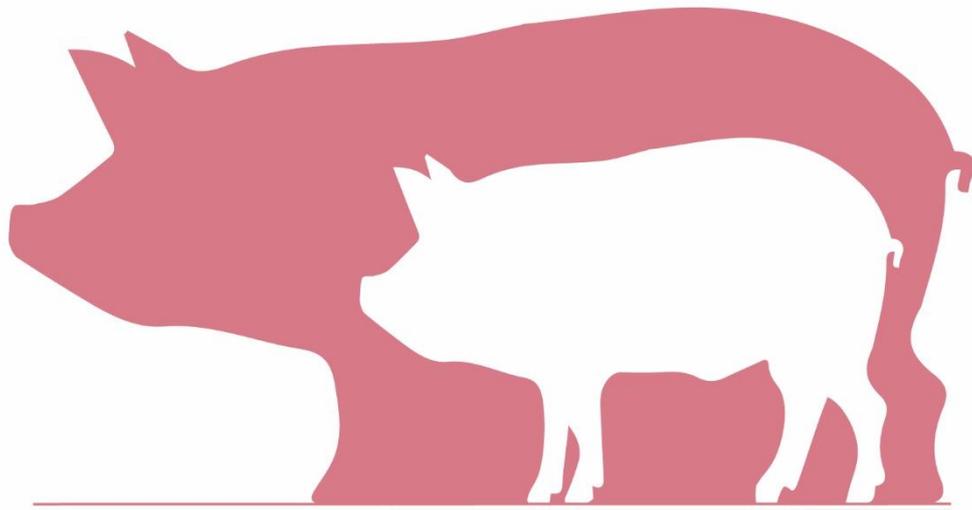


Trabajo Fin de Grado en Veterinaria



Facultad de Veterinaria
Universidad Zaragoza



Control de la salmonelosis porcina en maternidades mediante la adición de manano oligosacáridos en la alimentación de las madres.

Salmonella control in farrowing sows after dietary supplementation with mannan oligosaccharides.

Autora

María Bernad Roche

Directores

Raúl Carlos Mainar Jaime
Alejandro Casanova Higes

Facultad de Veterinaria

2016-2017



Índice

1. RESUMEN	2
2. INTRODUCCIÓN	4
2.1. Salmonelosis como problema de Salud Pública	4
Género <i>Salmonella</i>	4
Incidencia de salmonelosis humana	5
Fuentes de infección	5
2.2. Salmonelosis en la especie porcina	7
Características, serotipos principales y prevalencia de la infección en cerdos de cebo	7
Epidemiología en las diferentes fases de producción	8
2.3. Estrategias de control en la granja	9
Bioseguridad	9
Buenas prácticas de higiene	10
2.4. Control de la salmonelosis porcina a través de la alimentación	11
Probióticos	11
Prebióticos	12
Ácidos orgánicos	12
Extractos naturales derivados de plantas (EDP)	13
Manano oligosacáridos (MOS)	13
3. JUSTIFICACIÓN	15
4. OBJETIVOS	15
5. MATERIALES Y MÉTODOS	16
5.1. Producto utilizado	16
5.2. Diseño experimental	16
5.3. Toma de muestras	16
5.4. Bacteriología	17
5.5. Serología	18
5.6. Análisis del calostro	19
5.7. Análisis estadísticos	19
6. RESULTADOS Y DISCUSIÓN	20
6.1. Madres	20
6.2. Lechones	22
7. CONCLUSIONES	26
8. VALORACIÓN PERSONAL	28
9. BIBLIOGRAFÍA	29



1. RESUMEN

Título: Control de la salmonelosis porcina en maternidades mediante la adición de manano oligosacáridos en la alimentación de las madres.

Resumen:

La salmonelosis es una de las enfermedades más frecuentes transmitidas por los alimentos, lo que supone un problema importante de Salud Pública. Aunque se asocia principalmente al consumo de huevos y carne de pollo, recientemente han aumentado los brotes asociados al consumo de carne de cerdo. Teniendo en cuenta que el cerdo actúa como reservorio y que los lechones pueden infectarse a partir de las madres durante la lactación, es interesante buscar métodos de control de *Salmonella* a nivel de maternidad para evitar así su paso al resto de la cadena productiva y, posteriormente, al consumidor.

Resultados previos han demostrado el efecto beneficioso de la adición de un β -galactomanano (Salmosan®) en el pienso de cerdos de cebo para reducir la excreción de *Salmonella* spp. En este contexto, el objetivo es determinar si se produce el mismo efecto en las cerdas durante la maternidad. Este producto, además de evitar la excreción de *Salmonella*, mejoraría la calidad del calostro, puesto que podría estimular la respuesta inmune de la cerda.

Para ello, se seleccionó un grupo control de 21 cerdas y un grupo tratamiento del mismo número. Se administró Salmosan® al pienso del grupo tratamiento tres semanas antes del parto y hasta el destete y se monitorizaron ambos grupos mediante muestreos semanales. Se llevaron a cabo análisis microbiológicos de muestras de heces y serológicos tanto de las madres como de los lechones, así como de calidad del calostro. Además, los lechones se pesaron al nacimiento y al destete.

Los resultados obtenidos indican que, en general, la adición de Salmosan® al pienso de las madres no produce diferencias en la calidad del calostro ni en la excreción de *Salmonella*, a pesar de observarse diferencias en uno de los lotes. Sin embargo, parece ser beneficioso para los valores de GMD de los lechones, siendo superiores en el grupo tratado.

Palabras clave: cerdas, control, lechones, manano oligosacáridos, *Salmonella*, seguridad alimentaria.



ABSTRACT

Title: *Salmonella* control in farrowing sows after dietary supplementation with mannan oligosaccharides.

Abstract:

Salmonellosis is one of the most frequent food-borne diseases, which is a major problem in Public Health. Although it is mainly associated with poultry and egg consumption, the outbreaks associated with the ingestion of pork have recently increased. Sows can act as reservoirs for *Salmonella* spp., leading to infection of piglets. Therefore, there is a need to control *Salmonella* in farrowing sows to avoid transmission along the production chain and further to consumers.

Previous results have shown the beneficial effects of dietary supplementation with a β -galactomannan (Salmosan®) in fattening pigs to reduce *Salmonella* shedding. The objective of this study was to determine whether the same effect may occur in farrowing sows. In addition, this product seems also to stimulate the immune response of the sow, which may help to improve the quality of colostrum.

To assess this objective, a treatment group of 21 sows and a control group of the same number of animals were selected. Salmosan® was added to the diet of the treatment group from three weeks before farrowing up to weaning. Weekly samples of faeces and serum were taken from both sows and piglets. In addition, the piglets were weighed at birth and at weaning.

The dietary supplementation with Salmosan® of farrowing sows did not produce significant differences in the quality of the colostrum or in the excretion of *Salmonella*, although differences were observed in one of the batches. However, an increase in Average Daily Gain (ADG) values was observed in piglets fed with Salmosan®.

Keywords: control, food safety, mannan oligosaccharides, piglets, *Salmonella*, sows.



2. INTRODUCCIÓN

2.1. Salmonelosis como problema de Salud Pública

La salmonelosis es una de las toxiinfecciones alimentarias de mayor prevalencia en países industrializados. Es una infección común en el cerdo, generalmente de carácter subclínico, animal considerado reservorio de la enfermedad. Recientemente, se han asociado brotes de salmonelosis humana al consumo de carne porcina, de modo que esta especie es considerada la segunda fuente de infección de salmonelosis humana, por detrás de las aves (EFSA, 2016).

Género *Salmonella*

La salmonelosis es una infección producida por bacterias del género *Salmonella*, de la familia *Enterobacteriaceae*. Las bacterias del género *Salmonella* son Gram (-), anaerobias facultativas, asporógenas, de forma bacilar y, generalmente, móviles gracias a la presencia de flagelos. La mayoría tienen capacidad de producir ácidos a partir de la utilización de la glucosa y de reducir los nitratos a nitritos, son catalasa positivas y oxidasa negativas. Además, utilizan el citrato como única fuente de carbono, descarboxilan la lisina, la arginina y la ornitina y producen sulfuro de hidrógeno. Son capaces de tolerar altas concentraciones de sales biliares y de crecer en presencia de colorantes como la eosina, la fucsina, el azul de metileno y el verde brillante. El género *Salmonella* se agrupa en dos especies principales: *S. enterica* y *S. bongori*. *Salmonella enterica* se subdivide a su vez en seis subespecies: *enterica*, *salamae*, *arizonae*, *diarizonae*, *houtenae* e *indica* (Figura 1).

Familia	Género	Especie	Subespecie
Enterobacteriaceae	<i>Salmonella</i>	<i>S. enterica</i>	<i>enterica</i>
			<i>salamae</i>
			<i>arizonae</i>
			<i>diarizonae</i>
			<i>houtenae</i>
			<i>indica</i>
		<i>S. bongori</i>	

Figura 1. Clasificación básica del género *Salmonella*.

Cada subespecie se divide en serogrupos y cada serogrupo se subdivide a su vez en serovariedades o serotipos en función de sus características antigénicas, siguiendo el esquema



de clasificación de White-Kauffmann-Le Minor (Issenhuth-Jeanjean *et al.*, 2014). La mayoría de las cepas aisladas de *Salmonella* pertenecen a la subespecie *S. enterica* y dentro de esta subespecie hay más de 2.600 serotipos.

Dentro de las salmonelosis, se pueden diferenciar las salmonelosis tifoideas, causadas por los serotipos *S. Typhi* y *S. Paratyphi A* y *B*; y las salmonelosis no tifoideas, causadas principalmente por los serotipos *S. Enteritidis* y *S. Typhimurium*.

Algunos de los serotipos son más específicos de ciertos hospedadores que actúan como reservorios. Por ejemplo, los serotipos adaptados al hombre son *Typhi* y *Paratyphi*; los adaptados a los animales son *Pullorum* y *Gallinarum*; y los poliadaptados son *Enteritidis* y *Typhimurium*. Sin embargo, la mayoría son capaces de infectar a un amplio rango de hospedadores.

Incidencia de salmonelosis humana

En los países industrializados, la infección por *Salmonella* spp. es una de las infecciones de origen alimentario de mayor prevalencia. En la UE es la segunda enfermedad de carácter zoonótico en número de casos tras la campilobacteriosis (EFSA, 2016).

