



Facultad de Veterinaria
Universidad Zaragoza



Trabajo Fin de Grado en Veterinaria

CONTROL DE LA SALMONELOSIS EN EL PERIODO DE TRANSICIÓN

CONTROL OF SALMONELLOSIS IN THE NURSERY PERIOD

Autor/es

Sergio López Lanau

Director/es

Raúl Carlos Mainar Jaime
Alejandro Casanova Higes

Facultad de Veterinaria

Curso 2017-2018



Índice

1. Resumen	1
2. Introducción	3
2.1. Características y taxonomía del género <i>Salmonella</i>	3
2.2. Salmonelosis como problema en la Salud Pública	4
2.3. La infección en el porcino	6
2.4. Control de la salmonelosis	9
2.5. Problemática en la transición	10
2.6. Propiedades de los Ácidos Orgánicos	11
3. Objetivos	13
4. Metodología	13
4.1. Productos utilizados	13
4.2. Diseño del estudio	14
4.2.1. Asignación de grupos de muestreo	14
4.2.2. Análisis laboratoriales	15
4.2.2.1. Aislamiento bacteriológico	15
4.2.2.2. Análisis serológico	17
4.2.3. Análisis estadísticos	17
5. Resultados y discusión	18
5.1. Mortalidad	18
5.2. Peso y Ganancia Media Diaria (GMD)	18
5.3. Bacteriología	20
5.4. Serología	21
6. Conclusión	23
7. Valoración personal	24
8. Bibliografía	25

1. Resumen

La salmonelosis es una de las enfermedades zoonóticas transmitidas por alimentos que más prevalencia presenta en todo el mundo. Una de las principales fuentes de infección para los humanos es el consumo de carne de cerdo contaminada, principalmente por el serotipo *S. Typhimurium*.

El aumento relativo del porcentaje de casos relacionados con el consumo de productos cárnicos del cerdo, en parte asociado con la reducción de la prevalencia en aves tras la implantación de planes de control, ha propiciado un aumento en la preocupación en el sector. Además, esta problemática se ha visto acentuada por la reducción del uso profiláctico e indiscriminado de antimicrobianos en las explotaciones debido a la aparición de numerosos microorganismos resistentes. Todo ello ha propiciado la búsqueda de productos alternativos a los antibióticos (probióticos, prebióticos, acidificantes, extractos naturales, alimentación pre-fermentada, etc.) con resultados muy dispares.

Este estudio busca evaluar la efectividad de dos ácidos orgánicos añadidos al pienso como son el ácido butírico encapsulado (DICOSAN+, Norel SA, Madrid) y ácido fórmico monoesterificado (MOLI MC1, Molimen SL, Barcelona) comparándolos con un tratamiento convencional con óxido de zinc y amoxicilina. Para ello, se realizó un ensayo de campo en una explotación comercial de cerdos, llevando a cabo tres muestreos a un total de noventa animales (30 por grupo) en el periodo de transición e inicio del cebo.

No se observaron diferencias significativas entre los resultados obtenidos, tanto como por análisis serológico como por cultivo bacteriológico, entre los grupos con un tratamiento alternativo y el tratamiento convencional. Sin embargo, la constatación de la presencia de *Salmonella* en la nave de transición sugiere que ambos tratamientos presentaron una eficacia similar al grupo control. Para confirmar estos resultados, será necesario realizar más estudios de este tipo.

1.1 Abstract

Salmonellosis is one of the most prevalent foodborne zoonotic diseases in the world. One of the main sources of infection for humans is contaminated pork, particularly with *S. Typhimurium*

The relative increase in the percentage of cases related to the consumption of pork meat products, in part associated with the reduction of the prevalence in birds after the implementation of control plans, has led to an increase in concern in the sector. In addition, this problem has been also stressed by the reduction of the prophylactic use of antimicrobials on farms due to the emergence of numerous resistant microorganisms. All this has led to the search for numerous alternative products (probiotics, prebiotics, acidifiers, natural extracts, pre-fermented food, etc.) with very different results.

This study seeks to assess the effectiveness of two organic acids, such as encapsulated butyric acid (DICOSAN +, Norel SA, Madrid) and monosterified formic acid (MOLI MC1, Molimen SL, Barcelona), by comparing them with a conventional treatment with zinc oxide and amoxicillin. For this, a field trial was carried out in a commercial pig farm, conducted out three samplings to a total of ninety animals in the nursery period (period from the weaning of the pigs until they entry into the fattening unit) and the beginning of the fattening period.

No significant differences were observed between the results obtained, either by serological analysis or by bacteriological culture, between the groups with an alternative treatment and conventional treatment. However, confirmation of the presence of *Salmonella* in the transitional vessel suggests that both treatments presented a similar efficacy to the control group. To confirm these results, it will be necessary to carry out more studies of this type.

2. Introducción

2.1 Características y taxonomía del género *Salmonella*

Las bacterias que forman parte del género *Salmonella* pertenecen al Orden *Enterobacteriales*, Familia *Enterobacteriaceae*. Se tratan de microorganismos anaerobios facultativos, Gram negativos, de forma bacilar, sin capacidad de formar esporas y, generalmente, móviles por la presencia de flagelos. Este género se caracteriza por que la mayoría de sus especies presentan unas características bioquímicas similares como ser catalasa positiva, oxidasa negativa, descarboxilan la lisina, la arginina y la ornitina y producen sulfuro de hidrógeno y utilizan citrato como única fuente de carbono. Además, son capaces de fermentar la glucosa produciendo ácido y gas, pero no la lactosa ni la sacarosa. Poseen capacidad para tolerar altas concentraciones de sales biliares y de crecer en presencia de algunos colorantes (fucsina, eosina, azul de metileno, verde brillante). Estas características se han utilizado para el desarrollo de medios de cultivo selectivos.

Son capaces de crecer en un margen amplio de temperatura que va desde los 7°C hasta los 48°C, pero su temperatura óptima de multiplicación se encuentra entre los 35°C y los 37°C. A pesar de que por debajo de 7°C no son capaces de reproducirse pueden sobrevivir largos periodos de tiempo a temperaturas bajas, incluso de congelación. Son sensibles al calor, por lo que temperaturas superiores a 55°C son suficientes para su desactivación (Giaccone *et al.*, 2012). El pH óptimo para su crecimiento se encuentra entre 6,5 y 7,5, pero se ha demostrado que pueden multiplicarse entre valores de 3,8 a 9,5 (Cox, 1999). Para su desarrollo óptimo necesitan de una actividad de agua (a_w) de 0,995, sin embargo, son capaces de hacerlo a partir de 0,945.

Son organismos resistentes a la desecación, pudiendo sobrevivir durante largos periodos de tiempo en el polvo o en materia orgánica (Baloda *et al.*, 2001). Aunque son organismos cuyo hábitat natural está limitado al aparato digestivo de animales, estas características hacen que sean capaces de perdurar en explotaciones de manera ubicua. Son sensibles a desinfectantes comunes como son los fenoles, iodados y clorados.

El género *Salmonella* está compuesto por dos especies principales: *S. enterica* y *S. bongori* (Figura 1). La mayoría de cepas aisladas con interés clínico (99,5%) pertenecen a la especie *S. enterica*, que a su vez, se subdivide en seis subespecies: *enterica*, *salamae*, *arizonae*, *diarizonae*, *houtenae* e *indica*. Cada subespecie se divide en serogrupos, esta división está marcada por la

composición de los antígenos de su pared bacteriana (antígeno O). A su vez, cada serogrupo se subdivide en distintas serovariedades o serotipos según los antígenos capsulares (H) y flagelares (Vi). De los más 2.600 serotipos que se conocen actualmente la mayoría pertenecen a la especie *S. enterica*, y de las cuales, en torno a 1.500 se engloban dentro de la subespecie *enterica*. (Issenhuth-Jeanjean, *et al.*, 2014)

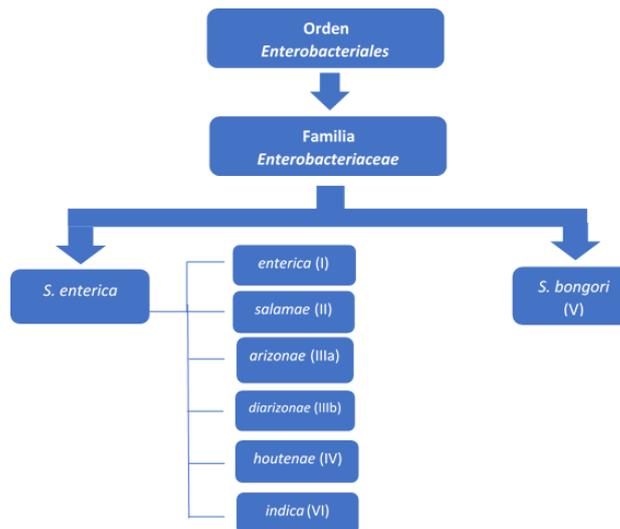


Figura 1. Esquema de clasificación del género *Salmonella*.

