



**Facultad de Veterinaria
Universidad Zaragoza**



Trabajo Fin de

Autor/es

Director/es

Facultad de Veterinaria



Índice

1. Resumen/Abstract	3
2. Introducción	5
2.1 <i>Salmonella</i> spp: características y taxonomía	5
2.2 La salmonelosis en el ganado porcino.....	7
2.3 Estrategias de control	9
2.4 Uso de aditivos como estrategias de control	10
3. Justificación y objetivos	12
4. Metodología	13
4.1 Producto utilizado	13
4.2 Diseño del estudio	13
4.3 Análisis laboratoriales	14
4.4 Análisis estadísticos	16
5. Resultados	17
5.1 Serología	17
5.2 Bacteriología	20
6. Discusión de los resultados	23
7. Conclusión	25
8. Valoración personal	27
9. Bibliografía	28

1. Resumen

España es el primer país de la UE en producción porcina y también líder en prevalencia de salmonelosis en esta especie animal. *Salmonella* es una bacteria ubicua, de gran persistencia ambiental y difícil de identificar en animales portadores. Además, la salmonelosis porcina se caracteriza por presentar una elevada prevalencia de resistencia a los antibióticos y por la falta de vacunas contrastadas en el mercado, lo que dificulta su control.

Así, el objetivo de este estudio fue evaluar la eficacia de una nueva forma protegida de butirato sódico con sales sódicas de ácidos grasos destilados de coco (DICOSAN+, Norel, España), en el control de *Salmonella* spp. en un cebadero comercial de porcino cuando se administra en la dieta habitual de los cerdos de engorde.

Para realizar este estudio se empleó la siguiente metodología: en el cebadero, se realizó un muestreo mensual de sangre y heces durante los 3-4 meses de duración aproximada del periodo de engorde. En el momento del sacrificio en matadero, se hizo un último muestreo donde se incluyó la recogida de nódulos linfáticos mesentéricos, además de heces y sangre. Los análisis microbiológicos para determinar la existencia de infección y/o excreción de *Salmonella* spp. se realizaron conforme a la norma ISO 6579:2002 y la evaluación de la presencia de anticuerpos frente a *Salmonella* spp. se realizó a través de una prueba de ELISA indirecto. Los resultados de prevalencia se compararon entre ambos grupos, el grupo tratamiento (dieta con el aditivo Dicosan +) y el grupo control (sin aditivo), mediante análisis estadísticos de Chi-cuadrado.

Como conclusión a este trabajo, podemos decir que el uso de este ácido orgánico, el butirato sódico (Dicosan +), tiene un efecto beneficioso en cuanto al control de la excreción e infección por parte de *Salmonella*.

Abstract

Spain is the first EU country in swine production and also a leader in the prevalence of salmonellosis in this animal specie. *Salmonella* is a ubiquitous bacterium of great environmental persistence, difficult to identify in carrier animals. In addition, salmonellosis is characterized by a prevalence of resistance to antibiotics and by the lack of contrasted vaccines in the market, which makes its control difficult.

Thus, the objective of this study was to evaluate the efficacy of a new protected form of sodium butyrate rice? with sodium salts of distilled coconut fatty acids (DICOSAN +, Norel, Spain), in the control of *Salmonella* spp. in a commercial pig feedlot when it is administered in the usual diet of fattening pigs.

To perform this study, the following methodology was used: in the feedlot, a monthly control of blood and feces was carried out during the 3-4 months of approximate duration of the fattening period. At the time of slaughter in the abattoir, a last sampling was done, which included the collection of mesenteric lymph nodes, as well as feces and blood. The microbiological tests to determine the existence of infection and / or excretion of *Salmonella* spp. were carried out according to the Standar ISO 6579: 2002. The evaluation of the presence of antibodies against *Salmonella* spp. was performed through an indirect ELISA test. The prevalence results were compared between both groups, the treatment (diet with the additive Dicosan +) and the control (without additive), by means of statistical analysis of Chi-square.

As a conclusion to this work, we can say that the use of this organic acid, sodium butyrate (Dicosan +), has a beneficial effect on the control of excretion and infection by *Salmonella*.

2. Introducción

La salmonelosis es una de las enfermedades con mayor prevalencia de entre las transmitidas al hombre por los alimentos. Aunque está principalmente asociada al consumo de huevos y carne de pollo, estudios recientes estiman que la carne de porcino podría ser una de las principales causas de salmonelosis humana (de Knegt, L et al., 2015). En la UE la salmonelosis es la segunda causa más frecuente de problemas gastrointestinales en humanos, por detrás de la campilobacteriosis (EFSA 2015). Es de destacar que casi un 50% de la carne consumida en la UE procede del cerdo (EFSA 2015).

El término de salmonelosis engloba tanto las fiebres tifoideas como la salmonelosis humana no tifoidea, pudiendo diferenciarlas en función de su sintomatología y del agente etiológico. La salmonelosis humana no tifoidea se caracteriza por la aparición de fiebre, náuseas e incluso vómitos y dolor abdominal, y aunque su presentación suele ser de carácter leve, puede ser problemática en personas inmunodeprimidas, niños o ancianos, siendo necesario el tratamiento antibiótico (Gordon, 2008). Por otro lado, *S. Thypi* o *S. Parathyphi*, provocan las conocidas como fiebres tifoideas, con sintomatología similar, pero con un signo clínico típico como es la roséola tifoidea (zona con máculas-pápulas de tonalidades salmón). Este tipo de fiebres no son muy comunes en Europa, pero si en países del Tercer Mundo y afectan exclusivamente a las personas.

La salmonelosis humana está provocada por bacterias del género *Salmonella* y el ganado porcino y las aves serían sus principales reservorios. La presencia de esta bacteria en la carne y sus derivados supone así un problema de salud pública y la necesidad de controlar su presencia en la producción animal, así como de evitar su transmisión a lo largo de la cadena alimentaria.

La incidencia de la salmonelosis a nivel europeo, según datos de 2014, confirmaron la presencia de 88.715 casos en la población (23,4 casos por 100.000 habitantes). En España, en ese mismo año, la incidencia fue muy superior a la media vista en Europa con 6.643 casos (47,6 casos por 100.000 habitantes) (EFSA 2015). Por tanto, con estos datos, vemos que estamos ante un problema importante de Salud Pública, tanto a nivel europeo como nacional.

2.1 *Salmonella* spp: características y taxonomía

Es un género de bacterias perteneciente al Orden *Enterobacteriales*, Familia *Enterobacteriaceae*. Son bacterias Gram – de forma bacilar, anaerobias facultativas, no encapsuladas ni esporuladas, móviles por flagelos. En su mayoría presentan características químicas comunes, como ser catalasa positivas y oxidasa negativas, fermentan glucosa para producir ácidos (no fermentan

lactosa ni sacarosa), reducen los nitratos a nitritos, descarboxilan arginina, lisina y ornitina, utilizan como única fuente de carbono el citrato.

