



Facultad de Veterinaria  
Universidad Zaragoza

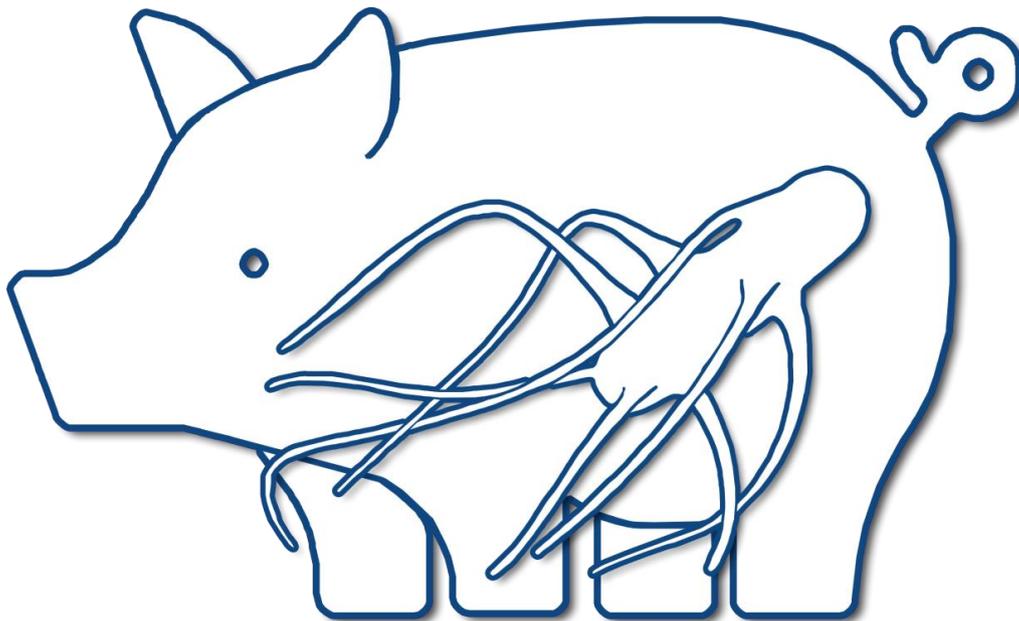


# Trabajo Fin de Grado en Veterinaria

**Control de la salmonelosis porcina mediante la adición de Butirato Sódico encapsulado en la dieta de cerdos de engorde**

---

**The control of pig salmonellosis through the addition of protected sodium butyrate to the diet of fattening pigs**



**Autor:**

Jordi Farrés Garrido

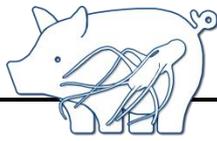
**Directores:**

Raúl Carlos Mainar Jaime

Sara Andrés Barranco

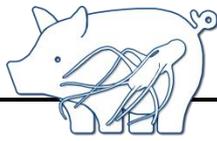
**Facultad de Veterinaria**

**Curso 2015 - 2016**



## Índice

<b>1. Resumen</b> .....	1
<b>2. Introducción</b> .....	2
<b>2.1. La salmonelosis como problema de Salud Pública</b> .....	2
2.1.1. Caracterización del G <sup>o</sup> <i>Salmonella</i> .....	3
2.1.2. Evolución de la salmonelosis humana en Europa y en España .....	4
2.1.3. Principales fuentes de infección.....	6
2.1.4. Importancia del cerdo como fuente de infección .....	7
<b>2.2. La salmonelosis en el cerdo</b> .....	8
<b>2.3. Programas de control</b> .....	9
2.3.1. Situación actual de la salmonelosis en cebaderos Españoles .....	11
2.3.2. Principales estrategias del control en granja .....	11
2.3.3. Dificultades para el control de la infección en el cerdo .....	15
<b>2.4. Estrategias de alimentación para el control de la salmonelosis porcina</b> .....	17
2.4.1. Probióticos.....	18
2.4.2. Prebióticos.....	18
2.4.3. Aceites esenciales.....	19
2.4.4. Ácidos orgánicos.....	19
<b>3. Justificación y objetivos</b> .....	21
<b>3.1. Justificación</b> .....	21
<b>3.2. Objetivos</b> .....	21
<b>4. Metodología</b> .....	22
<b>4.1. Producto utilizado</b> .....	22
<b>4.2. Diseño del estudio</b> .....	22
<b>4.3. Muestreo y análisis laboratoriales</b> .....	22
<b>4.4. Análisis estadístico</b> .....	23
<b>5. Resultados</b> .....	23
<b>5.1. Bacteriología</b> .....	23
<b>5.2. Serología</b> .....	24
<b>6. Discusión</b> .....	25
<b>7. Conclusión</b> .....	25
<b>8. Valoración personal</b> .....	26
<b>9. Bibliografía</b> .....	27
<b>10. Anexos</b> .....	31
<b>10.1. Anexo I: Esquema del protocolo del cultivo bacteriológico</b> .....	31