Algunos de estos serotipos son más específicos de ciertas especies, por ejemplo, *S. Typhi* y *S. Paratyphi* afectan principalmente a las personas, causando las salmonelosis tifoideas, lo mismo ocurre con *S. Cholerasuis* en porcino o *S. Gallinarum* y *S. Pullorum* en aves. Sin embargo, la mayoría de serotipos son capaces de infectar a una gran variedad de especies, por esto se consideran una potencial fuente de zoonosis. A pesar del gran número de serotipos, en humanos la mayoría de infecciones son provocadas por *S. Enteritidis*, *S. Typhimurium*, *S. Hadar* y *S. Infantis* (EFSA, 2017).

2.2 La salmonelosis como problema en la Salud Pública

La salmonelosis se trata de una de las enfermedades transmitidas por el consumo de alimentos con mayor prevalencia en el mundo. Solo en Europa en el 2016 se registraron más 94.500 casos, únicamente superada por la campylobacteriosis con más de 246.000 casos. Sin

embargo, la salmonelosis posee una mortalidad más elevada (Tabla 1) (EFSA, 2017), lo que incrementa su relevancia como problema de la Salud Pública.

	Casos Confirmados	Muertes
Campylobacteriosis	246.307	62
Salmonelosis	94.530	128
Yersiniosis	6.861	5
Infecciones por STEC	6.378	10
Listeriosis	2.536	247

Tabla 1. Casos de las principales zoonosis confirmados en la UE en 2016 (EFSA 2017).

El término salmonelosis engloba tanto las fiebres tifoideas como a la salmonelosis humana no tifoidea. Las fiebres tifoideas están producidas por serotipos específicos humanos como *S. Typhi* o *S. Paratyphi*, sin embargo, este tipo de infecciones no son muy comunes en Europa. Por tanto, la gran mayoría de casos de salmonelosis en países industrializados están producidos por *Salmonella* no tifoidea.

La salmonelosis humana no tifoidea se caracteriza por presentar una sintomatología que incluye dolor abdominal, fiebre alta, diarrea, náuseas y, a veces, vómitos. El tiempo de incubación suele variar entre las 6 y las 72 horas tras la ingestión de alimentos o agua contaminados. En la mayoría de casos se trata de una enfermedad autolimitante y los síntomas desaparecen en 2-7 días. Sin embargo, en poblaciones de riesgo como niños, ancianos o pacientes inmunodeprimidos puede causar infecciones graves, siendo indispensable el tratamiento antibiótico. Los principales serotipos asociados con este tipo de salmonelosis son *S. Enteritidis* y *S. Typhimurium*, que son los que más prevalencia presentan en alimentos contaminados. El primero está relacionado principalmente con el consumo de huevos, ovoproductos y carne de ave. *S. Typhimurium*, sin embargo, se asocia mayoritariamente con el consumo de carne de otros animales, principalmente de cerdo (EFSA, 2017).

Los casos de salmonelosis humana han disminuido significativamente en la UE con respecto a los años anteriores. Esto se ha producido gracias a planes específicos que se han implementado en la UE, principalmente contra la salmonelosis aviar, y que han conseguido una disminución de la prevalencia de *S. Enteritidis*. Así mismo, cabe destacar el ligero descenso progresivo que ha sufrido *S. Typhimurium* desde el año 2008. A pesar de esto, en los últimos años se ha dado un repunte en los casos totales de salmonelosis, provocado principalmente por el estancamiento del descenso de *S. Enteritidis* y la aparición de la variante monofásica de *S. Typhimurium* (*S. 4, [5],12:i:-*) que, desde su detección en Europa en la década de 1990, ha

ido en aumento llegando a ser el tercer serotipo en importancia (Figura 2) (Machado y Bernardo, 1990; Echeita, *et al.*, 1999; EFSA, 2009 - 2016).

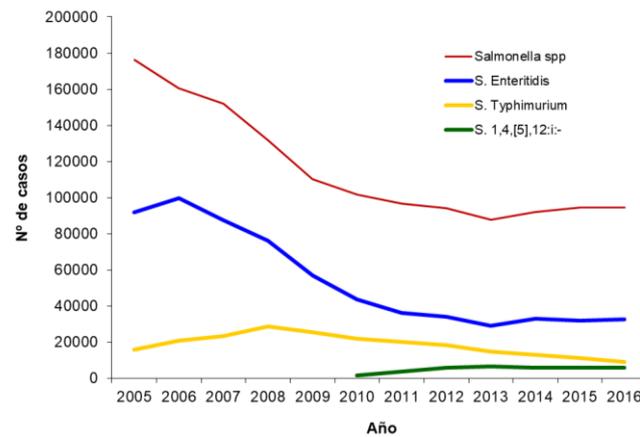


Figura 2. Evolución de los casos de salmonelosis humana en la UE 2005-2017.

2.3 La infección en el porcino

El sector porcino es el mayor productor de carne de la Unión Europea con unas 23.440 toneladas producidas en el 2017. España se sitúa como segundo mayor productor, por detrás de Alemania, con unas 4.059 toneladas, aportando más del 35% de la producción final ganadera (Figura 3) (Eurostat, 2017).

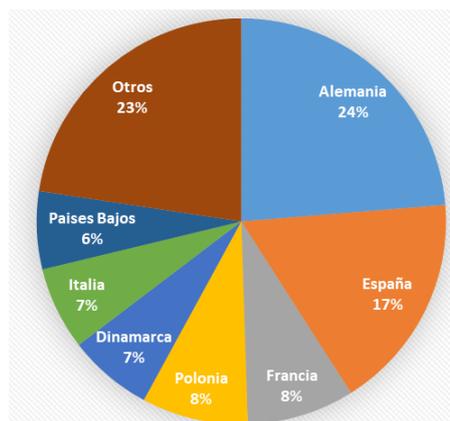


Figura 3. Producción de carne de cerdo en la UE en 2016 (Agriculture, forestry and fishery statistics. Eurostat, 2017).

La especie porcina es susceptible a la infección de una gran variedad de serotipos de *Salmonella*, sin embargo, en la mayoría de casos cursa de forma asintomática. Esto favorece que los cerdos se comporten como un importante reservorio para esta infección.

La principal vía de contagio es la oral, tras el contacto con heces de animales infectados. También es posible la vía aerógena, aunque no es tan común (Proux, *et al.*, 2001). Las numerosas vías de infección que posee este patógeno y su gran resistencia en el ambiente, hace que existan numerosas fuentes de introducción y persistencia de *Salmonella* en las explotaciones. Entre las principales vías de entradas en las explotaciones se puede destacar la introducción o mezcla con animales infectados, presencia de pájaros o ratones en las explotaciones u otros vectores como los insectos, el personal, el pienso y el agua, entre otros. Para reducir este riesgo es necesario aplicar unas correctas prácticas de manejo acompañadas de un plan de bioseguridad eficaz.

Una vez ingeridas, las bacterias del género *Salmonella* son capaces de superar la acidez del estómago y la acción de las sales biliares, consiguiendo llegar al intestino delgado. Una vez ahí, atraviesan la pared intestinal e invaden los nódulos linfáticos mesentéricos, donde se suelen acantonar. En el caso de que se trate de una infección subclínica, se quedará localizada ahí y en las amígdalas, principalmente. En el caso que lleguen a evadir las defensas intracelulares, conseguirán pasar a sangre, multiplicarse en los macrófagos y alcanzar el resto de órganos como el hígado, el bazo o los pulmones, pudiendo producir una septicemia (Hurd *et al.*, 2001).

Los animales que presentan una infección subclínica son una de las principales fuentes de salmonelosis, esto es debido a que las bacterias quedan acantonadas en los nódulos linfáticos y, tras un estímulo estresante (mezcla de animales, transporte, etc.), se puede favorecer su reactivación y excreción, aumentando la carga de *Salmonella* en heces (Visscher, *et al.*, 2011; Argüello, *et al.*, 2012). Esto adquiere gran importancia en los trasportes al matadero, ya que puede producirse una excreción masiva de *Salmonella* en los corrales de espera del matadero, incrementando la probabilidad de contaminación de canales, lo que supone un gran riesgo para la salud pública. En general, los cerdos subclínicamente infectados portan *Salmonella* en las amígdalas, tracto intestinal y en los nódulos linfáticos mesentéricos, siendo indetectables en las inspecciones rutinarias del matadero (Mainar-Jaime y Creus, 2010).

El 90% de las infecciones por *Salmonella* en porcino están producidas por *S. Cholerasuis* y *S. Typhimurium*. *S. Cholerasuis* se asocia principalmente con un cuadro de septicemia, caracterizado por inapetencia, un estado letárgico y fiebre, además, los animales pueden presentar problemas respiratorios. La diarrea suele aparecer a partir del cuarto o quinto día. En la necropsia los animales presentan abdomen y extremidades cianóticos, colitis, nódulos linfáticos mesentéricos infartados y hepatomegalia acompañada, en ocasiones, con focos de necrosis. Este serotipo supone un importante problema en explotaciones de Norteamérica, sin embargo, en Europa es infrecuente (Mainar-Jaime y Creus, 2010).