En 2015, se confirmaron un total de 94.625 casos de salmonelosis en la población dentro de la UE (21,2 casos/100.000 habitantes). En España, en ese año se registraron 9.045 (43,3 casos/100.000 habitantes) (EFSA, 2016). Sin embargo, esta estimación oficial del número de casos de salmonelosis está probablemente infravalorada, puesto que los datos provienen principalmente de sistemas pasivos de vigilancia epidemiológica.

La sintomatología de la salmonelosis humana no tifoidea se caracteriza por la aparición, tras un periodo de incubación de 6 a 72 horas, de fiebre, dolor abdominal, náuseas y vómitos. Aunque los síntomas son normalmente leves y la mayoría de las infecciones resultan ser autolimitantes, en niños y ancianos pueden llegar a ser graves.

Fuentes de infección

Aunque cualquier tipo de *Salmonella* es potencialmente patógeno para la especie humana, la mayor proporción de las infecciones por *Salmonella* en la población las provocan un número limitado de serotipos, fundamentalmente *Enteritidis* y *Typhimurium*, y en menor medida *Infantis*, *Hadar*, *Virchow* y *Derby*.



Salmonella Enteritidis es un serotipo asociado fundamentalmente con aves y su incidencia en la población ha descendido significativamente en la UE respecto a años anteriores, asociado con los programas de control de salmonelosis aviar implantados en todos los países de la UE.

Por el contrario, se ha observado un incremento de los casos debidos a *Salmonella* Typhimurium y a una variante de este serotipo denominada monofásica. Este serotipo y su variante son predominantes en el cerdo y el vacuno.

Este incremento es más importante si cabe en España. La evolución de los casos de salmonelosis humana por serotipos en la UE y en España se presenta en las **Figuras 2 y 3**, respectivamente.

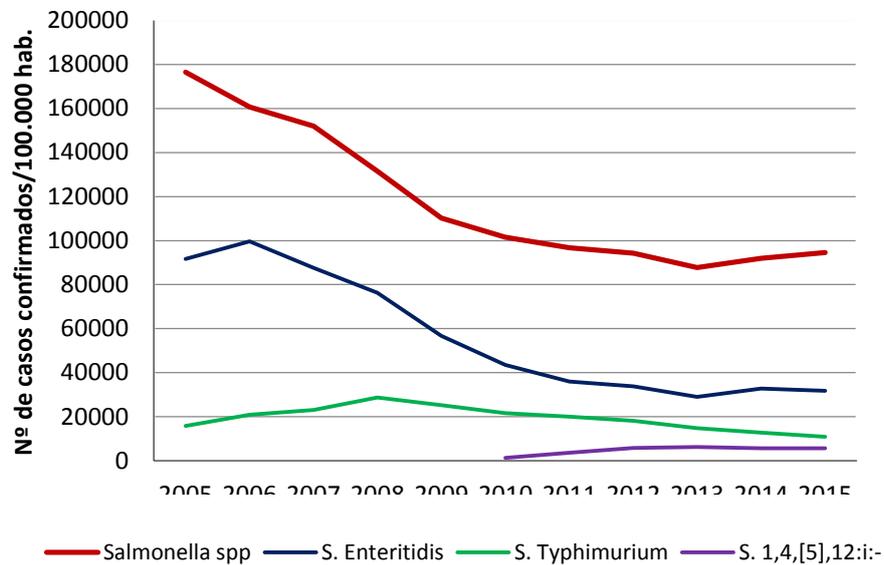


Figura 2. Evolución de los casos de salmonelosis humana en la UE (2008-2015). Fuente: EFSA.

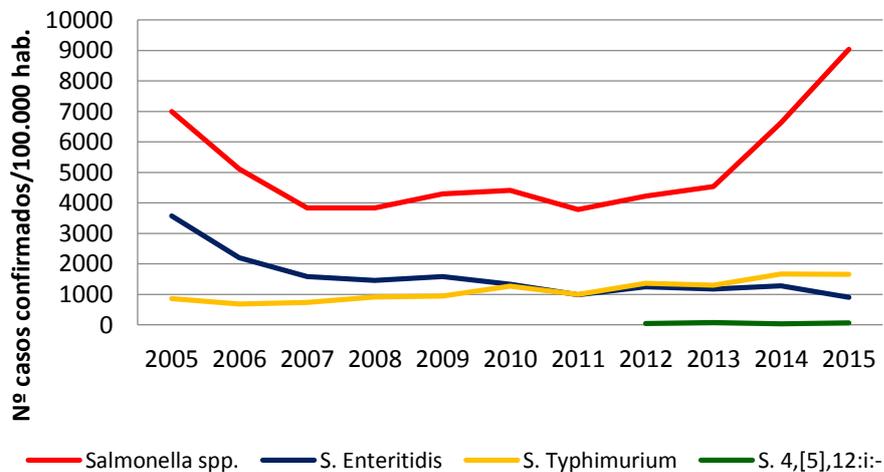


Figura 3. Evolución de los casos de salmonelosis humana en España (2000-2015). Fuente: Sistema de Información Microbiológica (SIM).



Además, en 2008 el número de brotes de salmonelosis humana asociados a consumo de carne de cerdo superó a los relacionados con el consumo de carne de ave (7,1% vs. 3,9%, respectivamente) según datos de la EFSA. Así, el cerdo parece desempeñar un papel importante como transmisor de la infección al hombre.

2.2. Salmonelosis en la especie porcina

Características, serotipos principales y prevalencia de la infección en cerdos de cebo

Los cerdos son susceptibles a la infección por una gran variedad de serotipos de *Salmonella* y en la mayoría de los casos de forma asintomática, comportándose como reservorios de la infección. Los cerdos infectados son portadores de *Salmonella* en las tonsilas, tracto intestinal y ganglios linfáticos mesentéricos y no se detectan en las inspecciones rutinarias de matadero.

Generalmente, la principal ruta de infección de los animales es la vía feco-oral, tras el contacto con heces de individuos infectados. Dosis altas de bacterias ($>10^5$ bacterias) son capaces de superar la acidez del estómago y la acción bacteriostática de las sales biliares y alcanzar el intestino delgado. Tras atravesar la pared intestinal, invaden los ganglios mesentéricos, donde suelen acantonarse. En los casos subclínicos, la infección queda localizada en dichos ganglios (Reed *et al.*, 1986). En otros casos, pueden llegar a evadir las defensas intracelulares, pasar a sangre, multiplicarse en macrófagos y alcanzar hígado, bazo, pulmones, etc. provocando una infección generalizada y septicemia.

En los casos asintomáticos, la excreción de *Salmonella* se ve favorecida por el estrés. De modo que los portadores asintomáticos son una de las principales fuentes de salmonelosis, tanto para otros animales como para los productos cárnicos elaborados a partir de ellos (Mainar-Jaime *et al.*, 2010a).

Aunque los cerdos son susceptibles a una amplia variedad de serotipos, el 90% de los casos clínicos de salmonelosis porcina están causados por dos serotipos: *Salmonella* Cholerasuis y *Salmonella* Typhimurium. *Salmonella* Cholerasuis está asociada a septicemia, pero en España es infrecuente. Por el contrario, *S.* Typhimurium cursa mayoritariamente con formas asintomáticas y es bastante frecuente en el ganado porcino europeo. Sin embargo, ante cepas más virulentas o estados de inmunosupresión, *S.* Typhimurium puede causar problemas graves asociados a un síndrome enterocolítico que suele afectar desde el destete a los 4 meses de edad. Este síndrome se caracteriza por diarrea acuosa y amarilla, anorexia, apatía y fiebre. La mortalidad suele ser baja, pero la morbilidad puede llegar a ser alta. En necropsia se observa



colitis necrótica focal o difusa y se pueden observar úlceras (Plonait *et al.*, 2001). Los ganglios mesentéricos están infartados y la mucosa intestinal con zonas enrojecidas.

En cuanto a la prevalencia en cerdos de cebo, en España el 30% de los cerdos que llegan a matadero estarían infectados por *Salmonella* spp. (comparado con el 10% de media de Europa) (EFSA, 2008 Parte A; Vico *et al.*, 2011).

Epidemiología en las diferentes fases de producción

La epidemiología de la infección por *Salmonella* es compleja debido a sus múltiples vías de entrada y de diseminación del patógeno entre explotaciones y dentro de la misma explotación, junto con su capacidad de supervivencia y multiplicación en una amplia variedad de condiciones ambientales.

Las rutas de infección de *Salmonella* son la vía feco-oral principalmente y, en menor medida, la vía aerógena, por ello destaca el papel de fómites y vectores en la diseminación del patógeno. Entre las principales fuentes de introducción en las instalaciones se encuentran el pienso, el agua, los pájaros, roedores, insectos y el personal.

- **Maternidades**

Se puede aislar *Salmonella* en lechones durante la lactación y hasta el destete, lo que sugiere una posible infección a partir de las madres. Hasta ahora, sólo se han llevado a cabo algunos estudios que señalaban que la prevalencia de infección en lechones era baja (0-9%) (Funk *et al.*, 2001; Barber *et al.*, 2002; Beloeil *et al.*, 2003; Roesler *et al.*, 2005). Sin embargo, estos valores podrían estar subestimados ya que normalmente se basan en análisis de poca cantidad de materia fecal. La técnica de muestreo utilizada en lechones en estudios anteriores ha sido el hisopado rectal, que se caracteriza por tener una menor sensibilidad en comparación con la recogida de una mayor cantidad de heces (Funk *et al.*, 2000). De hecho, un estudio reciente llevado a cabo a partir de muestras de heces de lechones recogidas en matadero demostró que la prevalencia de infección de *Salmonella* en lechones era más elevada, alcanzando el 32% (Casanova-Higes *et al.*, 2016). Este mismo estudio señaló que el 82% de los serotipos encontrados en los lechones se correspondía con los serotipos encontrados en las madres, lo que demuestra una asociación entre serotipos e indica que existe una transmisión madre-descendencia. La transmisión de la infección de la madre a su descendencia y los niveles altos de infección en lechones podrían jugar un papel importante en la infección en las etapas posteriores de transición y cebo.