## 1. Resumen

En los países industrializados la salmonelosis es una de las enfermedades de transmisión alimentaria de mayor incidencia, siendo en la UE la segunda enfermedad de carácter zoonótico más diagnosticada. La tendencia general al aumento en el número de casos de salmonelosis producidos por *S. Typhimurium*, asociada sobre todo con el cerdo (susceptible a la infección y actuando generalmente como reservorio asintomático), ha hecho que sea considerado la segunda fuente más importante de salmonelosis humana en Europa. La salmonelosis porcina es por lo tanto un problema de Salud Pública que los productores deben controlar, y actividades como determinadas prácticas de alimentación en origen (uso de acidificantes, prebióticos, probióticos, etc.), pueden ayudar a reducir el riesgo de infección una vez que los animales entran en contacto con el agente patógeno.

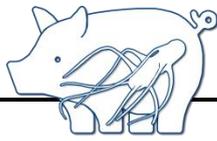
El objetivo del presente trabajo es determinar si el butirato sódico encapsulado puede ser eficaz en la prevención de la salmonelosis porcina tras su administración en el pienso de los cerdos de cebo. Para ello administramos GUSTOR BP70 (NOREL S.A., Madrid) a un grupo de 50 cerdos de una nave de engorde de 100 individuos a lo largo de su estancia en el cebadero. Para comprobar su efectividad efectuamos cuatro análisis microbiológicos utilizando heces como muestra (días 30, 60, 90 tras la entrada al cebo y en el sacrificio), uno utilizando los linfonodos mesentéricos (extraídos al sacrificio) y cuatro muestreos serológicos mediante un ELISA indirecto, estableciendo como punto de corte positivo los animales que presentaron un porcentaje de densidad óptica  $\geq 40\%$ . Los resultados se compararon con los de los otros 50 cerdos de la nave que actuaron como controles.

Analizando los datos obtenidos mediante un análisis de Chi-cuadrado y mediante un modelo mixto de medidas repetidas, observamos que el producto utilizado podría resultar efectivo para el control de *Salmonella* en cerdos de engorde, reduciendo la excreción y exposición de la bacteria. Sin embargo, los resultados no permitieron demostrar su eficacia para reducir la prevalencia general de la infección a su llegada al matadero.

---

### **The control of pig salmonellosis through the addition of protected sodium butyrate to the diet of fattening pigs**

In industrialized countries, salmonellosis is one of the most frequent foodborne diseases. Moreover, it is the second most diagnosed zoonotic disease in the EU. Due to the general trend towards the increase in the number of salmonellosis cases produced by *S. Typhimurium*



– mostly associated to swine, which are infected but they act as asymptomatic reservoir – it is now considered to be the second source of human salmonellosis in Europe.

Swine salmonellosis is thus a Public Health problem which producers must control. Activities, such as determined food practises in farms – use of acidified water or feed, prebiotics, probiotics, etc. – can help to reduce the infection risk once animals are in touch with the pathogen agent.

The objective of the present study is to determine whether the protected sodium butyrate can be effective for prevention of swine salmonellosis after its addition in the feed of fattening pigs. In order to assess it, GUSTOR BP70 (NOREL S.A., Madrid) was provided during all the fattening period to a group of 50 pigs (treatment group) from a total of 100 individuals in the fattening unit. Its effectiveness was tested by a variety of means: bacteriology on faeces collected at 30, 60, 90 days on fattening, and at slaughter; bacteriology on mesenteric lymph nodes, collected at the slaughter; and serology on serum samples (30, 60, 90 days on fattening and at slaughter). The results were compared to the 50 control pigs from the same fattening unit.

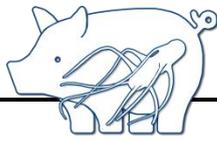
Analysing the resulting data – by means of a *Chi*-squared test and by means of a mixed sample of repeated measures – it was observed that the protected sodium butyrate be effective for *Salmonella* control in fattening pigs reducing the excretion and exposition to the bacteria. However, the results did not allow us to prove their effectiveness in reducing the general prevalence of the infection when arriving to the slaughter house.

## 2. Introducción

### 2.1. La salmonelosis como problema de Salud Pública

La salmonelosis es una infección bacteriana producida por bacterias pertenecientes al género *Salmonella*, siendo de las enfermedades transmitidas por consumo de alimentos más comunes y ampliamente extendidas, afectando anualmente en todo el mundo a decenas de millones de personas y provocando más de 100.000 defunciones (OMS, 2013). En el primer mundo es una de las zoonosis con mayor prevalencia, declarándose solo en la Unión Europea más de 90.000 casos al año. Se ha estimado que el coste de la lucha frente la salmonelosis humana podría ser de hasta 3.000 millones de euros al año en el conjunto de los estados miembros (EFSA, 2015).

