(13), i142-i150. <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/bty266>
- Mikkelsen, L. L., Vidanarachchi, J. K., Olnood, C. G., Bao, Y. M., Selle, P. H., & Choct, M. (2009). Effect of potassium diformate on growth performance and gut microbiota in broiler chickens challenged with necrotic enteritis. *British Poultry Science*, 50(1), 66-75. <https://doi.org/10.1080/00071660802613252>
- Mitchell, T. J. (2003). The pathogenesis of streptococcal infections: from Tooth decay to meningitis. *Nature Reviews Microbiology*, 1(3), 219-230. <https://doi.org/10.1038/nrmicro771>
- Moriarty, E. M., Mackenzie, M. L., Karki, N., & Sinton, L. W. (2011). Survival of *Escherichia coli*, Enterococci, and *Campylobacter* spp. in Sheep Feces on Pastures. *Applied and Environmental Microbiology*, 77(5), 1797-1803. <https://doi.org/10.1128/AEM.01329-10>
- Moriel, D. G., Piccoli, D., Raso, M. M., & Pizza, M. (2024). The overlooked bacterial pandemic. *Seminars in Immunopathology*, 45(4-6), 481-491. <https://doi.org/10.1007/s00281-023-00997-1>
- Mørk, T., Waage, S., Tollersrud, T., Kvitle, B., & Sviland, S. (2007). Clinical mastitis in ewes; bacteriology, epidemiology and clinical features. *Acta Veterinaria Scandinavica*, 49(1), 23. <https://doi.org/10.1186/1751-0147-49-23>
- Mu, Q., Tavella, V. J., & Luo, X. M. (2018). Role of *Lactobacillus reuteri* in Human Health and Diseases. *Frontiers in Microbiology*, 9. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2018.00757>
- Murray, C. J. L., Ikuta, K. S., Sharara, F., Swetschinski, L., Robles Aguilar, G., Gray, A., Han, C., Bisignano, C., Rao, P., Wool, E., Johnson, S. C., Browne, A. J., Chipeta, M. G., Fell, F., Hackett, S., Haines-Woodhouse, G., Kashef Hamadani, B. H., Kumaran, E. A. P., McManigal, B., ... Naghavi, M. (2022). Global burden of bacterial antimicrobial resistance in 2019: a systematic analysis. *The Lancet*, 399(10325), 629-655. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(21\)02724-0](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(21)02724-0)
- Mutreja, A., Kim, D. W., Thomson, N. R., Connor, T. R., Lee, J. H., Kariuki, S., Croucher, N. J., Choi, S. Y., Harris, S. R., Lebens, M., Niyogi, S. K., Kim, E. J., Ramamurthy, T., Chun, J., Wood, J. L. N., Clemens, J. D., Czerkinsky, C., Nair, G. B., Holmgren, J., ... Dougan, G. (2011). Evidence for several waves of global transmission in the seventh cholera pandemic. *Nature*, 477(7365), 462-465. <https://doi.org/10.1038/nature10392>
- Nagpal, R., Tsuji, H., Takahashi, T., Nomoto, K., Kawashima, K., Nagata, S., & Yamashiro, Y. (2017). Gut dysbiosis following C-section instigates higher colonisation of toxigenic *Clostridium perfringens* in infants. *Beneficial Microbes*, 8(3), 353-365. <https://doi.org/10.3920/BM2016.0216>
- Nicholas, R. A. J., & Loria, G. R. (2014). Lameness in lambs: questions around joint ill. *Veterinary Record*, 174(23), 577-578. <https://doi.org/10.1136/vr.g3623>

- Oh, S.-I., Kim, J. W., Kim, J., So, B., Kim, B., & Kim, H.-Y. (2020). Molecular subtyping and antimicrobial susceptibility of *Streptococcus dysgalactiae* subspecies *equisimilis* isolates from clinically diseased pigs. *Journal of Veterinary Science*, 21(4). <https://doi.org/10.4142/jvs.2020.21.e57>
- Østerås, O., Sølverød, L., & Reksen, O. (2006). Milk Culture Results in a Large Norwegian Survey—Effects of Season, Parity, Days in Milk, Resistance, and Clustering. *Journal of Dairy Science*, 89(3), 1010-1023. [https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302\(06\)72167-1](https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302(06)72167-1)
- Page, A. J., Cummins, C. A., Hunt, M., Wong, V. K., Reuter, S., Holden, M. T. G., Fookes, M., Falush, D., Keane, J. A., & Parkhill, J. (2015). Roary: rapid large-scale prokaryote pan genome analysis. *Bioinformatics*, 31(22), 3691-3693. <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btv421>
- Palmela, C., Chevarin, C., Xu, Z., Torres, J., Sevrin, G., Hirten, R., Barnich, N., Ng, S. C., & Colombel, J.-F. (2018). Adherent-invasive *Escherichia coli* in inflammatory bowel disease. *Gut*, 67(3), 574-587. <https://doi.org/10.1136/gutjnl-2017-314903>
- Park, M. J., Eun, I.-S., Jung, C.-Y., Ko, Y.-C., Kim, Y.-J., Kim, C., & Kang, E.-J. (2012). Streptococcus Dysgalactiae Subspecies Dysgalactiae Infection after Total Knee Arthroplasty: A Case Report. *Knee Surgery & Related Research*, 24(2), 120-123. <https://doi.org/10.5792/ksrr.2012.24.2.120>
- Petit, L., Gibert, M., & Popoff, M. R. (1999). Clostridium perfringens: toxinotype and genotype. *Trends in Microbiology*, 7(3), 104-110. [https://doi.org/10.1016/S0966-842X\(98\)01430-9](https://doi.org/10.1016/S0966-842X(98)01430-9)
- Pluske, J. R., Turpin, D. L., & Kim, J.-C. (2018). Gastrointestinal tract (gut) health in the young pig. *Animal Nutrition*, 4(2), 187-196. <https://doi.org/10.1016/j.aninu.2017.12.004>
- Pokharel, P., Dhakal, S., & Dozois, C. M. (2023). The Diversity of Escherichia coli Pathotypes and Vaccination Strategies against This Versatile Bacterial Pathogen. *Microorganisms*, 11(2), 344. <https://doi.org/10.3390/microorganisms11020344>
- Pop, M., Walker, A. W., Paulson, J., Lindsay, B., Antonio, M., Hossain, M. A., Oundo, J., Tamboura, B., Mai, V., Astrovskaya, I., Bravo, H. C., Rance, R., Stares, M., Levine, M. M., Panchalingam, S., Kotloff, K., Ikumapayi, U. N., Ebruke, C., Adeyemi, M., ... Stine, O. C. (2014). Diarrhea in young children from low-income countries leads to large-scale alterations in intestinal microbiota composition. *Genome Biology*, 15(6), R76. <https://doi.org/10.1186/gb-2014-15-6-r76>
- Porcellato, D., Smistad, M., Skeie, S. B., Jørgensen, H. J., Austbø, L., & Oppegaard, O. (2021). Whole genome sequencing reveals possible host species adaptation of Streptococcus dysgalactiae. *Scientific Reports*, 11(1), 17350. <https://doi.org/10.1038/s41598-021-96710-z>
- Poretzky, R., Rodriguez-R, L. M., Luo, C., Tsementzi, D., & Konstantinidis, K. T. (2014). Strengths and Limitations of 16S rRNA Gene Amplicon Sequencing in Revealing Temporal Microbial Community Dynamics. *PLoS ONE*, 9(4), e93827. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0093827>
- Posit Team. (2024). *RStudio: Integrated Development Environment for R* (2024.09.1).

- Purushothaman, S., Meola, M., & Egli, A. (2022). Combination of Whole Genome Sequencing and Metagenomics for Microbiological Diagnostics. *International Journal of Molecular Sciences*, 23(17), 9834. <https://doi.org/10.3390/ijms23179834>
- Quast, C., Pruesse, E., Yilmaz, P., Gerken, J., Schweer, T., Yarza, P., Peplies, J., & Glöckner, F. O. (2012). The SILVA ribosomal RNA gene database project: improved data processing and web-based tools. *Nucleic Acids Research*, 41(D1), D590-D596. <https://doi.org/10.1093/nar/gks1219>
- Quijada, N. M., Rodríguez-Lázaro, D., Eiros, J. M., & Hernández, M. (2019). TORMES: an automated pipeline for whole bacterial genome analysis. *Bioinformatics*, 35(21), 4207-4212. <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btz220>
- R Core Team. (2024). *R: A Language and Environment for Statistical Computing* (4.4.2).
- Rahman, Md. T., Sobur, Md. A., Islam, Md. S., Levy, S., Hossain, Md. J., El Zowlaty, M. E., Rahman, A. T., & Ashour, H. M. (2020). Zoonotic Diseases: Etiology, Impact, and Control. *Microorganisms*, 8(9), 1405. <https://doi.org/10.3390/microorganisms8091405>
- Ridler, A., Hickson, R., Griffiths, K., Pettigrew, E., & Kenyon, P. (2019). Effects of *Streptococcus dysgalactiae* polyarthritis on lamb growth and mortality and risk factors for disease. *Small Ruminant Research*, 177, 25-28. <https://doi.org/10.1016/j.smallrumres.2019.06.008>
- Ríos-Núñez, S. M., Coq-Huelva, D., & García-Trujillo, R. (2013). The Spanish livestock model: A coevolutionary analysis. *Ecological Economics*, 93, 342-350. <https://doi.org/10.1016/j.ecolecon.2013.06.019>
- Robeson, M. S., O'Rourke, D. R., Kaehler, B. D., Ziemski, M., Dillon, M. R., Foster, J. T., & Bokulich, N. A. (2020). *RESCRIPt: Reproducible sequence taxonomy reference database management for the masses*. <https://doi.org/10.1101/2020.10.05.326504>
- Rood, J. I., Adams, V., Lacey, J., Lyras, D., McClane, B. A., Melville, S. B., Moore, R. J., Popoff, M. R., Sarker, M. R., Songer, J. G., Uzal, F. A., & Van Immerseel, F. (2018). Expansion of the *Clostridium perfringens* toxin-based typing scheme. *Anaerobe*, 53, 5-10. <https://doi.org/10.1016/j.anaerobe.2018.04.011>
- Rutherford, S. -J., Jeckel, S., & Ridler, A. (2015). Characteristics of sheep flocks affected by *Streptococcus dysgalactiae* arthritis. *Veterinary Record*, 176(17), 435-435. <https://doi.org/10.1136/vr.102781>
- Sahay, S., Natesan, K., Prajapati, A., Kalleshmurthy, T., Shome, B. R., Rahman, H., & Shome, R. (2020). Prevalence and antibiotic susceptibility of *Mannheimia haemolytica* and *Pasteurella multocida* isolated from ovine respiratory infection: A study from Karnataka, Southern India. *Veterinary World*, 13(9), 1947-1954. <https://doi.org/10.14202/vetworld.2020.1947-1954>
- Saiki, R. K., Gelfand, D. H., Stoffel, S., Scharf, S. J., Higuchi, R., Horn, G. T., Mullis, K. B., & Erlich, H. A. (1988). Primer-Directed Enzymatic Amplification of DNA with a Thermostable DNA Polymerase. *Science*, 239(4839), 487-491. <https://doi.org/10.1126/science.2448875>
- Saladrigas-García, M., Durán, M., D'Angelo, M., Coma, J., Pérez, J. F., & Martín-Orúe, S. M. (2022). An insight into the commercial piglet's microbial gut colonization: from birth

- towards weaning. *Animal Microbiome*, 4(1), 68. <https://doi.org/10.1186/s42523-022-00221-9>
- Sampath, V., Song, J. H., Jeong, J., Mun, S., Han, K., & Kim, I. H. (2022). Nourishing neonatal piglets with synthetic milk and *Lactobacillus* sp. at birth highly modifies the gut microbial communities at the post-weaning stage. *Frontiers in Microbiology*, 13. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2022.1044256>
- SASAKI, E., OSAWA, R., NISHITANI, Y., & WHILEY, R. A. (2004). ARDRA and RAPD Analyses of Human and Animal Isolates of *Streptococcus gallolyticus*. *Journal of Veterinary Medical Science*, 66(11), 1467-1470. <https://doi.org/10.1292/jvms.66.1467>
- Schade, R. P., Van Rijn, M., Timmers, H. J. L. M., Dofferhoff, A. S. M., Klaassen, C. H. W., & Meis, J. F. G. M. (2006). *Clostridium cadaveris* bacteraemia: Two cases and review. *Scandinavian Journal of Infectious Diseases*, 38(1), 59-62. <https://doi.org/10.1080/00365540500388792>
- Seemann, T. (2020). *Abricate* (v1.0.0).
- Seemann, T. (2021). *Prokka* (v1.14.6).
- Seemann, T. (2025). *mlst* (2.23.0). <https://github.com/tseemann/mlst>
- Serrano, M., Climent, E., Freire, F., Martínez-Blanch, J. F., González, C., Reyes, L., Solaz-Fuster, M. C., Calvo, J. H., Jiménez, M. Á., & Codoñer, F. M. (2020). Influence of the Ovine Genital Tract Microbiota on the Species Artificial Insemination Outcome. A Pilot Study in Commercial Sheep Farms. *High-Throughput*, 9(3), 16. <https://doi.org/10.3390/ht9030016>
- Sharma, M., Wasan, A., & Sharma, R. K. (2021). Recent developments in probiotics: An emphasis on *Bifidobacterium*. *Food Bioscience*, 41, 100993. <https://doi.org/10.1016/j.fbio.2021.100993>
- Shen, J., Wu, X., Yang, Y., Lv, Y., Li, X., Ding, X., Wang, S., Yan, Z., Yan, Y., Yang, F., & Li, H. (2021). Antimicrobial Resistance and Virulence Factor of *Streptococcus dysgalactiae* Isolated from Clinical Bovine Mastitis Cases in Northwest China. *Infection and Drug Resistance*, Volume 14, 3519-3530. <https://doi.org/10.2147/IDR.S327924>
- Sheng, W.-H., Chuang, Y.-C., Teng, L.-J., & Hsueh, P.-R. (2014). Bacteraemia due to *Streptococcus gallolyticus* subspecies *pasteurianus* is associated with digestive tract malignancies and resistance to macrolides and clindamycin. *Journal of Infection*, 69(2), 145-153. <https://doi.org/10.1016/j.jinf.2014.03.010>
- Sievert, C. (2020). *Interactive Web-Based Data Visualization with R, plotly, and shiny*. Chapman and Hall/CRC. <https://plotly-r.com>
- Šlosárková, S., Pechová, A., Staněk, S., Fleischer, P., Zouharová, M., & Nejedlá, E. (2021). Microbial contamination of harvested colostrum on Czech dairy farms. *Journal of Dairy Science*, 104(10), 11047-11058. <https://doi.org/10.3168/jds.2020-19949>
- Small, A., James, C., James, S., Davies, R., Howell, M., Hutchison, M., & Buncic, S. (2007). Construction, management and cleanliness of red meat abattoir lairages in the UK. *Meat Science*, 75(3), 523-532. <https://doi.org/10.1016/j.meatsci.2006.09.002>