Las infecciones por *S. Typhimurium* son, sin embargo, muy frecuentes en las explotaciones europeas. Principalmente se presenta de forma asintomática por lo que no son detectadas ni en el cebadero ni durante el sacrificio. Cuando la infección es producida por cepas de mayor virulencia o ante estados de inmunosupresión de los animales, este serotipo puede causar graves problemas con la aparición de un síndrome enterocolítico. El cuadro comienza con una diarrea acuosa y amarillenta acompañada de inapetencia, letargia y fiebre. No suele presentar una elevada mortalidad, pero la morbilidad puede llegar a ser alta. Las principales lesiones que se pueden observar son una colitis necrótica focal o difusa, ganglios linfáticos mesentéricos infartados y contenido escaso y con restos de bilis en ciego y colon (Mainar-Jaime y Creus 2010).

La prevalencia de *Salmonella* en lechones suele ser baja, esto nos indica que la infección procedente de las madres es baja, representando solo entre un 1% y un 10% de las infecciones totales en la fase de engorde. Sin embargo, estos resultados podrían estar subestimados por el método de muestreo utilizado normalmente en lechones, hisopos rectales, que se caracterizan por tener una menor sensibilidad en comparación a la recolección de una mayor cantidad de heces. Esta hipótesis sobre la transmisión de las madres se ve reforzada por la diferencia que suele encontrarse entre los serotipos aislados en granjas de reproductoras y los que se pueden encontrar en las fases de transición y cebo. Por lo tanto, numerosos estudios apuntan a que la mayoría de infecciones ocurren durante la fase de engorde (Mainar-Jaime y Creus, 2010) (Figura 4).

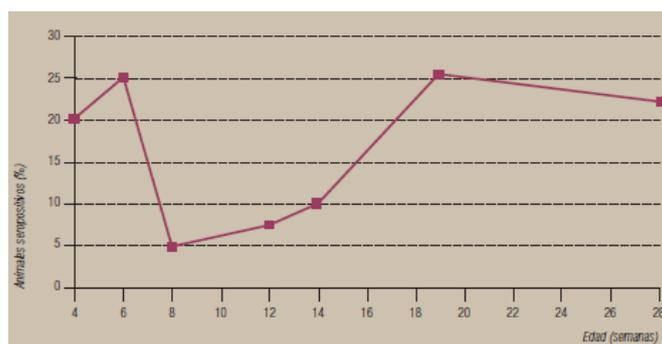


Figura 4. Evolución serológica de la infección por *Salmonella* en animales de transición y engorde (Mainar-Jaime y Creus, 2010).

2.4 Control de la salmonelosis

La eficacia de los programas de control de salmonelosis en avicultura puestos en marcha tras la publicación del Reglamento (CE) No. 2160/2003 sobre el control de la *Salmonella* y otros agentes zoonóticos específicos transmitidos por los alimentos, puso en evidencia el papel del ganado porcino y del consumo de su carne en las infecciones humanas. Todo esto, sumado a la importancia del sector en la UE, hace indispensable la implantación de programas de control.

Las características de persistencia y ubicuidad de esta bacteria hacen que en cada explotación se generen dinámicas de transmisión diferentes, lo supone que no exista un plan universal de control, por lo que cada explotación debe de establecer su propio plan específico (Mainar-Jaime y Creus 2010). Además, la detección de este patógeno es difícil debido a su presentación mayoritariamente subclínica y la baja especificidad y sensibilidad de las pruebas diagnósticas utilizadas. Esto sumado a la ausencia de tratamientos preventivos efectivos hace que unas adecuadas medidas de higiene en las explotaciones, acompañadas de un correcto plan de bioseguridad y un buen manejo, sean esenciales para el control de la introducción y transmisión de la salmonelosis porcina.

Para un buen programa de control frente a *Salmonella* se debe instaurar sistemas todo dentro/todo fuera, ya que, con esto, se podrá realizar correctos planes de limpieza y desinfección, logrando así que *Salmonella* desaparezca del entorno evitando nuevas infecciones (Berends *et al.*, 1996). Mediante la homologación de proveedores, tanto de reposición como de pienso, se podrá reducir significativamente el riesgo de la introducción de este patógeno en la explotación. El agua puede ser otra fuente de infección, por ello se deberá realizar un correcto tratamiento y controles microbiológicos periódicos. Para el control de vectores que puedan transmitir la infección dentro de la explotación, se podrá aplicar planes de DDD (Desinfección, Desratización y Desinsectación). Las visitas y la entrada de vehículos en la explotación deben ser limitadas y registradas. En el caso de los vehículos, hay que exigir el comprobante de limpieza y desinfección. Todas estas medidas se pueden complementar con estrategias alimentarias como adición de pienso de partícula grosera o ingredientes fibrosos, ácidos orgánicos en pienso o agua, alimentación líquida pre-fermentada o la utilización de prebióticos, probióticos u otros aditivos.

2.5 La problemática de la transición

La transición se trata del periodo que transcurre desde que se destetan a los lechones, en torno a los 21-28 días de vida, con aproximadamente 6 kg, hasta la entrada al cebo a las 5 o 7 semanas después, con aproximadamente 20 kg de peso (Figura 5).

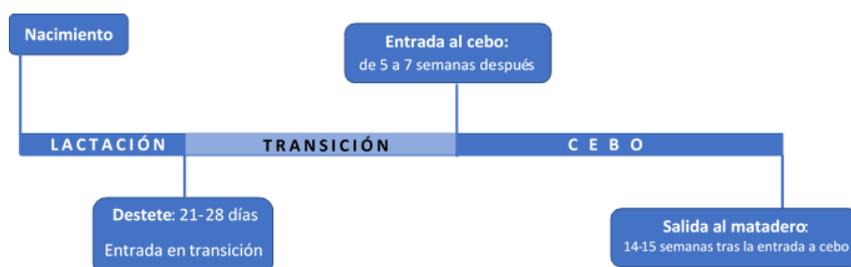


Figura 5. Esquema general de las fases en la producción porcina.

Es un momento crítico en la cría de porcino que supone un riesgo en la viabilidad del animal. Esto se debe al gran estrés que se produce por la mezcla de animales, la separación de la madre, cambio en la dieta y el cambio de ambiente con transporte incluido. Esto conlleva un descenso de la respuesta inmune, todavía inmadura. Además, se produce un aumento del pH intestinal desencadenado por la disminución de la producción de ácido láctico a partir de lactosa, y al mayor contenido de proteína en la nueva dieta que actúa tamponando la escasa capacidad acidificante del tracto digestivo del lechón. Este aumento de pH favorece la proliferación de microorganismos enteropatógenos. Es por eso que en esta fase es típico la aparición de diarreas a los 3-7 días post-destete (Fairbrother, *et al.*, 2005; Suárez, *et al.*, 2014).

En el inicio de esta fase se suelen administrar antibióticos junto al pienso de modo profiláctico para prevenir estos problemas entéricos. Sin embargo, el uso indiscriminado de antimicrobianos en producción animal es visto como un de los factores responsables de la aparición de numerosas especies de bacterias resistentes a los antimicrobianos (Aarestrup, 1999).

Ante esta problemática la UE prohibió el uso de antibióticos de modo profiláctico o como promotores del crecimiento a partir del 1 de enero del 2006 mediante el Reglamento (CE) No. 1831/2003 sobre los aditivos en la alimentación animal y, recientemente, restringió el uso de colistina mediante la comunicación de la comisión sobre directrices para una utilización prudente de los antimicrobianos en la medicina veterinaria (2015/C 299/04). Este fármaco se

trata de un polipéptido de elección para el control de los enteropatógenos Gram negativos, como *E. coli* o *Salmonella* spp.

Esto ha propiciado la búsqueda de nuevas sustancias alternativas a los antibióticos que permiten el control de infecciones y unos mejores índices productivos. Las alternativas son numerosas (probióticos, prebióticos, acidificantes, extractos naturales, alimentación pre-fermentada, etc.), pero existe una gran heterogeneidad en los resultados obtenidos (Palomo, *et al.*, 2014). Por lo que, probablemente, la mejor estrategia se una combinación de diversos compuestos.

2.6 Propiedades de los Ácidos Orgánicos (AO)

Una de las herramientas más prometedoras para la producción porcina es la utilización de ácidos orgánicos. Se trata de subproductos de la fermentación microbiana presentes de manera natural en las plantas, que se han utilizado mayoritariamente para la higienización del pienso. La adición de ácidos orgánicos al pienso ayuda a mejorar la calidad higiénica del mismo reduciendo la carga microbiana mediante la reducción del pH e inhibiendo el crecimiento de determinados microorganismos. Además, permiten reducir la capacidad tamponante de la dieta, disminuyendo posibles daños en el estómago del animal y aumentando la actividad de la pepsina, y finalmente la digestibilidad proteica.

El uso de algunas de estas sustancias parece mejorar el crecimiento y el índice de conversión de los cerdos. Sin embargo, existe una gran variación en las respuestas obtenidas que pueden estar producidas por la variabilidad en el tipo y la dosis de ácido orgánico, el tipo de dieta y el tipo de manejo e higiene (Mroz, 2003). La respuesta en cuanto el crecimiento está relacionado con la edad del animal: la mejor respuesta se observa tras el destete y el efecto va disminuyendo conforme el animal crece (Grilli, *et al.*, 2017).