Capaces de crecer en un rango amplio de temperatura, desde los 7°C a los 48 °C, siendo 35-37°C su rango óptimo. A temperaturas superior a 55°C se inactivan, pero si pueden sobrevivir por debajo de 7°C (Giaccone *et al.*, 2012). El pH óptimo para su crecimiento se encuentra entre 6.5-7.5.

Son resistentes a la desecación, sobre polvo y materia orgánica pueden sobrevivir durante largos periodos (Baloda *et al.*, 2001). Son sensibles a los desinfectantes habituales como son fenoles, iodados y clorados. Se han descrito períodos de supervivencia de 13 meses en heces deshidratadas, lo cual esta elevada resistencia es un factor de riesgo a posteriori.

Los medios de cultivo selectivos para su aislamiento han sido desarrollados gracias a su capacidad para tolerar altas concentraciones de sales biliares, así como crecer en presencia de colorantes (eosina, fucsina, azul de metileno...).

El género *Salmonella* spp. está formado por dos especies: *S. enterica* y *S. bongori*. A su vez, *S. enterica* se subdivide en 6 subespecies, a saber, enterica, salamae, arizonae, diarizonae, houtenae e indica, siendo las cepas de la subespecie enterica las de mayor interés sanitario (Schultz, 2008). La composición antigénica de la pared bacteriana (polisacárido somático O) subdivide cada subespecie en serogrupos, los cuales se subdividen a su vez en serotipos según las características de los antígenos capsulares (H) y flagelares (Vi), siendo conocidos alrededor de medio centenar de serogrupos diferentes y más de 2600 serotipos (Issenhuth-Jeanjean *et al.*, 2014) (Grimont PAD y Weill F-X *et al.*, 2007).

Es una bacteria presente en el tracto intestinal del hospedador, y gracias a su ubicuidad pueden ser aisladas en numerosos reservorios. La infección por parte de este patógeno no suele producir síntomas en los individuos infectados, siendo asintomáticos, mientras que el principal problema es la excreción de la bacteria pues provocan su diseminación en el ambiente.

Todas estas características propias de esta bacteria hacen que su entrada a las explotaciones sea más fácil, así como la dificultad en su eliminación. Para luchar contra ella hay que tener presente la necesidad de controlar su transmisión entre animales, así como una buena estrategia de limpieza y desinfección.

El uso indiscriminado de antibióticos, tanto en animales como en humanos, o su utilización en animales de abasto como promotores de crecimiento (a dosis subterapéuticas), están provocando la aparición de mecanismos de resistencia para estos antibióticos, restándoles

efectividad y siendo un problema a nivel de salud pública. Por eso, a partir del año 2006, se estableció la prohibición del uso de antibióticos como promotores de crecimiento (Reglamento CE nº1831/2003). A todo esto, van surgiendo nuevas alternativas para controlar el uso de los antibióticos, como es el caso de nuestro trabajo.

2.2 La salmonelosis en el ganado porcino

La avicultura siempre ha sido la principal fuente de salmonelosis humana, por lo que se han llevado a cabo diversas estrategias de control y erradicación de *Salmonella* spp. en aves. Esto ha supuesto un aumento relativo de la importancia del ganado porcino en cuanto a fuente de salmonelosis humana, siendo considerada ahora una de las principales causas de contagio de esta enfermedad (Argüello *et al.*, 2017).

El cerdo es susceptible a diferentes serotipos de *Salmonella* spp., siendo en su mayoría de los casos *S. Choleraesuis* y *S. Typhimurium*. Esta última, a diferencia de la primera, cursa de manera asintomática. Los cerdos infectados con este serotipo, que actúan como reservorio, portan las bacterias en zonas no detectables en las inspecciones rutinarias de matadero (tonsillas, nódulos linfáticos o tracto intestinal). Si la bacteria evade la respuesta inmune, puede atravesar la barrera intestinal y pasar a sangre, multiplicándose en macrófagos hasta llegar a hígado, bazo o pulmones provocando una infección generalizada y septicemia.

La principal vía de transmisión es feco-oral, por contacto con heces de individuos afectados. Suele cursar de manera subclínica, siendo el estrés un factor importante en la excreción, que suele ser intermitente. Por eso, en el transporte a matadero o en la mezcla de animales, la multiplicación y eliminación de bacterias aumentará, haciendo a los portadores asintomáticos, una de las principales fuentes de contaminación del matadero por *Salmonella*.

La infección por *S. Choleraesuis* se asocia con septicemia y la sintomatología empieza a las 24-36h post infección. Se caracteriza por la inapetencia, letargia, fiebre y problemas respiratorios que presentan los animales. A partir del 4º-5º día pueden aparecer diarreas y en la necropsia observaríamos colitis. Es común en cerdos destetados y de cebo, pero su infección en Europa es casi inexistente (mucho más común en Norte América).

Sin embargo, si la infección es provocada por *S. Typhimurium*, frecuente en el ganado porcino europeo, su curso es asintomático e irreconocible en matadero ni cebadero. La presencia de cepas muy virulentas o en situaciones de inmunosupresión puede dar graves problemas como el síndrome enterocolítico. Inicialmente presentan una diarrea acuosa amarillenta, con letargia e inapetencia y fiebre (al igual que en el serotipo anterior). La morbilidad de esta infección es

muy alta, por el contrario, su mortalidad es muy baja. En la necropsia se observa colitis necrótica, zonas enrojecidas de la mucosa intestinal y los nódulos linfáticos mesentéricos infartados (Althouse et al., 2003).

En Aragón, según un estudio realizado en 2011, se detectó que aproximadamente un 31% de los animales y un 94% de las explotaciones de cebo eran positivos a *Salmonella* spp. (Vico et al., 2011).

La figura 1 explica como evolucionarían los niveles de seroprevalencia en las diferentes fases de producción. En la fase de transición se infectarían los lechones entorno a las 8 semanas (posiblemente por la pérdida de anticuerpos maternos). En la fase de engorde, al final del primer tercio empieza a elevarse el nivel de seroprevalencia progresivamente hasta la llegada a matadero. El nivel de seroprevalencia en la fase de recría es igual o mayor que en el último tercio del engorde, al que hay que sumarle el factor ambiente que incrementa dicho valor. En el caso de las fases de parto y lactación, cuando los lechones todavía están en contacto con la madre (cuyo nivel de seroprevalencia suele ser bastante elevado), se desconoce exactamente la prevalencia por falta de estudios.