- **Transición y engorde**

Varios estudios apuntan a que la *Salmonella* aislada en matadero proviene principalmente de infecciones durante la fase de cebo (Visscher *et al.*, 2011; Argüello *et al.*, 2012) y, en menor medida, de infecciones procedentes de las madres. Durante las fases de transición y engorde se suelen encontrar serotipos diferentes a los que se encuentran en las cerdas reproductoras. En la transición los cerdos empezarán a infectarse a partir de las 8 semanas de edad, cuando desaparecen los anticuerpos maternos y son más vulnerables. En el engorde, la mayoría de las infecciones tendrían lugar entre el final del primer tercio y el inicio del segundo tercio del engorde, cuando entran en contacto con la flora de las granjas y con nuevas fuentes de infección y, sobre todo, al mezclarse con animales procedentes de otras explotaciones (Mainar-Jaime *et al.*, 2010b).

Dado que las fuentes de infección pueden ser distintas en cada etapa del ciclo productivo, las medidas de control que deben emplearse para la prevención de la infección también podrán variar en función de ello.

2.3. Estrategias de control en la granja

Las principales estrategias de control de la salmonelosis son medidas básicas que también podrían ser útiles para controlar otras infecciones porcinas. Estas estrategias se basan en un plan de **bioseguridad** y unas **buenas prácticas de higiene**. Por ello, para alcanzar el éxito es indispensable un alto grado de implicación por parte del ganadero (Mainar-Jaime *et al.*, 2010d).

Bioseguridad

La bioseguridad permite proteger a una explotación de la entrada de agentes infecciosos, así como de minimizar su difusión en el caso de que ya estén dentro. Las medidas de bioseguridad abarcan desde el diseño de las instalaciones al manejo de los animales.

El **diseño de las instalaciones** es un pilar fundamental. La separación de zonas entre diferentes poblaciones (maternidad y producción) y diferentes estatus sanitarios (enfermería y cuarentena por un lado y animales sanos por otro), disponer de un vestuario con zona limpia y zona sucia y una buena gestión de cadáveres y residuos, así como un vallado perimetral y no permitir la explotación mixta de animales, son algunas de las medidas a tener en cuenta. Además, son necesarias medidas específicas para el **control de vectores** (pájaros, roedores, insectos) que pueden actuar como reservorio de la enfermedad (Funk *et al.*, 2004). Por ejemplo, colocar redes, telas pajareras, tapar agujeros y evitar la acumulación de suciedad,



pienso y agua sobrante. También es importante evitar la entrada de gatos y perros y seguir programas de desparasitación y planes DDD (Desinfección, Desratización y Desinsectación). De hecho, varios estudios demuestran que existe una relación significativa entre la ausencia de barreras y planes de desratización y la seropositividad de la explotación a *Salmonella* spp. (Mejía *et al.*, 2006; Andrés-Barranco *et al.*, 2014).

Otro aspecto a tener en cuenta es el **manejo de los animales**, tanto a nivel logístico como de bienestar animal. La aplicación de sistemas Todo Dentro-Todo Fuera (TD/TF), con una correcta limpieza y desinfección de las naves entre lotes y respetando el periodo de vacío sanitario de más de 1 día, contribuyen en la reducción del riesgo de contaminación. Es importante evitar mezclar grupos de animales de diferentes procedencias y edades y que la separación entre corrales sea sólida y lo suficientemente alta. También es recomendable la utilización de suelos de tipo *slat*, que reducirían la carga microbiana en el ambiente al permitir una mejor limpieza y drenaje de las deyecciones que los de cemento. En cuanto al bienestar animal, es indispensable evitar situaciones de estrés, manteniendo una temperatura termoneutra y con una adecuada densidad de animales, y un control sanitario que cuente con la prevención de problemas digestivos y la separación física de los animales enfermos, ya que el estrés es un factor de riesgo para la excreción de *Salmonella* en la explotación (Rostagno *et al.*, 2003; Scherer *et al.*, 2008). También se ha demostrado que la excreción de *Salmonella* aumenta ante la presencia de otros patógenos entéricos como *Escherichia coli* y *Lawsonia intracellularis*, entre otros (Mainar-Jaime *et al.*, 2010b).

El **agua** y la **alimentación** son también dos aspectos a considerar. Por un lado, la calidad microbiológica del agua es determinante, puesto que el agua contaminada es una de las principales causas de seropositividad en la granja (Mejía *et al.*, 2006). Por ello es necesario tratar el agua, ya sea mediante cloración, adición de peróxidos u otros sistemas de potabilización, y realizar análisis periódicos para determinar la ausencia de *Salmonella* spp. Por otro lado, el alimento ha de ubicarse en un almacén en condiciones de mantener una correcta higiene, a una altura suficiente, de un tamaño adecuado, accesible a la limpieza y con garantías para evitar contaminaciones. También se puede exigir la certificación de un control específico frente a *Salmonella* spp. en origen.

Buenas prácticas de higiene

Las buenas prácticas de **higiene del personal** son básicas y de fácil aplicación. Consiste simplemente en lavarse de manos, cambiarse de ropa y botas y utilizar pediluvios al entrar y salir de las naves. Dentro de los planes de **limpieza y desinfección**, se contempla llevar a cabo



primero una correcta limpieza con agua caliente a presión en la que se retire toda la materia orgánica, secado y una posterior desinfección de los fómites. Se consideran fómites todos los equipos, utensilios, vehículos y materiales que entren en contacto de un modo u otro con la granja. Por ello, es recomendable el uso de material veterinario desechable y la esterilización del reutilizable (material propio y limpio), la limpieza y desinfección del material y de los vehículos que circulan por la granja y la restricción y desinfección de visitantes. Todo ello sin olvidarse de evitar la acumulación de suciedad en los corrales y de asegurar un correcto mantenimiento de los sistemas de ventilación de las naves.

2.4. Control de la salmonelosis porcina a través de la alimentación

Partiendo del hecho de que la salmonelosis porcina es difícil de detectar puesto que en la mayoría de los casos se presenta de forma subclínica, ante la ausencia de vacunas eficaces y en el contexto de lucha frente a la resistencia a los antimicrobianos, es necesario encontrar alternativas a los antibióticos para el control de *Salmonella* desde una perspectiva preventiva.

Como medidas **alternativas naturales a los antibióticos** aparecen las estrategias de alimentación. Aunque presentan beneficios, su efectividad para el control de *Salmonella* es sólo parcial, por ello han de aplicarse de forma complementaria a las anteriormente citadas (bioseguridad, buenas prácticas de higiene). El principio común de todas ellas es promover un ambiente favorable para la flora beneficiosa a nivel gastrointestinal y un ambiente hostil para la flora patógena, en este caso, *Salmonella* spp. Dentro de estas estrategias, destaca el uso de probióticos, prebióticos, ácidos orgánicos, aceites esenciales y manano oligosacáridos como aditivos del pienso.

Probióticos

Según la definición de la FAO, los probióticos son microorganismos vivos que cuando son administrados en cantidades adecuadas, confieren beneficios a la salud del huésped. A este grupo pertenecen diferentes especies de *Bacillus*, *Lactobacillus*, *Bifidobacterium*, *Saccharomyces*, etc. En general, se utilizan mezclas de microorganismos ya que debido a su efecto sinérgico su combinación resulta más efectiva. Los lactobacilos y las bifidobacterias son bacterias ácido-lácticas que provocan una disminución del pH intestinal, además de competir con las bacterias patógenas por los nutrientes y por los receptores de la mucosa intestinal, y de sintetizar compuestos antibacterianos como agua oxigenada y bacteriocinas que inhibirían el crecimiento de otras bacterias. También podría existir un efecto inmunoestimulador a nivel intestinal y sistémico debido a las interacciones de estas bacterias con la membrana de la mucosa (La Fata *et al.*, 2017). Se ha demostrado su eficacia *in vitro*, aunque todavía son



escasos los estudios *in vivo* y se está trabajando en mejorar su viabilidad durante el proceso de fabricación, almacenaje y tránsito gastrointestinal.

Prebióticos

Los prebióticos son ingredientes no digeribles de los alimentos con un efecto beneficioso para el hospedador mediante la estimulación selectiva del crecimiento y/o actividad de uno o varios tipos de microorganismos intestinales (Gibson y Roberfroid, 1995). Se caracterizan por no ser absorbidos o hidrolizados en estómago o intestino, ser selectivos para las bacterias comensales beneficiosas del intestino grueso (bífidobacterias) y llevar a cabo una fermentación que tenga efectos beneficiosos a nivel luminal y sistémico. Destacan los oligosacáridos no digeribles, concretamente los fructooligosacáridos (FOS) y la inulina, los galactooligosacáridos (GOS), los transgalactooligosacáridos (TOS) y la lactulosa por haber demostrado una mayor actividad protectora frente a *Salmonella* en cerdos tanto *in vitro* como *in vivo*. Su principal mecanismo de acción es el hecho de servir como sustrato selectivo que promovería el crecimiento de bacterias con actividad competitiva frente a *Salmonella*, contribuyendo en la fermentación. También ha sido descrito su efecto inmunoestimulador a nivel de la mucosa intestinal y a nivel sistémico (Delzenne, 2003) y de mejora en las defensas del intestino al incrementar el grosor de las mucinas.

Ácidos orgánicos

Los ácidos orgánicos presentan actividad antimicrobiana y efectos en el tracto gastrointestinal de los animales y se ha demostrado que pueden resultar efectivos al incorporarlos en la dieta o en el agua de bebida. Su actividad antimicrobiana se basaría en dos mecanismos principalmente: por la alteración del pH extracelular y por el efecto de la forma no disociada en el pH intracelular, que provocaría la muerte celular. En cuanto a su efecto sobre *Salmonella*, se podría deber al refuerzo de la barrera gástrica al incrementarse la cantidad total de ácidos y la reducción del pH, que favorecería la proliferación de la flora beneficiosa y a la vez competitiva contra *Salmonella*. También se ha descrito que el ácido butírico y el ácido caprílico podrían reducir la expresión de determinados genes de patogenicidad de *Salmonella*, disminuyendo su capacidad de colonización del epitelio (Van Immerseel *et al.*, 2004; Gantois *et al.*, 2006). Una de sus principales desventajas es que se absorben rápidamente en los tramos proximales del intestino, mientras que es en los tramos finales en los que *Salmonella* suele adherirse y colonizar (Piva *et al.*, 2007). Por ello, en la actualidad se está trabajando en técnicas de microencapsulación. Los resultados de los trabajos son variables, por lo que son necesarios más estudios para determinar la dosis y forma óptimas.