Actualmente se ha observado que la adición al pienso también tendría propiedades sobre la salud intestinal de los animales. El mecanismo de acción antimicrobiano de los ácidos orgánicos no está todavía claro, pero vendría determinado por el descenso de pH intestinal dificultando la presencia de bacterias patógenas en la luz intestinal. Esta característica es especialmente útil en lechones recién destetados ya que dejan de tener el efecto acidificante de la leche, provocando fuertes diferencias entre animales destetados (2,6-5,0) y animales adultos (2,0-3,0) (Owusu-Asiedu, *et al.*, 2003). Además, al ser ácidos débiles, pueden atravesar la pared bacteriana en su forma no disociada y disociarse en su interior en protones (H⁺) y

aniones (RCOO⁻), logrando bajar el pH interno. A su vez, cuanto más bajo sea el pH externo, más ácido débil logrará atravesar la pared bacteriana reduciendo, aún más, el pH interno (Warnecke y Gill, *et al.*, 2005).

La actividad antimicrobiana puede variar entre los distintos ácidos orgánicos, y se ha demostrado que depende de factores como la presencia de grupos polares, el número de enlaces dobles, el tamaño molecular y la solubilidad entre solventes apolares (Hsiao y Siebert, 1999). Las bacterias más sensibles a este compuesto son la Gram negativas como *Escherichia coli*, *Salmonella* spp. y *Campylobacter* (Grilli y Piva, 2012).

Los ácidos orgánicos se pueden administrar mediante formas libres o formas protegidas. Las formas libres actúan principalmente a nivel gástrico y en el tramo proximal del intestino delgado (duodeno). Esto supone una importante limitación en el control de *Salmonella* spp., ya que las bacterias de este género suelen colonizar y adherirse en tramos del íleon, ciego o colon.

Las formas protegidas, en cambio, son capaces de mantener una liberación lenta que les permite actuar a nivel del intestino delgado e intestino grueso ya que se encuentran recubiertos o microencapsulados. Esta presentación también presenta ventajas como la mejora del manejo y la seguridad, la reducción de problema de piensos pulverulentos, de corrosividad y de interacciones no deseables con otras sustancias (Figura 6) (Creus *et al.*, 2014).

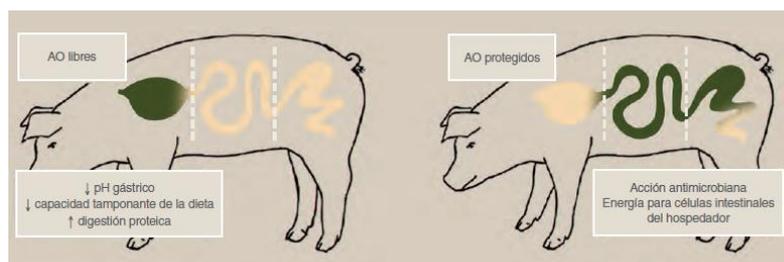


Figura 6. Acción de los AO libres y protegidos en el tracto gastrointestinal del cerdo (obtenido de Grilli *et al.*, 2017).

3. Objetivos

La alarmante aparición de microorganismos resistentes a antimicrobianos y el consecuente cambio en la legislación obligando a reducir el uso tanto de antibióticos como de otras sustancias con actividad antimicrobiana como el óxido de zinc, ha intensificado la búsqueda de sustancias que sustituyan eficazmente a estos productos.

Así, el principal objetivo de este estudio es evaluar la eficacia de dos tipos de ácidos orgánicos (ácido butírico encapsulado y ácido fórmico monoesterificado) administrados en el pienso, para el control de la infección por *Salmonella* spp. en lechones en la fase de transición, mediante su comparación frente a un tratamiento convencional (Óxido de Zinc + amoxicilina).

4. Metodología

4.1 Productos utilizados

El estudio se basó en la administración de dos ácidos orgánicos en la dieta:

- Butirato sódico protegido (DICOSAN+, Norel SA, Madrid).
- Ácido fórmico monoesterificado (MOLI MC1, Molimen SL, Barcelona).

DICOSAN+ es una forma de butirato de sodio protegido con una sal de sodio obtenida a partir del destilado de ácidos grasos de coco, principalmente ácido láurico (45-53%) junto con los ácidos cáprico y caprílico (≈10%). El compuesto usado para el recubrimiento ha demostrado tener algunas propiedades antimicrobianas por sí solo (Rossi *et al.*, 2010; Dayrit, 2015). Además, parece ser que su uso como recubrimiento no solo protege al butirato sódico de una temprana disociación en el estómago, sino que también es capaz de potenciar el efecto antimicrobiano.

MOLI MC1 es un ácido fórmico esterificado en forma de glicérido, principalmente en forma de *1-monoglicérido*. La esterificación consiste en la síntesis de un éster a partir de la reacción química entre un ácido carboxílico y un alcohol. Esto le procura al aditivo una mayor resistencia y le permite ser efectivo a nivel intestinal, a diferencia del ácido fórmico. Este producto destaca su potente actividad antimicrobiana y su capacidad de resistir temperaturas de granulación y extrusión. Además, presenta la ventaja de no ser corrosivo y

la capacidad de poder administrarse con el agua de bebida lo que mejora su manejo tanto en fábrica como en la granja.

4.2 Diseño del estudio

4.2.1 Asignación de grupos y muestreo

El estudio se realizó en una explotación comercial de aproximadamente 750 madres situada en la provincia de Huesca. Para su realización, tras el destete, se separaron aleatoriamente a los animales de una sala de transición en tres grupos de treinta animales cada uno (grupo Control, grupo Tratamiento 1 -DICOSAN+- y grupo Tratamiento 2 -MOLI MC1-). A su vez, cada grupo estaba dividido en dos subgrupos con quince animales separados por sexos (para un total de 6 cuadras en una misma sala de transición, 2 cuadras por grupo).

Al primer grupo, grupo control (GC), se le administró una dieta con antimicrobianos convencionales que consistía en óxido de zinc en el pienso de *pre-starter* a una dosis de 3,1 kg por tonelada y amoxicilina en el pienso *starter* a 300 ppm. Al segundo grupo (T1) se le administró DICOSAN+ a una dosis de 3 kg por tonelada de pienso. Al tercer grupo (T2), MOLI MC1 a una dosis de 20 kg por tonelada. Estos tratamientos se establecieron en la entrada de la transición, justo después del destete, y se mantuvieron hasta la entrada en el cebo (7 semanas aproximadamente), incluyendo así tanto el pienso *pre-starter* como *starter*.

Se realizaron tres muestreos en cada grupo para recoger heces y suero de cada animal (Figura 7). El primer muestreo se realizó al inicio de la transición, antes de que los animales recibieran algún tratamiento, con el fin de asegurar que el estado de los animales era similar y poder garantizar su comparabilidad. En este muestreo también se pesaron la totalidad de los animales y se crotalaron con un crotal distinto al de la explotación con el fin de identificar a los animales que participaban en el estudio. El segundo muestreo se llevó a cabo al final de la transición (43 días después) y se recogió el peso de un total de 8 lechones por grupo seleccionados aleatoriamente con el fin de estimar la Ganancia Media Diaria (GMD) en cada grupo. El último muestreo se realizó a las dos semanas de la entrada a cebo.

Las muestras de heces se recogieron tanto mediante hisopos rectales (en los primeros muestreos) como por estimulación anal (último muestreo). La sangre se obtuvo a partir de la vena yugular, y tras la extracción del suero, se congeló a -20°C hasta su análisis.



Figura 7. Esquema de los muestreos realizados en la granja.

4.2.2 Análisis laboratoriales

4.2.2.1 Aislamiento bacteriológico

Se trata de un método diagnóstico directo con una elevada especificidad, ya que nunca se aislará *Salmonella* si no está presente en la muestra. Esta prueba se ha considerado durante mucho tiempo como la técnica de referencia. En los casos de salmonelosis clínica los animales excretan gran cantidad de la bacteria, por lo que el cultivo de heces suele ser suficiente para su aislamiento. Sin embargo, ante una infección subclínica la sensibilidad de la prueba se reduce considerablemente. La variación de la sensibilidad también puede estar influida por factores como la cantidad de muestra, su grado de homogenización, de las distintas combinaciones de medios de cultivo o del serotipo presente. Además, otras bacterias presentes en las heces podrían inhibir el crecimiento de *Salmonella*.

Debido a esto y con el fin de que los resultados obtenidos en diferentes países puedan ser comparables (Mainar-Jaime y Creus, 2010), la UE dispuso para el estudio de la salmonelosis un mismo protocolo basado en la norma ISO 6579:2002/Amd 1:2007 (Anónimo, 2007).

Brevemente, este protocolo se basa en un cultivo inicial de la muestra en medio de pre-enriquecimiento no selectivo en agua tamponada (BPW), seguido de otro cultivo en un medio de enriquecimiento selectivo en un medio semisólido llamado Rappaport-Vassiliadis (MSRV). Tras esto se realiza un sembrado medios selectivos que permiten diferenciar visualmente las colonias de *Salmonella* spp. de las de otras bacterias. Para esta fase se utilizan los medios de agar verde brillante (BGA) y el XLD (agar xilosa lisina desoxicolato). Por último, se debe realizar una confirmación bioquímica mediante agar hierro-triple azúcar (TSI), agar lisina-hierro (LIA),

caldo urea y caldo nutritivo con triptona. Además, para complementar el aislamiento, se puede realizar un serotipado en laboratorios de referencia (Figura 8) (Anexo I).

