



Universidad
Católica de
Valencia
San Vicente Mártir

TFG

TRABAJO FIN DE GRADO

**GRADO EN
VETERINARIA**

Recuento de *Escherichia coli* en heces de cordero según el manejo en el destete.

Alumno: Maite Serrat Mayayo

Tutor: Marta González Clari

Curso académico: 2021-2022



Facultad de Veterinaria
y Ciencias Experimentales
Universidad Católica de Valencia
San Vicente Mártir

AGRADECIMIENTOS

A mi madre por ayudarme y aportar su punto de vista cuando más falta me hacía.

A Víctor, por ayudar en la edición del trabajo, aunque éste no estuviera desarrollado en “LaTeX”.

A mi tutora y directora del presente trabajo, Dra. Marta González Clari, por la paciencia, el trabajo y la ayuda, imprescindibles sobre todo en esos días interminables en el laboratorio.

Y a todas las personas que formaron parte de esta investigación, con las que compartí momentos en el laboratorio, gracias por contar conmigo en el proyecto en el que se incluye este trabajo.

ÍNDICE DE CONTENIDO:

RESUMEN	1
ABSTRACT	1
1. INTRODUCCIÓN	2
1.1 Importancia del sector ovino en España y en la Comunidad Valenciana	2
1.2 Importancia del destete en corderos.....	3
1.3 Estrés como factor de riesgo para el desarrollo de diarreas en corderos	4
1.4 E-coli como indicador de estrés	5
1.5 Utilización de melatonina para mitigar el estrés del destete	6
1.6 Justificación del estudio	6
2. OBJETIVOS	8
3. MATERIAL Y MÉTODOS	9
3.1 Población de estudio	9
3.2 Obtención de las muestras.....	10
3.3 Procesado de las muestras.....	10
3.3.1 Preparación de medios de cultivo.....	10
3.3.2 Diluciones seriadas y siembra masiva en MacConkey	12
3.3.3 Recuento y siembra en estría simple en EMB y en TSA	13
3.3.4 Ajuste de los recuentos y realización de galerías API	15
3.3.5 Lectura de galerías API	16
3.4 Cálculo de Unidades Formadoras de Colonias/gramo de heces (UFC/g).....	17
3.5 Análisis estadístico	17
4. RESULTADOS	18
4.1 Población de estudio	18
4.2 Procesado de las muestras.....	19
4.3 Recuento de <i>E. coli</i> en heces.....	23
4.3.1 Cantidad de <i>E. coli</i> en heces de corderos antes y después del destete.....	23
4.3.2 Influencia del destete en la cantidad de <i>E. coli</i> fecal y su posible relación con el estrés en dicho periodo.....	24

4.3.3	Efectos de la administración de melatonina en el momento del destete sobre la carga fecal de <i>E. coli</i>	26
5.	DISCUSIÓN.....	27
5.1	Población de estudio.....	27
5.2	Procesado de las muestras.....	27
5.3	Recuento de <i>E. coli</i> en heces.....	28
5.3.1	Cantidad de <i>E. coli</i> en heces de corderos antes y después del destete.....	28
5.3.2	Influencia del destete en la cantidad de E-coli fecal y su posible relación con el estrés en dicho periodo.....	29
5.3.3	Efectos de la administración de melatonina en el momento del destete sobre la carga fecal de <i>E. coli</i>	30
6.	CONCLUSIONES	32
	BIBLIOGRAFÍA.....	33
	ANEXOS	36

ÍNDICE DE FIGURAS:

Figura 1: Distribución del censo ovino por Comunidades Autónomas 2021 (Subdirección General de Producciones Ganaderas y Cinegéticas & Dirección General de Producciones y Mercados Agrarios., 2021).	2
Figura 2: Distribución de la producción de carne de ovino por Comunidades Autónomas (Subdirección General de Producciones Ganaderas y Cinegéticas & Dirección General de Producciones y Mercados Agrarios., 2021).....	3
Figura 3: Etiología del síndrome diarreico del cordero (Ferrer Mayayo et al., 2007).....	5
Figura 4: Crecimiento de colonias rosadas-rojizas compatibles con <i>E. coli</i> en agar MacConkey.	11
Figura 5: Crecimiento de distintas bacterias de la familia Enterobacteriaceae en agar EMB. ...	11
Figura 6: Preparación de Agar MacConkey para siembra en placa.....	12
Figura 7: Dilución 1:10 en tubo falcon.	13
Figura 8: Crecimiento de colonias en distintas cantidades tras la siembra de las diluciones 1:10-2, 1:10-4 y 1:10-6 durante el tanteo inicial.	13
Figura 9: Recuento de colonias de forma manual.	14
Figura 10: Crecimiento de cultivos puros en agar TSA.....	14
Figura 11: Crecimiento de colonias de color negro-azulado con brillo metálico compatibles con <i>E. coli</i> en agar EMB.....	15
Figura 12: Dilución de colonias crecidas en TSA en tubo para galería API 20E y llenado de los pocillos de las galerías.....	15
Figura 13: colocación de los distintos reactivos en las tiras API 20-E tras la incubación.....	16
Figura 14: Identificación de una muestra en agar TSA y en la hoja de registro de la galería API20E.	17

Figura 15: Representación de los grupos incluidos en el estudio y el número de animales en cada grupo.....	18
Figura 16: Representación del número de hembras y machos en cada uno de los grupos incluidos en el estudio.....	19
Figura 17: Ejemplo del registro de una muestra identificada con una seguridad del 99'5% como <i>E. coli</i>	20
Figura 18: Grado de seguridad en el recuento de <i>E. coli</i> en las muestras de heces analizadas 4 días antes del destete, indicando los porcentajes más repetidos.	21
Figura 19: Grado de seguridad en el recuento de <i>E. coli</i> en las muestras de heces analizadas 4 días después del destete, indicando los porcentajes más repetidos.....	22
Figura 20: Porcentaje de colonias utilizadas hasta tipificar E-coli. con la galería API20E de cada una de las muestras.	22
Figura 21: Distribución del total de datos de la diferencia entre ambos muestreos en UFC/ g de heces.	25

ÍNDICE DE TABLAS:

Tabla 1: Cantidad de muestras identificadas como *E. coli* con cada uno de los porcentajes de identificación más probable que se obtuvieron 4 días antes del destete. 20

Tabla 2: Cantidad de muestras identificadas como *E. coli* con cada uno de los porcentajes de identificación más probable que se obtuvieron 4 días después del destete..... 21

Tabla 3: Promedio de UFC/g de heces de cada grupo de animales antes y después del destete. 23

Tabla 4: Parámetros estadísticos de los datos, en UFC/g de heces, obtenidos en los recuentos de antes y después del destete..... 24

RESUMEN

El destete es un momento importante en la vida de los corderos. Puede ir acompañado de estrés y predispone a padecer el “síndrome diarreico del cordero”, que está causado entre otros agentes, por *Escherichia coli*. Varios estudios relacionan el estrés del destete con la carga fecal de cepas patógenas de *E. coli*, y otros estudios valoran el uso de melatonina para aliviar dicho estrés. El objetivo del presente trabajo fue cuantificar los niveles de *E. coli* genérico en heces de corderos antes y después del destete; así como conocer la influencia del destete, del estrés que supone, y de la administración de melatonina en la cantidad de *E. coli* fecal.

Se utilizaron corderos de raza Lacaune en lactancia artificial, y se dividieron en grupos según su ubicación y el tratamiento con melatonina en el momento del destete. Se realizaron recuentos de colonias compatibles con *E. coli* en muestras fecales 4 días antes y 4 días después del destete, y se confirmó la presencia de *E. coli* mediante galerías API 20E.

Los resultados obtenidos mostraron un promedio de 2×10^{11} UFC/g de heces antes del destete y $2,2 \times 10^{11}$ UFC/g después. No se relacionó el destete ni el estrés del destete con la cantidad de *E. coli* fecal, ni se observaron efectos significativos de la melatonina en la carga fecal de *E. coli*. Pero se consideró necesario complementar el presente trabajo con estudios posteriores.

Palabras clave: destete, corderos, estrés, síndrome diarreico del cordero, E. coli, melatonina.

ABSTRACT

Weaning is an important moment in the life of lambs. It can be accompanied by stress and predisposes them to suffer "lamb diarrheal syndrome" which is caused, among other agents, by *Escherichia coli*. Several studies relate weaning stress with the fecal load of pathogenic strains of *E. coli*, and other studies assess the use of melatonin to alleviate that stress. The objective of this study was to quantify the standard of generic *E. coli* in feces of lambs, before and after weaning; as well as knowing the influence of weaning, the stress it implies, and the administration of melatonin in the quantity of fecal *E. coli*.

Lambs of Lacaune breed in artificial lactation were used and were divided into groups according to their location and the treatment with melatonin at the time of weaning. Colony counts compatible with *E. coli* were obtained in fecal samples 4 days before and 4 days after weaning, and the presence of *E. coli* was checked using API 20E galleries.

The results obtained showed an average of 2×10^{11} CFU/g of feces before and $2,2 \times 10^{11}$ CFU/g after weaning. Weaning and weaning stress were not related to the quantity of fecal *E. coli*, neither significant effects of melatonin on the fecal amount of *E. coli* were observed. But it was considered necessary to complement the present work with later studies.

Keywords: weaning, lambs, stress, lamb diarrheal syndrome, E. coli, melatonin.

1. INTRODUCCIÓN

1.1 Importancia del sector ovino en España y en la Comunidad Valenciana

España es el primer país productor de ovino de la Unión Europea. El nivel de importaciones es menor al de exportaciones. España exportó el 38% de la carne de ovino y caprino producida en 2020. Además, también se exportan animales vivos a países europeos y a otros países como Libia o Jordania (Subdirección General de Producciones Ganaderas y Cinegéticas & Dirección General de Producciones y Mercados Agrarios, 2021).

En España hay un total de 114.196 explotaciones de ovino, de las cuales 1.370 se encuentran en la Comunidad Valenciana. En enero de 2021, el censo total de ovinos en España era de 15.919.162, mientras que el censo en la Comunidad Valenciana era de 275.605, lo que supone el 1,7% del total (figura 1) (Subdirección General de Producciones Ganaderas y Cinegéticas & Dirección General de Producciones y Mercados Agrarios, 2021).

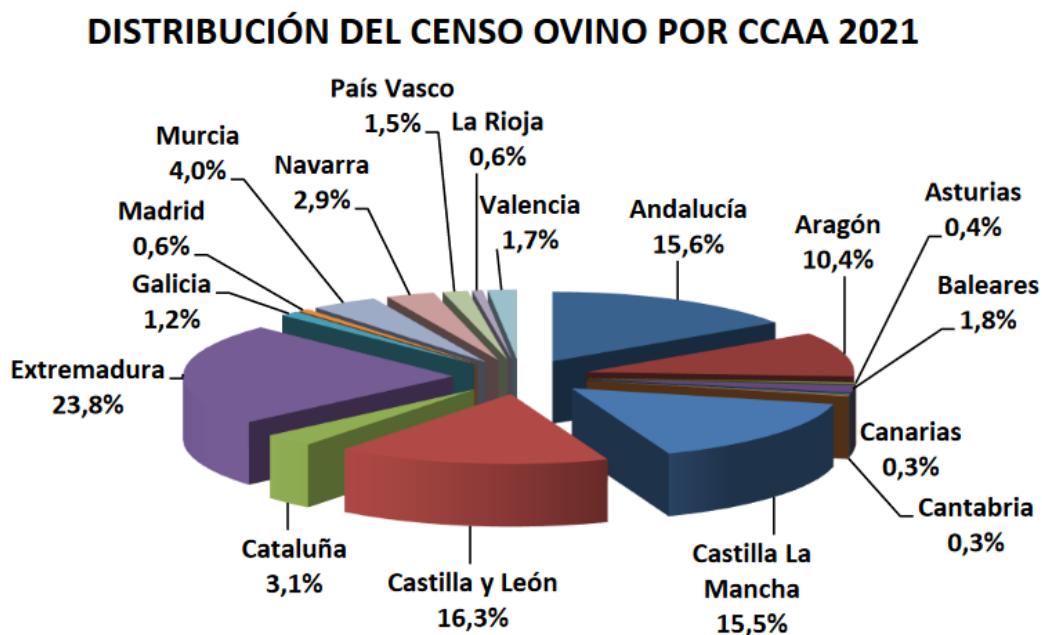


Figura 1: Distribución del censo ovino por Comunidades Autónomas 2021 (Subdirección General de Producciones Ganaderas y Cinegéticas & Dirección General de Producciones y Mercados Agrarios, 2021)

La Comunidad Valenciana produce el 6,9% del total de carne de ovino en España (figura 2) (Subdirección General de Producciones Ganaderas y Cinegéticas & Dirección General de Producciones y Mercados Agrarios, 2021). Se incluye en esta producción de carne, los corderos obtenidos de explotaciones lecheras. En las explotaciones de leche se mantiene a los corderos,

previo su cebo, en lactación artificial en una sala de nodriza, donde se alojan desde su nacimiento hasta el destete (Acero Adámez, 2013).