Extractos naturales derivados de plantas (EDP)

Entre los EDP destacan los derivados de plantas del género *Allium* (ajo, cebolla y puerro) y los aceites esenciales (AE) procedentes del tomillo, orégano, clavo y canela (Peñalver *et al.*, 2005). Existen pocos estudios sobre el efecto de los derivados de *Allium* en porcino. Los aceites esenciales son esencias volátiles extraídas de plantas aromáticas por vapor, destilación, prensado o extracción con disolventes. Su mecanismo de acción parece estar relacionado con la alteración de la membrana citoplasmática bacteriana, aumentando su permeabilidad, con la consiguiente pérdida de iones y muerte celular (de Lange *et al.*, 2010). Sus efectos mejoran con niveles bajos de oxígeno y pH bajo, condiciones en las que participan los lactobacilos y otras bacterias intestinales. Todavía no se han realizado estudios suficientes *in vivo* en porcino para determinar su eficacia frente a *Salmonella*.

Manano oligosacáridos (MOS)

Los manano oligosacáridos (MOS) son oligosacáridos no digeribles, pero no se consideran prebióticos porque no favorecen selectivamente las bacterias beneficiosas del intestino, aunque sí que cumplen las otras características de dicho grupo. Dado que tampoco son nutrientes directos ni de la flora intestinal ni del animal, son considerados como nutricinas (Adams, 2000). Los MOS podrían además utilizarse como promotores del crecimiento (Davis *et al.*, 2002; Castillo *et al.*, 2008). Su principal efecto antimicrobiano se basaría en su capacidad para unirse a lectinas manosa-específicas de las fimbrias Tipo-1 expresadas por patógenos Gram (-). De este modo, actuarían bloqueando la adhesión a las células epiteliales del intestino de estas bacterias Gram (-) como *Salmonella* (Borrowsky *et al.*, 2009), evitando la consecuente colonización (Becker y Galletti, 2008) y provocando su excreción a través del intestino (**Figura 4**).

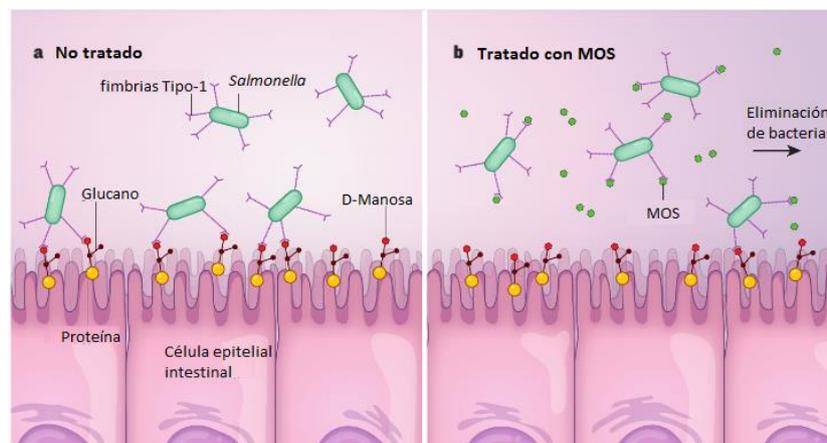


Figura 4. Mecanismo de acción de los mananoligosacáridos (MOS) a nivel intestinal.

Fuente: Bacterial pathogens: A spoonful of sugar could be the medicine (modificado).



Los MOS pueden proceder de diversas fuentes como semillas de la palma de aceite y del algarrobo, granos de café, levaduras, etc., que son procesadas de formas muy diferentes y presentan una variada composición biológica, por lo que su capacidad de unión puede variar en función de ello. Por esta razón es necesario estudiar individualmente cada producto para determinar su eficacia en la salmonelosis porcina. Otra característica de los MOS es que podrían actuar mejorando la salud gastrointestinal y modulando la respuesta inmunitaria. Además, una gran ventaja de los MOS es que su función no se ve alterada por los tratamientos térmicos, permitiendo su uso en pienso granulado.

Existen numerosos estudios acerca del efecto de los MOS en la prevalencia y eliminación de *Salmonella* en animales. En el caso de la salmonelosis aviar, se ha observado *in vitro* que las moléculas de manosa inhibían la adhesión de *S. Typhimurium* en el intestino de broilers (Oyofó *et al.*, 1989a) y se ha comprobado que la administración de manosa en el agua de bebida reducía la colonización del ciego de estas aves por *S. Typhimurium* (Oyofó *et al.*, 1989b). También se ha observado que la administración de dietas suplementadas con MOS a gallinas provocaría un aumento de bífidobacterias en el tracto digestivo, al mismo tiempo que disminuiría el de enterobacterias, y en pollos reduciría la colonización intestinal por *Salmonella* (Fernández *et al.*, 2000; Spring *et al.*, 2000; Fernández *et al.*, 2002).

En el caso de la salmonelosis porcina, los resultados varían e incluso son a veces contradictorios (Gaggia *et al.*, 2010). Estas diferencias podrían deberse a los diferentes productos y dosis empleadas, a la edad, a la duración del tratamiento y a las infecciones experimentales con dosis infectantes superiores a las observadas en condiciones naturales.

Recientemente, se llevó a cabo un estudio de campo para comprobar *in vivo* la eficacia de diferentes concentraciones de un galactomanano oligosacárido, concretamente un **β -galactomanano (β -GMOS)** sobre la infección y excreción de *Salmonella* en cerdos de cebo durante el periodo de engorde. Se probaron tres dosis distintas de 0.5, 2 y 3 kg de β -GMOS por tonelada de pienso durante todo el periodo de engorde. Tras el sacrificio se analizaron los nódulos linfáticos mesentéricos y las muestras fecales para estimar la prevalencia de infección y excreción respectivamente. Los resultados obtenidos permitieron demostrar que la adición al pienso de dosis superiores a 2 kg/T disminuía significativamente la prevalencia de infección por *Salmonella* y la excreción del patógeno a la llegada de los cerdos a matadero (Andrés-Barranco *et al.*, 2014). Además, estudios experimentales previos en lechones demostraron que la administración de este producto estimula la producción de TLR2 e IgA, lo que mejoraría la inmunidad local (Badia *et al.*, 2012).



3. JUSTIFICACIÓN

Apenas existen estudios que evalúen el control de la infección por *Salmonella* a nivel de maternidad. En cuanto a la prevalencia de *Salmonella* en lechones, la mayoría de los estudios sugieren que es muy baja (0-9%). Sin embargo, estos se basan en el análisis de una pequeña muestra fecal obtenida mediante hisopos, cuya sensibilidad diagnóstica es limitada. Un estudio reciente del equipo investigador llevado a cabo mediante muestras fecales obtenidas en matadero demuestra que **la prevalencia de *Salmonella* en lechones es alta** y además los serotipos identificados sugieren una **transmisión de la madre al lechón** (Casanova *et al.*, 2016).

Dado que no se pueden utilizar antibióticos de forma preventiva, se ha de recurrir a otras estrategias para la prevención y el control de la infección por *Salmonella*. Entre ellas, se encuentra el uso de aditivos alimentarios con propiedades antimicrobianas, como por ejemplo el β -galactomanano, un **producto no antibiótico que parece funcionar en cerdos de cebo** reduciendo significativamente la eliminación, y que presenta como ventajas un efecto **inmunoestimulador y prebiótico** (Andrés-Barranco *et al.*, 2014).

4. OBJETIVOS

El objetivo general de este estudio fue evaluar el efecto de la adición de un β -galactomanano al pienso de las madres para evitar la infección de los lechones a nivel de maternidad.

Para la consecución de este objetivo general, los objetivos específicos fueron los siguientes:

- En las **madres**:
 - Determinar el efecto del β -galactomanano en la reducción de la excreción de *Salmonella*.
 - Determinar su efecto en la calidad del calostro.
- En los **lechones**:
 - Determinar el efecto del β -galactomanano en la excreción de *Salmonella*.
 - Determinar su efecto en la presencia de IgG específicas de *Salmonella* en suero.
 - Determinar su efecto en la incidencia de diarrea.
 - Determinar su efecto en la Ganancia Media Diaria (GMD).



5. MATERIALES Y MÉTODOS

5.1. Producto utilizado

Salmosan® es un producto de origen vegetal rico en β -galactomananos. Está compuesto por un oligosacárido β -galactomanano (β -GMOS) obtenido de la semilla del algarrobo (*Ceratonia siliqua*) con actividad prebiótica, inmunomoduladora y secuestrante de bacterias Gram negativas (Borrowsky *et al.*, 2009). Este β -GMOS está formado por un esqueleto de β -(1-4)-manosa oligosacárido con ramificaciones formadas por unidades de galactosa (ratio galactosa/manosa 1:4) (Warrand, 2006) y ha demostrado su eficacia en la reducción de *Salmonella* en cerdos de engorde (Andrés-Barranco *et al.*, 2014).

5.2. Diseño experimental

El estudio de campo se desarrolló en una explotación de madres positiva frente a *Salmonella* (evidenciada por la presencia de cerdas seropositivas) y situada en una localidad de la provincia de Huesca. El trabajo en granja se inició en noviembre de 2016 y finalizó en abril de 2017, y los análisis laboratoriales y de resultados se realizaron en el CITA y en la Universidad de Zaragoza.

Se seleccionó un primer lote de madres compuesto por un grupo control de 11 cerdas y por un grupo tratamiento del mismo número de cerdas. A estas últimas se les administró en el pienso el oligosacárido β -galactomanano durante 21 días antes del parto (dosis de 3 kg/T de pienso) y hasta el destete. De cada cerda, se seleccionaron 5 lechones aleatoriamente para el estudio. Después, se repitió la experiencia con un segundo lote compuesto por un grupo control de 10 cerdas y un grupo tratamiento del mismo número. En total, 21 cerdas en el grupo control y 21 cerdas en el grupo tratamiento.