- Smistad, M., Tollersrud, T. S., Austbø, L., Porcellato, D., Wolff, C., Asal, B., Phythian, C. J., Oppegaard, O., & Jørgensen, H. J. (2021). Molecular detection and genotype characterization of *Streptococcus dysgalactiae* from sheep flocks with outbreaks of infectious arthritis. *Veterinary Microbiology*, 262, 109221. <https://doi.org/10.1016/j.vetmic.2021.109221>
- Smistad, M., Wolff, C., Tollersrud, T., Tømmerberg, V., Phythian, C., Kampen, A. H., & Jørgensen, H. J. (2020). Flock-level risk factors for outbreaks of infectious arthritis in lambs, Norway 2018. *Acta Veterinaria Scandinavica*, 62(1), 64. <https://doi.org/10.1186/s13028-020-00561-z>
- Smith, T. C., Male, M. J., Harper, A. L., Kroeger, J. S., Tinkler, G. P., Moritz, E. D., Capuano, A. W., Herwaldt, L. A., & Diekema, D. J. (2009). Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) Strain ST398 Is Present in Midwestern U.S. Swine and Swine Workers. *PLoS ONE*, 4(1), e4258. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0004258>
- Song, Y., Malmuthuge, N., Steele, M. A., & Guan, L. L. (2017). Shift of hindgut microbiota and microbial short chain fatty acids profiles in dairy calves from birth to pre-weaning. *FEMS Microbiology Ecology*. <https://doi.org/10.1093/femsec/fix179>
- Songer, J. G., Jones, R., Anderson, M. A., Barbara, A. J., Post, K. W., & Trinh, H. T. (2007). Prevention of porcine *Clostridium difficile*-associated disease by competitive exclusion with nontoxigenic organisms. *Veterinary Microbiology*, 124(3-4), 358-361. <https://doi.org/10.1016/j.vetmic.2007.04.019>
- Sora, V. M., Meroni, G., Martino, P. A., Soggiu, A., Bonizzi, L., & Zecconi, A. (2021). Extraintestinal Pathogenic *Escherichia coli*: Virulence Factors and Antibiotic Resistance. *Pathogens*, 10(11), 1355. <https://doi.org/10.3390/pathogens10111355>
- Stefan, G., & Baraitareanu, S. (2024). *Approaches of Milking Biosecurity and Milking Parlour Hygiene in Dairy Farms*. <https://doi.org/10.5772/intechopen.113084>
- Stefańska, I., Kwiecień, E., Didkowska, A., Kizerwetter-Świda, M., Chrobak-Chmiel, D., Sałamaszyńska-Guz, A., Żmuda, P., Anusz, K., & Rzewuska, M. (2025). Genetic analysis reveals the genetic diversity and zoonotic potential of *Streptococcus dysgalactiae* isolates from sheep. *Scientific Reports*, 15(1), 3165. <https://doi.org/10.1038/s41598-025-87781-3>
- Stewart, S., Godden, S., Bey, R., Rapnicki, P., Fetrow, J., Farnsworth, R., Scanlon, M., Arnold, Y., Clow, L., Mueller, K., & Ferrouillet, C. (2005). Preventing Bacterial Contamination and Proliferation During the Harvest, Storage, and Feeding of Fresh Bovine Colostrum. *Journal of Dairy Science*, 88(7), 2571-2578. [https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302\(05\)72933-7](https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302(05)72933-7)
- Suchodolski, J. S. (2016). Diagnosis and interpretation of intestinal dysbiosis in dogs and cats. *En Veterinary Journal* (Vol. 215, pp. 30-37). Bailliere Tindall Ltd. <https://doi.org/10.1016/j.tvjl.2016.04.011>
- Sun, F., Zhang, Q., Zhao, J., Zhang, H., Zhai, Q., & Chen, W. (2019). A potential species of next-generation probiotics? The dark and light sides of *Bacteroides fragilis* in health. *Food Research International*, 126, 108590. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2019.108590>
- Sun, J., Liao, X.-P., D'Souza, A. W., Boolchandani, M., Li, S.-H., Cheng, K., Luis Martínez, J., Li, L., Feng, Y.-J., Fang, L.-X., Huang, T., Xia, J., Yu, Y., Zhou, Y.-F., Sun, Y.-X., Deng, X.-B., Zeng, Z.-

- L., Jiang, H.-X., Fang, B.-H., ... Liu, Y.-H. (2020). Environmental remodeling of human gut microbiota and antibiotic resistome in livestock farms. *Nature Communications*, 11(1), 1427. <https://doi.org/10.1038/s41467-020-15222-y>
- Szott, V., Reichelt, B., Friese, A., & Roesler, U. (2022). A Complex Competitive Exclusion Culture Reduces *Campylobacter jejuni* Colonization in Broiler Chickens at Slaughter Age In Vivo. *Veterinary Sciences*, 9(4), 181. <https://doi.org/10.3390/vetsci9040181>
- Taagepera, R., & Nemčok, M. (2023). World population growth over millennia: Ancient and present phases with a temporary halt in-between. *Anthropocene Review*. <https://doi.org/10.1177/20530196231172423>
- Takahashi, N., Saito, K., Schachtele, C. F., & Yamada, T. (1997). Acid tolerance and acid-neutralizing activity of *Porphyromonas gingivalis*, *Prevotella intermedia* and *Fusobacterium nucleatum*. *Oral Microbiology and Immunology*, 12(6), 323-328. <https://doi.org/10.1111/j.1399-302X.1997.tb00733.x>
- Tamba, M., Pallante, I., Petrini, S., Feliziani, F., Iscaro, C., Arrigoni, N., Di Sabatino, D., Barberio, A., Cibir, V., Santi, A., Ianniello, M., Ruocco, L., & Pozzato, N. (2021). Overview of Control Programs for EU Non-regulated Cattle Diseases in Italy. *Frontiers in Veterinary Science*, 8. <https://doi.org/10.3389/fvets.2021.665607>
- Tan, H., Zhai, Q., & Chen, W. (2019). Investigations of *Bacteroides* spp. towards next-generation probiotics. *Food Research International*, 116, 637-644. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2018.08.088>
- Tappe, D., Dirks, J., Müller, R., Brederlau, J., Abele-Horn, M., Suerbaum, S., & Kurzai, O. (2005). Fatal *Clostridium tertium* septicemia in a nonneutropenic patient. *Journal of Infection*, 50(1), 76-80. <https://doi.org/10.1016/j.jinf.2004.04.005>
- Tettelin, H., Riley, D., Cattuto, C., & Medini, D. (2008). Comparative genomics: the bacterial pan-genome. *Current Opinion in Microbiology*, 11(5), 472-477. <https://doi.org/10.1016/j.mib.2008.09.006>
- The, H. C., Florez de Sessions, P., Jie, S., Pham Thanh, D., Thompson, C. N., Nguyen Ngoc Minh, C., Chu, C. W., Tran, T.-A., Thomson, N. R., Thwaites, G. E., Rabaa, M. A., Hibberd, M., & Baker, S. (2018). Assessing gut microbiota perturbations during the early phase of infectious diarrhea in Vietnamese children. *Gut Microbes*, 9(1), 38-54. <https://doi.org/10.1080/19490976.2017.1361093>
- Tiwari, P., Dwivedi, R., Bansal, M., Tripathi, M., & Dada, R. (2023). Role of Gut Microbiota in Neurological Disorders and Its Therapeutic Significance. *Journal of Clinical Medicine*, 12(4), 1650. <https://doi.org/10.3390/jcm12041650>
- Tuon, F. F., Dantas, L. R., Suss, P. H., & Tasca Ribeiro, V. S. (2022). Pathogenesis of the *Pseudomonas aeruginosa* Biofilm: A Review. *Pathogens*, 11(3), 300. <https://doi.org/10.3390/pathogens11030300>
- Van Doan, H., Soltani, M., Leitão, A., Shafiei, S., Asadi, S., Lymbery, A. J., & Ringø, E. (2022). Streptococcosis a Re-Emerging Disease in Aquaculture: Significance and Phytotherapy. *Animals*, 12(18), 2443. <https://doi.org/10.3390/ani12182443>

- van Elsas, J. D., Chiurazzi, M., Mallon, C. A., Elhottová, D., Křišťůfek, V., & Salles, J. F. (2012). Microbial diversity determines the invasion of soil by a bacterial pathogen. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 109(4), 1159-1164. <https://doi.org/10.1073/pnas.1109326109>
- Vidal, A., Martín-Valls, G. E., Tello, M., Mateu, E., Martín, M., & Darwich, L. (2019). Prevalence of enteric pathogens in diarrheic and non-diarrheic samples from pig farms with neonatal diarrhea in the North East of Spain. *Veterinary Microbiology*, 237, 108419. <https://doi.org/10.1016/j.vetmic.2019.108419>
- Virto, M., Santamarina-García, G., Amores, G., & Hernández, I. (2022). Antibiotics in Dairy Production: Where Is the Problem? En *Dairy* (Vol. 3, Número 3, pp. 541-564). MDPI. <https://doi.org/10.3390/dairy3030039>
- Wang, H., Huang, J., & Jiang, X. (2023). Perspectives on Using a Competitive Exclusion Approach to Control *Listeria monocytogenes* in Biological Soil Amendments of Animal Origin (BSAAO): A Review. *Applied Microbiology*, 3(3), 786-804. <https://doi.org/10.3390/applmicrobiol3030055>
- Wang, L., Jin, L., Xue, B., Wang, Z., & Peng, Q. (2019). Characterizing the bacterial community across the gastrointestinal tract of goats: Composition and potential function. *MicrobiologyOpen*, 8(9). <https://doi.org/10.1002/mbo3.820>
- Wang, S., Li, X., Zheng, C., Quereda, J. J., Sun, J., Yao, H., & Wu, Z. (2025). Genomic characteristics and antimicrobial resistance of the underreported zoonotic pathogen *Streptococcus pasteurianus* and its co-colonization with *Streptococcus suis*. *Veterinary Microbiology*, 303, 110428. <https://doi.org/10.1016/j.vetmic.2025.110428>
- Wang, S., Ma, M., Liang, Z., Zhu, X., Yao, H., Wang, L., & Wu, Z. (2022). Pathogenic investigations of *Streptococcus pasteurianus*, an underreported zoonotic pathogen, isolated from a diseased piglet with meningitis. *Transboundary and Emerging Diseases*, 69(5), 2609-2620. <https://doi.org/10.1111/tbed.14413>
- Wang, X., Niu, L., Wang, Y., Zhan, S., Wang, L., Dai, D., Cao, J., Guo, J., Li, L., Zhang, H., & Zhong, T. (2023). Combining 16S rRNA Sequencing and Metabolomics Data to Decipher the Interactions between Gut Microbiota, Host Immunity, and Metabolites in Diarrheic Young Small Ruminants. *International Journal of Molecular Sciences*, 24(14), 11423. <https://doi.org/10.3390/ijms241411423>
- Wang, Z., Li, J., Ma, L., Liu, X., Wei, H., Xiao, Y., & Tao, S. (2023). Metagenomic Sequencing Identified Specific Bacteriophage Signature Discriminating between Healthy and Diarrheal Neonatal Piglets. *Nutrients*, 15(7), 1616. <https://doi.org/10.3390/nu15071616>
- Ward, P. N., Field, T. R., Ditcham, W. G. F., Maguin, E., & Leigh, J. A. (2001). Identification and Disruption of Two Discrete Loci Encoding Hyaluronic Acid Capsule Biosynthesis Genes *hasA*, *hasB*, and *hasC* in *Streptococcus uberis*. *Infection and Immunity*, 69(1), 392-399. <https://doi.org/10.1128/IAI.69.1.392-399.2001>
- Ward, W. R., Hughes, J. W., Faull, W. B., Cripps, P. J., Sutherland, J. P., & Sutherst, J. E. (2002). Observational study of temperature, moisture, pH and bacteria in straw bedding, and

