

Colonizadores tempranos de la nariz de los lechones como probióticos nasales

■ Virginia Aragón y Florencia Correa Fiz

Investigadoras del CReSA, el programa de sanidad animal del IRTA



► Resumen

La microbiota nasal desempeña un papel relevante en la salud respiratoria de los lechones, principalmente mediante la exclusión de patógenos y la estimulación temprana del sistema inmunitario. El equilibrio de esta microbiota puede verse alterado por diversos factores, produciendo una disbiosis o microbiota con baja diversidad bacteriana, que permite más fácilmente la invasión de patógenos y la consecuente enfermedad.

Unos de los factores que afectan a la composición de la microbiota son los antibióticos. Cuando estos son administrados en las madres, tienen un efecto en la microbiota nasal de sus lechones que dura más tiempo que cuando se administran directamente en los lechones. Esto nos lleva a destacar la importancia de las madres en la transferencia de una microbiota saludable en los primeros días de vida de los lechones. Además, es interesante resaltar que la inoculación de colonizadores nasales obtenidos de lechones sanos parece tener un efecto estabilizante de la microbiota en lechones jóvenes y podría ser útil en la reversión de las disbiosis, especialmente las causadas por tratamientos antibióticos.

Palabras clave: microbiota nasal; antibióticos; probióticos; poliserositis; colonización nasal.

► Abstract

Early colonizers of piglets' noses as nasal probiotics

The nasal microbiota plays a relevant role in the respiratory health of piglets, mainly through the exclusion of pathogens and the early stimulation of the immune system. The balance of this microbiota can be altered by various factors, producing dysbiosis or low-diverse microbiota, which facilitates the invasion of pathogens and the subsequent disease.

One of the main factors affecting the microbiota composition are the antibiotics. These molecules administered to the sows, show an effect on the nasal microbiota of the offspring that lasts even longer than when the antibiotic is administered directly to the piglets. This fact highlights the importance of the sows in transferring a healthy microbiota to the piglets in early life. It is also interesting to note that the inoculation of nasal colonizers obtained from healthy piglets seems to have a stabilizing effect on the microbiota in young piglets and could be useful in resolving dysbiosis, especially those caused by antibiotic treatments.

Key words: nasal microbiota; antibiotics; probiotics; poliserositis; nasal colonization.

Contacto con las autoras: Florencia Correa, flor.correa@irta.cat

LA MICROBIOTA NASAL DE LOS LECHONES COMO PRONÓSTICO TEMPRANO

Los microorganismos vivos que habitan y conviven en una relación simbiótica con el huésped, se denominan en conjunto microbiota¹. Estas comunidades de microorganismos resultan fundamentales para regular la homeostasis y las funciones inmunológicas del huésped. En las distintas partes del cuerpo, se albergan comunidades bacterianas diferentes que demuestran una relación estrecha con la salud de los animales, aportándole funciones específicas. Se sabe desde hace algunas décadas que la microbiota intestinal es esencial para mantener la salud de los animales, debido a múltiples funciones específicas como la fermentación de la ingesta y la producción de vitaminas, pero también debido a su papel esencial en la maduración del sistema inmunitario². El papel que juega la microbiota en otras partes del cuerpo también se ha estudiado y demostrado su importancia más recientemente.

La microbiota respiratoria se compone de comunidades con funciones específicas, que actúan como guardianes o *gatekeepers* protegiendo contra la entrada de patógenos respiratorios³. Resulta fundamental su papel en la protección contra patógenos y en la estimulación temprana del sistema inmunitario. Cuando estas comunidades se ven perturbadas, resultando en pérdida de diversidad y desbalance de la composición, dan lugar a un estado de disbiosis que suele tener un impacto en cascada sobre el sistema inmunitario, ofreciendo una ventaja para la emergencia de patógenos⁴.