DISTRIBUCIÓN PRODUCCIÓN DE CARNE DE OVINO POR CCAA 2020

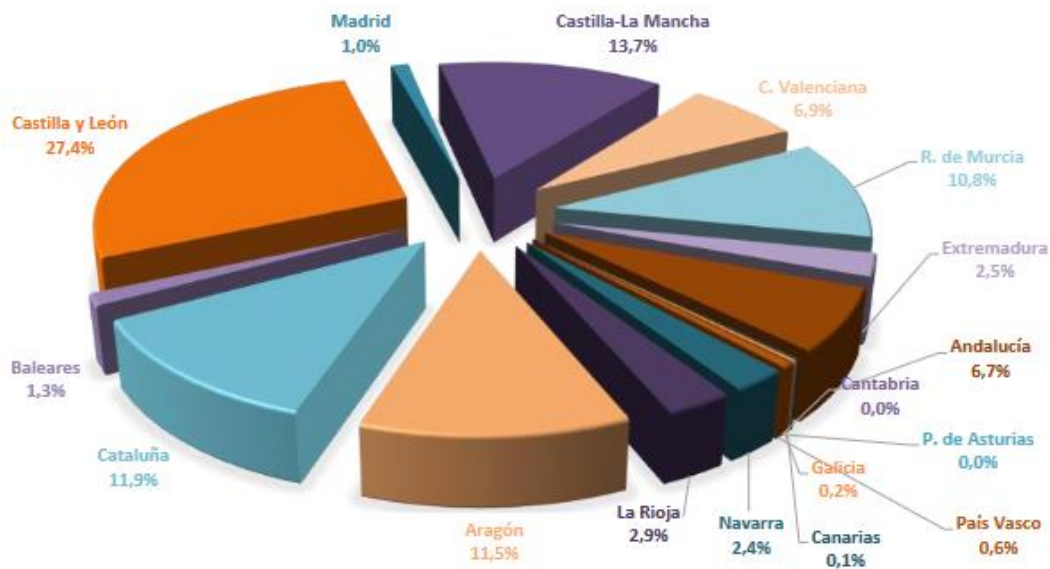


Figura 2: Distribución de la producción de carne de ovino por Comunidades Autónomas (Subdirección General de Producciones Ganaderas y Cinegéticas & Dirección General de Producciones y Mercados Agrarios, 2021).

1.2 Importancia del destete en corderos

El destete es la transición de una alimentación con leche o sustituto lácteo (lactancia artificial) a dietas sólidas con pienso y forraje. Este paso implica cambios nutricionales y cambios en el entorno social de los corderos, siendo por ello uno de los eventos más estresantes de su vida (Pascual-Alonso et al., 2015).

Tras el destete aumenta la diversidad microbiana gastro-intestinal de los animales, que continuará en ascenso con la edad (Li et al., 2018; Liao et al., 2021). Por otro lado, el cambio de dieta requiere que el rumen se haya desarrollado completamente antes del destete, de no ser así, puede dar lugar a una disminución en la ingesta y del crecimiento de los corderos (Wang et al., 2019). Además, la liberación de glucocorticoides en el destete coincide con una disminución de la hormona del crecimiento (Pascual-Alonso et al., 2015).

La edad de los corderos en el momento del destete condiciona su rendimiento productivo: un destete temprano mejora el crecimiento, el rendimiento del engorde y la calidad de la canal, pero la edad óptima del destete puede variar debido a la diversidad de alimentación, prácticas de manejo y genotipo (Liao et al., 2021; Wang et al., 2019). Existen, por ejemplo,

destetes tempranos, comunes en la industria moderna, a las 3 semanas de edad; destetes más tardíos, a las 6-10 semanas, típicos en Australia, o de incluso a las 12 semanas de edad o más, en China (Liao et al., 2021).

Por otro lado, varios estudios han comparado destetes tempranos (21-30 días de edad) con destetes más tardíos (45-56 días de edad); comprobando que, tanto en lactancia artificial como natural, la edad del destete es el principal factor de riesgo para desarrollar estrés e influir en la flora intestinal, predisponiendo a patologías (Li et al., 2018; Liao et al., 2021; Mao et al., 2021).

1.3 Estrés como factor de riesgo para el desarrollo de diarreas en corderos

El destete tiene varios efectos en el intestino: reducción en la altura de las vellosidades, aumento en la profundidad de las criptas, aumento en la permeabilidad de la mucosa y reducción en los niveles de proteínas de unión estrecha que mantienen la barrera epitelial (Li et al., 2018).

Por otro lado, el estrés derivado del destete temprano (en corderos menores a un mes de vida), puede dar lugar a inmunosupresión, predisponiendo a enfermedades multifactoriales, afectando así al bienestar y rendimiento productivo de los animales. En estos casos, los microorganismos comensales del intestino aumentan, y, posteriormente, aparecen signos histológicos de patología (Li et al., 2018; Pascual-Alonso et al., 2015).

La patología más frecuente que se produce en los corderos durante la lactación y el destete es el “síndrome diarreico del cordero”. Éste consiste en diarreas multifactoriales, con distintos factores predisponentes como: el manejo intensivo en la lactancia artificial, la ingesta de poco calostro y de mala calidad, la higiene ambiental y de la ubre en las parideras, los empachos de leche, la edad de las madres y el hacinamiento excesivo (Cid Vázquez, 2002; Ferrer Mayayo et al., 2007; Lindsay Pérez & Ingresa Capaccioni, 2019). Otros factores de riesgo son: la edad (antes del destete), el tamaño del rebaño (grande) y la estación (seca) (Abdou et al., 2021).

Las diarreas se producen cuando coinciden estos factores de riesgo o predisponentes con una baja inmunidad por parte de los corderos y la proliferación de microorganismos oportunistas que colonizan el aparato digestivo (figura 3) (Acosta Dibarrat et al., 2013; Cid Vázquez, 1993; Ferrer Mayayo et al., 2007).

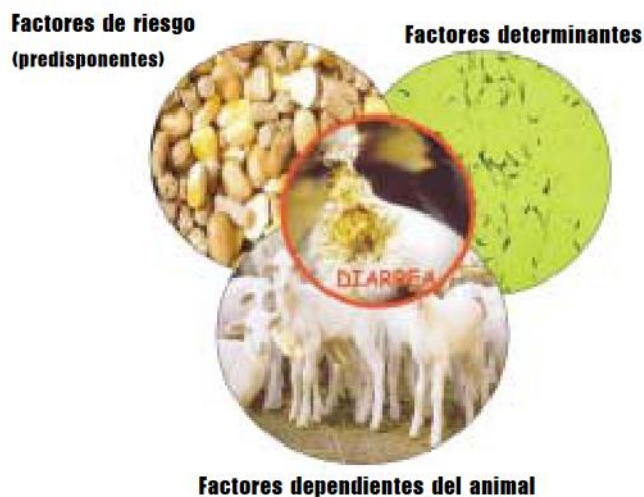


Figura 3: Etiología del síndrome diarreico del cordero (Ferrer Mayayo et al., 2007).

1.4 *E. coli* como indicador de estrés

Los principales agentes enteropatógenos oportunistas que intervienen en el desarrollo del “síndrome diarreico del cordero” son: *Rotavirus*, *Escherichia coli*, *Clostridium spp.*, *Salmonella spp.*, *Campylobacter spp.*, *coccidios* y *giardias* (Ferrer Mayayo et al., 2007). En concreto predominan *E. coli* y *Cryptosporidium spp.* (principalmente en corderos menores a 1 mes de vida) (Abdou et al., 2021; Cid Vázquez, 1993). En un estudio realizado en pequeños rumiantes de la Comunidad Valenciana, el agente infeccioso predominante era *E. coli*, con una prevalencia del 90,6% (Lindsay Pérez & Ingesa Capaccioni, 2019).

E. coli es un bacilo corto, Gram negativo, anaerobio facultativo, de la familia Enterobacteriaceae. Tras el nacimiento, *E. coli* coloniza el tracto intestinal de los animales, pasando a formar parte de la flora saprofita. Se encuentra, además, en el ambiente (suelo, agua y alimento) y puede sobrevivir en las heces durante varios meses. Las distintas cepas de *E. coli* son en su mayoría no patógenas, pero algunas poseen “factores de patogenicidad”; pudiendo así producir distintos tipos de infecciones (Bardají Mur & Ramos Antón, 2020; Cid Vázquez, 1993; Rivas et al., 2015).

Las cepas patógenas más comunes en corderos son la *E.coli* enterohemorrágica (ECEH) y la *E. coli* enteropatógena (ECEP) o “*E. coli* diarreico” (Bardají Mur & Ramos Antón, 2020).

Ciertos estudios han utilizado el recuento de *E. coli* genérico y de cepas patógenas de *E. coli* en heces como indicador de estrés en animales (Brown-Brandl et al., 2009; Cray et al., 1998).

1.5 Utilización de melatonina para mitigar el estrés del destete

Entre las distintas formas de mitigar el estrés, se encuentra el uso de melatonina (5-metoxi-N-acetilriptamina). Se trata de una neurohormona pineal que participa en la fisiología circadiana, estacional y reproductiva. Su acción se produce cuando se une a dos tipos de receptores, mt1 y MT2, que están presentes en el cerebro y en tejidos periféricos (Song et al., 2005; Torres-Farfan et al., 2003). Se ha estudiado su uso para aliviar distintas modalidades de estrés, como pueden ser: el estrés menstrual durante los viajes en avión hacia el este en humanos (Kirby et al., 1999) o el comportamiento y el aumento de defecación debidos al estrés en ratas (Song et al., 2005). Esto es posible debido a los efectos de la melatonina sobre la regulación de la homeostasis neuro-endocrina en el hipotálamo, la cual se altera en momentos de estrés (Konakchieva Al B' et al., 1997).

El estrés agudo da lugar a un aumento de la hormona liberadora de corticotropina y serotonina, debido a ello la motilidad intestinal aumenta y se promueve la defecación. En animales sanos, la melatonina tiene efectos excitatorios intestinales, pero en animales con disfunción intestinal debida al estrés, la melatonina reduce la hormona liberadora de corticotropina y la serotonina, atenuando así la defecación (Song et al., 2005).

La melatonina puede utilizarse también para reducir el estrés debido al destete, en estos casos, siempre que no se haya tratado a los animales con antibiótico, la melatonina promueve la flora intestinal beneficiosa, como distintas especies de *Lactobacillus*. Promueve el aumento de peso y mejora la morfología intestinal en estos animales, aunque no se observen cambios en las vellosidades y en las criptas intestinales. Gracias a los efectos de la melatonina en la flora intestinal de animales estresados, se reducen las infecciones por *E. coli*, el cual prolifera cuando bajan las cargas de *Lactobacillus* (Ren et al., 2018).

1.6 Justificación del estudio

En el destete se observan cambios en la morfología, en la barrera inmunitaria y en la flora intestinal, predisponiendo a patologías. La patología más frecuente que se produce es el “síndrome diarreico del cordero” desencadenado por distintos microorganismos, entre los que

destaca *E. coli*. En animales estresados, la suplementación con melatonina reduce las infecciones por *E. coli* y mejora su ganancia de peso. Los estudios realizados anteriormente utilizan modelos en ratas o ratones y en terneros, pero no se conoce con exactitud los efectos del destete ni de la melatonina en la carga fecal de *E. coli* en corderos.

En el presente trabajo se comparan las cargas fecales de *E. coli* en corderos de ovino lechero de una misma explotación antes y después del destete. Se incluyen factores que pueden favorecer el estrés, analizando heces de animales que no cambian de lugar y animales que pasan a cebadero en el momento del destete. Por otro lado, se incluyen en el estudio corderos a los que se les administra melatonina (inyectada o en implante) en el momento del destete, pretendiendo así conocer su efecto en la carga fecal de *E. coli*.

2. OBJETIVOS

Los objetivos del presente trabajo, ordenados de mayor a menor importancia, son los siguientes:

- Cuantificar la cantidad de *E. coli* en heces de corderos, antes y después del destete.
- Conocer la influencia del destete en la cantidad de *E. coli* fecal y su posible relación con el estrés en dicho periodo.
- Describir la influencia de la administración de melatonina sobre la carga fecal de *E. coli* tras el destete.

3. MATERIAL Y MÉTODOS

3.1 Población de estudio

La población utilizada para el presente estudio fue de corderos de un mes de vida aproximadamente, de la raza Lacaune (aptitud lechera). Dicha población pertenece a la Granja Rinya, en Catadau (Valencia). Los corderos se alojaban, desde horas después de su nacimiento, en una sala de nodriza, en lactancia artificial con acceso a lacto remplazantes y pienso de iniciación.

En el momento del destete algunos de estos animales fueron destinados a la nave de cebo, otros permanecieron en la sala de nodriza con pienso de cebo y otros no llegaron a destetarse. De esta manera se crearon 3 escenarios:

1. Animales destetados realizando el cebo en la sala de nodriza.
2. Animales no destetados.
3. Animales destetados y destinados a cebo en otra nave.