- faecal consistency, cleanliness and mastitis in cows in four dairy herds. *Veterinary Record*, 151(7), 199-206. <https://doi.org/10.1136/vr.151.7.199>
- Watkins, G. H., & Sharp, M. W. (1998). Bacteria Isolated from arthritic and omphalatic lesions in lambs in England and Wales. *The Veterinary Journal*, 156(3), 235-238. [https://doi.org/10.1016/S1090-0233\(98\)80132-9](https://doi.org/10.1016/S1090-0233(98)80132-9)
- Watterson, M. J., Kent, D. J., Boor, K. J., Wiedmann, M., & Martin, N. H. (2014). Evaluation of dairy powder products implicates thermophilic sporeformers as the primary organisms of interest. *Journal of Dairy Science*, 97(4), 2487-2497. <https://doi.org/10.3168/jds.2013-7363>
- Weese, J. S. (2020). *Clostridium (Clostridioides) difficile* in animals. *Journal of Veterinary Diagnostic Investigation*, 32(2), 213-221. <https://doi.org/10.1177/1040638719899081>
- White, D., Gurung, S., Zhao, D., Tabler, T., McDaniel, C., Styles, D., McKenzie, S., Farnell, Y., & Farnell, M. (2018). Foam or spray application of agricultural chemicals to clean and disinfect layer cages. *Journal of Applied Poultry Research*, 27(3), 416-423. <https://doi.org/10.3382/japr/pfx069>
- Wickham, H., Averick, M., Bryan, J., Chang, W., McGowan, L., François, R., Grolemund, G., Hayes, A., Henry, L., Hester, J., Kuhn, M., Pedersen, T., Miller, E., Bache, S., Müller, K., Ooms, J., Robinson, D., Seidel, D., Spinu, V., ... Yutani, H. (2019). Welcome to the Tidyverse. *Journal of Open Source Software*, 4(43), 1686. <https://doi.org/10.21105/joss.01686>
- Widdowson, C. A., Klugman, K. P., & Hanslo, D. (1996). Identification of the tetracycline resistance gene, tet(O), in *Streptococcus pneumoniae*. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 40(12), 2891-2893. <https://doi.org/10.1128/AAC.40.12.2891>
- Wood, D. E., Lu, J., & Langmead, B. (2019). Improved metagenomic analysis with Kraken 2. *Genome Biology*, 20(1), 257. <https://doi.org/10.1186/s13059-019-1891-0>
- Wu, Y., Hou, D., Zhan, S., Wang, L., Cao, J., Guo, J., Li, L., Zhang, H., Niu, L., & Zhong, T. (2024). Colonization profiles of gut microbiota in goat kids from neonatal to weaning period. *Frontiers in Microbiology*, 15. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2024.1467205>
- Xie, O., Davies, M. R., & Tong, S. Y. C. (2024). *Streptococcus dysgalactiae* subsp. *equisimilis* infection and its intersection with *Streptococcus pyogenes*. *Clinical Microbiology Reviews*, 37(3). <https://doi.org/10.1128/cmr.00175-23>
- Xu, S., Liu, Y., Gao, J., Zhou, M., Yang, J., He, F., Kastelic, J. P., Deng, Z., & Han, B. (2021). Comparative Genomic Analysis of *Streptococcus dysgalactiae* subspecies *dysgalactiae* Isolated From Bovine Mastitis in China. *Frontiers in Microbiology*, 12. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2021.751863>
- Yang, Q., Huang, X., Zhao, S., Sun, W., Yan, Z., Wang, P., Li, S., Huang, W., Zhang, S., Liu, L., & Gun, S. (2017). Structure and Function of the Fecal Microbiota in Diarrheic Neonatal Piglets. *Frontiers in Microbiology*, 8. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2017.00502>
- Yoshida, N., Yamashita, T., & Hirata, K. (2018). Gut Microbiome and Cardiovascular Diseases. *Diseases*, 6(3), 56. <https://doi.org/10.3390/diseases6030056>

- Zeineldin, M., Aldridge, B., & Lowe, J. (2018). Dysbiosis of the fecal microbiota in feedlot cattle with hemorrhagic diarrhea. *Microbial Pathogenesis*, 115, 123-130. <https://doi.org/10.1016/j.micpath.2017.12.059>
- Zeineldin, M., Barakat, R., Elolimy, A., Salem, A. Z. M., Elghandour, M. M. Y., & Monroy, J. C. (2018). Synergetic action between the rumen microbiota and bovine health. *Microbial Pathogenesis*, 124, 106-115. <https://doi.org/10.1016/j.micpath.2018.08.038>
- Zhang, F., Qi, N., Zeng, Y., Bao, M., Chen, Y., Liao, J., Wei, L., Cao, D., Huang, S., Luo, Q., Jiang, Y., & Mo, Z. (2020). The Endogenous Alterations of the Gut Microbiota and Feces Metabolites Alleviate Oxidative Damage in the Brain of LanCL1 Knockout Mice. *Frontiers in Microbiology*, 11. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2020.557342>
- Zhang, S., Piepers, S., Shan, R., Cai, L., Mao, S., Zou, J., Ali, T., De Vlieghe, S., & Han, B. (2018). Phenotypic and genotypic characterization of antimicrobial resistance profiles in *Streptococcus dysgalactiae* isolated from bovine clinical mastitis in 5 provinces of China. *Journal of Dairy Science*, 101(4), 3344-3355. <https://doi.org/10.3168/jds.2017-14031>
- Zhang, Y., Cheng, J., Lin, C., Li, F., Zhang, X., Li, C., Zhang, D., Yang, X., Xu, D., Zhao, Y., Zhao, L., Li, X., Tian, H., Weng, X., & Wang, W. (2025). Spatial heterogeneity determines the gastrointestinal microbiome signatures and ecological processes that govern bacterial community assembly in sheep. *Microbiology Spectrum*, 13(2). <https://doi.org/10.1128/spectrum.01110-24>
- Zhang, Y., Choi, S. H., Nogoy, K. M., & Liang, S. (2021). Review: The development of the gastrointestinal tract microbiota and intervention in neonatal ruminants. *Animal*, 15(8), 100316. <https://doi.org/10.1016/j.animal.2021.100316>
- Zhao, H., Wang, J., Peng, Y., Cai, X., Liu, Y., Huang, W., Huang, H., & Nie, Y. (2022). Genomic insights from *Paraclostridium bifermentans* HD0315_2: General features and pathogenic potential. *Frontiers in Microbiology*, 13. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2022.928153>
- Zhao, W., Wang, Y., Liu, S., Huang, J., Zhai, Z., He, C., Ding, J., Wang, J., Wang, H., Fan, W., Zhao, J., & Meng, H. (2015). The Dynamic Distribution of Porcine Microbiota across Different Ages and Gastrointestinal Tract Segments. *PLOS ONE*, 10(2), e0117441. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0117441>
- Zhong, T., Wang, Y., Wang, X., Freitas-de-Melo, A., Li, H., Zhan, S., Wang, L., Cao, J., Dai, D., Guo, J., Li, L., Zhang, H., Liu, J., & Niu, L. (2022). Diarrhea in suckling lambs is associated with changes in gut microbiota, serum immunological and biochemical parameters in an intensive production system. *Frontiers in Microbiology*, 13. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2022.1020657>
- Zhu, H. L., Zhao, X. W., Han, R. W., DU, Q. J., Qi, Y. X., Jiang, H. N., Huang, D. W., & Yang, Y. X. (2021). Changes in bacterial community and expression of genes involved in intestinal innate immunity in the jejunum of newborn lambs during the first 24 hours of life. *Journal of Dairy Science*, 104(8), 9263-9275. <https://doi.org/10.3168/jds.2020-19888>
- Zhuang, Y., Chai, J., Cui, K., Bi, Y., Diao, Q., Huang, W., Usdrowski, H., & Zhang, N. (2020). Longitudinal Investigation of the Gut Microbiota in Goat Kids from Birth to Postweaning. *Microorganisms*, 8(8), 1111. <https://doi.org/10.3390/microorganisms8081111>

Zhuang, Y., Liu, S., Gao, D., Xu, Y., Jiang, W., Chen, T., Xiao, J., Wang, J., Hou, G., Li, S., Zhao, X., Huang, Y., Li, S., Zhang, S., Li, M., Wang, W., Li, S., & Cao, Z. (2024). The Bifidobacterium-dominated fecal microbiome in dairy calves shapes the characteristic growth phenotype of host. *npj Biofilms and Microbiomes*, 10(1), 59. <https://doi.org/10.1038/s41522-024-00534-4>

Bases de datos

World Organization for Animal Health. (2024). World Animal Health Information System. Recuperado de <https://wahis.woah.org/#/home>

Anexos

Anexo I

Tabla 1. Abundancia relativa de los 10 grupos más abundantes para los grupos estudiados en la evolución temporal de boca mojada. Para corderos entre 0-12h, 12-24h y 24-36h de vida y abundancia relativa para los corderos WT6 y WT7

0-12h	%	12-24h	%	24-36h	%	WT6	%	WT7	%
<i>Staphylococcus</i>	25,7	<i>Clostridium</i>	44,58	<i>Escherichia_Shigella</i>	32,62	<i>Escherichia_Shigella</i>	92,31	<i>Clostridium</i>	54,19
<i>Acinetobacter</i>	11,59	<i>Escherichia_Shigella</i>	42,08	<i>Lactobacillus</i>	16,17	<i>Staphylococcus</i>	1,49	<i>Escherichia_Shigella</i>	35,78
<i>Jeotgalicoccus</i>	7,01	<i>Enterococcus</i>	4,64	<i>Clostridium</i>	14,85	<i>Jeotgalicoccus</i>	0,86	<i>Enterococcus</i>	3,93
<i>Salinicoccus</i>	5,26	<i>Streptococcus</i>	2,09	<i>Enterococcus</i>	12,5	<i>Dietzia</i>	0,70	<i>Staphylococcus</i>	2,13
<i>Psychrobacter</i>	3,4	<i>Terrisporobacter</i>	1,07	<i>Ruminococcus_gnavus_group</i>	7,15	<i>Salinicoccus</i>	0,63	<i>Paraclostridium</i>	0,85
<i>Bacillaceae</i>	2,88	<i>Lactobacillus</i>	1,01	<i>Bacilli</i>	5,66	<i>Lactobacillus</i>	0,46	<i>Terrisporobacter</i>	0,84
<i>Facklamia</i>	2,49	<i>Mannheimia</i>	0,79	<i>Blautia</i>	1,71	<i>Corynebacterium</i>	0,45	<i>Enterobacteriaceae</i>	0,59
<i>Planococcaceae</i>	2,07	<i>Enterobacteriaceae</i>	0,77	<i>Lachnospiraceae</i>	1,62	<i>Brachybacterium</i>	0,28	<i>Mannheimia</i>	0,56
<i>Atopostipes</i>	1,77	<i>Proteus</i>	0,37	<i>Veillonella</i>	1,32	<i>Bacillaceae</i>	0,28	<i>Klebsiella</i>	0,24
<i>Escherichia_Shigella</i>	1,68	<i>Clostridiaceae</i>	0,34	<i>Sutterella</i>	1,21	<i>Clostridium</i>	2,54	<i>Paeniclostridium</i>	0,23
Otros	36,16	Otros	2,26	Otros	5,21	Otros	2,32	Otros	0,66

Tabla 2. Abundancia relativa media de los 10 grupos más abundantes a lo largo del digestivo de 9 corderos con boca mojada

ASV	Abomaso	Duodeno	Yeyuno	Íleon	Ciego	Colon	Recto	Yeyuno-1	Yeyuno-2
<i>Escherichia_Shigella</i>	23,3	57,45	49,05	44,42	37,55	47,51	51,49	36,16	39,98
<i>Clostridium</i>	0,85	8,3	20,03	25,13	24,32	16,44	16,57	0,02	21,32
<i>Lactobacillus</i>	39,86	18,75	11,13	5,65	8,19	9,41	9,32	50,78	24,97
<i>Streptococcus</i>	5,11	3,08	4,89	7,22	5,27	5,81	1,38	0,45	4,07
<i>Enterococcus</i>	2,49	3,64	3,87	3,01	4,36	4,91	7,61	0,87	1,49
<i>Bacilli</i>	6,39	5,18	2,39	0,94	1,06	1	0,64	11,73	4,84
<i>Bacteroides</i>	7,59	0,01	0	1,89	4	2,44	3,56	0	0
<i>Lachnospiraceae</i>	0,01	0	1,34	3,44	3,39	3,9	0,88	0	0,13
<i>Paraclostridium</i>	0,08	2,34	2,78	0,6	2,19	1,1	0,87	0	0,22
<i>Mannheimia</i>	3,51	0,01	0,12	0,73	2,43	0,23	2,07	0	0,28
Otros	10,81	1,24	4,4	6,97	7,24	7,25	5,61	0	2,7

Tabla 3. Abundancia relativa media de los 11 grupos más abundantes en el abomaso de corderos vivos

ASV	WA1	WA2	WA3	ASV	WA4
<i>Escherichia_Shigella</i>	7,47	60,78	9,24	<i>Bacteroides</i>	46,88
<i>Lactococcus</i>	38,11	4,1	0,16	<i>Mannheimia</i>	14,22
<i>Mannheimia</i>	8,08	2,17	27,54	<i>Porphyromonas</i>	9,33
<i>Enterobacteriaceae</i>	20,28	0,46	0,02	<i>Pasteurellaceae</i>	6,22
<i>Pasteurellaceae</i>	2,06	4,23	13,06	<i>Streptococcus</i>	4,36
<i>Streptococcus</i>	0,66	3,8	14,8	<i>Flavobacteriaceae</i>	3,03
<i>Enterococcus</i>	8,1	5,18	1,34	<i>Fusobacterium</i>	2,76
<i>Pseudomonas</i>	3,29	1,07	8,12	<i>Escherichia_Shigella</i>	2,68
<i>Clostridium</i>	0	10	0,55	<i>Enterococcus</i>	1,63
<i>Bibersteinia</i>	2,42	4,91	2,74	<i>Streptobacillus</i>	1,62
<i>Bergeyella</i>	0	0,17	8,92	<i>Clostridium</i>	1,52
Otros	9,53	3,13	13,51	Otros	5,75

Tabla 4. Factores de virulencia identificados en aislados de *E. coli* a través de VFDB.