5.3. Toma de muestras

Se monitorizó semanalmente la excreción de *Salmonella* tanto en las madres como en los lechones seleccionados, así como la contaminación ambiental de las jaulas de maternidad. En el caso de las madres, también se tomaron muestras de heces 21 días antes del parto (el día del inicio del tratamiento) y una semana post-destete. Las muestras de heces se tomaron directamente del recto (madres) mediante guantes estériles y por hisopado (lechones y ambiente).



Los muestreos serológicos de los lechones tuvieron lugar al destete, y los de las madres se llevaron a cabo por el veterinario de la explotación. Las muestras de calostro se obtuvieron en el momento del parto gracias a la participación activa del ganadero. Se pesó a los lechones al parto y al destete con una balanza portátil. El esquema de las actividades y de la toma de muestras se presenta en la **Figura 5**.



Figura 5. Esquema de actividades y de muestreo.

5.4. Bacteriología

Las muestras de heces se mantuvieron en refrigeración hasta que se llevaron a cabo los análisis microbiológicos. La bacteriología a partir de heces e hisopos se realizó siguiendo la norma ISO de la Organización Internacional de Normalización (ISO) 6579:2002/Amd 1:2007 (Anónimo, 2007).

En el caso de las madres, se partió de una muestra de 25 gramos de heces. La muestra es inicialmente pre-enriquecida con agua de peptona tamponada (BPW) 1:10 durante 18h a 37 °C. Luego, se lleva a cabo un enriquecimiento selectivo en MSRVR durante 24h a 41,5 °C. Posteriormente, se siembra en medio de cultivo selectivo, XLD y BGA, y se deja incubar otras 24h a 37 °C para sembrarlo en agar nutritivo, donde se dejará incubando también 24h a 37 °C. Finalmente, se lleva a cabo la confirmación bioquímica, mediante las pruebas de indol, lisina, agar UREA y agar TSI, dejándolo incubar otras 24h a 37 °C (**Figura 6**).



En el caso de los lechones, se adaptó el protocolo a los hisopos y al tamaño de la muestra fecal.

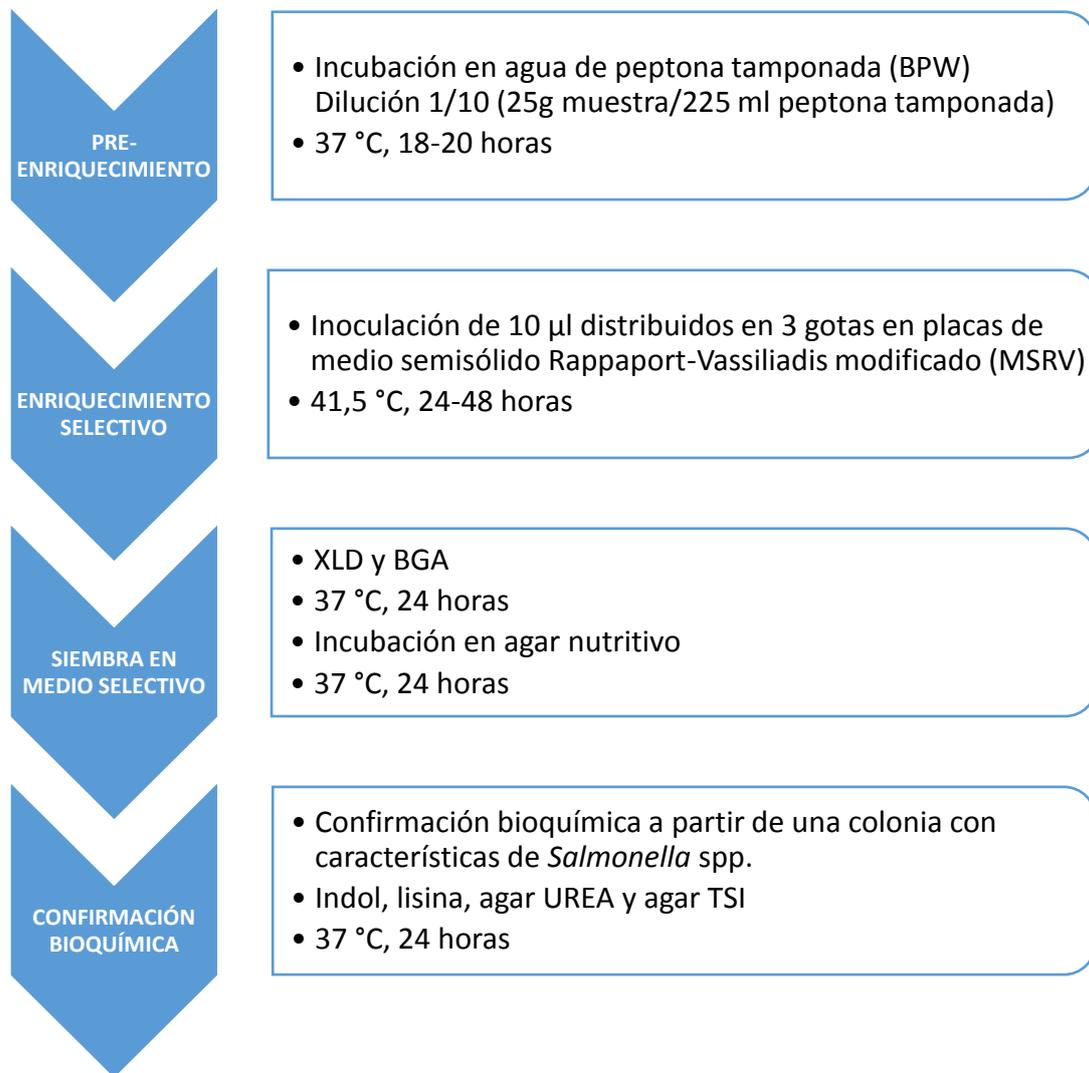


Figura 6. Aislamiento de *Salmonella* spp. según la Norma ISO 6579:2002/Amd 1:2007.

5.5. Serología

El objetivo de la serología es detectar la presencia de anticuerpos específicos de *Salmonella* spp. en el suero. Las muestras de suero se mantuvieron en congelación hasta que se llevaron a cabo los análisis serológicos, mediante un ELISA indirecto (Herdcheck® Swine *Salmonella* ELISA, Laboratorios IDEXX). Los análisis se llevaron a cabo siguiendo las instrucciones del fabricante. El suero de los lechones se obtuvo al destete y la toma de muestras del suero de las madres la llevó a cabo el veterinario de la explotación.



5.6. Análisis del calostro

Las muestras de calostro fueron recogidas por el ganadero en el momento del parto y conservadas en congelación hasta su análisis. El análisis de calidad del calostro para determinar la cantidad de IgG se llevó cabo con un refractómetro digital, con corrector automático de temperatura (**Figura 7**). El refractómetro Brix es una herramienta simple, rápida y de bajo coste que facilita su uso en condiciones de campo (Balzani *et al.*, 2016).

El refractómetro fue calibrado con agua destilada antes de llevar a cabo los análisis. Los resultados se expresaron en °Brix.



Figura 7. Refractómetro digital Milwaukee.

5.7. Análisis estadísticos

Los datos cuantitativos se analizaron por comparación de medias, mediante análisis de *t de Student*, tras transformar los datos para su normalización cuando era necesario. Los datos cualitativos (p. ej. ausencia/presencia de *Salmonella* spp.), se analizaron mediante el *Test de Fischer*. En algunos casos se estimó el *Odds Ratio* (OR) como medida de la magnitud de asociación entre dos variables. Se consideró un valor $p \leq 0,05$ para establecer las diferencias como significativas.



6. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

6.1. Madres

En el caso de las madres, los parámetros a analizar fueron los siguientes: calidad del calostro, número de lechones nacidos vivos, excreción de *Salmonella* spp. en cada muestreo y resultados serológicos.

Calidad del calostro

El objetivo de esta medición fue comprobar si la posible actividad inmunomoduladora del β -galactomanano a nivel intestinal se veía reflejada en la calidad del calostro de las cerdas. En general, no se observaron diferencias significativas en la calidad del calostro entre el grupo tratamiento y el grupo control, tras ajustar por el número de parto.

Aunque en el primer lote la calidad del calostro, expresada en °Brix, fue significativamente superior en el grupo tratamiento (GC: 23,2 vs. GT: 28,8; $p=0,0022$) (**Figura 8**), cuando se pusieron en común los datos de ambos lotes no se observaron diferencias significativas entre el grupo control y tratamiento. Estos resultados sugieren un posible efecto positivo del tratamiento, aunque el número final de animales analizado (17 cerdas) fue pequeño para obtener datos más concluyentes.

Los niveles de inmunoglobulinas (IgG) en el suero de las madres podrían ser indicativos de la cantidad de IgG presentes en el calostro, sin embargo en nuestro caso no se observó una correlación entre el resultado de refractometría del calostro y los valores ELISA de la cerda. La técnica utilizada para la valoración del calostro ha sido validada para otras especies como ovino (Harker, 1978), equino (Chavatte *et al.*, 1998; Cash, 1999) y bovino (Morril *et al.*, 2012; Quigley *et al.*, 2013; Bartier *et al.*, 2015) pero no lo ha sido todavía para la especie porcina, lo cual podría ser responsable de los resultados obtenidos. Se hacen necesarios estudios que validen la precisión de este aparato y determinen la relación entre °Brix y niveles de IgG calostrales en calostro porcino.

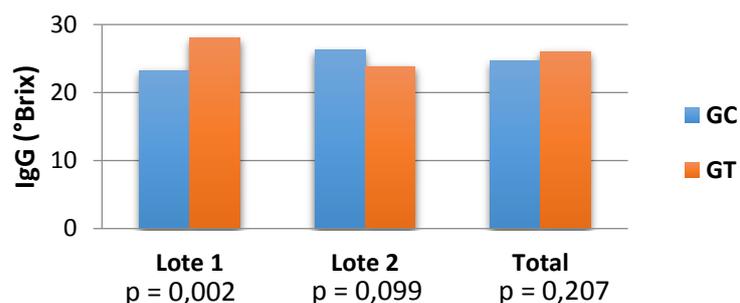


Figura 8. Resultados de los análisis de calidad del calostro del grupo control (GC) y del grupo tratamiento (GT).