Por otro lado, el grupo destinado a cebo se dividió en otros tres grupos: un grupo control, un grupo al que se le administró melatonina inyectada intramuscular en el momento del destete y otro grupo al que se le colocó un implante de melatonina subcutáneo en el momento del destete.

De esta forma, se obtuvo un total de 5 grupos. Para que los grupos fueran homogéneos, se ordenó a los animales de mayor a menor peso y a cada animal se le asignó un grupo. Cada grupo quedó con, aproximadamente, el mismo número de hembras y machos y animales de distintos pesos:

1. Grupo destete en sala de nodriza: formado por animales que se destetan y pasan a alimentarse de pienso de cebo, pero continúan en la sala de nodriza.
2. Grupo lactantes: formado por animales que no se destetan durante el estudio y continúan en la sala de nodriza.
3. Grupo control: formado por animales que se destetan de la manera habitual, pasando a un cebadero.

4. Grupo implante de melatonina: formado por animales que se destetan y en ese momento se les coloca un implante de melatonina comercial subcutáneo (Melovine) y pasan a cebadero.
5. Grupo melatonina inyectada: formado por animales que se destetan y en ese momento se les inyecta melatonina intravenosa y pasan a cebadero.

3.2 Obtención de las muestras

Se realizaron dos tomas de muestras de heces, con una diferencia de 8 días. Las tomas de muestras coincidieron con 4 días antes de realizar el destete y 4 días después.

Las heces fueron recogidas mediante vaciado rectal manual (Collins & Lyne, 1989). Cada muestra se colocó en un tubo falcon de 50ml y se rotuló con el número de crotal del cordero. Se registró al mismo tiempo el sexo de los animales.

3.3 Procesado de las muestras

El procesado de las muestras se realizó en los laboratorios de la sede de Santa Úrsula de la UCV. Consistió en el cultivo de las muestras para el recuento de colonias compatibles con *E. coli*, y su aislamiento y tipificación. Las muestras se procesaron en fresco el mismo día de su recogida, del mismo modo en las dos tomas de muestra:

3.3.1 Preparación de medios de cultivo

Previo al procesado, se prepararon varios medios de cultivo:

- Agua de peptona tamponada (Buffered peptone water, labkem®): medio de cultivo enriquecedor que sirve como diluyente y permite el crecimiento de microorganismos. Se usó para realizar diluciones seriadas de las muestras.
- Agar MacConkey (MacCONKEY No. 2 AGAR, Scharlau®): se utilizó para permitir el aislamiento selectivo y la identificación de Enterobacteriaceae de las heces inhibiendo el desarrollo de gran parte de la flora Gram positiva y diferenciando los microorganismos fermentadores de lactosa (colonias rosadas-rojizas con o sin halo de precipitación biliar) de los microorganismos no fermentadores de lactosa (colonias del color del medio, incoloras). La bacteria *E. coli* es fermentador de

lactosa, esto permitió seleccionar y contar las colonias rosadas-rojizas compatibles morfológicamente con dicha bacteria (figura 4) (Collins & Lyne, 1989).

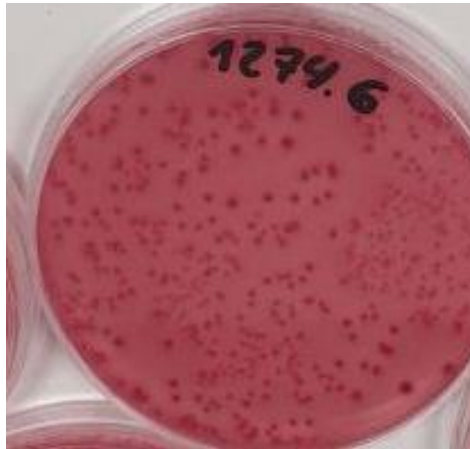


Figura 4: Crecimiento de colonias rosadas-rojizas compatibles con *E. coli* en agar MacConkey.

- Agar EMB (EOSIN METHYLENE BLUE AGAR (EMB AGAR), Scharlau®): se utilizó para diferenciar distintas especies de microorganismos de la familia Enterobacteriaceae según el color de las colonias (figura 5) (Collins & Lyne, 1989):
 - *Escherichia coli*: Negro azuladas con brillo metálico.
 - *Klebsiella pneumoniae*: Mucosas confluentes, con centro oscuro.
 - *Proteus mirabilis*, *Salmonella typhimurium*, *Shigella flexneri* y *Pseudomonas aeruginosa*: Incoloras.
 - *Enterococcus faecalis*: Incoloras puntiformes.
 - *Candida albicans*: Rosadas puntiformes.

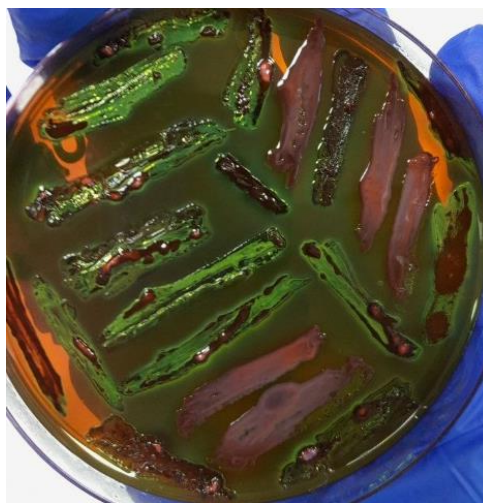


Figura 5: Crecimiento de distintas bacterias de la familia Enterobacteriaceae en agar EMB.

Las colonias compatibles con *E. coli* contadas en agar MacConkey se resembraron mediante estría simple en agar EMB, comprobando así que crecían de color negro-azulado con brillo metálico y, por tanto, eran compatibles con *E. coli* (Acosta Dibarrat et al., 2013).

- Agar TSA (TRYPTIC SOY AGAR (TSA) (Eur. Pharm.), Scharlau®): se utilizó por ser un medio de uso general muy rico en nutrientes. Permitió resembrar las colonias compatibles con *E. coli* y contadas en MacConkey (Collins & Lyne, 1989). Posteriormente, estas colonias, se utilizaron para tipificar las cepas de E-coli, mediante galerías API 20-E.

Para la preparación de estos medios de cultivo se siguieron las indicaciones de reconstitución de las etiquetas, se autoclavaron y distribuyeron en placas Petri (figura 6). Estas placas, con los medios de cultivo, fueron almacenadas en nevera hasta unos minutos antes de su uso, cuando se secaron en la campana de extracción de gases para eliminar la humedad superficial y facilitar el sembrado.



Figura 6: Preparación de Agar MacConkey para siembra en placa.

3.3.2 Diluciones seriadas y siembra masiva en MacConkey

El mismo día de la recogida de las heces se procesaron las muestras. Se pesó cada muestra en un tubo falcon tarado y se añadió agua de peptona estéril, proporcional al peso de la muestra, creando así una dilución 1:10 (figura 7)(Collins & Lyne, 1989). Desde los tubos Falcon se realizaron 9 diluciones seriadas con agua de peptona estéril

en tubos Eppendorff estériles de 1'5mL. De esta forma, se obtuvieron en total 10 diluciones de las muestras.



Figura 7: Dilución 1:10 en tubo falcon.

Tras un tanteo inicial, con el fin de facilitar el trabajo, se sembró sólo desde unas diluciones según la cantidad de colonias esperadas (figura 8). Las diluciones sembradas en MacConkey fueron: $1:10^{-4}$, $1:10^{-6}$, $1:10^{-8}$ y $1:10^{-10}$.

Tras la siembra, se incubaron las placas durante 18-24 horas a 37°C.

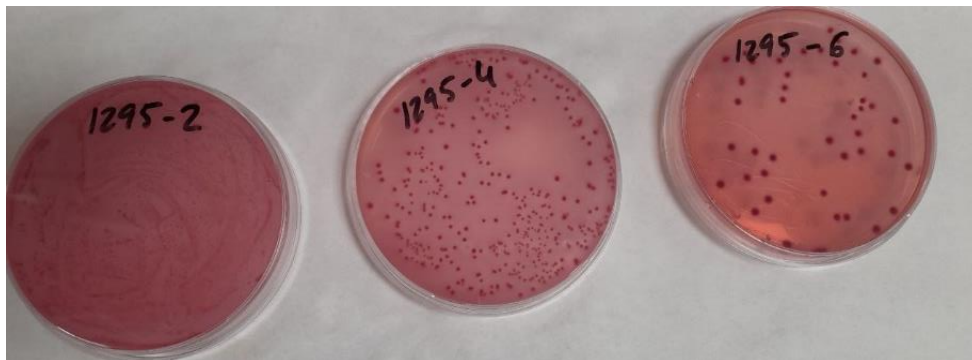


Figura 8: Crecimiento de colonias en distintas cantidades tras la siembra de las diluciones $1:10^{-2}$, $1:10^{-4}$ y $1:10^{-6}$ durante el tanteo inicial.

3.3.3 Recuento y siembra en estría simple en EMB y en TSA

De cada muestra se eligieron las placas con un número de colonias de entre 15 y 150 y se contaron las colonias rosadas-rojizas con o sin halo de precipitación biliar de forma manual, marcando con un rotulador permanente las placas (figura 9) (Collins & Lyne, 1989).

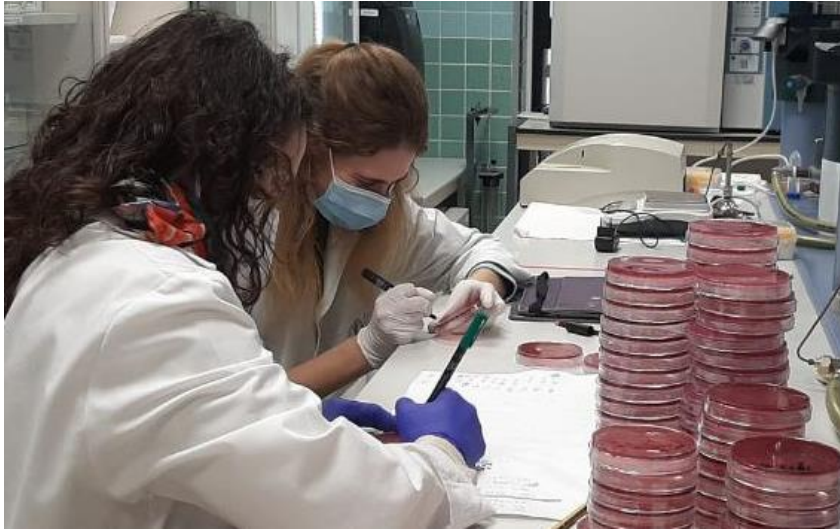


Figura 9: Recuento de colonias de forma manual.

En aquellas muestras con un número de colonias inferior a 15 en todas las placas sembradas, se contaron las colonias de la placa más acorde (sin manchas de condensación). Y en las muestras con un número de colonias superior a 150 en todas las placas sembradas, se eligió la de menor número de colonias, se contaron en un cuarto de la placa y se multiplicó por 4 (Collins & Lyne, 1989).

Las colonias contadas se resembraron en agar EMB y se incubaron las placas en estufa a 37°C durante 18-24 horas.

Por otro lado, cuatro de las colonias contadas en cada muestra, se sembraron en TSA y se incubaron las placas en estufa a 37°C durante 18-24 horas, obteniendo cultivos puros (figura 10).



Figura 10: Crecimiento de cultivos puros en agar TSA.

3.3.4 Ajuste de los recuentos y realización de galerías API

De cada muestra, se contó el número de colonias que en las placas de EMB era compatible con E-coli (negro azuladas con brillo metálico), (figura 11). Este paso permitió así reajustar el recuento, restando las colonias que no fueran compatibles con *E. coli* en EMB.

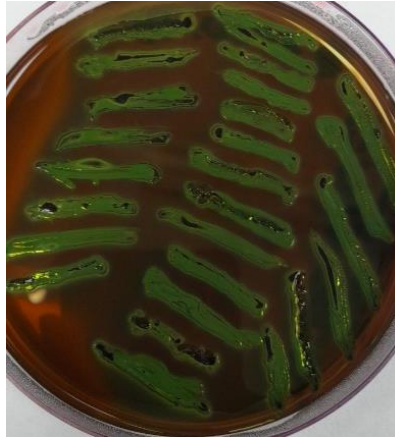


Figura 11: Crecimiento de colonias de color negro-azulado con brillo metálico compatibles con *E. coli* en agar EMB.

Por otro lado, se utilizó una galería API 20-E (Gama de galerías API® ID, BIOMÉRIEUX) para tipificar las colonias contadas en cada muestra. Esta galería presenta 20 microtubos y permite la identificación de enterobacterias y otros bacilos Gram negativos. Se diluyó, para cada muestra, una cepa pura del medio TSA en los tubos específicos para las galerías API 20-E (figura 12) y se rellenaron los pocillos siguiendo las indicaciones del fabricante. Se incubaron durante 18-24 horas en estufa a 37°C.