La microbiota nasal se presenta como la primera barrera que encuentran estos patógenos para colonizar y/o invadir hasta otros nichos, y ha demostrado ser primordial a la hora de prevenir o controlar diversas enfermedades. Por ello, es esencial su correcto establecimiento y desarrollo. En cerdos, se ha comprobado que la composición y diversidad de la microbiota nasal cambia desde el nacimiento hasta finales de transición drásticamente, siendo el destete un momento crítico en donde la microbiota establecida está relacionada con la predisposición de los lechones a padecer enfermedades más tarde en la vida. Así, se ha demostrado que la diversidad de la microbiota nasal en el destete en animales que desarrolla-

rán más tarde enfermedades como Glässer⁵ o aquellas asociadas a *Mycoplasma hyorhinis*⁶ o *Streptococcus suis*⁷ es más baja que la de aquellos que permanecerán sanos hasta finales de transición. Además, la microbiota nasal de los animales que enferman en la transición ya presenta una composición alterada en el momento del destete y estas alteraciones parecen ser específicas del patógeno que posteriormente causará los casos clínicos. Esto abre la posibilidad de aplicar este conocimiento para el desarrollo de un método pronóstico que permita realizar un seguimiento de los animales para conocer la predisposición a padecer diferentes enfermedades de origen respiratorio y poder tomar las medidas preventivas apropiadas.

ALTERACIONES EN LA MICROBIOTA NASAL

El establecimiento de las comunidades microbianas que habitan la cavidad nasal de los lechones es dinámico y comprende diferentes microorganismos. La colonización comienza justo al nacer, donde la transferencia de colonizadores desde las madres a los lechones es fundamental para el desarrollo de una microbiota sana⁸. Dentro de estos colonizadores tempranos, no solo se encuentran bacterias comensales, sino que también están presentes patógenos oportunistas con capacidad de desarrollar diversas patologías (patobiontes). Normalmente, esta colonización temprana ocurre cuando los lechones se encuentran aún protegidos por la inmunidad materna, y por lo tanto existe un balance entre colonización de patógenos e inmunidad. Pero si este balance se ve alterado, estos patobiontes podrán diseminarse a otros órganos internos y causar así la enfermedad asociada. Durante mucho tiempo, el foco se ha puesto solo en el nivel de anticuerpos adquiridos a través del calostro (inmunidad materna). Si bien es verdad que tras el destete la inmunidad materna alcanza los niveles más reducidos y la protección que proporcionaba desaparece, no podemos eliminar de la ecuación el efecto de la colonización. Esta colonización puede verse alterada por una reducción de la transmisión de colonizadores beneficiosos desde la madre o por actuaciones en el lechón que pueden causar disbiosis.

Existen diversos factores capaces de alterar la microbiota nasal, dentro de los cuales se destacan el medioambiente, la

comida y, más importante, los tratamientos aplicados. Las enfermedades bacterianas son normalmente controladas con antibióticos, especialmente cuando no existen vacunas comerciales. Las madres son el reservorio principal de patógenos y, por tanto, una manera de controlar a estos microorganismos nocivos en las granjas consiste en realizar tratamientos antibióticos en las madres preñadas y/o durante el periodo de lactancia. Estos tratamientos de las madres van dirigidos a evitar la transmisión de patógenos a los lechones, que son más inmaduros desde el punto de vista inmunológico. Alternativamente, los lechones son tratados con antibióticos en edades tempranas con el mismo objetivo de frenar la colonización por estos potenciales patógenos. En un estudio que publicamos en 2019, demostramos que los tratamientos antibióticos de lechones lactantes pueden tener un efecto perjudicial en el desarrollo normal de la microbiota nasal. Los tratamientos perinatales producían una reducción de la diversidad de la microbiota al destete, que los predisponía a padecer enfermedades más tarde. Además, observamos que cuando el tratamiento perinatal se eliminaba, los animales mostraban un estado de salud mejor, demostrado por la mejora en los parámetros productivos de la granja. Recientemente, nos propusimos comparar el efecto sobre la microbiota nasal al aplicar el antibiótico ceftiofur en grupos de madres preñadas o en lechones al nacer, y evaluarlo a largo plazo en una granja. Las camadas de lechones se evaluaron longitudinalmente tras 7 (lactantes), 21 (destete) y 49 (finales de transición) días de vida, observándose cambios tanto en la composición como en la diversidad de su microbiota nasal¹⁰. La administración de ceftiofur ya sea en madres o en lechones, indujo un incremento inesperado en la diversidad de la microbiota nasal a 7 días de vida, dominado por el incremento de bacterias pertenecientes a taxones típicamente medioambientales y/o fecales. Este hecho, aunque transitorio, nos demuestra la inestabilidad de la microbiota en etapas tempranas de la vida claramente afectada por el tratamiento con antibióticos. Además, la ausencia o baja abundancia de colonizadores habituales, demuestra que este tratamiento provee una posibilidad para la colonización por nuevos microorganismos potencialmente patogénicos que son capaces de ocupar el espacio dejado