Lechones nacidos vivos

No se observaron diferencias significativas entre el número de lechones nacidos vivos del grupo tratamiento y del grupo control tras considerar el número de partos de la madre. La adición de este β -galactomanano al pienso de las madres no parecía influir en este parámetro.

Bacteriología

Los resultados de excreción de *Salmonella* spp. se corresponden a muestras de heces positivas y están representados en la **Tabla 1**. El 13,5% de las madres fueron positivas a *Salmonella* en algún momento. Solo se observó excreción de *Salmonella* en el Lote 1, con una prevalencia del 23,8%. En el segundo lote estudiado todas las cerdas resultaron negativas. Hubo un mayor número de cerdas excretando los días 0, 7 y 14, es decir, al parto y durante las dos semanas siguientes (**Figura 9**), probablemente por el efecto del estrés post-parto. En general, no se observaron diferencias significativas ($p = 0,6815$) de excreción de *Salmonella* spp. entre el grupo control y el grupo tratamiento, por lo que no se pudo detectar ningún efecto positivo del β -galactomanano en la reducción de la excreción.

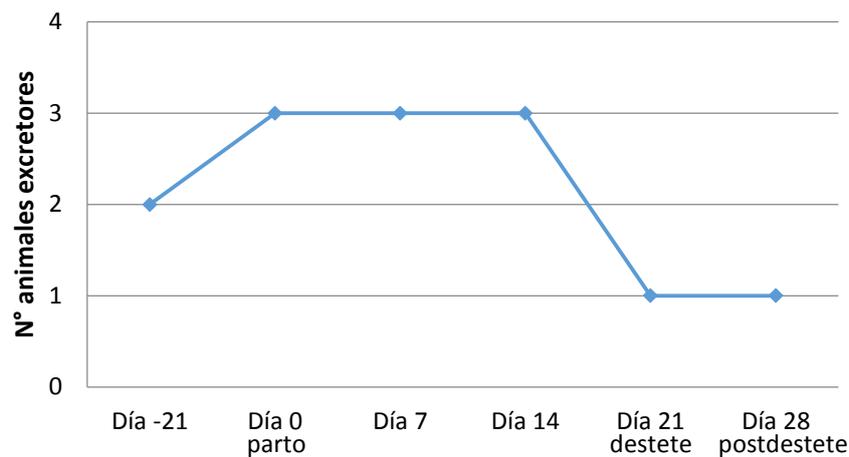


Figura 9. Distribución en el tiempo de las cerdas excretoras.

Este resultado podría estar influido de nuevo por el limitado número de cerdas comparadas en cada grupo y la baja prevalencia de excreción observada, algo que no esperábamos teniendo en cuenta que en la explotación circulaba *Salmonella* spp. (ver en el siguiente apartado). Además, en las infecciones subclínicas la sensibilidad del cultivo bacteriológico no es muy alta ya que los animales infectados son excretores intermitentes y suelen excretar *Salmonella* en heces sólo en situaciones de estrés (Pires *et al.*, 2013; Hurd *et al.*, 2004).



Tabla 1. Resultados microbiológicos del aislamiento de *Salmonella* spp. en las muestras de heces del Lote 1 y del total de madres de ambos lotes.

Lote 1			Total (Lote 1 + Lote 2)		
Grupo	Nº de cerdas negativas (%)	Nº de cerdas positivas (%)	Grupo	Nº de cerdas negativas (%)	Nº de cerdas positivas (%)
GC	8 (72,7%)	3 (27,3%)	GC	16 (84,2%)	3 (15,8%)
GT	8 (80%)	2 (20%)	GT	16 (88,9%)	2 (11,1%)
	16 (76,2%)	5 (23,8%)		32 (86,5%)	5 (13,5%)
p	0,7029		p	0,6815	

El número inicial de 21 cerdas estudiadas por grupo se vio reducido por cuestiones de manejo de la granja a 19 cerdas pertenecientes al grupo control (GC) y 18 cerdas pertenecientes al grupo tratamiento (GT).

Serología

El objetivo del análisis serológico fue comprobar si había circulación *Salmonella* spp. en la explotación. Sólo se obtuvieron 30 muestras por cuestiones de manejo. En ambos lotes la sangre se obtuvo al final de la experiencia y no al inicio, adaptándonos al momento en el que pasaba el veterinario a sangrar a las cerdas.

Se consideraron ELISA positivos aquellos valores de porcentaje de densidad óptica (%DO) por encima de 40. Más del 75% de las cerdas resultaron positivas, con una media de valores de %DO de 63. Los altos niveles de %DO confirman la circulación de *Salmonella* spp. en la explotación. No se observaron diferencias significativas entre GC y GT, por lo que se deduce que el tratamiento no estimuló la presencia de IgG específicos de *Salmonella* spp. en la sangre de las cerdas. Se observó sin embargo una relación significativa entre los valores de ELISA y la probabilidad de excretar *Salmonella* spp. (*Odds ratio* = 1,04; IC 95%: 1,0075-1,0723), confirmando que la explotación era positiva a *Salmonella* spp.

6.2. Lechones

En el caso de los lechones, los parámetros a analizar fueron los siguientes: incidencia de diarrea, Ganancia Media Diaria (GMD), excreción de *Salmonella* spp. y valores ELISA.

Incidencia de diarrea

El 22,9% de los lechones presentó diarreas en algún momento de la experiencia. Hubo mayor incidencia de diarreas en el grupo tratamiento que en el grupo control, existiendo diferencias



significativas en el total de lechones afectados (51,4% vs. 48,6%, respectivamente; $p = 0,03$). Del mismo modo que el grupo tratado presentó más diarreas que el grupo control, también se observaron más casos de diarreas en el Lote 2 que en el Lote 1 (**Figura 12**). Las diarreas de la primera semana pudieron tener que ver con *Clostridium difficile* o *E. coli*, agentes patógenos productores de diarreas a estas edades que fueron aislados en la explotación al mismo tiempo que se realizaba este estudio. La distribución del número de lechones con diarreas en el tiempo se presenta en la **Figura 13**. Aparentemente, el tratamiento no ayudó a la prevención de las diarreas.

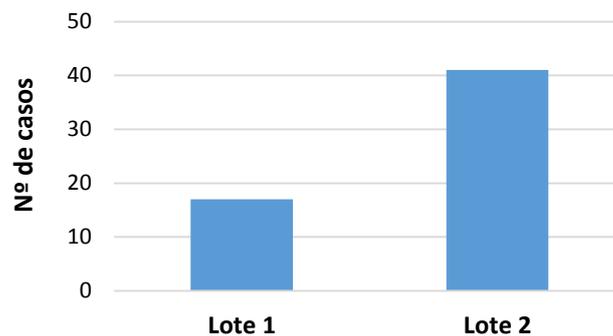


Figura 12. Nº de lechones con diarrea según lotes.

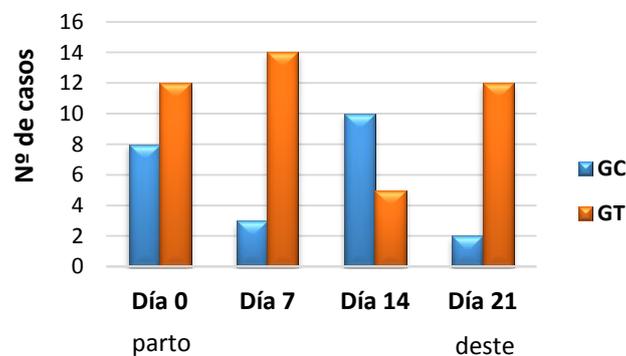


Figura 13. Nº de lechones con diarrea en el grupo control (GC) y en el grupo tratamiento (GT) de acuerdo con el momento de muestreo.



Ganancia Media Diaria (GMD)

Los lechones se pesaron dos veces, tras el parto (1^{er} o 2^o día de vida) y previamente al destete, y se estimó la GMD. La GMD media considerando todos los lechones en su conjunto fue de 218 gramos.

Se observaron diferencias significativas en GMD entre el grupo tratamiento y el grupo control tras descartar la influencia del sexo y del número de parto de la madre. El grupo tratamiento tuvo una GMD superior al grupo control (234 g vs. 204 g, respectivamente; $p = 0,0005$) (**Figura 14**). Este resultado parecía bastante consistente, pues se observó en cada lote independientemente (Lote 1: 235 g vs. 211 g, respectivamente; $p = 0,03$; Lote 2: 233 g vs. 195 g, respectivamente; $p = 0,007$).

Puesto que, dentro de cada grupo, algunos animales fueron transferidos de una madre a otra por cuestiones de manejo (adoptados), se analizó esta variable para los lechones adoptados por separado. En los animales adoptados las diferencias en GMD resultaron no significativas.

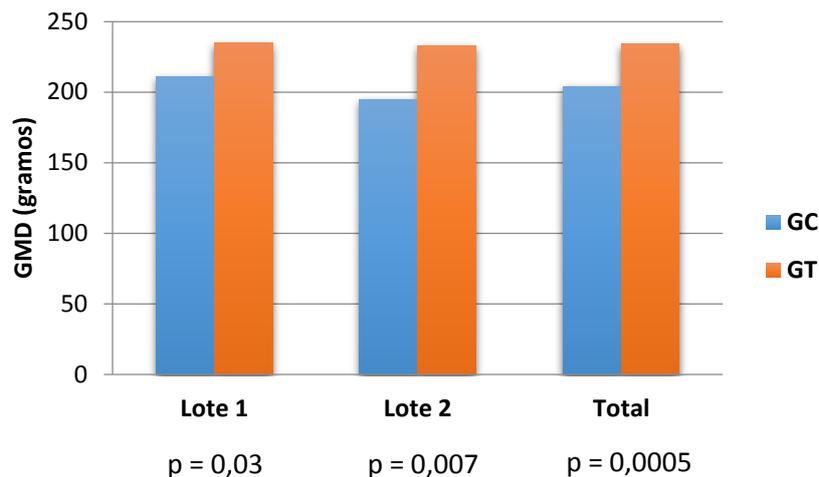


Figura 14. Ganancia media diaria (GMD) de los lechones.