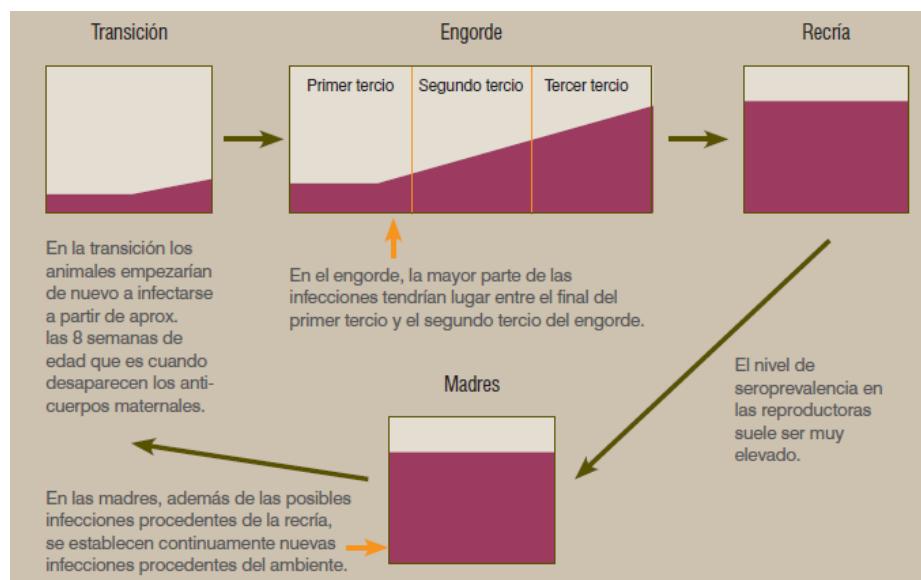


Figura 1. Evolución del nivel de seroprevalencia entre las distintas fases de producción (Creus y Mainar, 2010)

2.3 Estrategias de control

Dado que la salmonelosis presenta un curso asintomático, y una vez conocida la evolución de la misma en función de la fase de producción en la que nos encontramos, tenemos que tener en cuenta factores de riesgo como el estrés, el transporte, la alimentación y agua de bebida, el origen de los animales, etc. Una vez conocidos estos posibles factores hay que establecer unos programas de control y medidas correctoras. Se puede implantar un programa de vigilancia y control basado en pruebas con elevada especificidad y sensibilidad, recoger información sobre la prevalencia de infección y conocer la epidemiología de *Salmonella* spp. para poder aplicar estas medidas de control.

Una de las medidas aplicables sería la realización de un plan exhaustivo de limpieza y desinfección (estrategia de todo dentro, todo fuera: la efectividad del mismo vendrá determinada por la duración del vacío sanitario, si puede ser superior a un día).

La alimentación también puede ser un punto de control a la hora de controlar la aparición de *Salmonella* spp. El pienso granulado favorece más la infección, por contra las harinas, los alimentos fibrosos o la adición de ácidos reducen la posibilidad de infección (Berends *et al.*, 1998; Julie Funk *et al.*, 2010). También el agua de bebida es un punto para tener en cuenta, ya que su contaminación favorece la infección por *Salmonella* spp., por tanto, hay que realizar tratamientos de cloración, uso de peróxidos, etc. Igual de importante es llevar a cabo estos tratamientos, como regularmente realizar análisis microbiológicos.

Otro de los puntos a controlar sería el papel de las reproductoras en cuanto a la infección de la descendencia (que posteriormente irán a cebaderos y consumo humano) (Beloeil *et al.*, 2003). Según la nueva ley de bienestar animal que impone el alojamiento en grupo de las cerdas gestantes, se cree que esto puede incrementar la diseminación de la bacteria, así como el traslado a las parideras por el aumento del estrés al cambiar de ambiente (Poza, 2012).

También hay que tener en cuenta, dentro del control sanitario, la prevención de problemas entéricos; la presencia de otros patógenos digestivos causantes de brotes diarreicos (*Lawsonia intracellularis*, *Brachyspira hyodysenteriae*, *Escherichia coli*...) incrementan claramente el riesgo de excreción de *Salmonella* spp.

La prohibición en Europa del uso de antibióticos como promotores de crecimiento, impuesta en Enero del 2006 (Reglamento CE nº 1831/2003), con la cual se quiere hacer frente al problema de la creación de resistencias antibióticas en los microorganismos (Aarestrup, 1999), abre un nuevo campo de investigación, nuevas estrategias y productos alternativos que ayuden al

control de los patógenos y mejoren la salud intestinal y los índices productivos evitando el uso indebido de los antibióticos (Wilhelm *et al.*, 2012).

De todas las medidas de control propuestas destacan las basadas en estrategias alimentarias, todas con un objetivo principal, dificultar la supervivencia de bacterias patógenas como *Salmonella*.

No solo influye el qué añadimos, sino también la forma en la que lo añadimos. El uso de alimento granulado, en vez de harina grosera, se asocia a una probabilidad mayor de eliminación de *Salmonella* y una mayor seroprevalencia (Vico y Mainar, 2012). Estas diferencias tendrían que ver con la mayor capacidad de acidificación que produce la harina. También, el uso de harinas groseras promueve un ambiente a favor de las bacterias acido-lácticas que actúan como competidoras frente a *Salmonella* por los receptores de las células intestinales.

2.4 Uso de aditivos como estrategia de control

A la hora de añadir productos alternativos en la dieta, tenemos posibilidades varias. Una de ellas es el uso de ácidos orgánicos, que además de tener una actividad antimicrobiana directa sobre los patógenos, tiene efectos también en el tracto gastrointestinal de los animales. Estos ácidos, atraviesan la membrana celular, se disocian en su interior acidificando el citoplasma celular, afectando a la síntesis de DNA y proteínas, causando la muerte celular (Van Immerseel *et al.*, 2006). También se han descrito ácidos, como el butírico o el caprónico, que reducen la expresión de genes de patogenicidad de *Salmonella* (Gantois *et al.*, 2006; Boyen *et al.*, 2008). Como inconvenientes de estos ácidos, podemos encontrar la falta de palatabilidad y la necesidad de que lleguen a los tramos adecuados del tracto intestinal (de Lange *et al.*, 2010). La adición de estos ácidos orgánicos y su funcionalidad, dependen, no únicamente del tipo utilizado, sino también de la forma física en la que se administra (para evitar una rápida absorción en los tramos superiores del tracto digestivo, se han desarrollado formas encapsuladas mediante matrices lipídicas para que lleguen a tramos posteriores (Piva *et al.*, 2007)). El tiempo durante el cual se administra el ácido orgánico y la concentración empleada son también fundamentales a la hora de realizar un balance positivo o negativo del uso de estos productos.