en la mucosa nasal por la reducción drástica de los colonizadores típicos. Por otro lado, cuando se comparó la composición de la microbiota nasal entre los grupos a lo largo del tiempo, observamos que aquellos lechones que provenían de madres tratadas aún mostraban una microbiota alterada a finales de transición, demostrando un efecto a largo plazo del tratamiento de las madres (figura 1). Curiosamente, los lechones que habían recibido el tratamiento con ceftiofur al nacimiento, sí recuperaron la microbiota nasal normal, demostrando que el impacto del tratamiento es mayor y más difícil de revertir cuando se aplica en madres que en lechones. Esto nos lleva a destacar una vez más, la importancia de la colonización inicial y el papel tan importante que cumplen las madres en la transferencia de microbiota a sus lechones.

Estos tratamientos antibióticos, además de tener un efecto deletéreo en la microbiota, pueden ser los responsables de inducir la generación y propagación de bacterias resistentes, constituyendo un grave problema para la salud global. La microbiota respiratoria, al igual que otras microbiotas, puede ser una fuente de resistencias antimicrobianas capaces de ser transferidas a patógenos o patobiontes, con el riesgo que esto conlleva. Por ello, en este estudio nos planteamos también evaluar el conjunto de genes de resistencia presentes en una comunidad

microbiana, es decir el resistoma, en dos momentos de la vida de los animales: el destete (21 días) y a finales de transición (49 días). Los resultados mostraron un aumento en la prevalencia de genes de resistencias con el tiempo en todos los grupos, aunque el grupo de lechones nacidos de madres tratadas fue el que destacó con un mayor número de genes de resistencia en el momento del destete. El ceftiofur es un antibiótico del tipo b-lactámico y esto se evidenció en la acumulación de genes específicos capaces de conferir resistencia contra este grupo de antibióticos, especialmente en el grupo donde los lechones habían sido tratados. El monitoreo de las resistencias a antimicrobianos en animales de granja es fundamental, no solo por su potencial transferencia a la población humana, sino también por el aumento de los fallos terapéuticos en las granjas. Las políticas dirigidas a la reducción del uso de antibióticos tienen un reflejo en la prevalencia de las resistencias en aislados bacterianos, como ha mostrado recientemente un estudio retrospectivo realizado en Alemania¹¹. En dicho estudio, el número de cepas de *G. parasuis* resistentes a distintos antibióticos aisladas a lo largo del periodo 2006-2021, dejó de manifiesto la clara reducción desde la introducción de la obligatoriedad de comunicar las prescripciones de an-

tibióticos en uso veterinario. En nuestro estudio, demostramos que el tratamiento con ceftiofur, tanto en madres como en lechones, no solo alteró la microbiota nasal de los lechones, sino que favoreció la proliferación de bacterias portadoras de genes de resistencias contra el mismo, destacando una vez más que la aparición de resistencias se correlaciona con el uso de antibióticos, y dejando en evidencia la necesidad de utilizarlos de forma responsable y hacer monitoreos frecuentes.

En conjunto, los resultados de nuestro estudio señalan que el establecimiento de las comunidades bacterianas en los primeros días es esencial para garantizar un buen desarrollo de una microbiota saludable y resiliente a lo largo de la vida. Resulta fundamental la búsqueda de alternativas a los tratamientos antibióticos tradicionalmente utilizados, para permitir que este proceso de colonización natural ocurra, minimizando los cambios disruptivos en los balances microbianos, que pueden brindar oportunidades para invadir y causar enfermedad a los patógenos habituales de las granjas.

PROBIÓTICOS NASALES COMO ESTABILIZADORES DE LA MICROBIOTA NASAL

Durante los últimos años, nuestro grupo ha adquirido experiencia alrededor de la composición de la microbiota nasal de los lechones y su asociación con salud o enfermedad. Así, hemos identificado diversos géneros bacterianos asociados con granjas sin brotes de enfermedades respiratorias (granjas sanas), cuyos animales mostraban óptimas condiciones de salud. Seleccionamos algunos miembros representativos de cada uno de estos géneros más prevalentes y/o abundantes de la microbiota nasal de los lechones al destete provenientes de este tipo de granjas sanas para ser caracterizados como candidatos probióticos nasales. Solo existen en la literatura unos pocos estudios en donde se evalúa la inoculación intranasal con probióticos, es decir microorganismos vivos capaces de conferir un efecto beneficioso para la salud del hospedador. Estos estudios se realizaron en humanos y pollos, con resultados que parecen prometedores. De esta manera, en el mismo estudio¹⁰ en que evaluamos el efecto de los antibióticos a largo plazo en cerdos, se incluyeron otros dos grupos de animales para evaluar el efecto de la colonización con