Bacteriología

Los resultados de excreción de *Salmonella* spp. se corresponden a muestras de hisopos rectales positivas y están representados en la **Tabla 2**. El 2,4% de los lechones eliminaron *Salmonella* spp. en algún momento. Se observó baja prevalencia de excreción de *Salmonella* spp., aunque mayoritariamente ocurrió en el grupo control. En el Lote 2 solo hubo un lechón positivo a *Salmonella* spp. y pertenecía al grupo tratamiento. En general, no se observaron diferencias significativas ($p = 0,3661$) de excreción de *Salmonella* spp. entre el grupo control y el grupo tratamiento, por lo que no se pudo detectar ningún efecto positivo del β -galactomanano en la reducción de la excreción.



Tabla 2. Resultados microbiológicos del aislamiento de *Salmonella* spp. en las muestras de hisopos rectales del Lote 1 y del total de lechones de ambos lotes.

Lote 1			Total (Lote 1 + Lote 2)		
Grupo	Nº de lechones negativos (%)	Nº de lechones positivos (%)	Grupo	Nº de lechones negativos (%)	Nº de lechones positivos (%)
GC	65 (94,2%)	4 (5,8%)	GC	118 (96,7%)	4 (3,7%)
GT	73 (98,6%)	1 (1,4%)	GT	128 (98,5%)	2 (1,5%)
	138 (96,5%)	5 (3,5%)		246 (97,6%)	6 (2,4%)
p	0,149		p	0,366	

Serología

Se observó una correlación significativa ($R = 0,6$; $p < 0,0001$) entre los valores %DO de la madre y los valores %DO de sus lechones, sugiriendo que el estatus serológico de la madre podría influir en el estatus serológico del lechón al destete.

Los valores medios de %DO en los lechones que excretaron *Salmonella* spp. fueron menores que los valores medios de %DO en los lechones negativos, aunque las diferencias no fueron significativas (5,5% vs. 22,8%, respectivamente; $p = 0,27$) (**Figura 15**), posiblemente porque sólo se pudo disponer de suero de 4 de los 6 lechones excretores. Es probable que si el tamaño de muestra hubiera sido mayor y se mantuviesen estos resultados, las diferencias hubieran sido significativas. De hecho, en estudios previos sobre lechones destetados se ha observado que valores altos de %DO se asocian con menores prevalencias de infección y excreción (Casanova-Higes *et al.*, 2016), lo que sugiere un efecto protector de las IgG séricas presentes a estas edades.

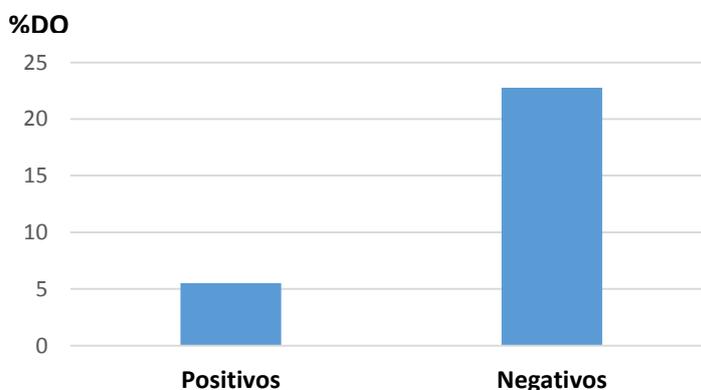


Figura 11. Valores medios de ELISA en lechones positivos y negativos a *Salmonella* spp.



También se observó una relación significativa positiva entre la calidad del calostro ingerido por el lechón y sus valores %DO. La exposición a calostros de más calidad mejoraría en un 6% las IgG específicas de *Salmonella* spp. presentes en la sangre de los lechones. Aunque además de la calidad calostrál, seguramente intervendrían otros factores como el momento de encalostramiento (temprano o tardío), la cantidad de calostro ingerida por cada lechón, etc., que no pudieron ser valorados en este estudio.

7. CONCLUSIONES

Teniendo en cuenta los resultados obtenidos en el presente estudio y bajo estas condiciones experimentales podemos concluir que no se observó un efecto claro de la adición en el pienso del β -GMOS (Salmosan®) sobre el control de *Salmonella* spp. en maternidades. La baja incidencia de excreción de *Salmonella* spp. tanto en el grupo control como en el grupo tratamiento impidió determinar si podría considerarse eficaz para reducir la prevalencia general de la infección.

Sin embargo, la adición del β -GMOS en la dieta de las madres, tuvo un efecto positivo en el crecimiento de los lechones. Los lechones pertenecientes al grupo tratamiento presentaron valores de GMD significativamente superiores a los del grupo control.

Además, se observaron diversas relaciones interesantes, entre el estatus serológico de la madre y el lechón al destete, entre el estatus serológico del lechón y la prevalencia de infección/excreción de *Salmonella* spp., y entre el estatus serológico del lechón y la calidad del calostro, que sugieren que la estimulación de la respuesta inmune de las madres podría servir de estrategia para el control de esta infección en los lechones. Por ello, un buen encalostramiento durante las primeras horas tras el parto se considera fundamental.

Es necesario continuar con más estudios que nos permitan evaluar la precisión del refractómetro utilizado para la determinación de la calidad de calostro en la especie porcina y con un mayor número de cerdas para obtener resultados más concluyentes.



CONCLUSIONS

The results from the present study suggest that there is no a clear effect of the addition of the β -GMOS (Salmosan®) to the feed on *Salmonella* spp. prevalence in farrowing sows. This may partly be due to the low incidence of *Salmonella* shedding in both the treatment and the control groups.

However, the addition of β -GMOS in the diet of the sows had a positive effect on the growth of piglets, as those under treatment presented higher values of Average Daily Gain (ADG) than those from the control group.

In addition, several interesting relationships were observed, namely, between the serological status of the sow and that of the weaned piglet, the serological status of the piglet and the prevalence of *Salmonella* infection/excretion, and the serological status of the piglet and the quality of the colostrum. These results suggest that stimulation of the immune response of the sows may be useful as a strategy for the control of *Salmonella* infection in piglets. Therefore, ensuring that piglets receive an adequate colostrum intake during the first hours after farrowing is considered essential.

More research is needed to assess the accuracy of the refractometer used to assess the quality of the colostrum in sows. Future studies should assess dietary supplementation in a greater number of sows for more conclusive results.



8. VALORACIÓN PERSONAL

El balance global de esta experiencia, más allá de los resultados obtenidos, no puede ser más positivo. Además de poder aplicar lo aprendido a lo largo de estos 5 años, desde la anatomía y la microbiología a la seguridad alimentaria, me ha permitido conocer de cerca el sector porcino y el mundo de la investigación.

Por un lado, he podido ver cómo funciona una explotación porcina, en este caso una pequeña explotación de 200 madres en el Pirineo. He aprendido acerca del manejo de las maternidades y de los lechones en lactación, desde el nacimiento hasta el destete. Además, he adquirido soltura en la toma de muestras de heces y suero.

Por otro lado, el análisis de las muestras en el CITA me ha permitido aprender a desenvolverme en el laboratorio. Los cultivos de *Salmonella* spp., la serología mediante ELISA indirecto y la refractometría para el análisis del calostro son ahora técnicas conocidas para mí.

Uno de los aspectos más positivos ha sido la oportunidad de poder participar activamente en este proyecto, formando parte de cada etapa, de cada muestreo, de cada base de datos y del análisis de los resultados. También han sido puntos muy positivos el equipo y el trabajar en equipo, el intercambio de ideas y el buen ambiente de trabajo, imprescindibles para seguir avanzando.

Este trabajo de investigación mixta, que combina trabajo de campo y laboratorio, que plantea preguntas y busca respuestas, sin perder el contacto directo con los animales y al mismo tiempo, mantiene un contacto estrecho con el agente patógeno, me parece el ideal para un veterinario que se quiera dedicar a la investigación.

Agradecer a Raúl Carlos Mainar Jaime el haberme invitado a formar parte de este proyecto, por su apoyo y motivación constantes y por mantenerme al día en el tema. Así como a Alejandro Casanova Higes, por compartir su trabajo conmigo, por su acogida y compañía. A mis dos directores, gracias por amenizar mis mañanas de los lunes.

También agradecer a cada una de las personas que han formado parte de la experiencia de un modo u otro: en los muestreos, leyendo y releendo este manuscrito o ayudándome a darle el toque final. Muchas gracias, sabéis quiénes sois.



9. BIBLIOGRAFÍA

Adams C.A. (2000). The role of nutricines in health and total nutrition. Proceedings of the Australian Poultry Science Symposium, University of Sydney, Australia, p. 17-24.

Andrés-Barranco S., Vico J.P., Grilló M.J., Mainar-Jaime, R.C. (2014). Reduction of subclinical *Salmonella* infection in fattening pigs after dietary supplementation with a β -galactomannan oligosaccharide. J Appl Microbiol 118(2): 284-294.

Anónimo (2007): ISO 6579:2002/Amd 1:2007 (E). Microbiology of food and animal feeding stuffs – horizontal method for the detection of *Salmonella* spp. AMENDMENT 1: Annex D: Detection of *Salmonella* spp. in animal faeces and in samples from the primary production stage. International Organization for Standardization. Disponible en: http://www.iso.org/iso/iso_catalogue/catalogue_tc/catalogue_detail.htm?csnumber=42109 [Consulta: 29 agosto 2017].

Argüello H., Carvajal A., Collazos J.A., García-Feliz C., Rubio P. (2012). Prevalence and serovars of *Salmonella enterica* on pig carcasses, slaughtered pigs and the environment of four Spanish slaughterhouses. Food Res Int, 45: 905-912.

Badia R., Brufau M.T., Guerrero-Zamora A.M., Lizardo R., Dobrescu I., Martin-Venegas R., Ferrer R., Salmon H., Martínez P., Brufau J. (2012). B-Galactomannan and *Saccharomyces cerevisiae* var. Boulardii modulate de immune response against *Salmonella enterica* serovar Typhimurium in porcine intestinal epithelial and dendritic cells. Clin Vaccine Immunol, 19 (3): 368-376.

Balzani A., Cordell H.J., Edwards S.A. (2015). Evaluation of an on-farm method to assess colostrum IgG content in sows. Animal, 10 (4): 643-648.

Barber D.A., Bahnon P.B., Isaacson R., Jones C.J., Weigel R.M. (2002). Distribution of *Salmonella* in swine production ecosystems. J Food Prot, 65 (12): 1861-1868.