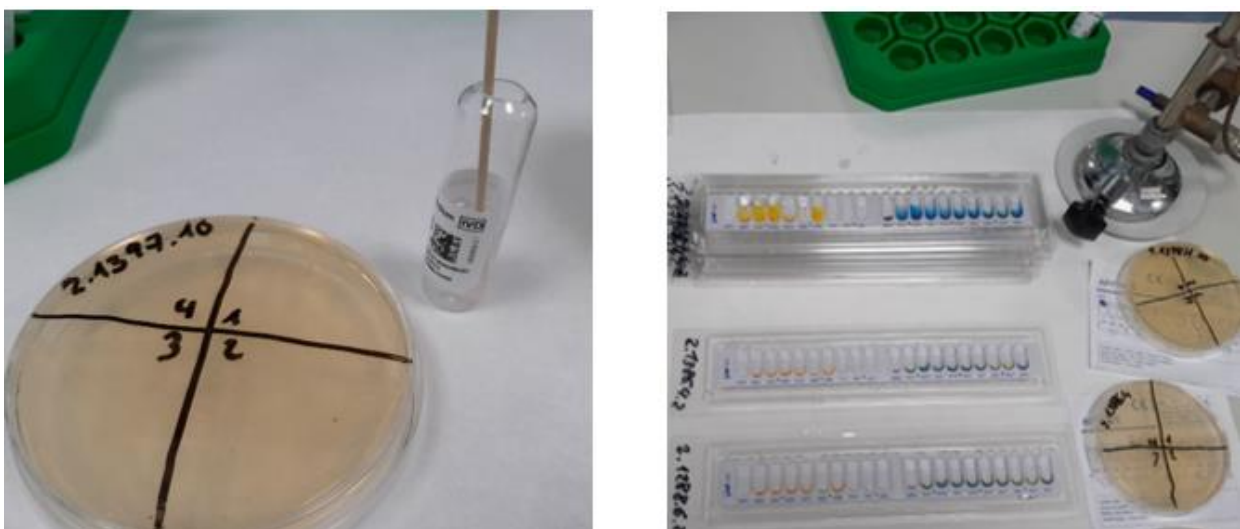


Figura 12: Dilución de colonias crecidas en TSA en tubo específico para galería API 20-E y llenado de los pocillos de las galerías.

3.3.5 Lectura de galerías API

Se siguieron las instrucciones de las galerías API para colocar en los pocillos correspondientes los reactivos indicados y se interpretaron utilizando el sistema informático API 20-E (figura 13). De esta forma, se tipificaron las colonias, obteniendo así cuál era el género y especie de cada cepa, pudiendo comprobar que se trataba de *E. coli*. En los casos en que las colonias no fueron identificadas como E-coli, se repitió la galería API usando otra de las cuatro colonias sembrada en TSA de la misma muestra.



Figura 13: colocación de los distintos reactivos en las tiras API 20-E tras la incubación.

3.3.6 Identificación de las muestras en el laboratorio

Durante su procesado en el laboratorio las muestras se identificaron como se aprecia en la figura 14: En cada placa se indicó el número de crotal del animal seguido de un número correspondiente a la dilución utilizada para el recuento (4, 6, 8 o 10). Estos números iban precedidos, en el caso del segundo muestreo, de un 2. Al utilizar la galería API 20-E, se añadió a la identificación un último dígito según la colonia escogida desde agar TSA (1, 2 o 3).

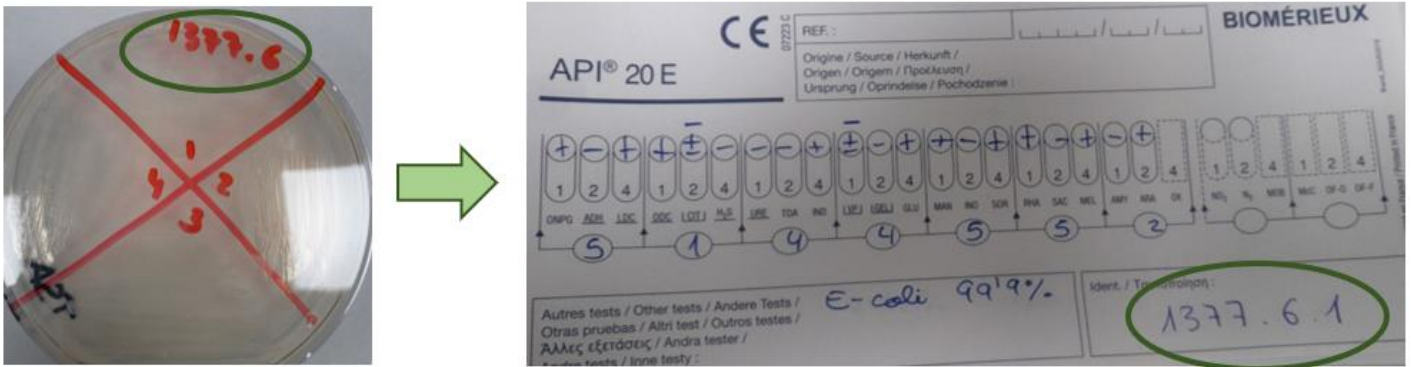


Figura 14: Identificación de una muestra en agar TSA y en la hoja de registro de la galería API20E.

3.4 Cálculo de Unidades Formadoras de Colonias/gramo de heces (UFC/g)

Para calcular las UFC/g de cada muestra, se expresó el peso de las heces en gramos y se utilizó la siguiente fórmula:

$$\frac{\text{Colonias} \times 10^n}{\text{peso}} = \text{UFC/g}$$

Siendo “n” el número correspondiente a la dilución utilizada para el conteo de las colonias (4, 6, 8 o 10), y “Colonias” el número de colonias compatibles con *E. coli* contadas (tras el ajuste con EMB) (Collins & Lyne, 1989).

3.5 Análisis estadístico

Los datos obtenidos se procesaron mediante el paquete estadístico RStudio (R Core Team 2021), utilizando:

- Test Shapiro para determinar si los datos se distribuían de forma normal.
- Test de Kruskal-Wallis para determinar si existen diferencias significativas entre los diferentes grupos de animales.

4. RESULTADOS

4.1 Población de estudio

Durante el estudio, 4 animales murieron, quedando 74 animales. El número de corderos en cada grupo quedó de la siguiente manera (figura 15):

1. Grupo control: 14
2. Grupo destete en sala de nodriza: 13
3. Grupo lactantes: 16
4. Grupo melatonina inyectada: 15
5. Grupo implante de melatonina: 16

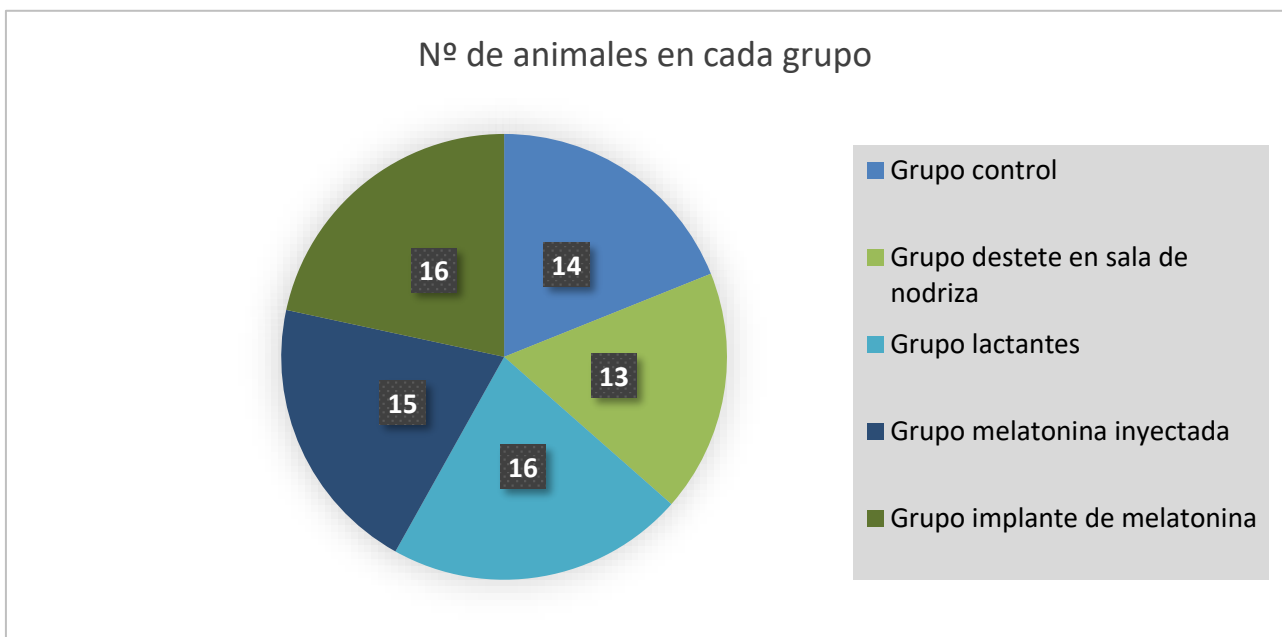


Figura 15: Representación de los grupos incluidos en el estudio y el número de animales en cada grupo.

Durante el estudio también se notificó el sexo de los animales. De los 74 animales, 26 eran hembras y 48 machos.

La representación de hembras y machos en cada grupo quedó de la siguiente manera (figura 16):

1. Grupo control: 3 hembras y 11 machos.

2. Grupo destete en sala de nodriza: 4 hembras y 9 machos.
3. Grupo lactantes: 7 hembras y 9 machos.
4. Grupo melatonina inyectada: 7 hembras y 8 machos
5. Grupo implante de melatonina: 5 hembras y 11 machos.

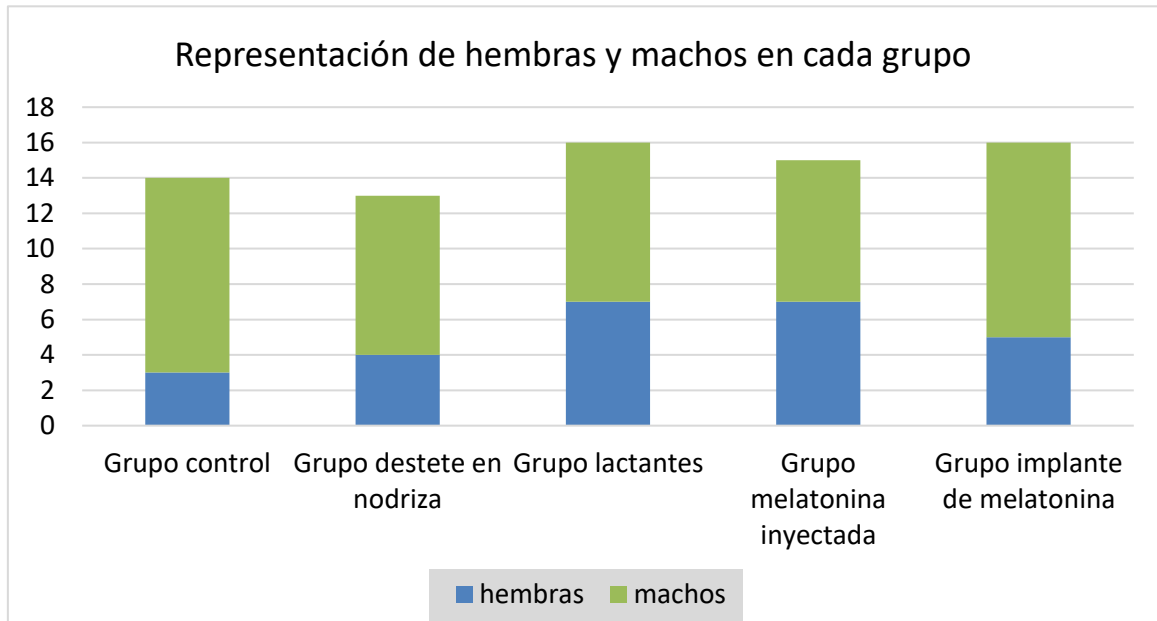


Figura 16: Representación del número de hembras y machos en cada uno de los grupos incluidos en el estudio.

4.2 Procesado de las muestras

Se identificó *E.coli* como agente más probable en las colonias sembradas en el medio de cultivo TSA de todas las muestras de heces, excepto una. Esta muestra se correspondía con el segundo muestreo (4 días después del destete) de un macho del grupo control. Este cordero fue descartado del estudio, quedando 13 animales en el grupo control y un total de 73 corderos en el estudio.

La lectura de las tiras API 20-E identificó *E. coli* como agente más probable, con una probabilidad de más de un 62'4% en todos los casos y de un 99% o más en la mayoría de las muestras, tanto del primer como del segundo muestreo (figura 17).