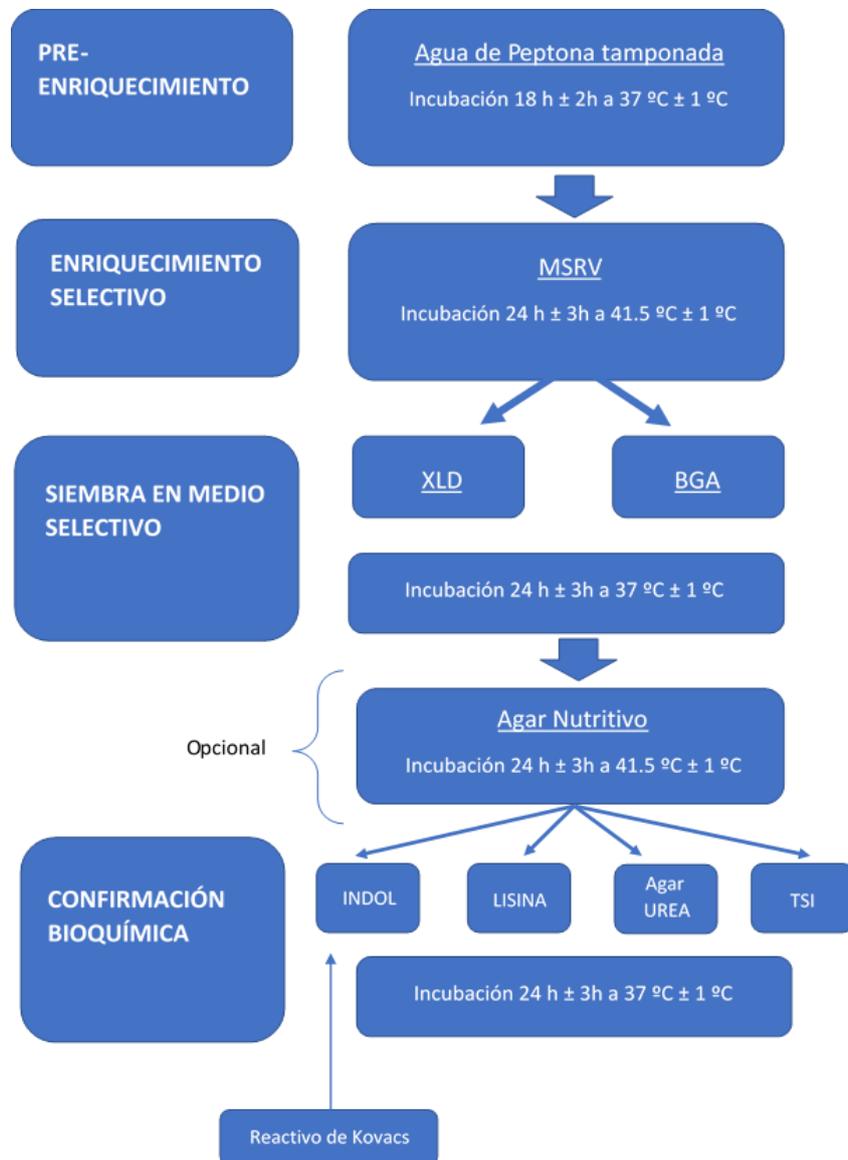


Figura 8. Esquema de la norma ISO 6579:2002.

4.2.2.2 Análisis serológico

El análisis serológico se llevó a cabo mediante ELISA (*Enzyme-Linked Immunosorbent Assay*), un método de diagnóstico indirecto que se basa en la detección de antígenos de los diferentes serotipos de *Salmonella* o anticuerpos presentes tras el contacto con las bacterias.

En este estudio se utilizó el test ELISA Herdcheck para *Salmonella* porcina de IDEXX (Laboratorios IDEXX, Westbrook, ME, EE. UU.), que se trata de un ELISA para la detección de anticuerpos contra *Salmonella* spp. en suero, plasma y jugo muscular de carne de porcino. Para llevarlo a cabo se necesitó 15 µL de suero de cada animal y se siguió el protocolo de la prueba explicado en el Anexo II. Los resultados fueron expresados en % de Densidad Óptica (%DO).

4.2.3 Análisis estadísticos

Para comparar los niveles de excreción y de seroprevalencia de *Salmonella* entre los diferentes grupos y los diferentes tiempos de muestreo se realizó el test exacto de Fisher. Para la comparación de pesos y de la Ganancia Media Diaria (GMD) se utilizó la prueba *t* de Student. Un resultado se consideró significativo si $P \leq 0,05$.

También se realizó un análisis de medias repetidas (software STATA StataCorp, L.P., USA) a partir de los valores medios de %DO en cada grupo teniendo en cuenta los tiempos de muestreo y tratamiento, para estimar la posible relación entre el los diferentes tratamientos y los valores de %DO entre los grupos.

5. Resultados y discusión

5.1 Mortalidad

La tasa de mortalidad al final del estudio para cada grupo se presenta en la Figura 9. No se observaron diferencias significativas en proporción de lechones muertos (17,2%, 20,7% y 20,7% para el grupo control, T1 y T2, respectivamente; $P= 1$). Por lo tanto, los tratamientos alternativos al tratamiento convencional no supusieron un incremento del riesgo de mortalidad de los lechones.

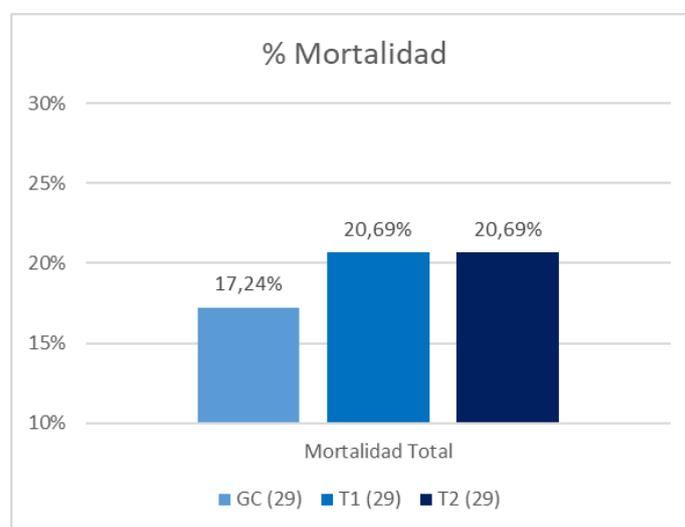


Figura 9. Porcentajes de mortalidad total y del segundo y tercer muestreo en los tres grupos.

5.2 Peso y Ganancia Media Diaria (GMD)

Se registraron los pesos en los dos primeros muestreos para calcular la GMD y poder comparar así las diferencias entre los grupos. Las tablas 3 y 4 muestran los resultados para la comparación entre el grupo control y el T1 y las 5 y 6 para el grupo control respecto al T2.

Grupo	Inicio transición		Final transición	
	GC	T1	GC	T1
N	28	25	8	7
Peso medio	6,19	6,99	20,70	21,35
(IC 95%)	(5,9-6,4)	(6,7-7,3)	(19,3-22,1)	(18,9-23,7)
P*	<0,01		0,56	

*t- test.

Tabla 3. Peso medio (en kg) para el grupo control (GC) y el tratado con DICOSAN+ (T1) al inicio y al final de la transición

	GMD	IC95% (GMD)	P*
GC (N= 8)	0,35	0,31-0,38	0,98
T1 (N= 7)	0,35	0,29-0,40	

*t-test.

Tabla 4. Ganancia media diaria (GMD) en kg. calculada para 42 días para el grupo control (GC) y el tratado con DICOSAN+ (T1).

Grupo	Inicio transición		Final transición	
	GC	T2	GC	T2
N	28	26	8	8
Peso medio	6,19	6,39	20,70	20,70
(IC 95%)	(5,9-6,4)	(5,9-6,9)	(19,3-22,1)	(17,7-23,6)
P*	0,45		1	

*t- test

Tabla 5. Peso medio (en kg) para el grupo control (GC) y el tratado con MOLI MC (T2) al inicio y al final de la transición.

	GMD	IC95% (GMD)	P*
GC (N= 8)	0,35	0,31-0,38	0,73
T2 (N= 8)	0,34	0,28-0,39	

*t-test.

Tabla 6. Ganancia media diaria (GMD) en kg. calculada para 42 días para el grupo control (GC) y el tratado con MOLI MC (T2).

En general, no se observaron diferencias significativas de pesos entre los grupos, salvo una diferencia a favor del T1 al principio del estudio (antes del comienzo del tratamiento) probablemente debida al error aleatorio con la asignación de los grupos. Esta ausencia general de diferencias en los pesos se vio reflejada también al comparar la GMD entre los grupos tratados y el control, que fue prácticamente la misma para todos ellos.