Gen	Función	Gen	Función	Gen	Función
afaA-VIII	AfaA-VIII_protein	entC	isochorismate-synthase1	espL1	TypeIII_secretion_system_effector_espL1
afaB-VIII	chaperone_protein_AfaB-VIII	entD	phosphopantetheinyl-transferase_component_of_enterobactin_synthase_multienzyme_complex	espL2	TypeIII_secretion_system_effector_espL2
afaC-VIII	AfaC-VIII usher_protein	entE	23-dihydroxybenzoate-AMPligase_component_of_enterobactin_synthase_multienzyme_complex	espL4	TypeIII_secretion_system_effector_EspL4
afaD-VIII	AfaD-VIII_protein	entF	enterobactin_synthase_multienzyme_complex_component_ATP-dependent	espR1	TypeIII_secretion_system_effector_espR1
afaE-VIII	AfaE-VIII_adhesin	entS	enterobactin_exporter_iron-regulated	espR3	TypeIII_secretion_system_effector_espR3
afaF-VII	AfaF-VII_protein	escC	TypeIII_secretionsystem_secretinEscC	espR4	TypeIII_secretion_system_effector_espR4
aslA	putative_aryl_sulfatase	escD	TypeIII_secretion_system_outer_MS_ring-proteinEscD	espX1	TypeIII_secretion_system_effector_EspX1
astA	heat-stable_enterotoxin_1	escE	chaperone_for_EscF	espX2	TypeIII_secretion_system_effector_EspX2
cesAB	chaperone_for_EspA_and_EspB	escF	TypeIII_secretionsystem_needle_filament_proteinEscF	espX4	TypeIII_secretion_system_effector_EspX4
cesD2	chaperone_for_EspD	escG	chaperone_for_EscF	espX5	TypeIII_secretion_system_effector_EspX5
cesD	chaperone_for_EspB_and_EspD	escI	TypeIII_secretion_system_inner_rod_componentEscI	espX6	TypeIII_secretion_system_effector_EspX6
cesF	CesF_chaperone_for_EspF	escJ	TypeIII_secretion_system_inner_MS_ring_proteinEscJ	espY1	TypeIII_secretion_system_effector_EspY1
cesL	chaperone_for_SepL	escL	negative_regulator_EscL_stator_protein	espY2	TypeIII_secretion_system_effector_EspY2
cesT	multieffector_chaperone	escN	ATPase_EscN	espY3	TypeIIIsecretion_system_effector_EspY3
chuS	hemeoxygenase_ChuC	escO	positive_regulatorEscO	espY4	TypeIII_secretion_system_effector_EspY4

chuT	periplasmicheme-binding_protein_Chut	escP	TypeIII_secretion_system_needle_length_regulatorEscP	etgA	T3SS-associated_peptidoglycanlytic_enzyme
chuU	hemepermease_protein_Chut	escR	TypeIII_secretion_system_minor_export_apparatus_protein_EscR	f17d-A	F17fimbrial_major_subunit_protein
chuV	ATP-binding_hydrophilic_protein_Chut	escS	TypeIII_secretion_system_minor_export_apparatus_protein_EscS	f17d-C	F17fimbrial_uscher
chuW	Putative_oxygen_independent_coproporphyrinogen_IIIoxidase	escT	TypeIII_secretion_system_minor_export_apparatus_protein_EscT	f17d-D	F17fimbrial_chaperone
chuX	putative_heme-binding_protein_Chut	escU	TypeIII_secretion_system_export_apparatus_switch_protein_EscU	f17d-G	F17fimbrial_adhesin
chuY	ChuY_protein	escV	TypeIII_secretion_system_major_export_apparatus_protein	faeC	FaeC_protein
cif	TypeIII_secretion_system_effectorC_if_cyclomodulin	espA	TypeIII_secretion_system_translocator_protein_EspA	faeD	fimbrial_usher_protein_FaeD
csgB	minorcurlin_subunit_precursor_curlineucleaseator_proteinCsgB	espB	EspB_protein	faeE	fimbrial_chaperone_FaeE
csgD	DNA-binding_transcriptional_regulatorCsgD	espB	TypeIII_secretion_system_translocator_protein_EspB_pore_protein	faeF	fimbrial_protein_FaeF
csgE	curli_production_assembly/transport_proteinCsgE	espD	EspD_protein	faeH	fimbrial_protein_FaeH
csgF	curli_production_assembly/transport_proteinCsgF	espD	TypeIII_secretion_system_translocator_protein_EspD_pore_protein	faeI	fimbrial_protein_FaeI
csgG	curli_production_assembly/transport_proteinCsgG	espF	EspF_protein	fdeC	adhesin_FdeC
eae	intimin	espG	TypeIII_secretionsystemeffectorEspGGTPaseactivatingprotein	fepA	ferrienterobactin_outer_membrane_transporter

Caracterización microbiana de las diarreas neonatales en ganado rumiante y porcino
bajo el enfoque 'Una Salud'

entA	23-dihydro-23-dihydroxybenzoatedehydrogenase	espH	TypeIIsecretionsystemeffectorspHrhoGEFinhibitor	fepB	ferrienterobactin_ABC_transporter_periplasmic_binding_protein
entB	isochorismatase	espJ	ribosyl_transferase	fepC	ferrienterobactin_ABC_transporter_ATPase
fepD	ferrienterobactin_ABCtransporter_perm ease	fimB	Type1_fimbriae_Regulatory_protein_fimB	fimF	FimF_protein_precursor
fepG	iron-enterobactin_ABC_transporter_permeas e	fimC	Chaperone_protein_fimC_precursor	fimG	FimG_protein_precursor
fes	enterobactin/ferricenterobactin_esteras e	fimD	Outermembrane_usher_protein_fimD_precursor	fimH	FimH_protein_precursor
fimA	Type-1fimbria_lprotein_Achain_precursor	fimE	Type1_fimbriae_Regulatory_protein_fimE	fimI	Fimbrin-likeprotein_fimI_precursor
fyuA	pesticin/yersiniabactin_receptor_protein	map	TypeIII_secretion_system_effector_MapRho_guanine_e xchange_factor	shuA	outermembrane_heme/hemoglobin_receptor_S huA
gspC	general_secretion_pathway_proteinC	nleB1	TypeIII_secretion_system_effector_nleB1	shuS	heme/hemoglobin_transport_protein_ShuS
gspD	general_secretion_pathway_proteinD	nleB2	TypeIII_secretion_system_effector_NleB2	shuT	periplasmic_binding_protein_ShuT
gspE	general_secretion_pathway_proteinE	nleC	TypeIII_secretion_system_effector_NleC_zinc_metallo_ protease	shuX	shu_locus_protein_ShuX
gspF	general_secretion_pathway_proteinF	nleD	TypeIIsecretionsystemeffectorsNleD	shuY	shu_locus_protein_ShuY
gspG	general_secretion_pathway_proteinG	nleE	TypeIIsecretionsystemeffectorsNleE	stcE	metalloprotease
gspH	general_secretion_pathway_proteinH	nleF	TypeIIsecretionsystemeffectorsNleFscapaseinhibitor	stx1B	shiga-like_toxin1_subunitB_encoded_within_prophag e_CP-933V

gspl	general_secretion_pathway_proteinI	nleG7'	TypeIIsecretionsystemeffectornleG7E3UbiquitinLigase	stx2A	shiga-liketoxinII-A_subunit_encoded_by_bacteriophage_BP-933W
gspl	general_secretion_pathway_proteinJ	nleH1	TypeIIsecretionsystemeffectornleH1	stx2B	shiga-liketoxinIIB_subunit_encoded_bybacteriophage_BP-933W
gspK	general_secretion_pathway_proteinK	nleH2	TypeIIsecretionsystemeffectornleH2	stxA	Shigatoxin_subunitA;RNA-N-glycosidase;catalytic_subunit
gspl	general_secretion_pathway_proteinL	ompA	outermembraneproteinA	vat	Haemoglobin_protease
gspM	general_secretion_pathway_proteinM	ospG	typeIIsecretionsystemeffectorkinaseOspG	yagV/ecpE	E.coli_common_pilus_chaperone_EcpE
gtrA	bactoprenol-linkedglucose_translocase/flippase	paa	outermembraneadhesinPaa	yagW/ecpD	polymerized_tip_adhesin_of_ECP_fibers
hlyA	hemolysin_toxin_protein	papB	regulatoryproteinPapB	yagX/ecpC	E.coli_common_pilus_usher_EcpC
hlyB	hemolysin_transport_protein	papC	usherproteinPapC	yagY/ecpB	E.coli_common_pilus_chaperone_EcpB
hlyC	hemolysin_transport_protein	papD	chaperoneproteinPapD	yagZ/ecpA	E.coli_common_pilus_structural_subunitEcpA
hlyD	hemolysin_transport_protein	papE	PpilusminorsubunitPapE	ybtA	transcriptional_regulator_YbtA
iroB	glucosyltransferase_IroB	papF	PpilusminorsubunitPapF	ybtE	yersiniabactin_siderophore_biosynthetic_protein
iroC	ATPbinding_cassette_transporter	papG	PpilustipadhesinPapG	ybtP	lipoprotein_innrmembrane_ABC-transporter
iroD	esterase	papH	PpilusterminationsubunitPapH	ybtQ	inner_membrane_ABC-transporterYbtQ
iroE	esterase	papI	regulatoryproteinPapI	ybtS	salicylate_synthase_Irp9

Caracterización microbiana de las diarreas neonatales en ganado rumiante y porcino
bajo el enfoque 'Una Salud'

iroN	salmochelin_receptor_IroN	papJ	PpilusasassemblyproteinPapJ	ybtT	yersinia_bactin_biosynthetic_protein_YbtT
irp1	yersiniabactin_biosynthetic_proteinIrp1	papK	PpilusminorsubunitPapK	ybtU	yersinia_bactin_biosynthetic_protein_YbtU
irp2	yersiniabactin_biosynthetic_proteinIrp2	papX	PapXproteinregulatesflagellumsynthesisstorepressmotility	ybtX	putative_signal_transducer
iucA	aerobactin_siderophore_biosynthesis_protein_iucD	pic	serineproteaseprecursor	ykgK/ecpR	regulator_protein_EcpR
iucB	aerobactin_siderophore_biosynthesis_protein_iucB	senB	enterotoxin		
iucC	aerobactin_siderophore_biosynthesis_protein_iucC	sepD	TypeIII_secretion_system_secretion_switch_protein_SepD		
iucD	L-lysine6-monooxygenase_iucD	sepL	TypeIII_secretion_system_secretion_gate_keeper_SepL		
iutA	ferrica_erobactin_receptor_precursor_iutA	sepQ/escQ	TypeIII_secretion_system_Cring_protein_EscQ		
kpsD	KpsD_protein	sfaX	regulatory_protein_SfaX		
kpsM	KpsM_protein	map	TypeIII_secretion_system_effector_MapRho_guanine_exchange_factor		

Tabla 5. Caracterización de aislados tomados de animales afectados por el síndrome de la boca mojada.

ID-Secuenciación	ID-Muestra	Localización	Muestra	Kraken-2	MLST-Achtman esquema	MLST-Pasteur esquema	Serotipo-H Antígeno	Serotipo-O Antígeno
MS6529	M74-1-1	Rectum	Swab	<i>Escherichia coli</i>	10	466	H31	O73
MS6530	M74-1-2	Rectum	Swab	<i>Escherichia coli</i>	446	397	H8	O23
MS6531	M74-1-3	Rectum	Swab	<i>Escherichia coli</i>	1882	416	H4	O23
MS6534	M74- 3-1	Rectum	Swab	<i>Escherichia coli</i>	297	487	H8	O45
MS6535	M74- 3-2	Rectum	Swab	<i>Escherichia coli</i>	109	-	H8	O8
MS6651	M74-5-1	Rectum	Swab	<i>Escherichia coli</i>	1882	416	H4	O23
MS6652	M74-5-2	Rectum	Swab	<i>Escherichia coli</i>	10	367	H40	O90
MS6653	M74-5-3	Rectum	Swab	<i>Escherichia fergusonii</i>	-	-	H2	-
MS6656	M74-7-1	Rectum	Swab	<i>Escherichia coli</i>	1611	-	H19	O100
MS6657	M74-7-2	Rectum	Swab	<i>Escherichia coli</i>	1611	-	H19	O100
MS6658	M74-7-3	Rectum	Swab	<i>Escherichia coli</i>	1611	-	H19	O100
MS7451	M6-1R-1	Rectum	Swab	<i>Escherichia coli</i>	345	636	H21	O125ab
MS7453	M6-2R-1	Rectum	Swab	<i>Escherichia coli</i>	10	835	H4	O154
MS7455	M6-3R-1	Rectum	Swab	<i>Escherichia coli</i>	57	-	H4	O176
MS7457	M6-4R-1	Rectum	Swab	<i>Escherichia coli</i>	57	-	H4	O176
MS7459	M6-5R-1	Rectum	Swab	<i>Escherichia coli</i>	117	48	H4	O24
MS7461	M6-6R-1	Rectum	Swab	<i>Escherichia coli</i>	1131	938		-
MS7468	M7-1R-1	Rectum	Swab	<i>Escherichia coli</i>	155	21	H21	-
MS7470	M7-2R-1	Rectum	Swab	<i>Escherichia coli</i>	43	-	H10	O5
MS7472	M7-3R-1	Rectum	Swab	<i>Escherichia coli</i>	69	3	H18	O17/O44
MS7474	M7-4R-1	Rectum	Swab	<i>Escherichia coli</i>	3595	-	H45	O154
MS7476	M7-5R-1	Rectum	Swab	<i>Escherichia coli</i>	155	21	H21	-
MS7478	M8-1R-1	Rectum	Swab	<i>Escherichia coli</i>	295	349	H11	O159
MS7481	M8-2R-1	Rectum	Swab	<i>Escherichia coli</i>	227	638	H10	O9