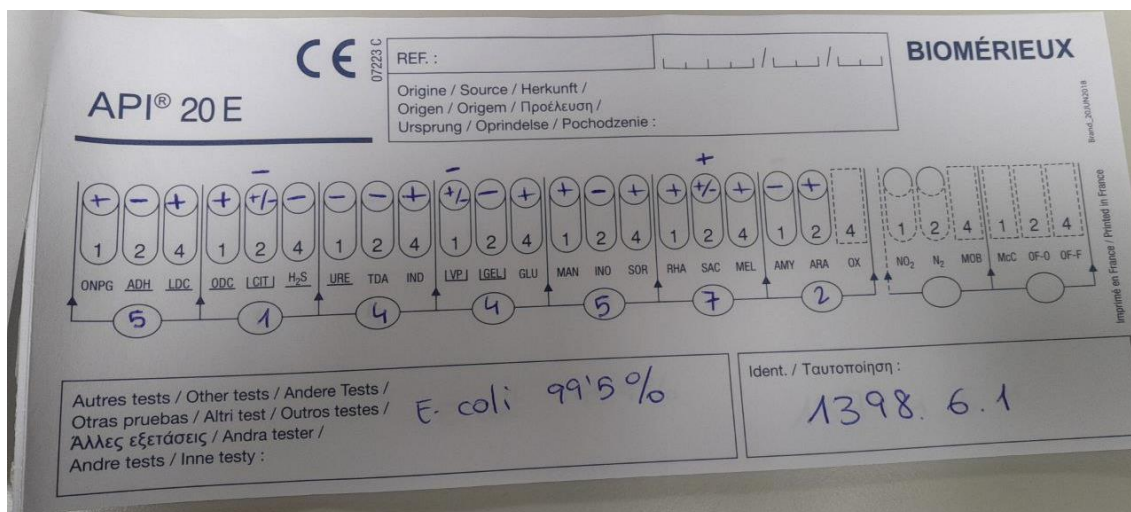


Figura 17: Ejemplo del registro de una muestra identificada con una seguridad del 99'5% como *E. coli*.

En el primer muestreo, como se observa en la tabla 1, de las 73 muestras de heces analizadas, se identificó *E. coli* con una probabilidad superior al 99'5% en 63 (86'3% de las muestras). Con una probabilidad de 95'9% a 99'5%, en 4 muestras. Y en las 6 muestras restantes se identificó *E. coli* con unas probabilidades superiores al 62'4% (figura 18).

Tabla 1: Cantidad de muestras identificadas como *E. coli* con cada uno de los porcentajes de identificación más probable que se obtuvieron 4 días antes del destete.

IDENTIFICACIÓN MÁS PROBABLE	NÚMERO DE MUESTRAS IDENTIFICADAS
<i>E. coli</i> 62'4%	1
<i>E. coli</i> 77'2%	1
<i>E. coli</i> 86'2 %	1
<i>E. coli</i> 87'7%	1
<i>E. coli</i> 89'7%	1
<i>E. coli</i> 94'7%	1
<i>E. coli</i> 95'9%	1
<i>E. coli</i> 96'3%	1
<i>E. coli</i> 98'4%	1
<i>E. coli</i> 98'9%	1
<i>E. coli</i> 99'5%	22
<i>E. coli</i> 99'7%	1
<i>E. coli</i> 99'8%	16
<i>E. coli</i> 99'9%	24
Total	73

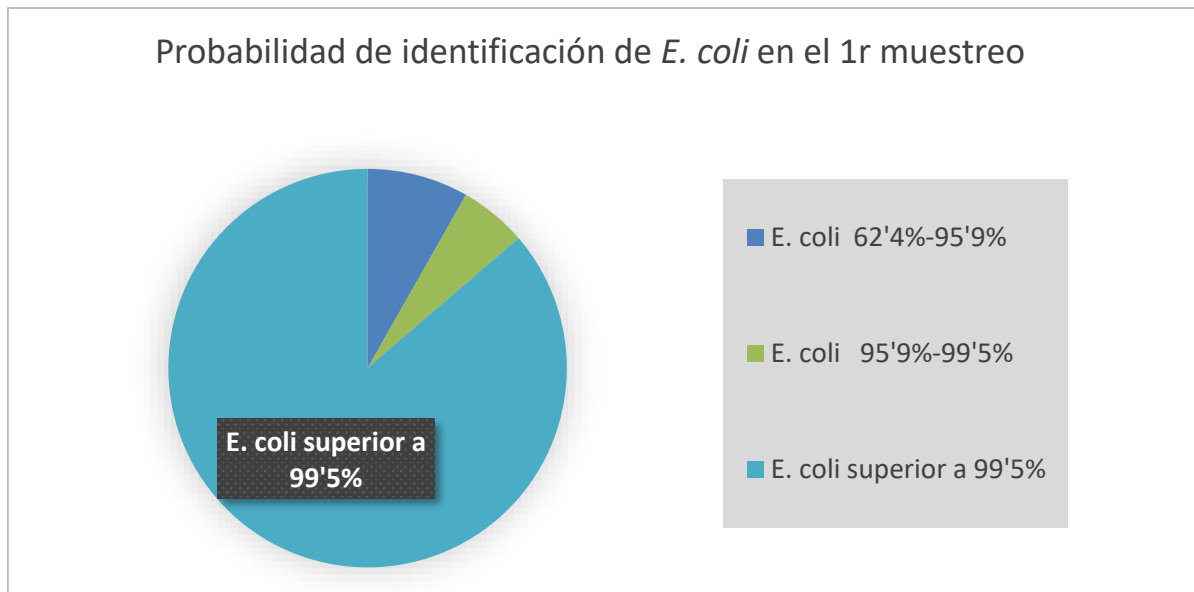


Figura 18: Grado de seguridad en el recuento de *E. coli* en las muestras de heces analizadas 4 días antes del destete, indicando los porcentajes más repetidos.

En el segundo muestreo, como se observa en la tabla 2, de las 73 muestras de heces analizadas, se identificó *E. coli* con una probabilidad superior al 99'5% en 58 muestras (79'4% de las muestras). Con una probabilidad de 97'9% a 99'5% en 6 muestras. Y en las 8 muestras restantes se identificó *E. coli* con unas probabilidades superiores al 62'4% (figura 19).

Tabla 2: Cantidad de muestras identificadas como *E. coli* con cada uno de los porcentajes de identificación más probable que se obtuvieron 4 días después del destete.

IDENTIFICACIÓN MÁS PROBABLE	NÚMERO DE MUESTRAS IDENTIFICADAS
<i>E. coli</i> 62'4%	1
<i>E. coli</i> 74'8%	1
<i>E. coli</i> 82'6 %	1
<i>E. coli</i> 87'4%	1
<i>E. coli</i> 87'7%	2
<i>E. coli</i> 89'7%	1
<i>E. coli</i> 92'1%	1
<i>E. coli</i> 97'9%	1
<i>E. coli</i> 98'4%	2
<i>E. coli</i> 98'9%	3
<i>E. coli</i> 99'1%	1
<i>E. coli</i> 99'5%	16
<i>E. coli</i> 99'6%	1
<i>E. coli</i> 99'7%	4
<i>E. coli</i> 99'8%	27
<i>E. coli</i> 99'9%	9
<i>E. coli</i> 100%	1
Total	73

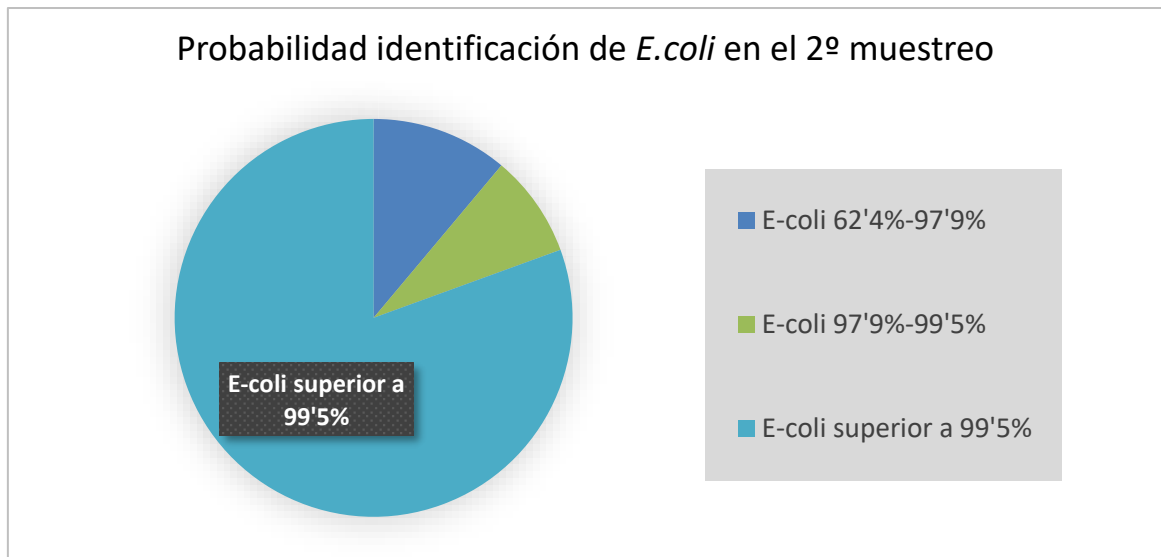


Figura 19: Grado de seguridad en el recuento de *E. coli* en las muestras de heces analizadas 4 días después del destete, indicando los porcentajes más repetidos.

Estas identificaciones de *E. coli* se obtuvieron a partir de una de las colonias crecidas en MacConkey tras resembrarla en TSA y utilizar la galería API20-E. En el 92% de las muestras del primer y segundo muestreo se identificó *E. coli* desde una primera colonia. En el resto (8%), fue necesario escoger una segunda o tercera colonia desde agar TSA con la que repetir la galería API 20-E (figura 20).

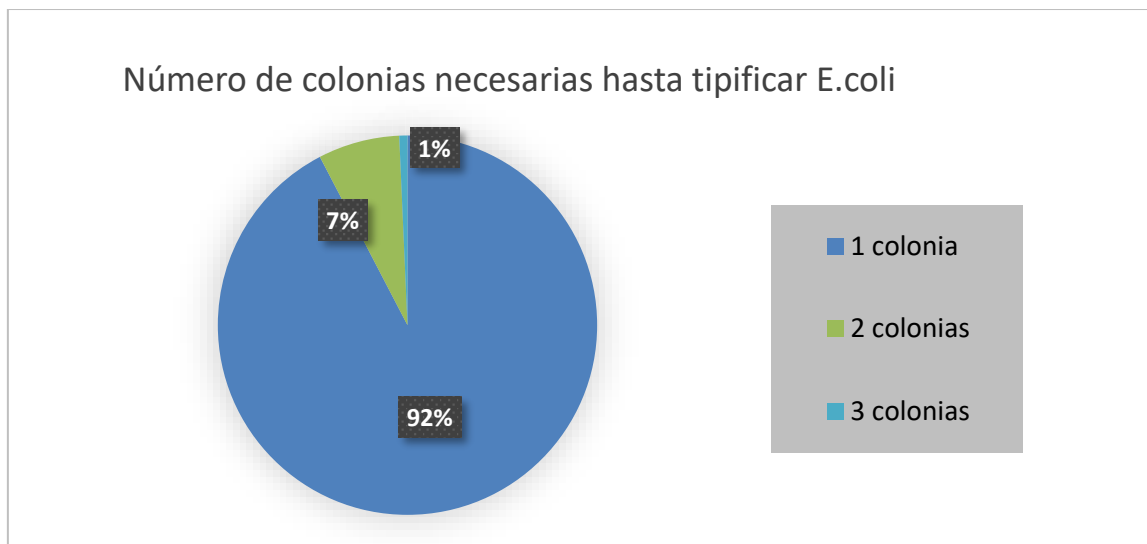


Figura 20: Porcentaje de colonias utilizadas hasta tipificar *E.coli*. con la galería API20E de cada una de las muestras.

En los casos en los que no se tipificó *E. coli* (8%), las primeras colonias tipificadas mediante tiras API20-E, dieron lugar a la identificación de otras enterobacterias: *Cronobacter*

spp, *Raoultella ornithinolytica*, *Klebsiella oxytoca*, *Salmonella spp. arizonae*, *Enterobacter amnigenus*, *Pasteurella multocida*, *Serratia ficaria*, *Rhanella aquatilis* y *Pantoea spp.*

4.3 Recuento de *E. coli* en heces

El número de UFC/g de heces de cada animal antes y después del destete, así como las colonias contadas en MacConkey y las confirmadas en EMB, quedan registrados en el ANEXO I.

4.3.1 Cantidad de *E. coli* en heces de corderos antes y después del destete

Como se muestra en la tabla 3, el promedio de UFC/g de heces dentro de cada grupo de animales, tanto en el primer muestreo (4 días antes del destete) como en el segundo (4 días después del destete), diferían muy poco:

- En el grupo control, antes del destete se obtuvo un promedio de 2×10^{11} UFC/ g de heces y $2,2 \times 10^{11}$ UFC/ g de heces 4 días después del destete.
- En el grupo destete en sala de nodriza, se obtuvo un promedio de $3,1 \times 10^{11}$ UFC/ g de heces antes del destete y $4,4 \times 10^{11}$ UFC/ g de heces después del destete.
- En el grupo lactantes, se obtuvo un promedio de 9×10^{11} UFC/ g de heces en el primer muestreo y $6,5 \times 10^{11}$ UFC/ g de heces en el segundo muestreo.
- En el grupo implante de melatonina, se obtuvo un promedio de $1,5 \times 10^{12}$ UFC/ g de heces antes del destete y $9,3 \times 10^{10}$ UFC/ g de heces después del destete.
- En el grupo melatonina inyectada, se obtuvo un promedio de $4,1 \times 10^{11}$ UFC/ g de heces antes del destete y $1,1 \times 10^{11}$ UFC/ g de heces después del destete.