Con estos resultados podemos concluir que no existe diferencia significativa, con respecto a la GMD, entre una dieta con aditivos antimicrobianos convencionales y las dos dietas suplementadas con sustancias alternativas, como lo son el butirato sódico protegido y el ácido fórmico monoesterificado.

5.3 Bacteriología

A continuación, se presentan los resultados del aislamiento bacteriológico (Tabla 7):

	1º Muestreo (inicio transición)			2º Muestreo (final transición)			3º Muestreo (inicio cebo)		
	No. +	No. -	TOTAL	No. +	No. -	TOTAL	No. +	No. -	TOTAL
GC	0 (0%)	30	30	1 (3,7%)	27	28	0 (0%)	26	26
T1	0 (0%)	30	30	0 (0%)	24	24	0 (0%)	23	23
T2	0 (0%)	31	31	0 (0%)	24	24	0 (0%)	23	23
P*		1			1			1	

*Prueba exacta de Fisher

Tabla 7. Resultados de aislamientos bacteriológicos en los 3 muestreos.

Como se puede observar, no se encontraron resultados positivos en los cultivos realizados, salvo un caso en el grupo control en el segundo muestreo con un lechón positivo (3,7%). La ausencia de resultados positivos en el primer muestreo podría estar relacionada con el hecho de haber usado hisopos rectales para la recolección de las muestras, lo que supone la utilización de una cantidad de muestra pequeña, lo que seguramente conllevó a un descenso de la sensibilidad del análisis bacteriológico. En el segundo muestreo (final de transición), solo un animal del grupo control dio resultado positivo, lo que confirmaba la presencia de *Salmonella* spp. en la nave de transición. La baja prevalencia observada en este segundo muestreo podría deberse bien a la eficacia de los distintos tratamientos para evitar la infección o, quizás, a unos bajos niveles de exposición a *Salmonella* spp. a lo largo del periodo de transición. La ausencia de un control real, es decir, sin ningún tipo de tratamiento, impidió clarificar esta situación.

Este mismo escenario se repitió en el último muestreo, con todos los animales negativos en bacteriología tras 15 días en la nave de cebo. Este resultado sugería que la presión de infección en esta fase, donde los animales ya no estaban bajo tratamiento, fue baja, lo que podría ser la consecuencia de la entrada de animales libres de infección (gracias a los tratamientos) a las nuevas instalaciones, o bien una falta de sensibilidad de la técnica bacteriológica (ver resultados serológicos).

5.4 Serología

En este apartado se muestra los resultados de las pruebas serológicas en los distintos grupos (Tablas 8, 9 y 10):

1º Muestreo

Punto de corte	10%		20%		40%	
	No. sero +	No. sero -	No. sero +	No. sero -	No. sero +	No. sero -
GC (25)	8 (32%)	17	3 (12%)	22	1 (4%)	24
T1 (23)	8 (34,8%)	15	6 (26,1%)	17	1 (4,3%)	22
p*	1		0,2787		1	
GC (25)	8 (32%)	17	3 (12%)	22	1 (4%)	24
T2 (27)	7 (25,9%)	20	5 (18,5%)	22	1 (3,7%)	26
p*	0,7619		0,705		1	

*Prueba exacta de Fisher

Tabla 8. Resultados de la serología en el 1º muestreo.

2º Muestreo

Punto de corte	10%		20%		40%	
	No. sero +	No. sero -	No. sero +	No. sero -	No. sero +	No. sero -
GC (26)	1 (3,8%)	25	1 (3,8%)	25	1 (3,8%)	25
T1 (24)	2 (8,3 %)	22	1 (4,2%)	23	1 (4,2%)	23
p*	0,602		1		1	
GC (26)	1 (3,8%)	25	1 (3,8%)	25	1 (3,8%)	25
T2 (23)	3 (13%)	20	0 (0%)	23	0(0%)	23
p*	0,3297		1		1	

*Prueba exacta de Fisher

Tabla 9. Resultados de la serología en el 2º muestreo.

3º Muestreo

Punto de corte	10%		20%		40%	
	No. sero +	No. sero -	No. sero +	No. sero -	No. sero +	No. sero -
GC (24)	6 (25%)	18	3 (12,5%)	21	1 (4,2%)	23
T1 (23)	11 (47,8%)	12	5 (21,7%)	18	3 (13%)	20
p*	0,1351		0,4614		0,3475	
GC (24)	6 (25%)	18	3 (12,5%)	21	1 (4,2%)	23
T2 (23)	8 (34,8%)	15	5 (21,7%)	18	0 (0%)	23
p*	0,5343		0,4641		1	

*Prueba exacta de Fisher

Tabla 10. Resultados de la serología en el 3º muestreo.

El número de individuos analizados en cada muestreo y para los diferentes grupos varió debido a las dificultades para extraer sangre a todos los individuos y a la muerte de algunos lechones durante la realización del estudio.

En el primer muestreo la obtención de resultados similares sugería que los grupos definidos al principio del estudio eran comparables. En el segundo muestreo, y en particular para los puntos de corte del 10% y del 20%, se observa una reducción del número de lechones seropositivos con respecto al primero, lo que indicaría que la técnica de ELISA utilizada estaba detectando anticuerpos calostrales, que suelen decaer en torno a las 8 semanas de vida (Mainar-Jaime y Creus, 2010).

En el tercer muestreo, ya en la fase de cebo, la seroprevalencia empieza a aumentar en todos los grupos, indicando posiblemente que los animales, en su nueva ubicación, empezaban a entrar en contacto con *Salmonella*. Esto entraría en contradicción con los resultados de bacteriología, salvo que los resultados negativos de cultivo tengan que ver con la baja sensibilidad de detección de esta técnica en heces. También podría ocurrir que los valores serológicos observados (bajos en cualquier caso) muestren simplemente una variabilidad inherente a la técnica de ELISA empleada y no reflejen un contacto real con el patógeno.

La evolución de estos resultados serológicos se observa más fácilmente en la Figura 10. En general, no se encontraron diferencias en los valores medios de %DO debido a los tratamientos ($P=0,622$).

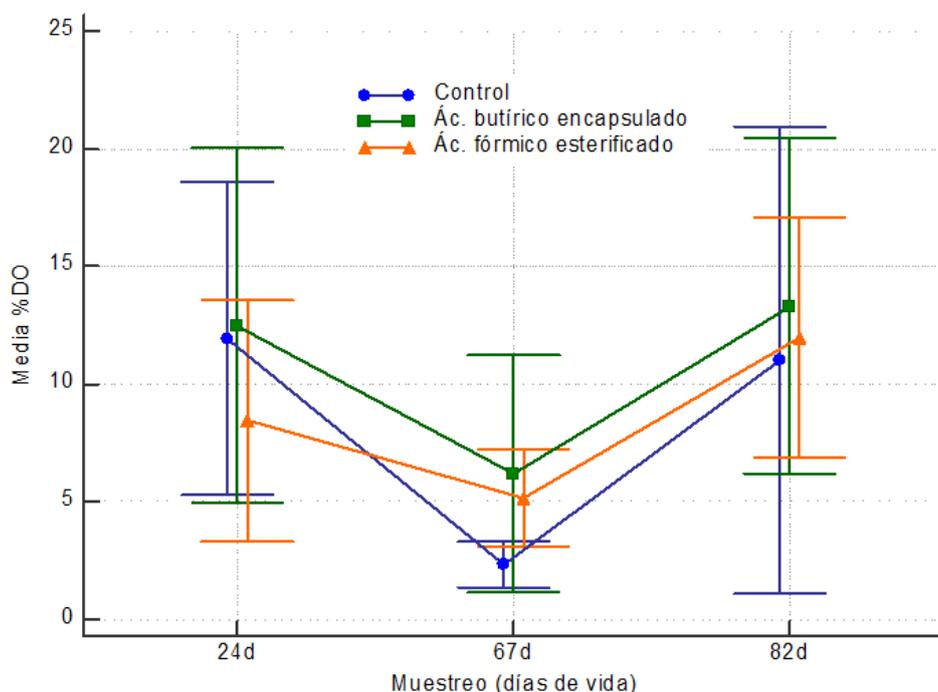


Figura 10. Evolución de los valores de %DO para cada grupo (24d: inicio de la fase transición; 67d: final transición; 82d: 15 en fase de cebo)

6. Conclusión

La falta de resultados significativos, tanto en las pruebas bacteriológicas como en las pruebas serológicas, pueden ser debidos a una baja presión de la infección de *Salmonella* spp., a una insuficiente sensibilidad de las pruebas realizadas (hisopos rectales) o a la efectividad de los tratamientos. Debido a esto, es difícil obtener una conclusión clara a la hora de establecer la efectividad y la comparabilidad entre los distintos tratamientos. Hubiera sido necesario utilizar controles reales (sin tratamiento) para aclarar esta situación, pero la empresa no lo permitió debido al riesgo sanitario que ello suponía. Pero, en general, por el uso de los ácidos no se observaron efectos negativos ni en mortalidad, ni en GMD, cuando se compararon con el tratamiento convencional de ZnO₂ + amoxicilina, resultando además el resto de las variables analizadas (prevalencia y seroprevalencia de *Salmonella* spp.) similares. Todo ello sugiere que la utilización de estos ácidos orgánicos podría sustituir a los antimicrobianos convencionales, pero serán necesarios más estudios de este tipo para confirmar estos resultados.