MS7485	M8-4R-1	Rectum	Swab	<i>Escherichia coli</i>	1819	-	H28	O166
MS7487	M8-5R-1	Rectum	Swab	<i>Escherichia coli</i>	5841	-	H28	-
MS7490	M9-1R-1	Rectum	Swab	<i>Escherichia coli</i>	2325	647	H25	O45
MS7492	M9-2R-1	Rectum	Swab	<i>Escherichia coli</i>	362	46	H1	O15
MS7494	M9-3R-1	Rectum	Swab	<i>Escherichia coli</i>	108	946	H15	O13/O129
MS7496	M9-4R-1	Rectum	Swab	<i>Escherichia coli</i>	10	466	H32	-
MS7498	M9-5R-1	Rectum	Swab	<i>Escherichia coli</i>	56	366	H21	O21
MS7502	M10-2R-1	Rectum	Swab	<i>Escherichia coli</i>	-	3	H18	O17/O44
MS7504	M10-3R-1	Rectum	Swab	<i>Escherichia coli</i>	301	917	H2	O180
MS7506	M10-4R-1	Rectum	Swab	<i>Escherichia coli</i>	69	-	H18	O17/O44
MS7510	M11-1R-1	Rectum	Swab	<i>Escherichia coli</i>	362	46	H6	O7
MS7512	M11-2R-1	Rectum	Swab	<i>Escherichia coli</i>	117	641		-
MS7514	M11-3R-1	Rectum	Swab	<i>Escherichia coli</i>	295	-	H16	-
MS7516	M11-4R-1	Rectum	Swab	<i>Escherichia coli</i>	295	469	H16	-
MS7518	M12-1R-1	Rectum	Swab	<i>Escherichia coli</i>	58	-	H25	O8
MS7520	M12-2R-1	Rectum	Swab	<i>Escherichia coli</i>	117	48	H19	-
MS7522	M12-3R-1	Rectum	Swab	<i>Escherichia coli</i>	58	-	H25	O8
MS7524	M12-4R-1	Rectum	Swab	<i>Escherichia coli</i>	-	7	H9	O8
MS7526	M12-5R-1	Rectum	Swab	<i>Escherichia coli</i>	-	7	H9	O8
MS7928	M13-2R-1	Rectum	Swab	<i>Escherichia coli</i>	154	338	H38	O187
MS7930	M13-3R-1	Rectum	Swab	<i>Escherichia coli</i>	-	305	H18	-
MS7932	M13-4R-1	Rectum	Swab	<i>Escherichia coli</i>	10	2	H33	O1
MS7934	M13-5R-1	Rectum	Swab	<i>Escherichia coli</i>	155	21	H51	O8
MS7936	M14-1R-1	Rectum	Swab	<i>Escherichia coli</i>	-	-	H32	O53
MS7938	M14-2R-1	Rectum	Swab	<i>Escherichia coli</i>	101	88	H40	O109
MS7940	M14-3R-1	Rectum	Swab	<i>Escherichia coli</i>	744	2	H10	O101
MS7942	M14-4R-1	Rectum	Swab	<i>Escherichia coli</i>	101	88	H40	O109
MS7944	M14-5R-1	Rectum	Swab	<i>Escherichia coli</i>	58	-	H25	O11
MS7946	M15-1R-1	Rectum	Swab	<i>Escherichia coli</i>	155	21	H21	-

MS7948	M15-2R-1	Rectum	Swab	<i>Escherichia coli</i>	-	-	H15	O23
MS7950	M15-3R-1	Rectum	Swab	<i>Escherichia coli</i>	-	-	H7	O147
MS7952	M15-4R-1	Rectum	Swab	<i>Escherichia coli</i>	162	893	H19	O8
MS7954	M15-5R-1	Rectum	Swab	<i>Escherichia coli</i>	162	-	H19	-
MS7956	M18-1R-1	Rectum	Swab	<i>Escherichia coli</i>	58	24	H17	O9
MS7958	M18-2R-1	Rectum	Swab	<i>Escherichia coli</i>	58	24	H17	O9
MS7960	M18-3R-1	Rectum	Swab	<i>Escherichia coli</i>	57	-	H4	O176
MS7962	M18-4R-1	Rectum	Swab	<i>Escherichia coli</i>	297	487	H8	O45
MS7964	M18-5R-1	Rectum	Swab	<i>Escherichia coli</i>	388	339	H2	-
MS7965	M18-6-1-1	Contenido intestinal	Content	<i>Escherichia coli</i>	5841	-	H28	-
MS7966	M18-6-2-1	Contenido intestinal	Content	<i>Escherichia coli</i>	69	3	H18	O15
MS7967	M18-6-3-1	Contenido intestinal	Content	<i>Escherichia coli</i>	75	-	H8	-
MS7968	M18-7-1-1	Contenido intestinal	Content	<i>Escherichia coli</i>	2002	-	H1	O5
MS7969	M18-7-2-1	Contenido intestinal	Content	<i>Escherichia coli</i>	23	-	H16	-
MS7970	M18-7-3-1	Contenido intestinal	Content	<i>Escherichia coli</i>	58	24	H17	O9
MS7976	M18-11-1.1	Rectum	Swab	<i>Escherichia coli</i>	58	24	H25	O9
MS7977	M18-11-2.1	Rectum	Swab	<i>Escherichia coli</i>	6345	755	H7	O83
MS7978	M18-11-3.1	Rectum	Swab	<i>Escherichia coli</i>	2002	-	H1	O5
MS7979	M18-11-4.1	Rectum	Swab	<i>Escherichia coli</i>	25	-	H2	O128ac
MS7980	M18-11-5.1	Rectum	Swab	<i>Escherichia coli</i>	-	339	H2	-
MS7982	M19-1R-1	Rectum	Swab	<i>Escherichia coli</i>	227	638	H10	O9
MS7984	M19-2R-1	Rectum	Swab	<i>Escherichia coli</i>	69	3	H18	O17/O44
MS7986	M19-3R-1	Rectum	Swab	<i>Escherichia coli</i>	2175	-	H16	O103

Caracterización microbiana de las diarreas neonatales en ganado rumiante y porcino
bajo el enfoque 'Una Salud'

MS7988	M19-4R-1	Rectum	Swab	<i>Escherichia coli</i>	278	-	H7	-
MS7990	M19-5R-1	Rectum	Swab	<i>Escherichia coli</i>	8103	935	H34	O9
MS8011	M17-1-1	Rectum	Swab	<i>Escherichia coli</i>	-	716	H30	O9
MS8012	M17-2-1	Rectum	Swab	<i>Escherichia coli</i>	-	716	H30	O9
MS9392	M84-1-1-ID	Small intestine	Content	<i>Escherichia coli</i>	88	66	H12	-
MS9393	M84-1-2-ID	Small intestine	Content	<i>Escherichia coli</i>	88	66	H12	-
MS9394	M84-1-3-ID	Small intestine	Content	<i>Escherichia coli</i>	88	66	H12	-
MS9395	M84-1-4-ID	Small intestine	Content	<i>Escherichia coli</i>	410	7	H9	O8
MS9396	M84-1-5-ID	Small intestine	Content	<i>Escherichia coli</i>	88	66	H12	-
MS9397	M84-1-1-IG	Small intestine	Content	<i>Escherichia coli</i>	88	66	H12	-
MS9398	M84-1-2-IG	Small intestine	Content	<i>Escherichia coli</i>	88	-	H12	-
MS9399	M84-1-3-IG	Large intestine	Content	<i>Escherichia coli</i>	-	-	H12	-
MS9400	M84-1-4-IG	Large intestine	Content	<i>Escherichia coli</i>	88	66	H12	-
MS9401	M84-1-5-IG	Large intestine	Content	<i>Escherichia coli</i>	88	66	H12	-
MS9402	M84-1-1-AB	Abomasum	Content	<i>Escherichia coli</i>	88	-	H12	-
MS9403	M84-1-2-AB	Abomasum	Content	<i>Escherichia coli</i>	88	-	-	-
MS9404	M84-1-3-AB	Abomasum	Content	<i>Escherichia coli</i>	88	66	H12	-
MS9405	M84-1-4-AB	Abomasum	Content	<i>Escherichia coli</i>	88	66	H12	-
MS9406	M84-1-5-AB	Abomasum	Content	<i>Escherichia coli</i>	69	3	H18	O15
MS10414	M29-1 H5.1	Rectum	Swab	<i>Escherichia coli</i>	227	638	H10	-

Caracterización microbiana de las diarreas neonatales en ganado rumiante y porcino
bajo el enfoque 'Una Salud'

MS10415	M29-1 H5.2	Rectum	Swab	<i>Escherichia coli</i>	6071	-	H45	-
MS10416	M29-1 H5.3	Rectum	Swab	<i>Escherichia coli</i>	-	-	H10	O181
MS10418	M29-1 H6.2	Rectum	Swab	<i>Escherichia coli</i>	1670	-	H45	O23
MS10419	M29-1 H6.3	Rectum	Swab	<i>Escherichia coli</i>	58	24	H25	O8
MS10420	M29.3 AB4.1	Abomasum	Content	<i>Escherichia coli</i>	25	-	H2	O128ac
MS10422	M29.3 AB4.3	Abomasum	Content	<i>Escherichia coli</i>	56	-	H51	-

Tabla 6. Recuentos de coliformes totales y anaerobios mesófilos en camas, heces maternas, placentas y calostro.

COLIFORMES				ANAEROBIOS MESÓFILOS			
Camas				Camas			
Muestra	ID	Media	Desviación estándar	Muestra	ID	Media	Desviación estándar
M28-5-CM1	B1	2,09E+06	1,78E+05	M28-5-CM1	B1	4,90E+08	8,54E+07
M28-5-CM2	B2	2,59E+07	5,25E+04	M28-5-CM2	B2	7,67E+08	5,86E+07
M28-5-CM3	B3	3,87E+08	5,80E+07	M28-5-CM3	B3	7,10E+08	6,00E+07
M29-5-CM1	B4	1,07E+06	1,57E+05	M29-5-CM1	B4	4,60E+08	4,00E+07
M29-5-CM2	B5	1,05E+06	1,56E+05	M29-5-CM2	B5	1,30E+08	6,19E+06
Media_total		8,34E+07		Media_total		5,11E+08	
Heces maternas				Heces maternas			
Muestra	ID	Media	Desviación estándar	Muestra	ID	Media	Desviación estándar
M28-2-HE1	F1	2,62E+04	3,64E+03	M28-2-HE1	F1	3,85E+06	7,57E+05
M28-2-HE2	F2	2,56E+04	4,56E+03	M28-2-HE2	F2	5,42E+06	3,19E+05
M28-2-HE3	F3	1,04E+04	2,78E+02	M28-2-HE3	F3	2,25E+06	2,20E+05
M28-2-HE4	F4	7,91E+03	2,41E+02	M28-2-HE4	F4	2,86E+06	1,09E+05
M28-2-HE5	F5	7,09E+03	6,56E+02	M28-2-HE5	F5	2,18E+06	8,67E+04
M28-2-HE6	F6	4,58E+04	4,54E+03	M28-2-HE6	F6	3,91E+07	9,09E+05
M28-2-HE7	F7	9,77E+04	5,75E+03	M28-2-HE7	F7	3,85E+07	7,57E+06
Media_total		3,15E+04		Media_total		1,34E+07	

Placenta				Placenta			
Muestra	ID	Media	Desviación estándar	Muestra	ID	Media	Desviación estándar
M28-6-P1	P1	2,23E+03	3,67E+02	M28-6-P1	P1	2,60E+06	2,65E+05
M28-6-P2	P2	2,45E+02	2,41E+01	M28-6-P2	P2	6,00E+06	7,44E+05
M28-6-P3	P3	3,61E+03	3,67E+02	M28-6-P3	P3	1,76E+05	1,89E+04
Media_total		2,03E+03		Media_total		2,93E+06	
Calostro				Calostro			
Muestra	ID	Media	Desviación estándar	Muestra	ID	Media	Desviación estándar
M84-2-1	C1	0,00E+00	0,00E+00	M84-2-1	C1	0	0
M84-2-2	C2	0,00E+00	0,00E+00	M84-2-2	C2	0	0
M84-2-3	C3	0,00E+00	0,00E+00	M84-2-3	C3	0	0
M85-1	C4	0,00E+00	0,00E+00	M85-1	C4	0	0
M85-2	C5	0,00E+00	0,00E+00	M85-2	C5	0	0
M85-3	C6	0,00E+00	0,00E+00	M85-3	C6	0	0
M28-4-C1	C7	0,00E+00	0,00E+00	M28-4-C1	C7	0	0
M28-4-C2	C8	0,00E+00	0,00E+00	M28-4-C2	C8	0	0
M28-4-C3	C9	0,00E+00	0,00E+00	M28-4-C3	C9	0	0

Tabla 7. Abundancia relativa media de los 10 grupos más abundantes, en los focos de contaminación estudiados para el síndrome de la boca mojada.