Tabla 3: Promedio de UFC/g de heces de cada grupo de animales antes y después del destete.

GRUPO	PROMEDIO DE UFC/g DE HECES 4 DÍAS ANTES DEL DESTETE	PROMEDIO DE UFC/g DE HECES 4 DÍAS DESPUÉS DEL DESTETE
CONTROL	2×10^{11}	$2,2 \times 10^{11}$
DESTETE EN SALA NODRIZA	$3,1 \times 10^{11}$	$4,4 \times 10^{11}$
LACTANTE	9×10^{11}	$6,5 \times 10^{11}$
IMPLANTE DE MELATONINA	$1,5 \times 10^{12}$	$9,3 \times 10^{10}$
MELATONINA INYECTADA	$4,1 \times 10^{11}$	$1,1 \times 10^{11}$

4.3.2 Influencia del destete en la cantidad de *E. coli* fecal y su posible relación con el estrés en dicho periodo

En los recuentos obtenidos antes del destete, el número mínimo de UFC/g de heces, fue de $9,2 \times 10^5$, en el primer cuadrante el recuento fue de $3,5 \times 10^7$, la mediana de $1,6 \times 10^8$ y el tercer cuadrante de $1,7 \times 10^9$, mientras que el número máximo fue de $1,6 \times 10^{13}$. La media de estos datos fue de $6,8 \times 10^{11}$ UFC/g.

En los recuentos después del destete el número mínimo de UFC/g de heces fue de $2,1 \times 10^3$, el primer cuadrante fue de $3,2 \times 10^6$, la mediana de $3,7 \times 10^8$ y el tercer cuadrante de $3,7 \times 10^{10}$, mientras que el número máximo fue de $6,8 \times 10^{12}$. La media de estos datos fue de 3×10^{11} UFC/g.

Como se observa en la tabla 4, en general, estos datos mostraron una leve reducción en la cantidad de *E. coli* fecal en el 2º muestreo. En la tabla 3 observamos que los grupos de animales tratados con melatonina y el grupo de lactantes no destetados, se redujeron los recuentos de *E. coli* fecal, mientras que en los grupos control y destete en sala de nodriza los recuentos aumentaron.

Tabla 4: Parámetros estadísticos de los datos, en UFC/g de heces, obtenidos en los recuentos de antes y después del destete.

PARÁMETROS ESTADÍSTICOS	UFC/g DE HECES 4 DÍAS ANTES DEL DESTETE	UFC/g DE HECES 4 DÍAS DESPUÉS DEL DESTETE
MÍNIMO	$9,2 \times 10^5$	$2,1 \times 10^3$
1R CUADRANTE	$3,5 \times 10^7$	$3,2 \times 10^6$
MEDIANA	$1,6 \times 10^8$	$3,7 \times 10^8$
MEDIA	$6,8 \times 10^{11}$	3×10^{11}
3R CUADRANTE	$1,7 \times 10^9$	$3,7 \times 10^{10}$
MÁXIMO	$1,6 \times 10^{13}$	$6,8 \times 10^{12}$

La distribución de los datos de UFC/g de heces obtenidos de la diferencia entre antes y después del destete, no seguía una distribución normal, como se observa en la figura 21:

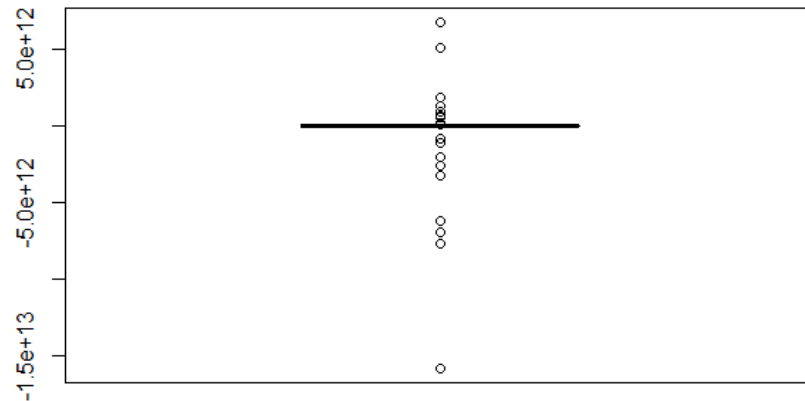


Figura 21: Distribución del total de datos en “box plot” de la diferencia entre ambos muestreos en UFC/ g de heces.

Se realizó el análisis estadístico de los datos de UFC/g de heces obtenidos de la diferencia entre antes y después del destete. Y, entre los distintos grupos de animales, no se encontraron diferencias significativas:

- El test Shapiro, con un p-value = $1'195 \times 10^{-14}$, no aseguró normalidad ($<0'05$).
- El test Kruskal- Wallis, con un p-value= $0'9524$, indicó que no hay diferencias significativas entre grupos ($>0'05$).

Por otro lado, la diferencia en la carga fecal de *E. coli* antes y después del destete, no mostró una diferencia significativa entre los animales del grupo de lactantes (sin destetar en ningún momento), y el resto de grupos, destetados en el segundo muestreo.

- Entre el grupo de lactantes y el grupo de destetados en sala nodriza:
 - El test Shapiro, con un p-value = $4'73 \times 10^{-9}$, no aseguró normalidad ($<0'05$).
 - El test Kruskal- Wallis, con un p-value= $0'5087$, indicó que no hay diferencias significativas entre grupos ($>0'05$).
- Entre el grupo de lactantes y el grupo control (destetados y pasados a cebo fuera de la sala de nodriza):
 - El test Shapiro, con un p-value = $4'403 \times 10^{-10}$, no aseguró normalidad ($<0'05$).
 - El test Kruskal-Wallis, con un p-value= $0'9337$, indicó que no hay diferencias significativas entre grupos ($>0'05$).

De esta manera, no se observó una influencia clara entre el destete y la carga fecal de *E. coli*.

En cuanto a la relación de la carga fecal de *E. coli* con el estrés, se comparó los grupos control y destete en sala nodriza. Comprobando de esta manera si existen diferencias en las cargas de *E. coli* cuando se realiza el destete cambiando de lugar y cuando se realiza el destete en el mismo alojamiento. En este caso tampoco se obtuvieron diferencias significativas:

- El test Shapiro, con un p-value = $6'243 \times 10^{-7}$, no aseguró normalidad ($<0'05$).
- El test Kruskal wallis, con un p-value= 0'6275, indicó que no hay diferencias significativas entre grupos ($>0'05$).

4.3.3 Efectos de la administración de melatonina en el momento del destete sobre la carga fecal de *E. coli*

Tras el destete, aparentemente, se redujo la cantidad de *E. coli* tanto en los corderos que habían sido tratados con melatonina inyectada como los a los que se les había puesto un implante de melatonina en el momento del destete. Aun así, el análisis estadístico no mostró una diferencia significativa en las cargas de *E. coli* fecal de los corderos del grupo control y los corderos de los grupos implante de melatonina e inyección de melatonina:

- El test Shapiro, con un p-value = $1'562 \times 10^{-10}$, no aseguró normalidad ($<0'05$).
- El test Kruskal- Wallis, con un p-value= 0'9139, indicó que no hay diferencias significativas entre grupos ($>0'05$).

5. DISCUSIÓN

5.1 Población de estudio

Aunque se diseñaron grupos homogéneos con aproximadamente el mismo número de hembras y machos, finalmente quedó un número de hembras menor, debido a que, los cuatro animales que fallecieron durante el estudio fueron hembras:

- Una hembra del grupo destete en sala de nodriza.
- Una hembra del grupo control.
- Dos hembras del grupo implante de melatonina.

Aun siendo el número de hembras menor, la distribución de hembras y machos en todos los grupos es similar, por ello consideramos que esta circunstancia no influye en los resultados del estudio.

5.2 Procesado de las muestras

El recuento de coliformes totales, *E. coli* genérico y cepas de *E. coli* patógenas en heces se ha utilizado en varios estudios para relacionarlo con estrés en animales. En dichos estudios es habitual la elección del agar MacConkey como primer medio de cultivo en el que sembrar las heces (Cray et al., 1998; Ren et al., 2018).

La forma de diferenciar *E. coli*, en agar MacConkey, de las demás enterobacterias, es su capacidad de fermentar la lactosa. Pero otras enterobacterias también son lactosa + y dan lugar a colonias rosadas-rojizas del mismo modo que *E. coli* (Lopardo, 2016a). Por ello, no es de extrañar que se hayan identificado bacterias como *Klebsiella oxytoca*, *Raoultella ornithinolytica*, *Enterobacter amnigenus*, *Serratia ficaria* o *Pantoea spp.* en las galerías API20-E.

También se identificaron otras bacterias lactosa - (*Salmonella spp. arizonae*, *Cronobacter spp.* y *Rhanella aquatilis*), estas forman colonias incoloras en agar MacConkey (Lopardo, 2016a). Su tipificación puede ser debida a un error laboratorial, al seleccionar en agar MacConkey colonias no compatibles con *E. coli*. O por un fallo de identificación: algunas de estas bacterias, como *Salmonella*, no se identifican de forma fiable con la galería API20E y requieren de una identificación serológica para confirmar la identificación bacteriana (Collins & Lyne, 1989).

Por otro lado, en una muestra se identificó *Pasteurella multocida*, la cual no crece en agar MacConkey, pero si en TSA, su hallazgo puede ser debido a una contaminación del TSA en el laboratorio (Lopardo, 2016b).

Ninguna de estas bacterias distintas a *E. coli* (identificadas en el 8% de las muestras) se contabilizó en los recuentos gracias al uso del agar EMB como medio de confirmación, el cual permite diferenciar *E. coli* de otras enterobacterias por su crecimiento, formando colonias oscuras con brillo metálico (Collins & Lyne, 1989).

En otros estudios similares, tras el uso de agar MacConkey, han realizado recuentos de cepas patógenas de *E. coli* utilizando para ello agares cromogénicos o agar MacConkey enriquecido (KASMAC) (Brown-Brandl et al., 2009; Cray et al., 1998; Kim et al., 2017; Lara Duran et al., 2019).

Debido a los altos niveles de seguridad conseguidos al tipificar *E. coli* en las muestras mediante galerías API 20-E, consideramos que el recuento de colonias compatibles con *E. coli* en agar MacConkey es fiable para realizar recuentos de *E. coli* genérico en heces.

5.3 Recuento de *E. coli* en heces

5.3.1 Cantidad de *E. coli* en heces de corderos antes y después del destete

Los niveles de coliformes totales en las heces pueden fluctuar a lo largo de los días (Cray et al., 1998) y pueden ser muy variables entre animales (Kim et al., 2017). Además, la diversidad de la flora intestinal de los animales afecta al número de *E. coli* en heces y esta varía con la dieta (Kim et al., 2017).

En el presente estudio, todos los grupos de animales cambiaron, en el momento del destete, a una dieta con pienso de engorde, excepto los animales que continuaron lactando. Las pocas diferencias encontradas en la carga fecal de *E. coli* entre grupos podrían deberse a que se trata de animales con la misma alimentación y en una misma explotación (Cray et al., 1998; Kim et al., 2017).

La mayoría de las diarreas en animales están asociadas con un aumento en los niveles de excreción de *E. coli* enterotoxigénico (ETEC) (Schifferli et al., 2016). En concreto, la cepa *E.*

coli ETEC k99 es el patógeno predominante en las diarreas de corderos y cabritos antes del destete criados en sistemas intensivos (Abdou et al., 2021). Es por ello que algunos estudios han realizado recuentos en heces de cepas de *E. coli* patógeno. Por ejemplo, en terneros antes del destete, el nivel de excreción máximo de *E. coli* O157:H7 (enterohemorrágico) es de $4,03 \times 10^5$ a $1,63 \times 10^9$ CFU/g (Cray et al., 1998), y en novillos con distintas dietas, es de 1,2 a $5,1 \log_{10}$ CFU/g (Kim et al., 2017). Estos niveles son inferiores a los obtenidos en el primer muestreo de nuestro estudio (de $9,2 \times 10^5$ a $1,6 \times 10^{13}$), antes del destete, seguramente porque la carga total de *E. coli* siempre es superior a los niveles de las cepas patógenas de *E. coli*. Además, en el presente estudio las heces analizadas son de corderos, los cuales tienen una prevalencia mayor de coliformes totales respecto al bovino (Lara Duran et al., 2019).