Otros aditivos, como los probióticos y los prebióticos podrían ser efectivos para minimizar la colonización intestinal de *Salmonella* spp. Estos aditivos favorecen el crecimiento de bacterias acido-lácticas y se limita el crecimiento de coliformes como *Salmonella* spp. Aunque uno de los inconvenientes de estos es la poca capacidad que tienen para sobrevivir y mantenerse viables durante la fabricación y almacenaje del pienso.

Otra alternativa a tener en cuenta es el uso de aceites esenciales, obtenidos de algunas plantas (tomillo, orégano, clavo, canela, ajo...), debido a su poder antimicrobiano (Peñalver et al., 2005). Esta alternativa necesita todavía de un número mayor de estudios, no hay resultados disponibles de su eficacia en granjas comerciales.

3. Justificación y objetivos:

Como ya hemos comentado anteriormente, dada la alta prevalencia de infección por *Salmonella* en cerdos de matadero, la importancia del ganado porcino como fuente de transmisión y la necesidad de controlar una enfermedad bacteriana sin antibióticos, ya que el uso irracional de los mismos provoca una alta presencia de resistencias a los antimicrobianos, se han establecido unas nuevas estrategias comentadas en los programas de control. El objetivo de este trabajo fue comprobar el efecto antimicrobiano que produce un ácido orgánico a nivel intestinal al ser añadido en la dieta habitual en cerdos de engorde.

En nuestro caso, comprobaremos la efectividad de un aditivo en base a butirato sódico (DICOSAN +, Norel S.A., Madrid) en el control de la salmonelosis en un cebadero de porcino. En particular:

- Evaluar el estado serológico frente a *Salmonella* de los cerdos de engorde, comparando el grupo control y el grupo tratamiento, mediante un ELISA indirecto.

- Estimar los niveles de excreción de *Salmonella* spp. tanto en el grupo control como en el grupo tratamiento.

4. Metodología

4.1 Producto utilizado

DICOSAN + (Norel S.A., Madrid), una nueva forma protegida de butirato sódico con sales sódicas de ácidos grasos destilados procedentes del coco, eficaz contra *Salmonella*, *Clostridium* y otras bacterias patógenas.

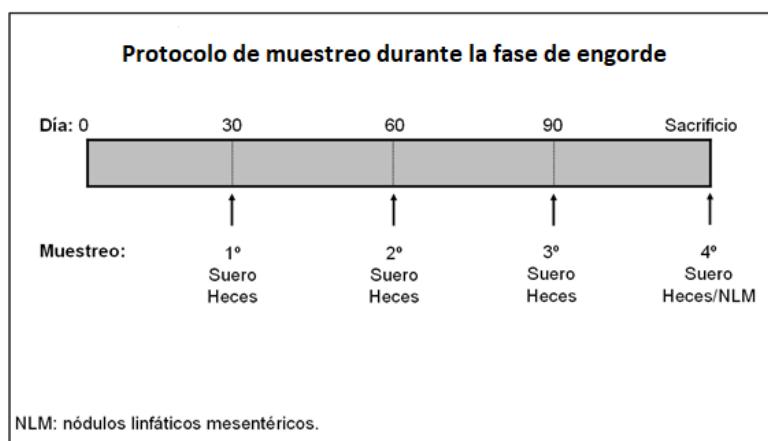
Los ácidos grasos derivados del aceite de coco se componen entre un 41 a 55 % de ácido láurico (ácido graso mayoritario) y también en cantidades en torno al 10 % de ácido caprílico y cáprico.

Dado que el ácido láurico es el componente mayoritario del aceite de coco, las propiedades de este aceite están atribuidas a las propiedades de este ácido, que es un gran antimicrobiano.

4.2 Diseño del estudio

Para el estudio se dispuso de una pequeña explotación comercial de cerdos de engorde en la provincia de Huesca (100 cerdos aproximadamente). Los animales estaban dispuestos en 8 corrales (~13 animales por corral), en los cuales cuatro de ellos eran los grupos control, y los cuatro restantes los grupos tratados con el butirato sódico, con una dosis de 3kg/T.

Para realizar este estudio, se llevaron a cabo extracciones mensuales de sangre y recogida de heces para su posterior análisis serológico y microbiológico, respectivamente, los días 30, 60, 90 y previo al sacrificio en matadero. Una vez sacrificados los animales, también se tomaron muestras de heces post-mortem y nódulos linfáticos mesentéricos (NLM). El sacrificio de los animales y la toma de muestras posterior se llevó a cabo en un matadero de la provincia de Huesca.



4.3 Análisis laboratoriales

Una vez recibidas las muestras en el laboratorio, tanto de heces, como de nódulos linfáticos mesentéricos y sangre, se procesaron por separado para realizar un análisis serológico (sangre) y un análisis microbiológico (heces y nódulos linfáticos mesentéricos (NLM)).

Para realizar los análisis serológicos se utilizó un kit ELISA indirecto (Herdcheck *Salmonella*®, Laboratorios IDEXX) para detectar anticuerpos específicos frente a *Salmonella* spp. Los resultados se obtenían en forma de porcentaje de densidad óptica (%DO) respecto a sueros controles positivos y negativos. Se consideraron positivos todos los sueros con valores de %DO \geq 40, también utilizaremos los valores de %DO \geq 20 para comparar y ver las variaciones entre ambos resultados

Por otro lado, para llevar a cabo los análisis microbiológicos, tanto de heces como de nódulos linfáticos mesentéricos, para la detección de *Salmonella* spp., se llevaron a cabo siguiendo la norma ISO 6579/2002. El cultivo bacteriológico es considerado la prueba referencia para el diagnóstico de la salmonelosis porcina. Con una especificidad del 100%, pero en cuanto a la sensibilidad influyen factores como el tipo o cantidad de muestra analizada (Swanenburg *et al.*, 2001b; Hurd, 2002; Rostagno *et al.*, 2003).

Para analizar estas muestras, tanto las heces como los nódulos linfáticos mesentéricos, se llevan a cabo tres etapas: pre-enriquecimiento no selectivo, enriquecimiento selectivo y aislamiento en medios selectivos.

Se toman 25 gramos de muestra; en el caso de las heces hacemos una dilución 1/10 en agua de peptona tamponada (APT) y, en el caso de los NLM primeramente los flameamos y los trituramos para su dilución posterior en agua de peptona tamponada. Esta sería la primera etapa de pre-enriquecimiento no selectivo, con la que favorecemos el crecimiento de las bacterias presentes en la muestra (sea *Salmonella* u otras), la cual dejaremos incubando a 37°C +/- 1°C durante 18h +/- 2h.