Bucal_Madres		Heces Madres-Granja A		Heces Madres -Granja G	
ASV	TOTAL	ASV	TOTAL	ASV	TOTAL
g__Streptococcus	15,83	f__Lachnospiraceae	9,24	g__Arcanobacterium	12,28
g__Bibersteinia	14,11	g__Bacteroides	7,79	g__Porphyromonas	8,56
g__Mannheimia	7,69	g__Treponema	6,69	g__Psychrobacter	7,48
g__Psychrobacter	7,41	g__Christensenellaceae_R-7_group	5,76	g__Olsenella	6,41
g__Porphyromonas	4,92	g__Rikenellaceae_RC9_gut_group	5,44	o__Bacteroidales	5,55
f__Pasteurellaceae	4,66	g__Ruminococcus	4,2	g__Proteiniphilum	4,42
g__Moraxella	3,99	g__Eubacterium_coprostanoligenes_group	4,02	f__Lachnospiraceae	4,08
g__Proteiniphilum	3,08	g__Alistipes	3,98	g__Bacteroides	3,11
g__Neisseria	2,33	g__Akkermansia	2,91	g__Murdochella	2,77
g__Alysiella	2,15	o__Bacteroidales	2,61	g__Streptococcus	1,84
others	33,84	others	47,36	others	43,48
Vaginal		Placenta Seca		Placenta fresca	
ASV	TOTAL	ASV	TOTAL	ASV	TOTAL
g__Streptobacillus	30,34	g__Psychrobacter	29,62	g__Jeotgalicoccus	11,97
g__Fusobacterium	10,85	g__Jeotgalicoccus	18,75	g__Corynebacterium	8,45
g__Histophilus	9,45	g__Facklamia	11,64	g__Atopostipes	7,09
f__Leptotrichiaceae	8,88	g__Atopostipes	10,9	g__Alloiococcus	6,24
g__Corynebacterium	5,08	g__Acinetobacter	8,05	g__Psychrobacter	5,71
g__Mannheimia	4,73	g__Desemzia	3,37	f__Bacillaceae	4,81
g__Alloiococcus	3,04	g__Jeotgalibaca	3,13	g__Facklamia	3,81
g__Porphyromonas	2,27	f__Aerococcaceae	2,09	g__Ulvibacter	3,25
g__Anaerococcus	2,02	g__Carnobacterium	1,95	f__Lachnospiraceae	2,8
g__Peptoniphilus	1,48	g__Oceanisphaera	1,93	g__ChristensenellaceaeR7_group	2,39
others	21,85	others	8,58	others	43,48

Tabla 8. Perfil MLST por el esquema sbsec, de los tres aislados de *S. gallolyticus sub pasteurianus*.

ID-Aislado	Esquema	ST	Gen1	Gen2	Gen3	Gen4	Gen5	Gen6	Gen7	Gen8	Gen9	Gen10
MS10974	sbsec	~234	ddl(9)	gki(9)	glnA(6)	mutS(10)	mutS2(33)	pheS(7)	pros(40)	pyrE(60)	thrS(13)	tpi(6)
MS10975	sbsec	~234	ddl(9)	gki(9)	glnA(6)	mutS(10)	mutS2(33)	pheS(7)	pros(40)	pyrE(60)	thrS(13)	tpi(6)
MS10976	sbsec	~234	ddl(9)	gki(9)	glnA(6)	mutS(10)	mutS2(33)	pheS(7)	pros(40)	pyrE(60)	thrS(13)	tpi(6)

Tabla 9. Abundancia relativa de los 10 grupos más abundantes en derrame articular.

ASV	c.4968	c.5109	c.5022	c.5191	TOTAL
g__Streptococcus	99,96	100	5,26	44,95	62,54
g__Lactobacillus	0	0	17,44	0	4,36
g__Psychrobacter	0	0	9,61	0	2,4
g__Escherichia_Shigella	0	0	5,2	3,69	2,22
f__Caulobacteraceae	0	0	0,46	8,11	2,14
g__Corynebacterium	0	0	7,26	0,81	2,02
g__Caulobacter	0	0	0	5,68	1,42
c__Bacilli	0	0	4,92	0,09	1,25
g__Staphylococcus	0,02	0	0	4,32	1,09
g__Lysinibacillus	0	0	4,29	0	1,07
Others	0,03	0	45,57	32,34	19,48

Tabla 10. Abundancia relativa de los 10 grupos más abundantes en calostro fresco (CF), en calostro pasteurizado (CP) y en la leche del tanque de almacenamiento (LT).

ASV	CF	CP	LT	TOTAL
g__Pseudomonas	93,79	98,47	88,73	93,66
s__Lactococcus_piscium	2,35	0	0,94	1,1
g__Hafnia_Obesumbacterium	0,85	0,09	1,12	0,69
s__Streptococcus_dysgalactiae	0	0	1,66	0,55
g__Leuconostoc	1,3	0,04	0,04	0,46
s__Porphyromonas_levii	0	0	1,23	0,41
g__Staphylococcus	0,03	0	1,13	0,39
g__Clostridium_sensu_stricto_1	0,31	0,74	0	0,35
s__Fusobacterium_necrophorum	0	0	1,03	0,34
s__Trueperella_pyogenes	0	0	0,8	0,27
Otros	1,37	0,67	3,31	1,78

Tabla 11. Resultados PERMANOVA (adonis2). Disimilitud entre los hospedadores estudiados. Significancia (***) $p \leq 0.001$, ** $p \leq 0.01$, * $p \leq 0.05$, ns no significativo)

Distancias	R ²	p-valor	Significancia	Interpretación
Bray-Curtis	0.18	0.001	***	Diferencias significativas en la abundancia relativa de los taxones; los hospedadores presentan perfiles microbianos distintivos en términos de composición cuantitativa.
Jaccard	0.15	0.001	***	Diferencias significativas basadas en presencia/ausencia de taxones; los hospedadores difieren en los grupos microbianos detectados, independientemente de su abundancia.
Unweighted-UniFrac	0.27	0.001	***	Diferencias notables en la composición filogenética basadas en presencia/ausencia; los hospedadores albergan comunidades microbianas evolutivamente distintas
Weighted-UniFrac	0.23	0.001	***	Diferencias en la microbiota tanto en abundancia como en distancia filogenética de los taxones; los hospedadores albergan comunidades bacterianas tanto estructural como evolutivamente divergentes

Tabla 12. Resultados PERMANOVA (Adonis2), disimilitud por especie animal.

Significancia (** $p \leq 0.001$, * $p \leq 0.01$, * $p \leq 0.05$, ns no significativo)

		Ovino	Porcino	Bovino
Bray-Curtis	R ²	0,16	0,27	0,092
	p	0,001	0,001	0,02
	Significancia	***	***	*
Jaccard	R ²	0,12	0,23	0,10
	p	0,001	0,001	0,001
	Significancia	***	***	***
Unweighted- UniFrac	R ²	0,13	0,32	0,13
	p	0,001	0,001	0,001
	Significancia	***	***	***
Weighted- UniFrac	R ²	0,12	0,41	0,12
	p	0,09	0,001	0,037
	Significancia	ns	***	*

Tabla 13. Abundancia relativa de los 15 grupos más abundantes por rango de edad en ovino diarreico

Rango de edad de 0 horas a 1 día de vida

ASV	[0h]	ASVs	(0h-12h]	ASVs	(12h-1d]
g__Staphylococcus	16,29	g__Escherichia-Shigella	44,43	g__Escherichia-Shigella	39,74
g__Acinetobacter	11,12	g__Clostridium_sensu_stricto_1	19,86	g__Clostridium_sensu_stricto_1	28,11
g__Corynebacterium	6,03	g__Streptococcus	7,83	g__Streptococcus	6,60
g__Jeotgalicoccus	4,82	g__Enterococcus	3,86	g__Lactobacillus	5,40
g__Salinicoccus	3,19	g__Lactobacillus	3,47	g__Enterococcus	3,35
g__Psychrobacter	2,97	g__Psychrobacter	2,89	g__Butyricicoccus	3,19
f__Planococcaceae	2,13	g__Mannheimia	1,41	g__Bacteroides	2,53
g__Brachybacterium	2,06	g__Staphylococcus	1,36	g__Mannheimia	1,99
g__Facklamia	1,78	g__Acinetobacter	1,30	g__[Ruminococcus]_gnavus_group	1,90
g__Brevibacterium	1,47	g__Bacteroides	1,17	g__Terrisporobacter	1,34
g__Escherichia-Shigella	1,37	g__Terrisporobacter	1,04	g__Hafnia-Obesumbacterium	0,68
g__Atopostipes	1,32	g__Pseudomonas	1,00	g__Clostridium_sensu_stricto_2	0,62
g__Dietzia	1,25	g__Lachnoclostridium	0,99	g__Klebsiella	0,48
g__Pseudomonas	1,15	g__Butyricicoccus	0,80	g__Tyzzerella	0,35
g__Pseudogracilibacillus	1,06	g__Romboutsia	0,69	f__Lachnospiraceae.1	0,33
Others	41,89	Others	7,82	Others	3,34

Rango de edad de 1 día a 15 días

ASVs	(1d-2d]	ASVs	(2d-15d]
g__Escherichia-Shigella	39,74	g__Escherichia-Shigella	25,30
g__Clostridium_sensu_stricto_1	28,11	g__Lactobacillus	12,54
g__Streptococcus	6,60	g__Bacteroides	11,79
g__Lactobacillus	5,39	g__Clostridium_sensu_stricto_1	6,39
g__Enterococcus	3,35	g__Fusobacterium	3,92
g__Butyricicoccus	3,19	g__[Ruminococcus]_gnavus_group	3,40
g__Bacteroides	2,53	g__Streptococcus	3,20
g__Mannheimia	1,99	g__Enterococcus	2,72
g__[Ruminococcus]_gnavus_group	1,90	g__Peptostreptococcus	2,26
g__Terrisporobacter	1,34	g__Butyricicoccus	2,21
g__Hafnia-Obesumbacterium	0,68	g__Veillonella	2,18
g__Clostridium_sensu_stricto_2	0,62	g__Tyzzerella	1,90
g__Klebsiella	0,48	g__Campylobacter	1,78
g__Tyzzerella	0,35	g__Lachnoclostridium	1,73
f__Lachnospiraceae.1	0,33	g__Faecalibacterium	1,49
Others	3,34	Others	17,12

Tabla 14. Abundancia relativa de los 15 grupos más abundantes por rango de edad en bovino diarreico

Rango de edad de 0h a 15 días

ASV	[0h-12h]	ASVs	(12h-1d]	ASVs	(2d-15d]
g__Escherichia-Shigella	13,12	g__Escherichia-Shigella	29,43	g__Escherichia-Shigella	18,56
g__Lactobacillus	12,78	g__Lactobacillus	9,30	g__Lactobacillus	12,78
g__Pseudomonas	8,35	g__Clostridium_sensu_stricto_1	6,65	g__Bacteroides	10,02
g__Gallibacterium	5,52	g__Enterococcus	6,55	g__Clostridium_sensu_stricto_1	4,00
g__Psychrobacter	4,91	g__Pseudomonas	4,60	g__Stenotrophomonas	4,00
g__Bacteroides	4,50	g__Comamonas	4,13	g__Faecalibacterium	3,52
g__[Ruminococcus]_gnavus	3,80	g__Stenotrophomonas	3,84	g__Bifidobacterium	3,28
g__Acinetobacter	3,14	g__Proteiniclasticum	3,36	g__Enterococcus	2,33
g__Enterococcus	2,95	g__Streptococcus	3,16	g__Chryseobacterium	2,04
g__Streptococcus	2,57	f__Pseudomonadaceae	2,33	g__Arthrobacter	2,02
g__Peptostreptococcus	2,56	g__Flavobacterium	2,25	g__Psychrobacter	1,96
g__Alloprevotella	2,44	g__Acinetobacter	1,99	g__[Ruminococcus]_gnavus	1,92
g__Sphingobacterium	2,01	g__Collinsella	1,91	g__Butyricicoccus	1,86
g__Stenotrophomonas	1,85	g__Pedobacter	1,74	g__Tyzzerella	1,75
g__Fusobacterium	1,67	g__Carnobacterium	1,36	g__Streptococcus	1,59
Others	27,82	Others	17,39	Others	28,38

Rango de edad de 15 días a 1 mes

ASVs	(2d-15d]	ASVs	(15d-1m]
g__Lactobacillus	16,60	g__Escherichia-Shigella	22,43
g__Escherichia-Shigella	10,95	g__Lactobacillus	10,47
g__Enterococcus	9,88	g__Bacteroides	8,48
g__Pseudomonas	7,34	g__Corynebacterium	5,36
g__Bacteroides	6,52	g__Faecalibacterium	3,85
g__Psychrobacter	4,93	g__Bifidobacterium	3,54
g__Bifidobacterium	4,79	g__Alloprevotella	3,43
g__Corynebacterium	4,25	g__Prevotella	3,24
g__Streptococcus	2,76	g__Fusobacterium	2,13
g__Fusobacterium	2,30	g__Pelitesta	2,12
g__Staphylococcus	2,12	g__Collinsella	1,56
g__Stenotrophomonas	1,80	g__Lachnospirillum	1,47
g__Serratia	1,66	g__[Ruminococcus]_gnavus_group	1,41
g__Tyzzerella	1,60	g__Enterococcus	1,35
g__Hafnia-Obesumbacterium	1,59	g__Subdoligranulum	1,34
Others	20,91	Others	27,82

Tabla 15. Abundancia relativa de los 15 grupos más abundantes por rango de edad en porcino diarreico