6.1 Conclusion

The lack of significant results, both in bacteriological tests and serological tests, may be due to low pressure of *Salmonella* spp. infection, insufficient sensitivity of the tests performed (rectal swabs) or the effectiveness of treatments. Because of this, it is difficult to obtain a clear conclusion when establishing the effectiveness and comparability between the different treatments. The use of real controls would have been necessary to clarify this situation, but the company did not allow this because of the health risk that this entailed. However, in general, due to the use of acids, the negative effects were not observed either in mortality or GMD, when compared with the conventional treatment of ZnO₂ + amoxicillin, resulting in the rest of the variables analysed (prevalence and seroprevalence of *Salmonella* spp.) similar. This suggests that conventional antimicrobial agents can replace conventional antimicrobials, but similar more studies are necessary to confirm these results.

7. Valoración personal

En primer lugar, agradecer a Raúl Mainar y Alejandro Casanova por su ayuda a la hora de realizar este trabajo, los conocimientos que he adquirido gracias a ellos y las largas jornadas de muestreos junto a alumnos voluntarios de la Facultad. Hacer especial mención a la empresa integradora y a los ganaderos que han permitido la realización de este estudio en su explotación. Agradecer también al CITA que me permitiera la realización de prácticas en sus instalaciones para el procesado de muestras de este estudio.

Gracias a la elaboración de este trabajo he adquirido numerosos conocimientos como la importancia de las enfermedades zoonóticas en la UE, en concreto de *Salmonella*, las dimensiones y la importancia del sector porcino y la capacidad de realizar un trabajo de carácter científico. Además, he podido desarrollar habilidades como la realización de muestreos, sacando sangre y recolectando heces, y el trabajo realizado en el laboratorio, realizando cultivos bacteriológicos y serologías. Todo esto es de gran valor en mi formación y puede ser de gran ayuda en un futuro.

8. Bibliografía

- Aarestrup F.M. (1999). Association between the consumption of antimicrobial agents in animal husbandry and the occurrence of resistant bacteria among food animals. *International J. Antimicrob. Agents*, Vol 12; 279–85.
- 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.
- Baloda S.B., Christensen L., Trajcevska S. (2001). Persistence of a *Salmonella* enterica serovar Typhimurium DT12 clone in a piggery and in agricultural soil amended with *Salmonella*-contaminated slurry. *Appl. Environ. Microbiol.* 67; 2859-2862.
- Berends B.R., Urlings H.A., Snijders J.M., Van Knapen F. (1996). Identification and quantification of risk factors in animal management and transport regarding *Salmonella* spp. in pigs. *Int. J. Food. Microbiol* 30; 37-53.
- Carlson S.A., Barnhill A.E., Griffith R.W. (2012). Salmonellosis. *Diseases of Swine*, 10th edition; 821-831.
- Casanova A., Andrés S., Mainar R.C. (2017) Effect of the addition of protected sodium butyrate to the feed on *Salmonella* spp. infection dynamics in fattening pigs. *Anim. Feed Sci. Technol.*, 231; 12–18.
- Centro Nacional de Epidemiología. Informe anual del sistema de información microbiológica 2016 (2017).
- COMUNICACIÓN DE LA COMISIÓN. Directrices para una utilización prudente de los antimicrobianos en la medicina veterinaria (2015/C 299/04).
- Cox J. (1999) *Salmonella*/Introduction. *Encyclopaedia of Food Microbiology*, Academic Press, London, United Kingdom; 1928-1973.
- Creus E., Andrés S., Mainar R.C. (2014). Actualización en el control de la salmonelosis porcina a través de la alimentación (I). *Avances*, octubre 2014; 36-47.
- Creus E., Andrés S., Mainar R.C. (2014). Actualización en el control de la salmonelosis porcina a través de la alimentación (II). *Avances*, noviembre 2014; 34-45.
- Echeita M. A., Aladueña A., Cruchanga S., Usera M. A. (1999). Emergence and spread of an atypical *Salmonella* entérica subsp. enterica serotype 4,5,12:i:- strain in Spain. *J. Clin. Microbiol.*, 37; 3425.
- European Centre for Disease Prevention and Control (ECDC). Surveillance Atlas of Infectious Diseases. [citado 06/05/2018]. <http://atlas.ecdc.europa.eu/public/index.aspx>
- European Food Safety Authority (EFSA) (2014). The European Union summary report on trends and sources of zoonoses, zoonotic agents and food-borne outbreaks in 2012. *EFSA J.* 2014, 12; 3547
- European Food Safety Authority (EFSA) (2015). The European Union summary report on trends and sources of zoonoses, zoonotic agents and food-borne outbreaks in 2013. *EFSA J.* 2015, 13; 3991

- European Food Safety Authority (EFSA) (2016). The European Union summary report on trends and sources of zoonoses, zoonotic agents and food-borne outbreaks in 2014. EFSA J. 2016, 13; 4329
- European Food Safety Authority (EFSA) (2016). The European Union summary report on trends and sources of zoonoses, zoonotic agents and food-borne outbreaks in 2015. EFSA J. 2016, 14; 4634
- European Food Safety Authority (EFSA) (2017). The European Union summary report on trends and sources of zoonoses, zoonotic agents and food-borne outbreaks in 2016. EFSA J. 2017, 15; 5077
- Eurostat (2017). Agriculture, forestry and fishery statistics.
- Fabian M. D. (2015). The Properties of Lauric Acid and Their Significance in Coconut Oil. J. Am. Oil Chem.' Soc., Vol 92; 1–15.
- Fairbrother J.M., Nadeau E., Gyles C.L. (2005). Escherichia coli in postweaning diarrhea in pigs: an update on bacterial types, pathogenesis, and prevention strategies. Anim. Heal Res. Rev. 6; 17-39.
- Giaccone V., Catellani P., Alberghini L. (2012). Food as cause of human salmonellosis. In book: Salmonella- A dangerous Foodborne Pathogen; 47-72.
- Grilli E., A. Piva (2012). Organic acids and their role in reduce foodborne pathogens in food animals. On-Farm Strategies to Control Foodborne Pathogens. NOVA Science Publishers, New York; 183-210.
- Grilli E., Rossi B., Tugnoli B. (2017). ¿Pueden los ácidos orgánicos y extractos naturales mejorar el crecimiento de los cerdos? SUIIS 140; 10-17.
- Grimont P.A.D., Weill F.X. (2007). Antigenic formulae of the *Salmonella* serovars: Institut Pasteur And WHO Collaboration Center for Reference and Research on *Salmonella*, 9th edition.
- Hsiao, C. P., K.J. Siebert (1999). Modeling the inhibitory effects of organic acids on bacteria. Int. J. Food Microbiol., 47; 189-201.
- Hurd H.S., Gailey J.K., McKean J.D., Rostagno M.H. (2001). Rapid infection in market-weight swine following exposure to a *Salmonella* typhimurium-contaminated environment. Am. J. Vet. Res. 62; 1194–1197.
- International Organization for Standardization (ISO) (2007). 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. Available at: <https://www.iso.org/standard/29315.html> [citado 20/05/2018]
- Issenhuth-Jeanjean S., Roggentin P., Mikileit M., Guibourdenche M., de Pinna E., Nair S., Fields P.I., Weil F. X. (2014). Supplement 2008-2010 (No. 48) to the White-Kauffmann-Le Minor scheme. Res. Microbiol. 165; 526-530.
- Machado J., Bernardo F. (1990). Prevalence of *Salmonella* in chicken carcasses in Portugal. J. Appl. Bacteriol. 64; 477-480.