La segunda etapa, para los dos tipos de muestra por igual, consiste en un enriquecimiento selectivo con siembra en un medio semisólido selectivo, vamos a utilizar agar Rappaport-Vassiladis semisólido modificado (MSVR) a 41,5°C +/- 1°C durante 24h +/- 3h, *Salmonella* spp gracias a su movilidad aprovecha las características de este medio. En el caso de una muestra negativa, se volverá a incubar otras 24h.

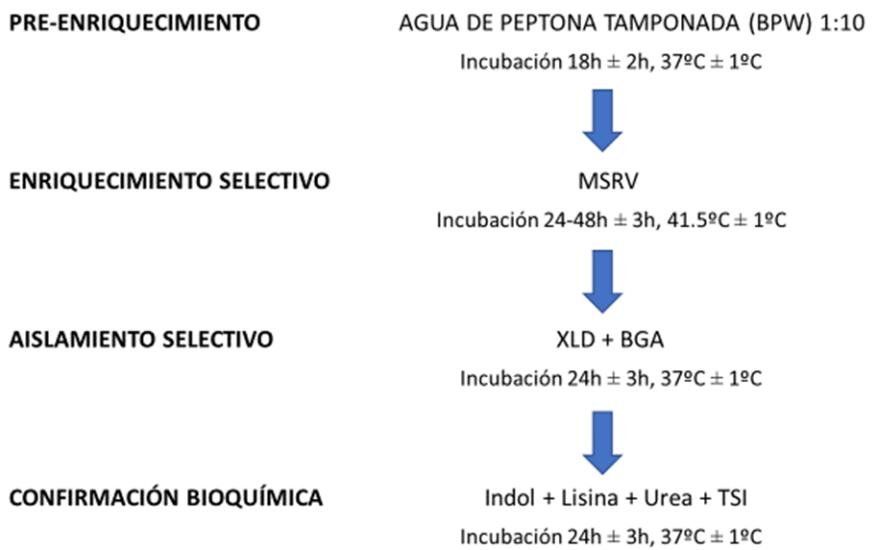
La tercera etapa, a partir del cultivo anterior, vamos a realizar un aislamiento en medios sólidos selectivos, en nuestro caso agar xilosa lisina desoxicolato (XLD) y agar verde brillante (BGA),

incubados a 37°C +/-1°C durante 24h +/- 3h. En el caso del medio XLD, las muestras positivas van a ser identificadas por el precipitado negro que se produce por el contacto entre *Salmonella* spp con el tiosulfato sódico y citrato férrico amonio. El medio BGA, inhibe gran cantidad de bacterias Gram positivas, nos indica muestra positiva a *Salmonella* spp cuando vemos colonias translúcidas con tonalidad rosácea con un halo rojizo brillante.

Una vez realizado el aislamiento selectivo hay que confirmar la identidad de la bacteria aislada mediante una serie de pruebas bioquímicas:

- Prueba del Indol: se determina la capacidad de producir indol con la degradación del triptófano, detectado tras añadir el reactivo de Kovacs (alcohol isoamilo, *p*-dimetilaminobenzaldehído y ácido clorhídrico concentrado). *Salmonella* es negativa a esta prueba, por lo que no observamos cambio de color (si fuera positiva veríamos un cambio a amarillo)
- Descomposición de urea: agar urea como fuente de carbono. El indicador Rojo Fenol vira de amarillo a un color rosado. Esta prueba es negativa a *Salmonella*.
- Descarboxilación de Lisina: para la detección de bacterias con enzimas descarboxilasas, como es el caso de *Salmonella*, observando un cambio de color en la muestra positiva hacia tonalidad púrpura.
- Agar triple azúcar de hierro (TSI): podemos estudiar diferentes reacciones, como la degradación de glucosa (formación de burbujas en muestras positivas a *Salmonella*), lactosa o sacarosa (ambas negativas), y la producción de sulfhídrico en forma de precipitado negruzco (en muestras positivas a *Salmonella*).

Una vez realizada la confirmación bioquímica, las muestras aisladas como positivas a *Salmonella* son enviadas al Laboratorio Nacional de Referencia para la Salmonelosis Animal, donde se procede al serotipado de las mismas.



4.4 Análisis estadísticos

Las comparaciones entre las distintas categorías, tanto en los análisis serológicos como en los análisis microbiológicos, se realizaron mediante análisis univariantes de Chi-cuadrado. El nivel de significación se estableció en $p \leq 0,05$.

5. Resultados

5.1 Serología

Los resultados de los muestreos serológicos entre el grupo control y el grupo tratado con DICOSAN +, tomando como punto de corte $\%OD \geq 40$, se presentan en las siguientes tablas, donde también representamos los valores obtenidos con el punto de corte $\%OD \geq 20$, para ver la variación de los resultados.

Tabla 1: Resultados de los análisis serológicos para el grupo control y grupo tratado a los 30 días de fase de engorde

1^{er} Muestreo Serológico

	%OD ≥ 20			%OD ≥ 40	
	Nº sero +	Nº sero -		Nº sero +	Nº sero -
C (52)	25 (48,1%)	27	C (52)	14 (26,9%)	38
Tt (52)	21 (40,4%)	31	Tt (52)	13 (25%)	39
p* 0,22			p* 0,41		

*Prueba de Chi-cuadrado (una cola)

Tabla 2: Resultados de los análisis serológicos para el grupo control y grupo tratado a los 60 días de fase de engorde.

2^o Muestreo Serológico

	%OD ≥ 20			%OD ≥ 40	
	Nº sero +	Nº sero -		Nº sero +	Nº sero -
C (50)	38 (76%)	12	C (50)	30 (60%)	20
Tt (51)	35 (68,6%)	16	Tt (51)	17 (33,3%)	34
p* 0,21			p* 0,004		

*Prueba de Chi-cuadrado (una cola)

Tabla 3: Resultados de los análisis serológicos para el grupo control y grupo tratado a los 90 días de fase de engorde.

3 er Muestreo Serológico

	%OD≥20			%OD≥40	
	Nº sero +	Nº sero -		Nº sero +	Nº sero -
C (51)	37 (72,5%)	14	C (53)	27 (50,9%)	26
Tt (51)	16 (31,4%)	35	Tt (51)	5 (9,8%)	46
p* 0,000017			p* 0,0000022		

*Prueba de Chi-cuadrado (una cola)

Tabla 4: Resultados de los análisis serológicos para el grupo control y grupo tratado previo al sacrificio.