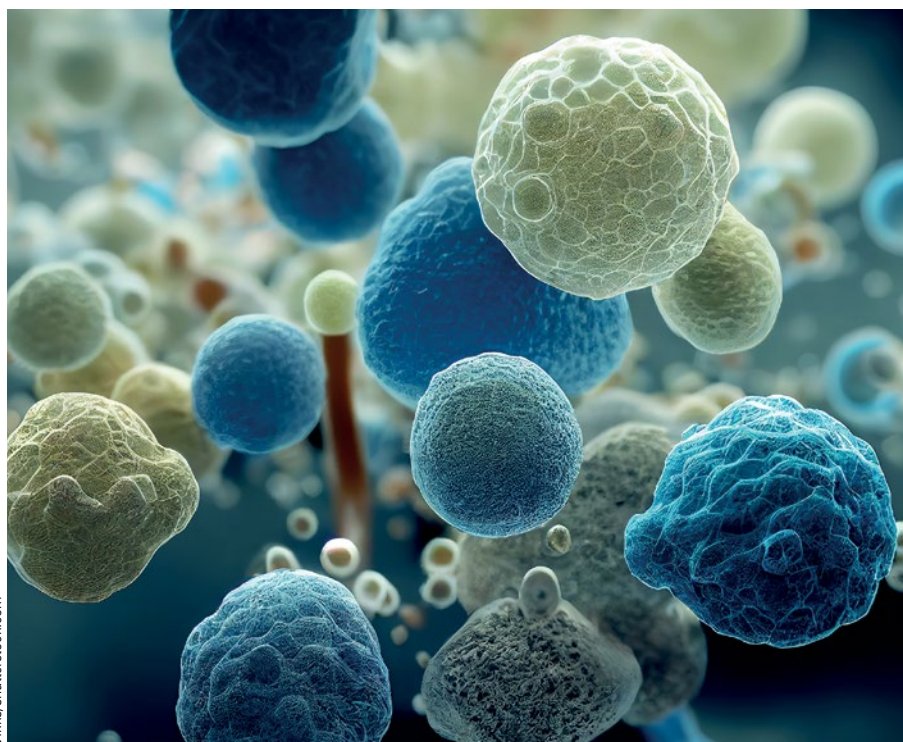
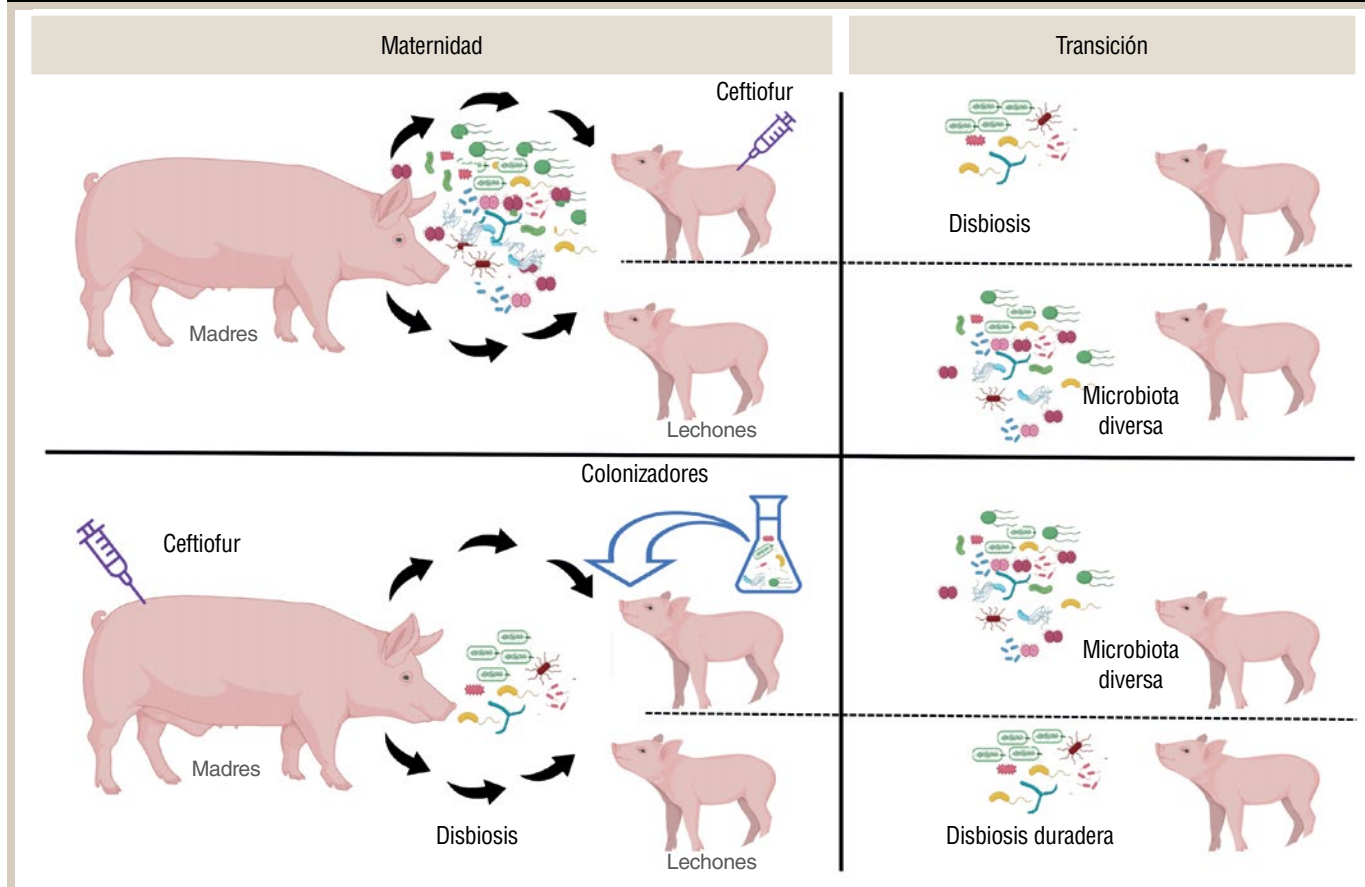