- Mainar R.C., Creus E. (2010). Salmonelosis en las explotaciones porcinas: Características e importancia de la infección en el cerdo. SUIS 67; 53-55.
- Mainar R.C., Creus E. (2010). Salmonelosis en las explotaciones porcinas: Dinámica de la transmisión en las explotaciones porcinas. SUIS 68; 40-48.
- Mainar R.C., Creus E. (2010). Salmonelosis en las explotaciones porcinas: Métodos de diagnóstico. SUIS 69; 44-53.
- Mainar R.C., Creus E. (2010). Salmonelosis en las explotaciones porcinas: Estrategias de control. SUIS 70; 48-56.
- Mainar R.C., Creus E., Vico J.P. (2011). Control de la salmonelosis porcina en las explotaciones. Producción Animal 264; 6-15.
- Mainar R.C., Creus E., Vico J.P. (2011). Salmonelosis porcina. Algunas consideraciones sobre su control. Avances, marzo 2011; 22-36.
- Ministerio de agricultura y pesca, alimentación y medio ambiente (2017). Informe del consumo de alimentación en España 2016.
- Ministerio de agricultura y pesca, alimentación y medio ambiente. *Salmonella* (2018). [citado 06/05/2018]. http://www.mapama.gob.es/es/ganaderia/temas/sanidad-animal-higiene-ganadera/sanidad-animal/enfermedades/salmonella/salmonella_general.aspx
- Mroz Z. (2003). Organic acids of various origin and physical chemical forms as potential alternatives to antibiotic growth promoters for pigs. Proceedings from the 9th International Symposium on Digestive Physiology in Pigs, Banff, Canada, 1; 267-293.
- Organization for Economic Cooperation and Development. Meat consumption. [citado 06/05/2018]. <https://data.oecd.org/agroutput/meat-consumption.htm>
- Owusu-Asiedu A., Nyachoti C.M., Baidoo S.K., Marquardt R.R. y Yang X. (2003). Response of early-weaned pigs to an enterotoxigenic *Escherichia coli* (K88) challenge when fed diets containing spray-dried porcine plasma or pea protein isolate plus egg yolk antibody. J. Anim. Sci. 81; 1781–1789.
- Palomo G., García A. (2014). Alternativas a los antibióticos en producción de porcino (I). SUIS 110; 14-20.
- Palomo G., García A. (2014). Alternativas a los antibióticos en producción de porcino (II). SUIS 111; 22-26.
- Proux K., Cariolet R., Fravallo P., Houdayer C., Keranflech A., Madec F. (2001). Contamination of pigs by nose-to-nose contact or airborne transmission of *Salmonella* Typhimurium. Vet. Res. 32; 591–600.
- Red Nacional de Vigilancia Epidemiológica (2017). Resultados de la vigilancia epidemiológica de las enfermedades transmisibles informe anual. Año 2015.
- REGLAMENTO (CE) No 1831/2003 DEL PARLAMENTO EUROPEO Y DEL CONSEJO de 22 de septiembre de 2003 sobre los aditivos en la alimentación animal.
- REGLAMENTO (CE) No 2160/2003 DEL PARLAMENTO EUROPEO Y DEL CONSEJO de 17 de noviembre de 2003 sobre el control de la *Salmonella* y otros agentes zoonóticos específicos transmitidos por los alimentos.



- Suárez J., Latorre M. A. (2014). Nutrición y salud intestinal de los lechones al destete. SUI 105; 14-19.
- Test exacto de Fisher. [citado 06/05/2018]: <http://www.socscistatistics.com/tests/fisher/Default2.aspx>
- Tsioloyannis V.K., Kyriakis S.C., Vlemmas J., Sarris K. (2001). The effect of organic acids on the control of porcine post-weaning diarrhoea. Res. Vet. Sci. 70; 287-293.
- Visscher C.F., Winter P, Verspohl J., Stratmann-Selke J., Upmann M., Beyerbach M., Kamphues J. (2009). Effects of feed particle size at dietary presence of added organic acids on caecal parameters and the prevalence of *Salmonella* in fattening pigs on farm and at slaughter. J. Anim. Physiol. Anim. Nutr. 93;423-430.
- Warnecke T., Gill R. (2005). Organic acid toxicity, tolerance, and production in *Escherichia coli* biorefining applications. Microb. Cell Fact. 4; 25.
- World Health Organization (2018). *Salmonella* (non-typhoidal). [citado 06/05/2018]. [http://www.who.int/en/news-room/fact-sheets/detail/salmonella-\(non-typhoidal\)](http://www.who.int/en/news-room/fact-sheets/detail/salmonella-(non-typhoidal))

Anexo I

Resumen de la norma ISO 6579:2002/Amd 1:2007:

1. Cultivo de la muestra en medio de pre-enriquecimiento no selectivo

Las muestras de animales infectados subclínicamente contienen un pequeño número de bacterias que pueden estar dañadas o debilitadas. Con este paso se busca revitalizar y conseguir la multiplicación de los microorganismos presentes en la muestra para después poder llevar a cabo un cultivo selectivo.

Aunque existen numerosos medios de pre-enriquecimiento, el más utilizado, y el que dicta la norma ISO, es el agua de peptona tamponada (BPW) que logra revitalizar las células de *Salmonella* dotándoles de una condición fisiológica estable. Además, asegura el mantenimiento del pH durante al menos 24h, lo que sumado a un periodo de incubación durante $18h \pm 2h$ a $37^{\circ}C \pm 1^{\circ}C$, favorece la multiplicación bacteriana.

2. Cultivo de enriquecimiento en medio selectivo

Con esta fase se busca la multiplicación en medios selectivos de *Salmonella* a niveles que puedan ser detectados en los medios de cultivo que se usen posteriormente. A su vez, son capaces de inhibir el crecimiento de otras bacterias.

Para esta fase se utiliza el medio Rappaport-Vassiliadis semi-sólido modificado (MSRV), realizando una incubación de $24h \pm 3h$ a $41,5^{\circ}C \pm 1^{\circ}C$. Gracias al verde malaquita que contiene y la adición de un antibiótico (Novobiocina) al medio el crecimiento de la flora competitiva se inhibe, además, al ser semi-sólido se aprovecha de la característica de movilidad que posee la mayoría de serotipos de *Salmonella*.

Sembrado en placas

El fin de esta fase es utilizar medios que permitan el crecimiento selectivo de *Salmonella* y la inhibición de otra flora bacteriana y que, además, permitan diferenciar las colonias de *Salmonella* spp. de las formadas por otras bacterias mediante diferentes colores. Con este fin existen numerosos medios con diferentes agentes selectivos e indicadores. Para conseguir una sensibilidad aceptable se recomienda utilizar como mínimo dos de estos medios. Según la norma ISO 6579:2002 los medios de elección serán el agar verde brillante (BGA) y el XLD (agar xilosa lisina desoxicolato).

La selectividad del agar verde brillante se basa en la alta concentración de este colorante que inhiba las bacterias Gram positivas y la gran mayoría de Gram negativas. Las colonias de *Salmonella* spp. se pueden observar traslucidas con un tono entre el rojo y el rosa con un halo rojo brillante.

En el agar XLD las colonias de *Salmonella* spp. se muestran de un color rojizo con el centro negro gracias a la producción de ácido sulfhídrico. Además, este medio es capaz de inhibir la multiplicación de Gram positivos, debido a la presencia de desoxicolato, y la de coliformes por la acidificación del medio inducida por la lactosa y la sacarosa.

En esta fase la incubación debe ser de 24 h \pm 3h a 37 °C \pm 1 °C.

3. Confirmación bioquímica y serológica

Una vez aisladas morfológicamente las colonias se debe realizar su identificación mediante pruebas bioquímicas. Para esto, como narra la norma ISO, las colonias se siembran en medios que permiten medir su capacidad para utilizar glucosa y sacarosa y producir sulfuros (agar hierro-triple azúcar -TSI-); para descarboxilar la lisina y producir también sulfuros (agar lisina- hierro -LIA-); desdoblar la urea en amoníaco (caldo urea); y degradar el aminoácido triptófano y producir indol (caldo nutritivo con triptona). Gracias a estas reacciones en los medios de superficie y en profundidad se provocarán variaciones de pH que producirán variaciones en el color del medio permitiendo confirmar la presencia o no de *Salmonella* spp.

Anexo II

Prueba ELISA de IDEXX Herdcheck Swine *Salmonella* Ab

Paso	Acción
1. Preparación de muestras	Muestras de suero y plasma Diluya las muestras de suero y plasma en la proporción (1:20) con el diluyente de la muestra (ej. 15 µL de la muestra en 285 µL del diluyente de la muestra). Tenga cuidado de cambiar las puntas de pipeta cada muestra. Las muestras diluidas deben mezclarse bien antes de dispersarlas en la placa tapizada.
2. Distribución de las muestras	<ul style="list-style-type: none">- Tome las placas tapizadas con el antígeno y anote la posición de las muestras en una hoja de trabajo.- Dispense 100 µL de Control Negativo no diluido en los pocillos apropiados.- Dispense 100 µL de Control Positivo no diluido en los pocillos apropiados.- Dispense 100 µL de muestra diluida en los pocillos adecuados. Se recomienda la utilización de una pipeta multicanal para dispensar las muestras
3. Incubación de las muestras	Incube la placa durante 30 minutos a temperatura ambiente (18-25°C) o durante la noche (12-18 horas) entre 2-6°C. Si elige la opción nocturna, la placa debe de sellarse o ponerse en una cámara húmeda.
4. Lavado de la placa	<ul style="list-style-type: none">-Aspire el contenido de los pocillos en un recipiente de desechos adecuado-Lave cada pocillo de 3 a 5 veces con aproximadamente 300 µL de la Solución de Lavado.
5. Dilución del conjugado	Dispense 100 µL de Conjugado anti-Porcino HRP0 en cada pocillo.
6. Incubación del conjugado	Incube durante 15 minutos a temperatura ambiente (18-25°C).
7. Repita la etapa 3	Lavar.
8. Distribución del sustrato	Dispense 100 µL de la Solución de Sustrato TMB en cada pocillo.
9. Incubación del sustrato	Incube durante 15 minutos a temperatura ambiente (18-25°C)
10. Frenado de la reacción	Dispense 100 µL de la Solución de Frenado en cada pocillo para frenar la reacción.
11. Medición de la placa	<ul style="list-style-type: none">- Calibrar el blanco del espectrofotómetro con aire.-Mida y anote los valores de absorbancia a 650 nm.