Rango de edad de 0 horas a 2 días

ASV	[0h-12h]	ASVs	(12h-1d]	ASVs	(1d-2d]
g__Lactobacillus	46,53	g__Escherichia-Shigella	9,64	g__Lactobacillus	24,31
g__Escherichia-Shigella	21,59	g__Prevotella	8,44	g__Escherichia-Shigella	13,60
g__Prevotella	4,31	g__Alloprevotella	5,90	g__Fusobacterium	10,19
g__Streptococcus	3,72	g__Lactobacillus	5,62	g__Streptococcus	7,73
g__Megasphaera	2,85	g__Clostridium_sensu_stricto_1	3,44	g__Clostridium_sensu_stricto1	6,09
g__Actinobacillus	2,51	f__Lachnospiraceae	3,34	g__Prevotella	6,08
g__Pasteurella	1,71	g__Prevotellaceae_NK3B31_	3,33	g__Actinobacillus	5,26
g__Mitsuokella	1,68	g__Campylobacter	3,29	g__Tyzzera	3,82
g__Bacteroides	1,54	g__Muribaculaceae	2,76	g__Bacteroides	2,89
g__Enterococcus	0,93	g__Rikenellaceae_RC9	2,26	g__Lachnoclostridium	2,04
g__Muribaculaceae	0,84	g__Christensenellaceae_R-7	1,89	g__Butyricoccus	1,74
g__Olsenella	0,83	g__Phascolarctobacterium	1,88	f__Lachnospiraceae.1	1,73
g__Fusobacterium	0,79	g__Anaerovibrio	1,73	g__Holdemanella	1,68
g__Anaerobacillus	0,69	g__Subdoligranulum	1,60	g__Peptostreptococcus	1,46
g__Sharpea	0,61	g__Oscillospiraceae_UCG-005	1,58	g__[Ruminococcus]_gnavus	1,21
Others	8,85	Others	43,30	Others	10,16

Rango de edad de 2 días a 2 meses

ASV	(2d-15d]	ASVs	(15d-1m]	ASVs	(1m-2m]
g__Lactobacillus	19,09	g__Bacteroides	11,75	g__Prevotella	18,10
g__Fusobacterium	11,67	g__Escherichia-Shigella	7,60	g__Lactobacillus	5,91
g__Bacteroides	7,83	g__Prevotella	4,79	g__Clostridium_sensu_stricto_1	4,67
g__Escherichia-Shigella	7,42	g__Lactobacillus	3,60	g__Megasphaera	3,86
g__Megasphaera	6,01	g__Alloprevotella	3,56	g__Muribaculaceae	3,73
g__Butyrivibrio	3,91	g__Oscillospiraceae_UCG-002	3,32	g__Rikenellaceae_RC9_group	3,69
f__Lachnospiraceae	3,39	g__Christensenellaceae_R-7	3,13	f__Lachnospiraceae	2,26
g__Campylobacter	3,26	g__Campylobacter	2,98	g__Treponema	2,23
g__Clostridium_sensu_stricto_1	3,23	g__Muribaculaceae	2,81	g__Prevotellaceae_NK3B31	2,17
g__Lachnoclostridium	3,23	g__Lachnoclostridium	2,80	g__Oscillospiraceae_UCG-005	1,99
g__Lachnospiraceae_CHKCI001	2,18	g__Eubacterium_coprostanoligenes	2,65	g__Clostridia_UCG-014	1,85
g__Acidaminococcus	1,77	f__Lachnospiraceae	2,54	g__Oscillospiraceae_UCG-002	1,76
g__Prevotella	1,51	g__Phascolarctobacterium	2,28	g__Alloprevotella	1,73
g__Comamonas	1,27	g__Subdoligranulum	1,94	g__Ruminococcus	1,70
g__Muribaculaceae	1,26	g__Rikenellaceae_gut_group	1,82	g__Faecalibacterium	1,61
Others	22,97	Others	42,43	Others	42,74

Rango de edad de 2 meses a 5 meses

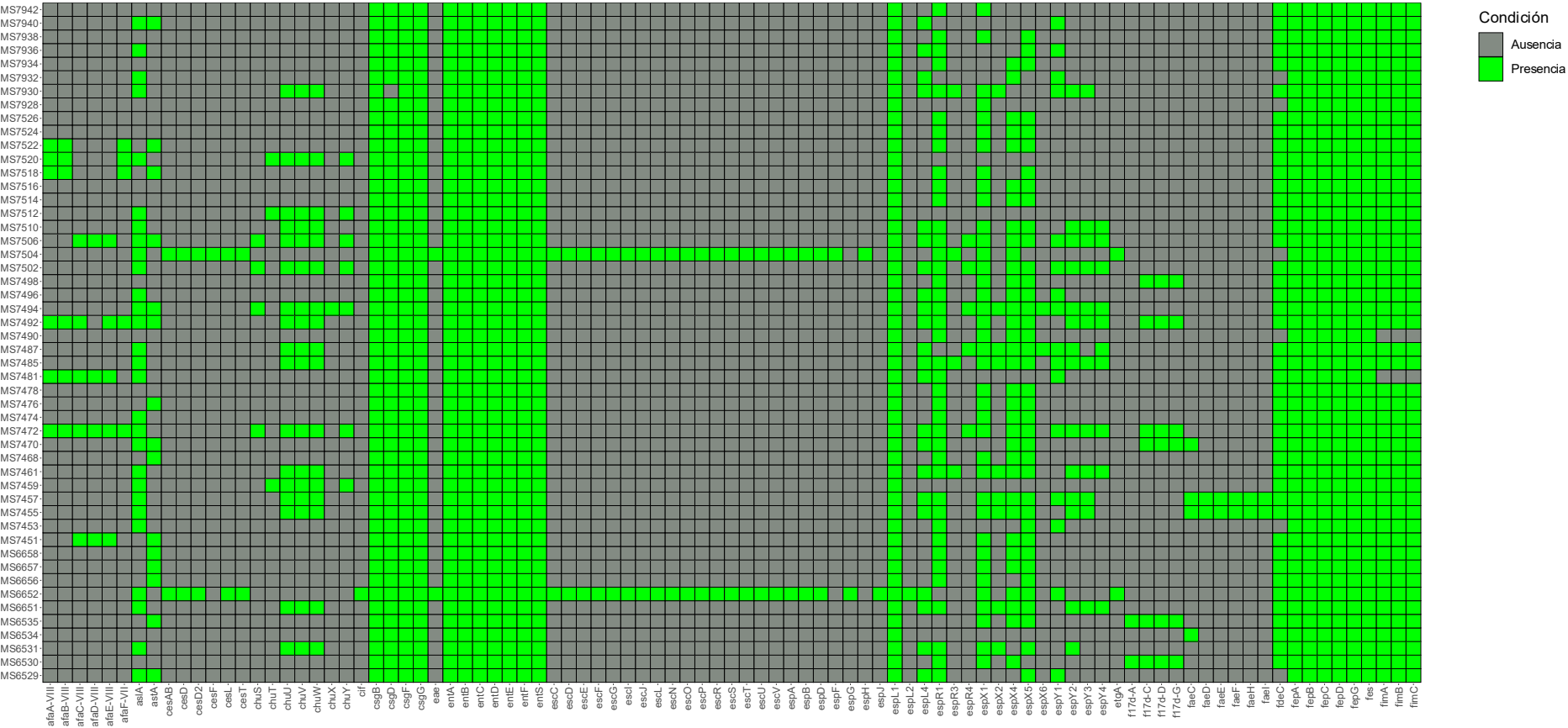
ASVs	(2m-5m]
g__Lactobacillus	16,41
g__Prevotella	12,73
g__Megamonas	11,52
g__Megasphaera	6,62
g__Alloprevotella	3,79
g__Muribaculaceae	2,57
g__Christensenellaceae_R-7_group	2,56
g__Phascolarctobacterium	2,36
f__Lachnospiraceae	2,00
g__Acidaminococcus	1,92
g__Blautia	1,75
g__[Eubacterium]_coprostanoligenes_group	1,58
g__Olsenella	1,42
g__Subdoligranulum	1,31
g__Catenibacterium	1,24
Others	30,21

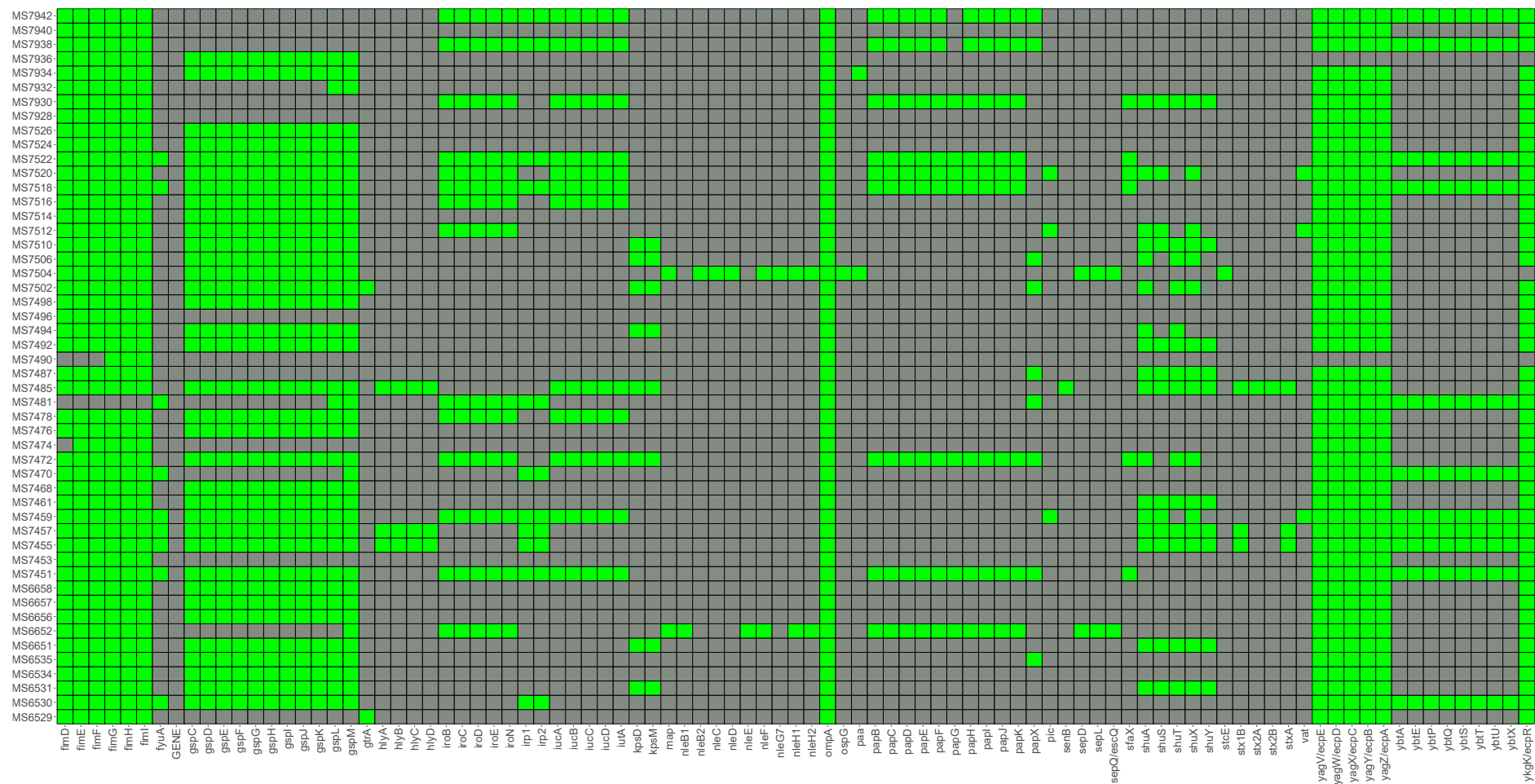
Tabla 16. Abundancia relativa de los 15 grupos más abundantes en caprino diarreico

ASVs	%
g__Escherichia-Shigella	50,98
g__Bacteroides	15,05
g__Lactobacillus	12,33
g__Clostridium_sensu_stricto_1	10,86
g__Butyricicoccus	1,29
g__Streptococcus	1,29
g__Romboutsia	1,20
g__Tyzzerella	0,89
g__Enterococcus	0,72
g__Mannheimia	0,71
g__[Ruminococcus]_gnavus_group	0,61
g__Akkermansia	0,56
g__Lachnoclostridium	0,56
g__Terrisporobacter	0,49
g__Blautia	0,48
Others	1,96

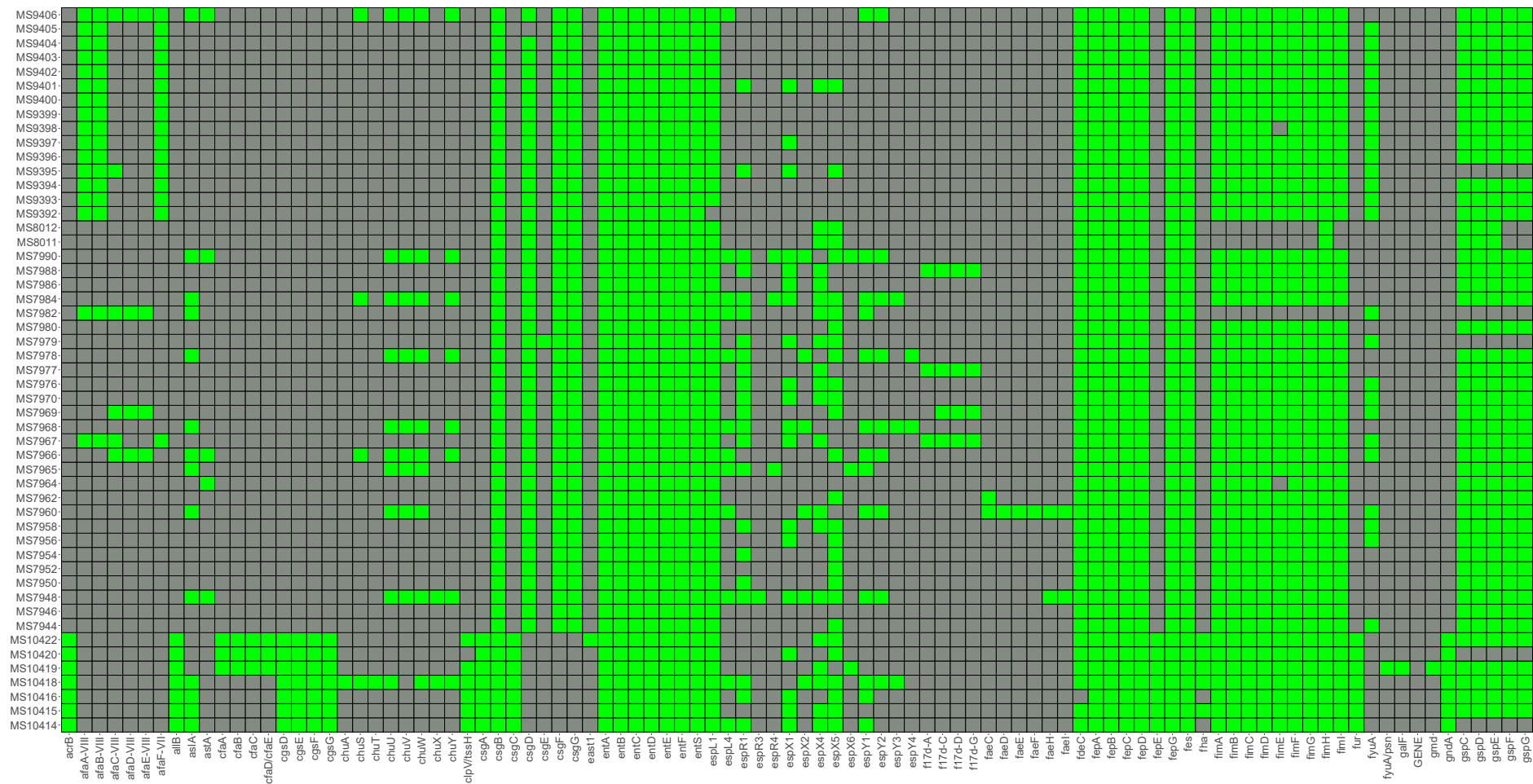
Anexo II

Figura 1. Heat map presencia-ausencia de los factores de virulencia identificados para cada aislado de *E. coli*