5.3.2 Influencia del destete en la cantidad de E-coli fecal y su posible relación con el estrés en dicho periodo

En el presente estudio, los resultados indicaron que no existen diferencias significativas en la carga fecal de *E. coli* entre los animales que continuaron lactando, retrasando así el momento de su destete, y el resto de los grupos (destetados al mes de vida). Teniendo en cuenta la relación de la microbiota ruminal e intestinal con los microorganismos que aparecen en heces, estos datos concuerdan con el estudio de Wang (2019) en el que se indica que no existen efectos significativos de la edad al momento del destete en la microbiota ruminal.

De acuerdo con nuestro estudio, en cabras tampoco existen diferencias significativas en la cantidad de proteobacterias en las heces antes y después del destete (Liao et al., 2021).

En un estudio (aún sin datos concluyentes) realizado de forma paralela al presentado en este trabajo, se evaluó el estrés de los corderos mediante parámetros de comportamiento, observándose que tras el destete aumentaba el número de vocalizaciones, entre otros factores. Determinándose así, que los corderos de todos los grupos estaban estresados tras el destete. En los grupos control y destete en sala nodriza, destetados al mes de vida, los niveles de *E. coli* en heces aumentan levemente tras el destete, quizá debido al estrés. Aun así, no existen diferencias significativas entre los grupos ni entre antes y después del destete, de forma que no se puede relacionar el estrés del destete con la carga fecal de *E. coli*. Esto ocurre también en otros estudios, y se asocia a que la relación entre los factores que producen estrés y la inmunidad es compleja. Pueden influir muchos factores en la respuesta al estrés por parte de los animales y en los estudios que valoran el estrés (tipo de factor estresante, duración del estrés, tipo de muestra o momento de recogida de la muestra en relación con el inicio del estrés) (Brown-

Brandl et al., 2009). Por ello no sería conveniente utilizar la carga de *E. coli* fecal como único medidor de estrés.

En animales que padecen estrés dietético por restricción alimentaria, se produce una mayor excreción de *E. coli* y una mayor prevalencia de infecciones y diarreas (Cray et al., 1998). Esto no se ha observado de manera significativa en los recuentos de *E. coli* en este trabajo, debido a que algunos de los corderos destetados (de los grupos control y destete en sala de nodriza) sí presentaban una mayor carga de *E. coli* fecal, pero otros no. Quizás esto se deba a que el estrés presentado por los corderos venía dado por las condiciones de manejo y no solamente debido a una menor ingesta tras el destete. No habiéndose relacionado el estrés por manejo con la carga de *E. coli* en heces en otros estudios como el de Brown-Brandl et al. (2009).

5.3.3 Efectos de la administración de melatonina en el momento del destete sobre la carga fecal de *E. coli*

Varios estudios sugieren la efectividad de la melatonina, aliviando o reduciendo el estrés, gracias a los efectos que provocan suprimiendo el eje hipotálamo-hipofisario-suprarrenal (HPA), de forma que se reduce el nivel de glucocorticoides secretados en la corteza adrenal en momentos de estrés. Estos estudios han observado como la melatonina induce una reducción de la prolactina y la corticotropina (ACTH), las cuales aumentan de forma fisiológica cuando se produce estrés, tanto en humanos como en animales (Kirby et al., 1999; Konakchieva Al B' et al., 1997). El estrés y la falta de sueño reducen la concentración de melatonina en heces y en colon, en estos casos se puede producir disbiosis intestinal y aumentar la flora patógena, predisponiendo a patologías (Park et al., 2020).

Al reducirse la melatonina, se pierde su efecto inhibitor en la motilidad intestinal, fomentando la defecación (Song et al., 2005). El tratamiento con melatonina recupera los niveles de concentración en colon y modula la disbiosis intestinal, además se inhibe la defecación inducida por el estrés (Park et al., 2020; Song et al., 2005). Por ello, los animales tratados con melatonina presentan, tras el destete, una menor excreción de *E. coli* patógeno (ETEC) y una menor prevalencia de diarreas (Ren et al., 2018).

Por otro lado, en animales destetados, la melatonina aumenta la diversidad de la flora intestinal (índices de riqueza), aumentando la flora beneficiosa, y reduce la carga de ETEC en animales ya infectados (Ren et al., 2018). En el presente estudio se recuenta *E. coli* total,

desconociendo si los animales se encontraban infectados de cepas patógenas de *E. coli*, las cuales se ven reducidas al administrar melatonina.

Tal y como se muestra en los resultados, los animales tratados con melatonina sí redujeron su carga fecal de *E. coli*. Aun así, no mostraron diferencias significativas con los animales a los que no se les administró melatonina.

Aunque en la mayoría de los corderos a los que se les administró melatonina, los recuentos de *E. coli* fecal se reducen tras el destete, algunos presentan mayor carga de *E. coli* tras el destete. Este efecto contrario al esperado, puede ser debido a que estos corderos se encontraban sufriendo estrés leve crónico en el momento de administración de la melatonina. En estos casos, la melatonina produce un efecto excitatorio sobre el tracto intestinal, aumentando la excreción (Song et al., 2005).

La falta de diferencias significativas entre los animales tratados y sin tratar con melatonina, podría mejorarse aumentando el tamaño muestral y reduciendo, con ello, los errores aleatorios.

6. CONCLUSIONES

1. Se ha cuantificado la cantidad de *E. coli* en heces de corderos obteniendo un promedio de 2×10^{11} UFC/g de heces antes del destete y $2,2 \times 10^{11}$ UFC/g después del destete en el grupo control. Variando entre 2×10^{11} y $1,5 \times 10^{12}$ UFC/g antes del destete, y entre $9,3 \times 10^{10}$ y $4,4 \times 10^{11}$ UFC/g después del destete según las modalidades de manejo.
2. No se han obtenido diferencias significativas en la carga fecal de *E. coli* entre animales destetados y sin destetar, por lo que, en el presente estudio, el destete no parece influir en la carga fecal de *E. coli* en corderos.
No se ha podido relacionar el estrés del destete con la carga fecal de *E. coli*.
3. No se han observado efectos significativos en la administración de melatonina sobre la carga fecal de *E. coli* en el momento del destete, debiéndose revisar el procedimiento para estudios posteriores.

BIBLIOGRAFÍA

- Abdou, N. E. M. I., Majeed, Q. A. H., El-Azazy, O. M. E., Tahrani, L. M. A., AlAzemi, M. S., & Alajmi, A. (2021). Risk factors of diarrhea in small ruminants in Kuwait. *Iranian Journal of Veterinary Research*, 22(2), 146–149. <https://doi.org/10.22099/IJVR.2021.38092.5546>
- Acero Adámez, P. (2013). Planificación y Manejo de la Explotación de Ovino de Leche (Consejería de Agricultura y Ganadería, Ed.; 1st ed., Vol. 4). Dirección General de Industrias Agrarias y Modernización de Explotaciones.
- Acosta Dibarrat, J., Talavera-Rojas, M., Soriano-Vargas, E., & Roberto Montes de Oca Jiménez. (2013). Caracterización de *Escherichia coli* aislados de hisopados rectales de corderos del Estado de México [Proyecto de Investigación]. Universidad Autónoma del Estado de México.
- Bardají Mur, T., & Ramos Antón, J. J. (2020). Estudio de prevalencia de *Bacteroides fragilis* en heces de corderos de una a tres semanas, con y sin diarrea. [Trabajo de Fin de Grado]. Universidad Zaragoza.
- Brown-Brandl, T. M., Berry, E. D., Wells, J. E., Arthur, T. M., & Nienaber, J. A. (2009). Impacts of Individual Animal Response to Heat and Handling Stresses on *Escherichia coli* and *E. coli* O157:H7 Fecal Shedding by Feedlot Cattle. *Foodborne Pathogens and Disease*, 6(7), 855–864.
- Cid Vázquez, M. Dolores. (1993). Caracterización de estirpes de *Escherichia coli* aisladas de diarreas neonatales de corderos y cabritos [Memoria para optar al grado de doctor]. Universidad Complutense de Madrid, Facultad de Veterinaria.
- Collins, C. H., & Lyne, P. M. (1989). Métodos microbiológicos (ACRIBIA S.A., Ed.; 5th ed., Vol. 1). Butterworths.
- Cray, W. C., Casey, T. A., Bosworth, B. T., & Rasmussen, M. A. (1998). Effect of Dietary Stress on Fecal Shedding of *Escherichia coli* O157:H7 in Calves. *Applied and Environmental Microbiology*, 64(5), 1975–1979. <https://journals.asm.org/journal/aem>
- Ferrer Mayayo, L. M., Ramos Antón, J. J., Lacasta Lozano, D., Figueras Ara, L., González Saínz, J. M., Callejas Casedas, M., & Congost Luengo, S. (2007). Las diarreas del cordero, un problema multifactorial. Dirección General de Desarrollo Rural. Centro de Transferencia Agroalimentaria, 188, 1–16.
- Kim, M., Kuehn, L. A., Bono, J. L., Berry, E. D., Kalchayanand, N., Freetly, H. C., Benson, A. K., & Wells, J. E. (2017). The impact of the bovine faecal microbiome on *Escherichia coli* O157:H7 prevalence and enumeration in naturally infected cattle. *Journal of Applied Microbiology*, 123(4), 1027–1042. <https://doi.org/10.1111/jam.13545>
- Kirby, A. W., Clayton, M., Rivera, P., & Comperatore, C. A. (1999). Melatonin and the reduction or alleviation of stress. *Journal of Pineal Research*, 27(2), 78–85. <https://doi.org/10.1111/j.1600-079X.1999.tb00600.x>

- Konakchieva Al B', R., Mitev, Y., Fx Almeida, O., & Patchev, V. K. (1997). Chronic melatonin treatment and the hypothalamo-pituitary-adrenal axis in the rat: Attenuation of the secretory response to stress and effects on hypothalamic neuropeptide content and release. *Biology of the Cell*, 89, 587–596.
- Lara Duran, J. A., Silva Vega, M., Bañuelos Valenzuela, R., Delgadillo Ruiz, L., & Delgadillo Ruiz, O. (2019). Incidencia de *Escherichia coli* O157:H7 en heces de rumiantes lactantes con síndrome diarreico. *Revista MVZ Cordoba*, 24(3), 7339–7345. <https://doi.org/10.21897/rmvz.1232>
- Li, C., Wang, W., Liu, T., Zhang, Q., Wang, G., Li, F., Li, F., Yue, X., & Li, T. (2018). Effect of early weaning on the intestinal microbiota and expression of genes related to barrier function in lambs. *Frontiers in Microbiology*, 9. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2018.01431>
- Liao, R., Xie, X., Lv, Y., Dai, J., Lin, Y., & Zhu, L. (2021). Ages of weaning influence the gut microbiota diversity and function in Chongming white goats. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 105, 3649–3658. <https://doi.org/10.1007/s00253-021-11301-2/Published>
- Lindsay Pérez, E., & Ingesa Capaccioni, S. (2019). Diarreas neonatales en pequeños rumiantes: Prevalencia de *Escherichia coli*, *Salmonella spp.*, *Clostridium spp.* y *Cryptosporidium parvum* en la Comunidad Valenciana. [Trabajo de Fin de Grado]. Universidad Católica de Valencia, San Vicente Mártir.
- Lopardo, H. A. (2016a). Manual de Microbiología Clínica de la Asociación Argentina de Microbiología Volumen I: Bacterias de Importancia Clínica. In H. A. Lopardo, S. C. Predari, & C. Vay (Eds.), *Manual de Microbiología Clínica de la Asociación Argentina de Microbiología Volumen I: Bacterias de Importancia Clínica* (1a ed., Vol. 1, pp. 11–429). Asociación Argentina de Microbiología.
- Lopardo, H. A. (2016b). Manual de Microbiología Clínica de la Asociación Argentina de Microbiología Volumen I: Bacterias de Importancia Clínica. In H. A. Lopardo (Ed.), *Manual de Microbiología Clínica de la Asociación Argentina de Microbiología Volumen I: Bacterias de Importancia Clínica* (1st ed., Vol. 1, pp. 9–297).
- Mao, H., Zhang, Y., Yun, Y., Ji, W., Jin, Z., Wang, C., & Yu, Z. (2021). Weaning Age Affects the Development of the Ruminal Bacterial and Archaeal Community in Hu Lambs During Early Life. *Frontiers in Microbiology*, 12. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2021.636865>
- Park, Y. S., Kim, S. H., Park, J. W., Kho, Y., Seok, P. R., Shin, J. H., Choi, Y. J., Jun, J. H., Jung, H. C., & Kim, E. K. (2020). Melatonin in the colon modulates intestinal microbiota in response to stress and sleep deprivation. *Intestinal Research*, 18(3), 325–336. <https://doi.org/10.5217/IR.2019.00093>
- Pascual-Alonso, M., Miranda-de la Lama, G. C., Aguayo-Ulloa, L., Ezquerro, L., Villarroel, M., Marín, R. H., & Maria, G. A. (2015). Effect of Postweaning Handling Strategies on Welfare and Productive Traits in Lambs. *Journal of Applied Animal Welfare Science*, 18(1), 42–56. <https://doi.org/10.1080/10888705.2014.941107>