Figura 1. Estudio longitudinal del efecto sobre la microbiota nasal de los lechones de aplicar ceftiofur en madres preñadas o sobre los lechones al nacer. Tanto si se aplica ceftiofur en las madres como en lechones, el resultado es una disbiosis en la microbiota nasal de los lechones que demuestra la importancia del establecimiento inicial de la microbiota. Estas disbiosis se mantienen hasta finales de transición cuando el tratamiento es aplicado en las madres, destacando la relevancia de las madres como fuente de microbiota, y la necesidad de contacto entre madre y lechón para favorecer la transferencia. El uso de colonizadores nasales naturales sobre lechones al nacer revierte las disbiosis inducidas por el uso de ceftiofur en sus madres.



los candidatos bacterianos seleccionados (figura 1). Al nacer, un grupo de lechones provenientes tanto de madres tratadas con ceftiofur como de madres control (sin tratamiento antibiótico) se inoculó intranasalmente con esta colección de 5 colonizadores naturales seleccionados. La inoculación con estos colonizadores dio por resultado un incremento de la diversidad cuando se comparaban los grupos de lechones nacidos de madres no tratadas, demostrando que la inoculación perinatal fue capaz de provocar cambios a los 7 días de vida. El aumento en la diversidad de la microbiota, ha demostrado ser beneficioso en distintas ocasiones para distintas microbiotas y, por tanto, la inoculación podría tener un efecto ventajoso en los animales en etapas tempranas.