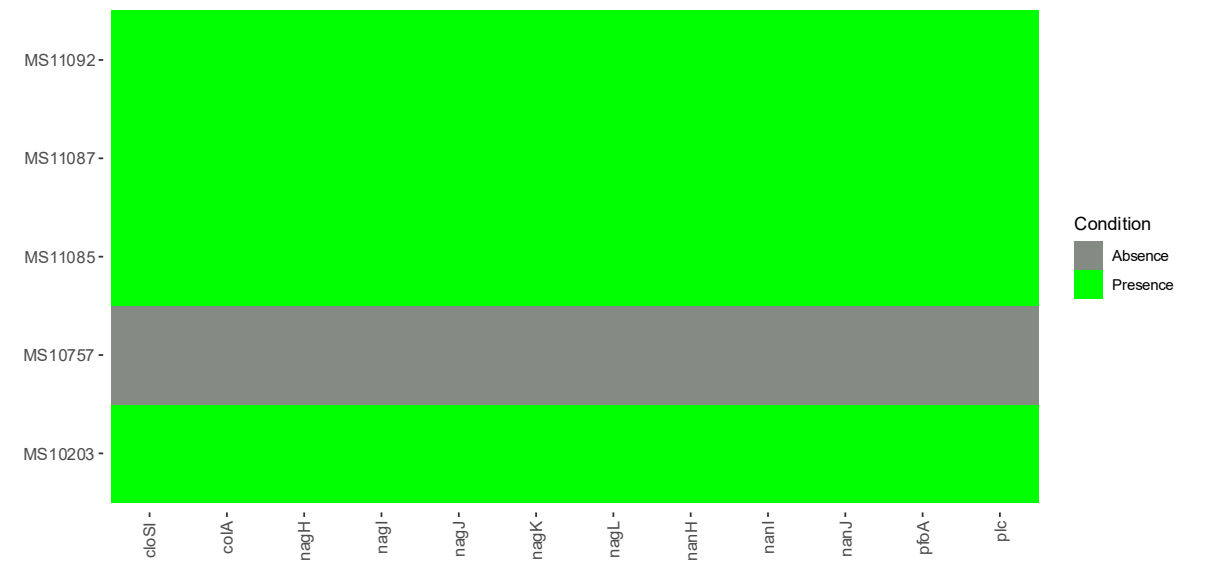
Caracterización microbiana de las diarreas neonatales en ganado rumiante y porcino bajo el enfoque 'Una Salud'



Caracterización microbiana de las diarreas neonatales en ganado rumiante y porcino
bajo el enfoque 'Una Salud'

Figura 2. Heat map presencia-ausencia de los factores de virulencia encontrados en los aislados de *Clostridium perfringens* (A) y de *Clostridioides difficile* (B), a través de la base de datos Virulence Factor Database

A



B

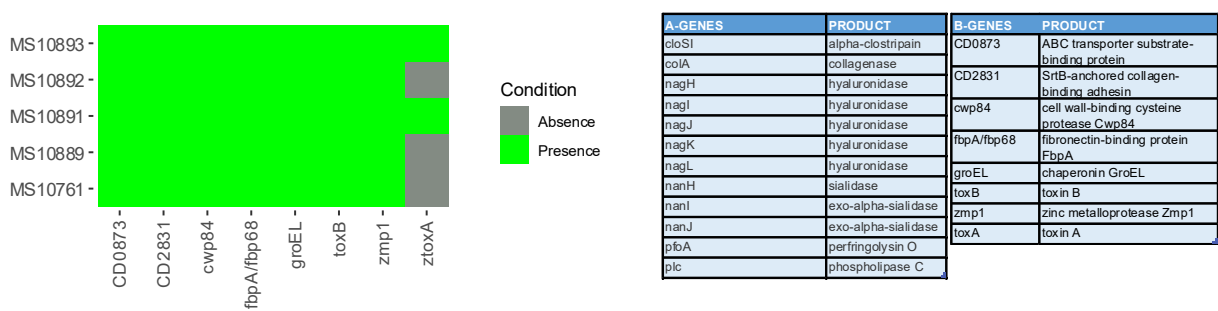


Figura 3. Ensayo de halos de inhibición, generados por Dominated liquid, sobre 15 aislados de *E. coli*. Ec1 a Ec9

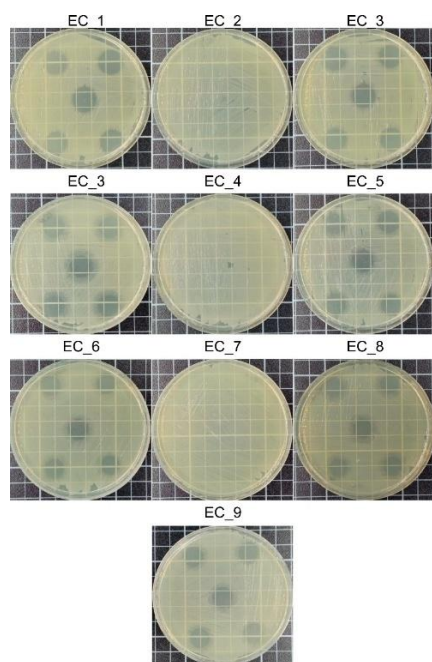
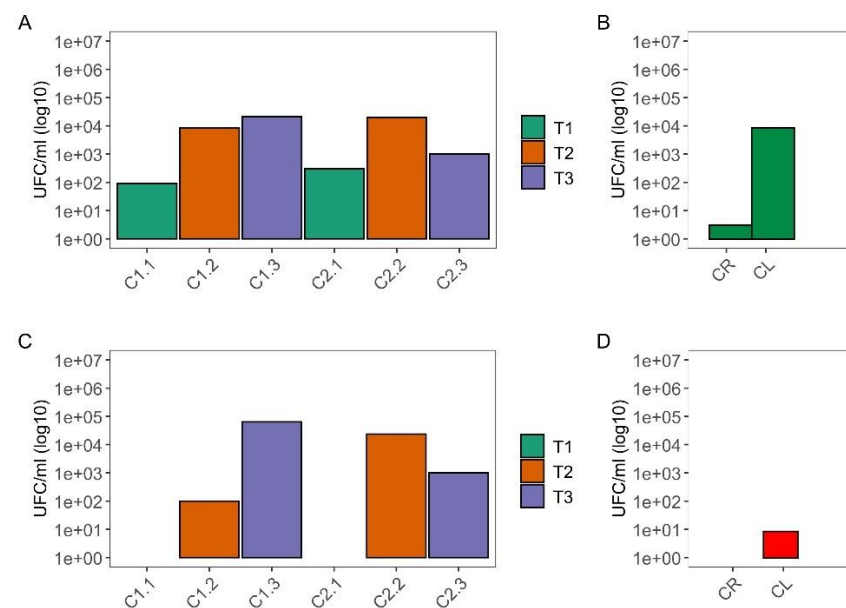


Figura 4. Estudio de la carga bacteriana en calostro para aerobios mesófilos (A y B) y estreptococos del grupo D (C y D). Para calostro recién recogido (T1), calostro antes de pasteurizar (T2) y calostro tras pasteurización (T3), en dos lotes C1 y C2. Y para calostro con enfriamiento a temperatura ambiente (CL) y calostro con enfriamiento rápido (CR)



Caracterización microbiana de las diarreas neonatales en ganado rumiante y porcino bajo el enfoque 'Una Salud'



Figura 6. Abundancia relativa de los 20 taxones bacterianos más abundantes, identificados hasta nivel de género, en bovinos neonatales diarreicos. Se presentan los resultados para cada uno de los grupos de edad: 0 a 12 horas (0–12 h), 12 horas a 1 día (12 h–1 d), 2 días a 15 días (2 d–15 d), de 15 días a 1 mes (15d–1m) y de 1 mes a 2 meses (1m–2m). Cada barra representa un ternero muestreado.

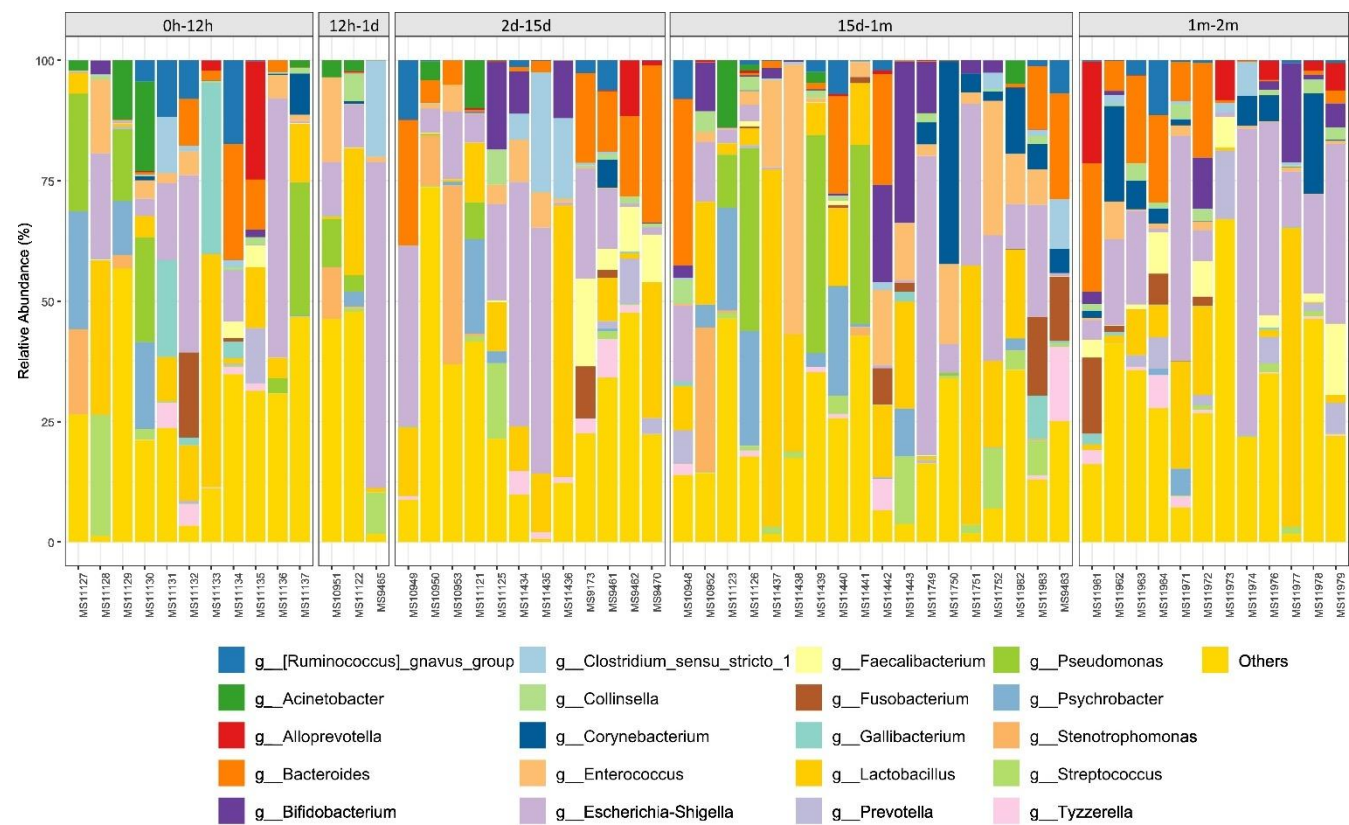


Figura 7. Abundancia relativa de los 20 taxones bacterianos más abundantes, identificados hasta nivel de género, en porcinos neonatales diarreicos. Se presentan los resultados para cada uno de los grupos de edad: 0 a 12 horas (0–12 h), 12 horas a 1 día (12 h–1 d), 1 día a 2 días (1d–2d), 2 días a 15 días (2 d–15 d), de 15 días a 1 mes (15d–1m), 1 mes a 2 meses (1m–2m) y 2 meses a 5 meses (2m–5m). Cada barra representa un lechón muestreado.