- R: A language and environment for statistical computing. R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria. URL: <http://www.R-project.org/>.
- Ren, W., Wang, P., Yan, J., Liu, G., Zeng, B., Hussain, T., Peng, C., Yin, J., Li, T., Wei, H., Zhu, G., Reiter, R. J., Tan, B., & Yin, Y. (2018). Melatonin alleviates weanling stress in mice: Involvement of intestinal microbiota. *Journal of Pineal Research*, 64(2). <https://doi.org/10.1111/jpi.12448>
- Rivas, L., Mellor, G. E., Gobius, K., & Fegan, N. (2015). Detection and Typing Strategies for Pathogenic *Escherichia coli* (R. W. Hartel, Ed.; 1st ed., Vol. 1). Springer Briefs in Food, Health and Nutrition. <http://www.springer.com/series/10203>
- Schifferli, DM., Dubreuil JD., & Isaacson RE. (2016). Animal Enterotoxigenic *Escherichia coli*. *EcoSal Plus*, 7(1), 1–80. <https://doi.org/10.1128/ecosalplus.ESP-0006-2016>.
- Song, G. H., Gwee, K. A., Moochhala, S. M., & Ho, K. Y. (2005). Melatonin attenuates stress-induced defecation: Lesson from a rat model of stress-induced gut dysfunction. *Neurogastroenterology and Motility*, 17(5), 744–750. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2982.2005.00653.x>
- Subdirección General de Producciones Ganaderas y Cinegéticas, & Dirección General de Producciones y Mercados Agrarios. (2021). Sector Ovino y Caprino de carne en cifras: Principales Indicadores Económicos. <https://cpage.mpr.gob.es/>
- Torres-Farfan, C., Richter, H. G., Rojas-García, P., Vergara, M., Forcelledo, M. L., Valladares, L. E., Torrealba, F., Valenzuela, G. J., & Serón-Ferré, M. (2003). Mt1 melatonin receptor in the primate adrenal gland: Inhibition of adrenocorticotropin-stimulated cortisol production by melatonin. *Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism*, 88(1), 450–458. <https://doi.org/10.1210/jc.2002-021048>
- Wang, S., Ma, T., Zhao, G., Zhang, N., Tu, Y., Li, F., Cui, K., Bi, Y., Ding, H., & Diao, Q. (2019). Effect of age and weaning on growth performance, rumen fermentation, and serum parameters in lambs fed starter with limited ewe-lamb interaction. *Animals*, 9(825), 1–12. <https://doi.org/10.3390/ani9100825>

ANÁLISIS Y RECuento DE E-COLI DE LAS MUESTRAS RECOGIDAS 4 DÍAS POSTDESTETE

IDENTIFICACIÓN CORDEROS	tipo cordero	Seed - hum. cróti -	volumen agua de peptona añadido	colónias		DILUCIÓN - colónias		colónias PASADAS A COLONIAS		COLONIAS COLONIAS Q. NO SON E		EMB-> COLONIAS e- TOTAL COLONIAS		API	API DE LA 2A COLONIA DE TSA	
				g de heces -	dilución -	colónias	dilución -	EMB	COU	SON E-COLI	EMB-> POR MUESTRA	E-coli 997%	E-coli 997%			
Destete en sala de nodriza	M	126	2,44444444	22	47	47	47	47	47	47	47	47	47	1922723	E-coli 997%	
Control	M	1237	1,44444444	13	27	27	27	27	27	27	27	27	27	18692308	E-coli 997%	
Implante de melatonina	M	1238	3,88888889	35	286	286	286	286	286	286	286	286	286	73542857	E-coli 998%	
Control	M	1241	0,66666667	6	54	54	54	54	54	54	54	54	54	81000000	E-coli 998%	
Implante de melatonina	M	1242	2,33333333	21	4	4	4	4	4	4	4	4	4	1714286	E-coli 998%	
Control	M	1247	0,55555556	5	220	220	220	220	220	220	220	220	220	396000000	E-coli 999%	
Implante de melatonina	M	1248	2,38888889	21,5	56	56	56	56	56	56	56	56	56	234418604651	E-coli 979%	
Control	M	1250	1	9	504	504	504	504	504	504	504	504	504	504000000	E-coli 995%	
Destete en sala de nodriza	M	1252	4,05555556	36,5	2	2	2	2	2	2	2	2	2	495150684932	E-coli 748%	
Control	M	1254	1,33333333	12	9	9	9	9	9	9	9	9	9	6790000	E-coli 999%	
Lactantes	M	1259	1,44444444	13	7	7	7	7	7	7	7	7	7	2769230769231	E-coli 996%	
Melatonina inyectada	M	1259	2,27777778	20,5	41	41	41	41	41	41	41	41	41	1273170732	E-coli 996%	
Melatonina inyectada	M	1261	1,77777778	16	19	19	19	19	19	19	19	19	19	1068750000	E-coli 998%	
Control	M	1263	0,88888889	8	30	30	30	30	30	30	30	30	30	337500000	Serratia liquefaciens 891%	
Melatonina inyectada	M	1265	1,16666667	10,5	2	2	2	2	2	2	2	2	2	17428571	E-coli 997%	
Lactantes	M	1269	0,38888889	3,5	34	34	34	34	34	34	34	34	34	8742857143	E-coli 995%	
Melatonina inyectada	M	1270	2,44444444	22	377	377	377	377	377	377	377	377	377	13852227272727	E-coli 991%	
Control	M	1271	1,22222222	11	31	31	31	31	31	31	31	31	31	31000000	E-coli 998%	
Melatonina inyectada	M	1273	1,55555556	14	6	6	6	6	6	6	6	6	6	3242857143	E-coli 877%	
Lactantes	M	1274	0,33333333	3	148	148	148	148	148	148	148	148	148	444000000	E-coli 998%	
Melatonina inyectada	M	1277	2,94444444	26,5	13	13	13	13	13	13	13	13	13	148000000	E-coli 998%	
Destete en sala de nodriza	M	1278	2,72222222	24,5	20	20	20	20	20	20	20	20	20	204248979592	E-coli 874%	
Implante de melatonina	M	1280	0,94444444	8,5	11	11	11	11	11	11	11	11	11	11647059	E-coli 999%	
Lactantes	M	1281	0,33333333	3	13	13	13	13	13	13	13	13	13	390000000	E-coli 874%	
Melatonina inyectada	M	1282	0,83333333	7,5	286	286	286	286	286	286	286	286	286	3432000000	E-coli 998%	
Lactantes	M	1284	1,94444444	17,5	18	18	18	18	18	18	18	18	18	925714286	E-coli 998%	
Destete en sala de nodriza	M	1286	0,5	4,5	278	278	278	278	278	278	278	278	278	5560000000	E-coli 998%	
Control	M	1288	0,5	4,5	61	61	61	61	61	61	61	61	61	1159000000	Serratia licaria 952%	
Melatonina inyectada	M	1289	3,83333333	34,5	13	13	13	13	13	13	13	13	13	3391304347826	E-coli 995%	
Destete en sala de nodriza	M	1290	1,44444444	13	90	90	90	90	90	90	90	90	90	623076923077	E-coli 995%	
Implante de melatonina	M	1291	1,61111111	14,5	324	324	324	324	324	324	324	324	324	20110348275862	E-coli 984%	
Implante de melatonina	M	1294	4,11111111	37	544	544	544	544	544	544	544	544	544	132324324324	E-coli 998%	
Implante de melatonina	M	1295	2	18	38	38	38	38	38	38	38	38	38	190000000000	E-coli 995%	
Control	M	1297	1,38888889	12,5	131	131	131	131	131	131	131	131	131	943200000000	E-coli 989%	
Control	M	1298	2,11111111	19	94	94	94	94	94	94	94	94	94	445263157695	E-coli 998%	
Destete en sala de nodriza	M	1319	1	9	7	7	7	7	7	7	7	7	7	70000000	E-coli 995%	
Destete en sala de nodriza	M	1320	2,66666667	24	71	71	71	71	71	71	71	71	71	26625000000	E-coli 995%	
Lactantes	M	1321	3,33333333	30	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1000000	E-coli 995%	
Implante de melatonina	M	1324	0,33333333	3	225	225	225	225	225	225	225	225	225	675000000000	E-coli 995%	
Destete en sala de nodriza	M	1329	3,16666667	28,5	10	10	10	10	10	10	10	10	10	3157894736842	E-coli 989%	
Melatonina inyectada	M	1339	1,77777778	16	37	37	37	37	37	37	37	37	37	2081250000000	E-coli 995%	
Implante de melatonina	M	1352	3,55555556	32	2	2	2	2	2	2	2	2	2	56250000	E-coli 995%	
Lactantes	M	1365	1,83333333	16,5	21	21	21	21	21	21	21	21	21	114545454546	E-coli 998%	
Control	H	1376	0,77777778	7	59	59	59	59	59	59	59	59	59	758571428571	E-coli 984%	
Implante de melatonina	M	1377	1,83333333	16,5	2	2	2	2	2	2	2	2	2	109909090909	E-coli 998%	
Control	M	1378	1,94444444	17,5	6	6	6	6	6	6	6	6	6	3085714285714	E-coli 998%	
Melatonina inyectada	M	1378	1,88888889	17	11	11	11	11	11	11	11	11	11	4235294117647	Pasteurella multocida 72.4%	
Lactantes	M	1379	1,11111111	10	3	3	3	3	3	3	3	3	3	27000000	E-coli 998%	
Destete en sala de nodriza	H	1379	MUERTO													
Implante de melatonina	H	1382	MUERTO													
Destete en sala de nodriza	M	1383	6,11111111	55	216	216	216	216	216	216	216	216	216	35345455	E-coli 997%	
Melatonina inyectada	M	1386	3,44444444	31	244	244	244	244	244	244	244	244	244	70838710	Enterobacter amnigenus 88.5%	
Melatonina inyectada	H	1388	2,22222222	20	47	47	47	47	47	47	47	47	47	1057500000000	E-coli 995%	
Lactantes	H	1389	0,55555556	5	28	28	28	28	28	28	28	28	28	9440000000000	E-coli 824%	
Melatonina inyectada	H	1390	2,61111111	23,5	10	10	10	10	10	10	10	10	10	3829787234043	E-coli 998%	
Lactantes	H	1392	0,44444444	4	29	29	29	29	29	29	29	29	29	662500000000	E-coli 999%	
Lactantes	H	1393	1,33333333	12	10	10	10	10	10	10	10	10	10	675000000000	Rhanelia aquatilis 91.2%	
Lactantes	H	1397	1,44444444	13	18	18	18	18	18	18	18	18	18	12461538461539	E-coli 998%	
Implante de melatonina	M	1398	2,22222222	20	17	17	17	17	17	17	17	17	17	7650000000	E-coli 995%	
Destete en sala de nodriza	H	1400	2,55555556	23	1	1	1	1	1	1	1	1	1	3913043478	E-coli 82.6%	
Destete en sala de nodriza	H	1401	1,66666667	15	125	125	125	125	125	125	125	125	125	6750000000000	E-coli 999%	
Melatonina inyectada	H	1406	2,61111111	23,5	31	31	31	31	31	31	31	31	31	118723404255	E-coli 999%	
Implante de melatonina	H	1412	3,88888889	35	1	1	1	1	1	1	1	1	1	257143	E-coli 998%	
Implante de melatonina	H	1413	MUERTO													
Destete en sala de nodriza	H	1421	2,77777778	25	23	23	23	23	23	23	23	23	23	7920000000	E-coli 998%	
Control	H	1442	4,83333333	43,5	1	1	1	1	1	1	1	1	1	206897	E-coli 998%	
Control	H	1445	2	18	365	365	365	365	365	365	365	365	365	1825000000000	E-coli 998%	
Destete en sala de nodriza	H	1448	1,44444444	13	24	24	24	24	24	24	24	24	24	276923077	E-coli 995%	
Control	H	1450	MUERTO													
Implante de melatonina	H	1452	2,16666667	19,5	21	21	21	21	21	21	21	21	21	9692307692308	E-coli 998%	
Melatonina inyectada	H	1460	1,27777778	11,5	3	3	3	3	3	3	3	3	3	782609	Cronobacter spp. 58.2%	
Lactantes	H	1463	0,61111111	5,5	4	4	4	4	4	4	4	4	4	65454545455	E-coli 989%	
Implante de melatonina	H	1467	4,05555556	36,5	6	6	6	6	6	6	6	6	6	6000000	147945205	Pantoea spp. 95.7%
Implante de melatonina	H	1469	2,77777778	25	62	62	62	62	62	62	62	62	62	2232000000	E-coli 995%	
Lactantes	H	1478	0,61111111	5,5	14	14	14	14	14	14	14	14	14	1963636364	E-coli 998%	
Melatonina inyectada	H	1484	2,83333333	25,5	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3000000	105882353	E-coli 998%
Implante de melatonina	H	1485	3,83333333	34,5	9	9	9	9	9	9	9	9	9	20695652	E-coli 998%	
Lactantes	H	1490	1,88888889	17	21	21	21	21	21	21	21	21	21	847058824	E-coli 999%	