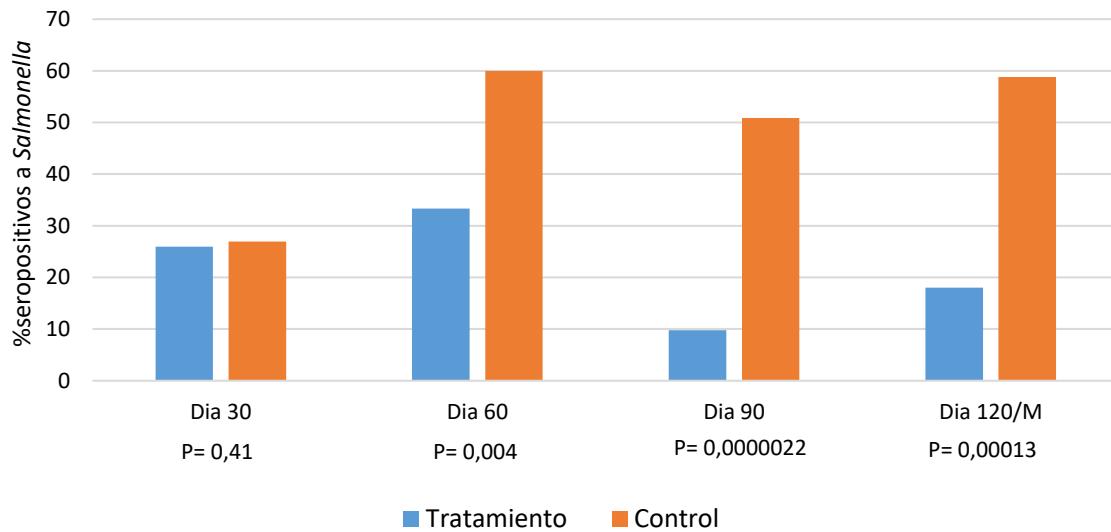
4º Muestreo Serológico

	%OD≥20			%OD≥40	
	Nº sero +	Nº sero -		Nº sero +	Nº sero -
C (51)	41 (80,4%)	10	C (51)	30 (58,8%)	21
Tt (51)	24 (47,1%)	26	Tt (50)	9 ((18%))	41
p* 0,00038			p* 0,00013		

*Prueba de Chi-cuadrado (una cola)

Podemos observar, tomando %OD≥40 como punto de corte, que ya desde el segundo muestreo se observaron diferencias claramente significativas ($p \leq 0,05$) que se mantuvieron hasta el momento previo al sacrificio. Quizá es en el tercer muestreo donde más clara se ve esta diferencia con una seropositividad del 9,8% en el grupo tratado por un 50,9% obtenido en el grupo control (Figura 2).

Figura 2. Resultados de los análisis serológicos para el grupo control y el grupo tratamiento. Od \geq 40



5.2 Bacteriología

Los resultados de los muestreos microbiológicos en heces y nódulos linfáticos mesentéricos, entre el grupo control y el grupo tratado con DICOSAN +, se presentan en las siguientes tablas.

Tabla 1. Resultados de los análisis microbiológicos en heces (norma ISO 6579:2002) para el grupo control y grupo tratado en el muestreo realizado a los 30 días de entrar al cebadero.

1^{er} Muestreo

	Nº muestras +	Nº muestras -	Total
C	22 (91,7%)	2	24
Tt	17 (65,4%)	9	26
P*	0,015		

*Prueba de Chi-cuadrado (una cola)

Tabla 2. Resultados de los análisis microbiológicos en heces (norma ISO 6579:2002) para el grupo control y grupo tratado en el muestreo realizado a los 60 días de entrar al cebadero.

2^o Muestreo

	Nº muestras +	Nº muestras -	Total
C	4 (16%)	21	25
Tt	3 (12%)	22	25
P*	0,35		

*Prueba de Chi-cuadrado (una cola)

Tabla 3. Resultados de los análisis microbiológicos en heces (norma ISO 6579:2002) para el grupo control y grupo tratado en el muestreo realizado a los 90 días de entrar al cebadero.

3 er Muestreo

	Nº muestras +	Nº muestras -	Total
C	3 (11,1%)	24	27
Tt	0 (0%)	26	26
P*	0,06		

*Prueba de Chi-cuadrado (una cola)

Tabla 4. Resultados de los análisis microbiológicos en heces (norma ISO 6579:2002) para el grupo control y grupo tratado en el muestreo realizado tras el sacrificio en el matadero.

4º Muestreo

	Nº muestras +	Nº muestras -	Total
C	7 (15,6%)	38	45
Tt	5 (12,5%)	35	40
P*	0,35		

*Prueba Chi-cuadrado (una cola)

Tabla 5. Resultados de los análisis microbiológicos en nódulos linfáticos mesentéricos (norma ISO 6579:2002) para el grupo control y grupo tratado en el muestreo realizado tras el sacrificio en el matadero.

Resultados microbiológicos de los NLM

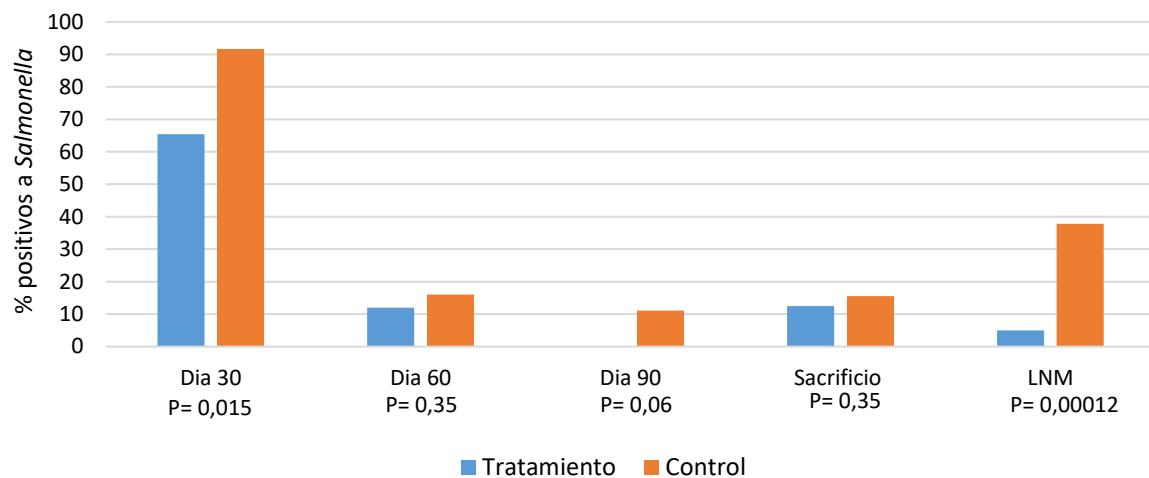
	Nº muestras +	Nº muestras -	Total
C	17 (37,8%)	28	45
Tt	2 (5%)	38	40
P*	0,00012		

*Prueba Chi-cuadrado (una cola)

Los niveles de excreción de *Salmonella* spp. fueron siempre ligeramente inferiores en el grupo tratado con DICOSAN + con respecto al grupo control. Destacar los valores encontrados en el primer muestreo, donde tanto el grupo control como el grupo tratado presentan valores superiores al 60%, incluso superiores al 90% en el caso del grupo control. Se evidencian diferencias significativas ($p \leq 0,05$) tanto en el primero como en el tercer muestreo, en cambio en los otros dos muestreos restantes no es así.