Quizá aún más relevante, fue la observación de una disminución de las fluctua-

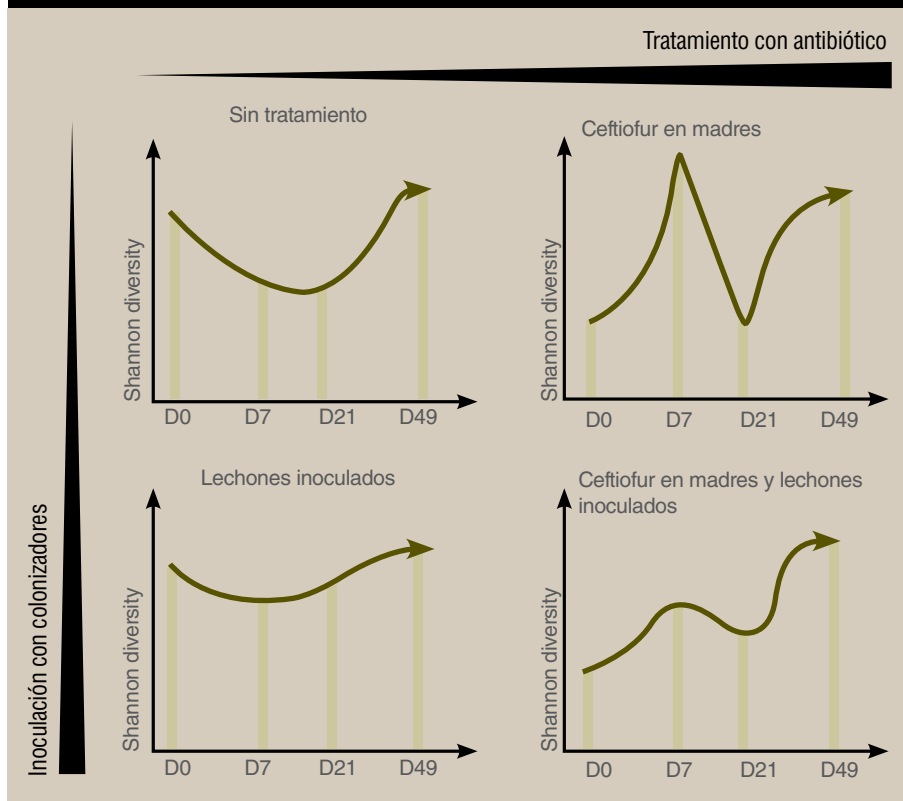
ciones de diversidad detectadas con los tratamientos, sugiriendo que la inoculación otorgaba una mayor estabilidad a la microbiota a edades tempranas (figura 2). El efecto de la inoculación fue además notable, al analizar particularmente las cepas de patógenos responsables de enfermedades típicas del periodo de transición, como es la poliserositis porcina causada por *Glaesserella parasuis*, *Streptococcus suis* y/o *Mycoplasma hyorhinis*. Estas bacterias son consideradas patobiontes, debido a su presencia habitual en la microbiota respiratoria de los cerdos, además de su potencial patógeno. Sin embargo, es sabido también que, dentro de estas especies existe una plétora de cepas que, debido a sus características genómicas, contienen el potencial de producir enfermedad (virulentas) o son inocuas para el huésped (no virulentas). Cabe destacar que la inoculación

intranasal con los candidatos probióticos, retrasó específicamente la aparición de cepas virulentas de *G. parasuis* y modificó la dinámica de colonización de otros patógenos como *S. suis* y *M. hyorhinis*. Aunque no podemos demostrar la implicación directa en la modificación de estas dinámicas de colonización de estos patógenos sobre la salud de los animales, la evaluación de los signos clínicos en la transición, arrojó resultados interesantes. Dentro del grupo de animales nacidos de madres tratadas e inoculados al nacer hubo un número significativamente menor de animales que desarrollaron signos clínicos típicamente asociados a estos patógenos como cojeras. Esto podría deberse a la reducción en la transmisión de patógenos desde las madres (tratadas con antibióticos), quienes fueron reemplazados por colonizadores naturales (inoculados) capaces de ocu-

par el nicho natural. De esta manera, parece haberse conseguido prevenir la colonización por patógenos. La maduración del sistema inmunitario que se consigue con el paso del tiempo en los lechones,

sumada al desarrollo de una microbiota saludable y resiliente, los haría menos vulnerables a la infección por patógenos y más capaces de defenderse contra un intento de invasión de los mismos.

Figura 2. Dinámica de diversidad de la microbiota nasal de los lechones. El efecto del tratamiento con ceftiofur tanto en madres como lechones provoca unos cambios drásticos en la diversidad de la microbiota nasal en las primeras etapas de vida. La inoculación al nacer con colonizadores nasales seleccionados estabiliza la microbiota nasal, siendo capaz de revertir el efecto deletéreo observado tras el uso de los antibióticos.