Bartier A.L., Windeyer M.C., Doepel L. (2015). Evaluation of on-farm tools for colostrum quality measurement. J Dairy Sci, 98 (3): 1878-1884.

Becker P.M. y Galletti S. (2008). Food and feed components for gut health-promoting adhesion of *E. coli* and *Salmonella enterica*. J Sci Food Agric, 88: 2026-2035.



Beloeil P.A., Chauvin C., Proux K., Rose N., Quequiner S., Eveno E., Houdayer C., Rose V., Fravallo P., Madec F. (2003). Longitudinal serological responses to *Salmonella enterica* of growing pigs in a subclinically infected herd. *Prev Vet Med*, 28;60 (3): 207-226.

Borrowsky L., Corção G., Cardoso M. (2009). Mannanligosaccharide agglutination by *Salmonella enterica* strains isolated from carrier pigs. *Braz J Microbiol*, 40 (3): 458-464.

Casanova-Higes A., Andrés-Barranco S., Marín-Alcalá C.M., Mainar-Jaime R.C. (2016). *Salmonella* spp. infection in piglets from *Salmonella*-positive breeding holdings. 24th International Pig Veterinary Society Congress – abstract book (pp.127-127) [O-VET3-012]. Dublin, Ireland: Royal Dublin Society. Disponible en <http://orbit.dtu.dk/files/127839294/IPVS_ESPHM_2016_Book_of_Abstracts.pdf> [Consulta: 26 agosto 2017].

Cash R.S.G. (1999). Colostral quality determined by refractometry. *Equine Veterinary Education* 11, 36-38.

Castillo M., Martín-Orúe S.M., Taylor-Pickard J.A., Pérez J.F., Gasa J. (2008). Use of mannanligosaccharides and zinc chelate as growth promoters and diarrhea preventive in weaning pigs: Effects on microbiota and gut function. *J Anim Sci*, 86 (1): 94-101.

Chavate P., Clement F., Cash R., Grongnet J.F. (1998). Field determination of colostrum quality by using a novel, practical method. *American Association of Equine Practitioners* 44, 206-209.

Davis M.E., Maxwell C.V., Brown D.C., De Rodas B.Z., Johnson Z.B., Kegley E.B., Hellwig D.H., Dvorak R.A. (2002). Effect of dietary mannan oligosaccharides and (or) pharmacological additions of copper sulfate on growth performance and immunocompetence of weanling and growing/finishing pigs. *J Anim Sci*, 80: 2887-2894.

De Lange D.F.M., Pluske J., Gong J., Nyachoti C.M. (2010). Strategic use of feed ingredients and feed additives to stimulate gut health and development in young pigs. *Livest Sci*, 134: 124-134.

Delzenne N.M. (2003). Oligosaccharides: state of the art. *Proc Nutr Soc*, 62 (1): 177-182.

EFSA (2008). Report of the task force on zoonoses data collection on the analysis of the baseline survey on the prevalence of *Salmonella* in slaughter pigs, in the EU, 2006-2007. Part A: *Salmonella* prevalence estimates. *EFSA Journal*, 135: 1-111.



- EFSA (2016).** The European Union summary report on trends and sources of zoonoses, zoonotic agents and food-borne outbreaks in 2015. *EFSA Journal*, 4634: 35-38.
- Funk J.A., Davies P.R., Nichols M.A. (2000).** The effect of fecal sample weight on detection of *Salmonella enterica* in swine feces. *J Vet Diagn Invest*, 12 (5): 412-418.
- Funk J.A., Davies P.R., Gebreyes W. (2001).** Risk factors associated with *Salmonella enterica* prevalence in three-site swine production systems in North Carolina, USA. *Berl Munch Tierarztl Wochenschr*, 114 (9-10): 335-338.
- Funk J.A., Gebreyes W.A. (2004).** Risk factors associated with *Salmonella* prevalence on swine farms. *Swine Health Prod*, 12: 246-251.
- Gaggia F., Mattarelli P., Biavati B. (2010).** Probiotics and prebiotics in animal feeding for safe food production. *Int J Food Microbiol*, 141, S15-S28.
- Gantois I., Ducatelle R., Pasmans F., Haesebrouck F., Hautefort I., Thompson A., Hinton J.C., Van Immerseel F. (2006).** Butyrate specifically down-regulates *Salmonella* pathogenicity island 1 gene expression. *Appl Environ Microbiol*, 7 (1): 946-946.
- Gibson G.R., Roberfroid M.B. (1995).** Dietary modulation of the human colonic microbiota: introducing the concept of prebiotics. *J Nutr*, 125 (6): 1401-1412.
- Harker D.B. (1978).** Simple estimation of immunoglobulin content of ewe colostrum. *Veterinary Record* 103, 8-9.
- Hurd H.S., McKean J.D., Griffith R.D., Rostagno M.H. (2004).** Estimation of the *Salmonella enterica* prevalence in finishing swine. *Epidemiol Infect*, 132 (1): 127-135.
- Issenhuth-Jeanjean S., Roggentin P., Mikoleut M., Guibourdenche M., De Pinna E., Nair S., Fields P.I., Weill F.X. (2014).** Supplement 2008-2010 (no. 48) to the White-Kauffmann-Le Minor scheme. *Res Microbiol*, 165 (7): 526:530.
- La Fata G., Weber P., Mohajeri M.H. (2017).** Probiotics and the gut immune system: indirect regulation. *Probiotics Antimicrob Proteins*.
- Mainar-Jaime R.C., Creus E. (2010a).** Salmonelosis en las explotaciones porcinas. Características e importancia de la infección en el cerdo. *SUIS*, 67: 52-58.
- Mainar-Jaime R.C., Creus E. (2010b).** Salmonelosis en las explotaciones porcinas. Dinámica de la transmisión en las explotaciones porcinas. *SUIS*, 68: 40-48.



Mainar-Jaime R.C., Creus E. (2010d). Salmonelosis en las explotaciones porcinas. Estrategias de control. SUIIS, 70: 48-55.

Mejía W., Casal J., Zapata D., Sánchez G.J., Martín M., Mateu E. (2006). Epidemiology of *Salmonella* infections in pig units and antimicrobial susceptibility profiles of the strains of *Salmonella* species isolated. Vet Rec, 159 (9): 271-276.

Morril K.M., Conrad E., Polo J., Lago A., Campbell J., Quigley J., Tyler H. (2012). Estimate of colostrum immunoglobulin G concentration using refractometry without or with caprylic acid fractionation. J Dairy Sci, 95 (7): 3987-3996.

Oyoyo B.A., Dovekey R.E., Norman J.O., Mollenhauer H.H., Ziprin R.L., Corrier D.E., Deloach J.R. (1989a). Inhibition by mannose of in vitro colonization of chicken small intestine by *Salmonella* Typhimurium. Poultry Sci, 68: 1351-1356.

Oyoyo B.A., Dovekey R.E., Norman J.O., Mollenhauer H.H., Ziprin R.L., Corrier D.E., Deloach J.R. (1989b). Prevention of *Salmonella* Typhimurium colonization of broilers with D-mannose. Poultry Sci, 68: 1357-1360.

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

Pires A.F., Funk J.A., Bolin C.A. (2013). Longitudinal study of *Salmonella* shedding in naturally infected finishing pigs. Epidemiol Infect, 141 (9): 1928-1936.

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

Plonait H. y Bickhardt K. (2001). Manual de las enfermedades del cerdo. Zaragoza: Editorial ACRIBIA, S.A.: 358-362.

Quigley J.D., Lago A., Chapman C., Erickson P., Polo J. (2013). Evaluation of the Brix refractometer to estimate immunoglobulin G concentration in bovine colostrum. J Dairy Sci, 96 (2): 1148-1156.

Reed W.M., Olander H.J., Thacker H.L. (1986). Studies on the pathogenesis of *Salmonella* Typhimurium and *Salmonella* Choleraesuis var kunzendorf infection in weanling pigs. Am J Vet Res 47 (1): 75-83.



Roesler U., Vonaltrock A., Heller P., Bremerich S., Arnold T., Lehmann J., Waldmann K.H., Truyen U., Hensel A. (2005). Effects of fluorequinolone treatment acidified feed, and improved hygiene measures on the occurrence of *Salmonella* Typhimurium DT104 in an integrated pig breeding herd. *J Vet Med B Infect Dis Vet Public Health*, 52 (2): 69-74.

Rostagno M.H., Hurd H.S., McKean J.D., Ziemer C.J., Gailey J.K., Leite R.C. (2003). Preslaughter holding environment in pork plants is highly contaminated with *Salmonella enterica*. *Appl Environ Microbiol*, 69 (8): 4489-4494.

Scherer K., Szabó I., Rösler U., Appel B., Hensel A., Nöckler K. (2008). Time course of infection with *Salmonella* Typhimurium and its influence on fecal shedding, distribution in inner organs, and antibody response in fattening pigs. *J Food Prod*, 71 (4): 699-705.

Spring P., Wenk C., Dawson K.A., Newman K.E. (2000). The effects of dietary mannanoligosaccharides on cecal parameters and the concentrations of enteric bacteria in the ceca of *Salmonella*-challenged broiler chicks. *Poultry Sci*, 7: 205-211.

Van Immerseel F., De Buck J., Boyen F., Bohez L., Pasmans F., Volf J., Sevcik M., Rychlik I., Haesebrouck F., Ducatelle R. (2004). Medium-chain fatty acids decrease colonization and invasion through hila suppression shortly after infection of chickens with *Salmonella enterica* serovar Enteritidis. *Appl Environ Microbiol*, 70 (6): 3582-3587.

Vico J.P., Rol I., Garrido V., San Román B., Grilló M.J., Mainar-Jaime R.C. (2011). Salmonellosis in finishing pigs in Spain: prevalence, antimicrobial agent susceptibilities, and risk factor analysis. *J Food Protect*, 74 (7): 1070-1078.

Visscher C.F., Klein G., Verspohl J., Beyerbach M., Stratmann-Selke J., Kamphues J. (2011). Serodiversity and serological as well as cultural distribution of *Salmonella* on farms and in abattoirs in Lower Saxony, Germany. *Int J Food Microbiol*, 146 (1): 44-51.

Warrand J. (2006). Healthy polysaccharides. *Food Technol Biotechnol* 44(3): 355-370.