En cuanto a la infección por *Salmonella* spp., evidenciada por su presencia en nódulos linfáticos mesentéricos (donde pasa desapercibida en las inspecciones rutinarias de matadero), encontramos diferencias claramente significativas ($p \leq 0,05$) entre el grupo control, con un 37,8% de individuos positivos, y el grupo tratado, con un 5% (Figura 3).

Figura 3. Resultados de los análisis microbiológicos en heces y NLM para el grupo tratado y el grupo control



6. Discusión de los resultados.

Una vez observados los resultados en el apartado anterior, podemos discutir los hallazgos que hemos obtenido en nuestro trabajo, valorando de forma positiva o negativa el uso, en nuestro caso, del butirato sódico (Dicosan +).

En cuanto a los resultados encontrados en la serología vemos que los valores de %DO para el grupo control y el grupo tratado fue similar a los 30 días, pero en los posteriores muestreos los valores de %OD permanecieron significativamente más bajos para el grupo tratado. El %DO para el grupo tratado aumentó el número de muestras positivas a *Salmonella* desde el primer (25%) al segundo muestreo (33,3%), pero comenzaron a disminuir en los muestreos siguientes. Sin embargo, en el grupo control se observó una tendencia general al aumento en el % de muestras positivas, del 26,9% en el día 30 al 58,8% en el sacrificio.

Si nos fijamos en los resultados de la bacteriología en muestras fecales y nódulos linfáticos mesentéricos, tanto para el grupo control como para el grupo tratado, se observa una gran proporción de excreción de *Salmonella* en el primer muestreo, pero en posteriores muestreos se observó, para ambos grupos, una disminución en los valores de excreción a lo largo del periodo de engorde, sin diferencias significativas. Esta reducción en la excreción en ambos grupos puede estar relacionada con la adaptación de los cerdos al nuevo ambiente al que han sido llevados. Sin embargo, tras el sacrificio, la proporción encontrada de cerdos infectados (NLM +) fue significativamente mayor para el grupo control (37,8%) con respecto al grupo tratado (5%).

Dado el gran número de cerdos que excretan *Salmonella* en el primer muestreo, lo que cabría esperar sería un gran número de cerdos infectados (NLM +) en el sacrificio. Únicamente se observó esto en el grupo control, mientras que en el grupo tratado no. Este hallazgo sugiere un efecto protector de Dicosan + contra la infección por *Salmonella* a pesar de un alto nivel de exposición al comienzo del periodo de engorde.

Este hallazgo, será respaldado por los resultados vistos en la serología. Después de un aumento inicial de los valores de %DO en el grupo tratado, disminuyeron significativamente con el tiempo a pesar de la presencia de *Salmonella* en la granja. En el segundo muestreo, dentro del grupo tratado, se observó un aumento en los valores de %DO, sugiriendo que el tratamiento necesita varios días para empezar su efecto (3-4 semanas aproximadamente). En el caso del grupo control ocurrió todo lo contrario, desde el primer muestreo (26,9%) hasta el momento del sacrificio (58,8%), los valores fueron muy superiores a nuestro valor máximo considerado como punto de corte para considerar un cerdo como seropositivo (%DO ≥40).

Antes del sacrificio, sorprenden los bajos valores en cuanto a excreción de *Salmonella* sobre todo en el grupo control (15,6%). Puede ser consecuencia del tiempo de transporte y de estabulación en matadero que fueron cortos, también el nivel de limpieza en la estabulación puede haber contribuido a estos resultados.

7. Conclusión

Una vez valorados los resultados obtenidos, tanto en serología como en bacteriología, se puede concluir que, en nuestro trabajo, con el objetivo de controlar la salmonelosis porcina con la adición del butirato sódico al pienso, se ha encontrado un efecto beneficioso tras la administración de Dicosan + en la dieta de los cerdos de engorde. Dentro del grupo tratado se observó una reducción significativa en el número de cerdos infectados con respecto al grupo control.

Por lo tanto, el uso de Dicosan + puede ser contemplada como una estrategia potencial para reducir la excreción de *Salmonella* y la infección de los cerdos durante el periodo de engorde.

Otro de los puntos a valorar sería si es económico o no añadir estos aditivos al pienso, sobre todo en cuanto a coste final del pienso, ya que los bajos costes en alimentación son algo muy buscado en la formulación de piensos de cerdos de engorde, y en cuanto a mejoras en parámetros productivos como pueden ser la ganancia media diaria o el índice de conversión.

Conclusion

Once the results obtained have been evaluated, both in serology and in bacteriology, it can be concluded that, in our work, controlling swine salmonellosis with the addition of sodium antibiotic, a beneficial effect has been found in the administration of Dicosan + in the diet of the fattening pigs.

Within the group it is a significant reduction in the number of infected pigs with respect to the control of the group. It is also positively associated with the excretion of *Salmonella* and its infection, to which must be added the intermittency in the excretion of this bacterium.

Therefore, the use of Dicosan + (3kg / T) can be considered as a potential strategy to reduce the excretion of *Salmonella* and the infection of pigs during the fattening period. Another point to assess whether it is economic or not is an addition to these feed additives, especially at a final price of the feed, since low feed costs are something much sought after in the fattening pigs, and to improvements in productive parameters such as the average daily gain or conversion rate.

8. Valoración personal

En primer lugar, agradecer tanto a Raúl C. Mainar, Alejandro Casanova y el equipo del CITA por dejarme colaborar en este proyecto, sin olvidarme también de los alumnos de 2º de Veterinaria que han ayudado en la toma y análisis de muestras. Remarcando el buen trato recibido, las ayudas ofrecidas en todo momento, enseñarme el ámbito laboratorial (más allá del visto durante la duración del Grado) y todo lo relacionado con la redacción del trabajo. Pero, sobre todo, la paciencia que han tenido en cuanto a la realización de este Trabajo Final de Grado.