CONCLUSIÓN

Es esencial favorecer la adquisición temprana de microorganismos beneficiosos, ya que marcan el establecimiento de una microbiota nasal saludable con un impacto a largo plazo en la vida de los animales. La transferencia desde las madres es fundamental y por tanto los tratamientos antibióticos que la perturban deberían evitarse cuando sea posible. En nuestra experiencia, la eliminación de los tratamientos metaflácticos aplicados tanto a madre como a los lechones, puede tener un impacto beneficioso en el estado de salud de los animales y no tener un impacto negativo en la productividad de la granja. Cabe destacar, que fuimos capaces de revertir el impacto negativo del uso de antibióticos en madres y lechones observado sobre la microbiota nasal de los lechones, con la inoculación intranasal con colonizadores naturales seleccionados. Estos resultados nos llevan a pensar que la inoculación de colonizadores beneficiosos podría representar una buena estrategia para favorecer el desarrollo de una microbiota nasal más saludable en los lechones. Así, este tipo de intervenciones podrían utilizarse para minimizar las disbiosis provocadas por los tratamientos con antimicrobianos aplicados en los lechones y, específicamente para promover el desarrollo saludable de lechones recién nacidos, cuando provengan de madres preñadas que hayan requerido de estos tratamientos. De esta manera, podríamos promover la salud desde edades tempranas, con un impacto a largo plazo en la vida de los lechones.

REFERENCIAS

- 1.- Berg, G., Rybakova, D., Fischer, D. *et al.* Microbiome definition re-visited: old concepts and new challenges. *Microbiome* 2020; 8, 103. doi.org/10.1186/s40168-020-00875-0.
- 2.- Hou, K., Wu, ZX., Chen, XY. *et al.* Microbiota in health and diseases. *Sig Transduct Target Ther* 2022; 7, 135. doi.org/10.1038/s41392-022-00974-4.
- 3.- Correa-Fiz F., Aragon V. (2023) Microbiota respiratoria. Rodríguez-Gomez JM., *Microbiota respiratoria en el ámbito veterinario y su modulación* p191-197, Ed. Ergon.
- 4.- Pirolo, M., Espinosa-Gongora, C., Bogaert, D. *et al.* The porcine respiratory microbiome: recent insights and future challenges. *Animal microbiome* 2021; 3, 9. doi.org/10.1186/s42523-020-00070-4.
- 5.- Correa-Fiz F, Fraile L, Aragon V. Piglet nasal microbiota at weaning may influence the development of Glässer's disease during the rearing period. *BMC Genomics*. 2016; 17:404. doi:10.1186/s12864-016-2700-8.
- 6.- Blanco-Fuertes M, Correa-Fiz F, Fraile L, Sibila M, Aragon V. Altered Nasal Microbiota Composition Associated with Development of Polyserositis by *Mycoplasma hyorhinis*. *Pathogens*. 2021; 10(5):603. doi:10.3390/pathogens10050603.
- 7.- Fredriksen S., Neila-Ibáñez C., Hennig-Pauka I. *et al.* *Streptococcus suis* infection on European farms is associated with an altered tonsil microbiome and resistome. *bioRxiv* 2022. doi.org/10.1101/2022.08.01.500980.
- 8.- Obregon-Gutierrez P, Aragon V, Correa-Fiz F. Sow Contact Is a Major Driver in the Development of the Nasal Microbiota of Piglets. *Pathogens*. 2021;10(6):697. doi: 10.3390/pathogens10060697.
- 9.- Correa-Fiz, F., Gonçalves dos Santos, J.M., Illas, F. *et al.* Antimicrobial removal on piglets promotes health and higher bacterial diversity in the nasal microbiota. *Sci Rep* 9, 6545 (2019). doi.org/10.1038/s41598-019-43022-y.
- 10.- Blanco-Fuertes M., Sibila M. Franzo G. *et al.* Ceftiofur Treatment of Sows Results in Long-Term Alterations in the Nasal Microbiota of the Offspring That Can Be Ameliorated by Inoculation of Nasal Colonizers. *Research Square* 2023. doi.org/10.21203/rs.3.rs-2836014.
- 11.- Wienczek, I.; Hartmann, M.; Merkel, J.; Trittmacher, S.; Kreienbrock, L.; Hennig-Pauka, I. Temporal Patterns of Phenotypic Antimicrobial Resistance and Coinfecting Pathogens in *Glaesserella parasuis* Strains Isolated from Diseased Swine in Germany from 2006 to 2021. *Pathogens* 2022, 11, 721. https://doi.org/10.3390/pathogens11070721.