Las razones que me llevaron a realizar este trabajo fueron varias, una de ellas fue el gusto que le cogí a la asignatura de Microbiología e Inmunología cuando la cursé, por ello decidí preguntar en dicho departamento para realizar este trabajo. Otro de los motivos fue el interés en el sector porcino y el objetivo del trabajo, un tema a tener muy en cuenta a día de hoy. Que la realización del trabajo fuera en el pueblo donde resido, cosa que fue totalmente al azar, también me hizo decantarme por este trabajo, y no me lo pensé dos veces.

Por un lado, he adquirido conocimientos varios acerca de la *Salmonella*, transmisión, métodos de análisis. Por otro lado, todo lo que incumbe al trabajo en un laboratorio, a realizar el trabajo de forma ordenada, hacer una buena toma de muestras, ya que sin todo ello los resultados obtenidos no tendrían la importancia que tienen.

No solo dentro del campo de la investigación he adquirido conocimientos, sino también a la hora de redactar un trabajo de estas características. La verdad que redactar nunca ha sido lo mío, pero este trabajo me ha servido para saber sintetizar, entender y explicar información. También mejorar habilidades en cuanto al programa Excel y conceptos estadísticos, poco o nada conocidos durante estos años.

Tras la realización de este trabajo, estoy satisfecho con los resultados, ya que un proyecto de investigación implica que puedan salir datos concluyentes o no, y más sobre la temática que ha ido este trabajo y la importancia sobre la Salud Pública que tienen las enfermedades zoonóticas, en este caso la salmonelosis. Al fin y al cabo, la alimentación que le damos a los animales nos va a beneficiar o perjudicar, directa e indirectamente, a la hora del consumo de los productos de estos animales.

9. Referencias bibliográficas

- 3tres3.com (2017). El control de *Salmonella* en porcino en la actualidad. Disponible en: https://www.3tres3.com/salmonela/el-control-de-salmonella-en-porcino-en-la-actualidad_37633
- Aerestrup, FM. (1999). Association between the consumption of antimicrobial agents in animal husbandry and the occurrence of resistant bacteria among food animals. *Int J Antimicrob Agents*, 12 (4): 279-285.
- Creus, E., Mainar Jaime, R.C. (2010). Salmonelosis en las explotaciones porcinas. *SUIS nº 67*: 52-58.
- Creus, E., Mainar Jaime, R.C. (2010). Salmonelosis en las explotaciones porcinas. *SUIS nº 68*: 40-48.
- Creus, E., Mainar Jaime, R.C. (2010). Salmonelosis en las explotaciones porcinas. *SUIS nº 69*: 44-53.
- Creus, E., Mainar Jaime, R.C. (2010). Salmonelosis en las explotaciones porcinas. *SUIS nº 70*: 48-53
- de Knegt, L. V., S. M. Pires, and T. Hald, (2015). Attributing foodborne salmonellosis in humans to animal reservoirs in the European Union using a multi-country stochastic model. *Epidemiol. Infect.* 143, 1175–1186.
- Efsa.europa.eu (2015). EFSA Journal. The European Union summary report on trends and sources of zoonoses, zoonotic agents and food-borne outbreaks in 2013. Disponible en: <http://ecdc.europa.eu/en/publications/Publications/EU-summary-report-trends-sources-zoonoses-2013.pdf>
- Gantois, I., Ducatelle, R., Pasmans, F., Haesebrouck, F., Hautefort, I., Thompson, A., Hinton, JC., Van Immerseel, F. (2006). Butyrate specifically down-regulates *Salmonella* pathogenicity island 1 gene expression. *Appl Environ Microbiol*, 72 (1): 946-949.
- Giaccone, V., Catellani, P., Alberghini L (2012). Food as cause of human salmonellosis: 47-72.
- Grimont, P., Weill, F. (2007). *Antigenic formulae of the Salmonella serovars*. Institut Pasteur. Paris. Disponible en: <http://www.scacm.org/free/Antigenic%20Formulae%20of%20the%20Salmonella%20Serovars%202007%209th%20edition.pdf>

Hurd, HS., McKean, JD., Griffith, RW., Wesley, IV., Rostagno, MH. (2002). *Salmonella* entérica infections in market swine with and without transport and holding. *Appl Environ Microbiol*, 68 (5): 2376-2381.

Issenhuth-Jeanjean, S., Roggentin, P., Mikoleit, M., Guibourdenche, M., de Pinna, E., Nair, S., Fields, PI., Weill, FX. (2014). Supplement 2008-2010 (nº48) to the White-Kauffmann-Le Minor scheme. *Res Microbiol*, 165 (7): 526-530.

Peñalver, P., Huerta, B., Borge, C., Astorga, R., Romero, R., Perea, A. (2005). Antimicrobial activity offive essential oils against origin strains of the Enterobacteriaceae family. *APMIS*, 113 (1): 1-6.

Pires, S. M., deKnegt L., Hald, T. (2011). Estimation of the relative contribution of different food and animal sources to human *Salmonella* infections in the European Union. Scientific/ Technical report submitted to EFSA. National Food Institute, Technical University of Denmark.

Piva, A., Pizzamiglio, V., Morlacchini, M., Tedeschi, M., Piva, G. (2007). Lipid microencapsulation allows slow reléase of organic acids and natural identical flavors along the swine intestine. *J Anim Sci*, 85(2): 486-493.

Schultz, M. (2008). Theobald Smith. *Emerg Infect Dis*, 14 (12): 1940-1942.

Swanenburg, M., Urlings, HA., Snijders, JM., Keuzenkamp, DA., van Knapen, F. (2001b). *Salmonella* in slaughter pigs: prevalence, serotypes and critical control points during slaughter in tow slaughterhouses. *Int J Food Microbiol*, 70 (3): 243-254.

Van Immerseel, F., Russell, JB., Flyhte, MD., Gantois, I., Timbermont, L., Pasmans, F., Haesebrouck, F., Ducatelle, R. (2006). The use of organic acids to combat *Salmonella* in poultry: a mechanistic explanation of the efficacy. *Avian Pathol*, 35(3): 182-188.

Vico, JP y Mainar Jaime, RC. (2012). Serological survey of *Salmonella* spp. infection in finishing pigs from northeastern Spain and associated risk factors. *Span J Agric Res*, 10 (2): 372-382.

Wilhelm, B., Rajic, A., Parker, S., Waddell, L., Sanchez, J., Fazil, A., Wilkins, W., McEwen, SA. (2012). Assessment of the efficacy and quality of evidence for five on-farm interventions for *Salmonella* reduction in grow-finish swine: a systematic review and meta-analysis. *Prev Vet Med*, 107 (1-2): 1-20.