La enfermedad se caracteriza por la presentación en el paciente de fiebre alta, dolor cólico, diarrea y náuseas que pueden ir acompañadas de vómito. Los síntomas se manifiestan entre las 6 y 72 horas post infección, pudiendo durar entre 2 y 7 días. De forma general, los casos de



salmonelosis suelen ser leves, produciéndose la recuperación del paciente sin necesidad de tratamiento. Sin embargo, en algunas ocasiones (sobre todo en colectivos de riesgo como niños, personas mayores e inmunodeprimidos) la enfermedad puede causar la muerte del paciente, mayoritariamente por deshidratación o el desarrollo de una septicemia.

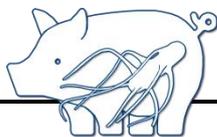
### 2.1.1. Caracterización del género *Salmonella*

Género bacteriano perteneciente a la familia *Enterobacteriaceae*. Se trata de bacterias Gram negativas, catalasa positivas y oxidasa negativas, anaerobias facultativas, sin capacidad de formar esporas, con forma de bacilo y generalmente móviles por la presencia de flagelos peritricos. Como características comunes del género presentan la capacidad de producir ácidos a partir de la utilización de la glucosa, de reducir los nitratos a nitritos, utilizan el citrato como fuente única de carbono, descarboxilan la lisina, la arginina y producen sulfuro de hidrógeno. Toleran altas concentraciones de sales biliares y crecen en presencia de colorantes como eosina, fucsina, azul de metileno o verde brillante, entre otros.

Su temperatura óptima de crecimiento se encuentra entre 35 y 37°C, pero son capaces de crecer dentro de un rango de temperaturas bastante amplio (7 - 47°C) y son necesarias temperaturas superiores a 63°C para destruirlas. A su vez pueden crecer a un pH entre 3,8 y 9,5, y ser capaces de multiplicarse en matrices con actividades de agua ( $a_w$ ) superiores a 0,94. Así, aunque el hábitat natural de este género estaría limitado al tracto digestivo de personas y animales, su resistencia para sobrevivir en diferentes nichos ambientales sugiere que debería aceptarse como un organismo ambiental cuya diseminación es probable que continúe o que incluso incremente.

El género *Salmonella* está constituido por dos especies, *Salmonella enterica* (que a su vez se divide en seis subespecies: *S. enterica* subsp. *enterica*, *S. enterica* subsp. *salamae*, *S. enterica* subsp. *arizonae*, *S. enterica* subsp. *diarizonae*, *S. enterica* subsp. *houtenae* y *S. enterica* subsp. *indica*) y *Salmonella bongori*. Esta clasificación es la aceptada actualmente para el género *Salmonella*, ya que la especie anteriormente llamada *Salmonella subterranea* no pertenece al mismo (Issenhuth-Jeanjean *et al.*, 2014).

*Salmonella* posee antígenos de pared bacteriana (polisacárido somático O), antígenos capsulares (H) y flagelares (Vi). Utilizando la composición antigénica que presentan las distintas salmonelas, podemos dividir cada subespecie en serogrupos (teniendo en cuenta los antígenos de la pared) y estos a su vez en serovariedades o serotipos (según las características de sus antígenos capsulares y flagelares). La gran mayoría (99,5%) de las cepas de *Salmonella* aisladas y de interés sanitario pertenecen a la especie *S. enterica* (Mainar-Jaime *et al.*, 2010). De los



2.659 serotipos que se conocen actualmente, 2.637 pertenecen a la especie *S. enterica*, de los cuales 1.586 se encuentran englobados dentro de la subespecie *enterica*.

De forma general, los distintos serotipos de *Salmonella* son capaces de infectar a un amplio número de especies animales. Dentro de los posibles hospedadores de *Salmonella* se encuentra el hombre, para el que se considera que todos los serotipos son potencialmente zoonóticos. De todos modos, los serotipos que causan las infecciones en humana en el primer mundo son un grupo muy reducido del total existentes, siendo Enteritidis y Typhimurium, los principales causantes de salmonelosis humana en la actualidad.

**Tabla 1: Número presente de serotipos en cada especie y subespecie de *Salmonella***

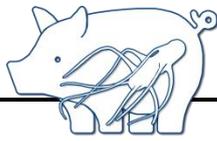
<i>S. enterica</i>	n
subsp. <i>enterica</i>	1.586
subsp. <i>salamae</i>	522
subsp. <i>arizonae</i>	102
subsp. <i>diarizonae</i>	338
subsp. <i>houtenae</i>	76
subsp. <i>indica</i>	13
<i>S. bongori</i>	22
<b>Total</b>	<b>2.659</b>

(“Supplement 2008-2010 (no. 48) to the White-Kauffmann-Le Minor scheme”, Issenhuth-Jeanjean *et al.*, 2014)

### 2.1.2. Evolución de la salmonelosis humana en Europa y en España

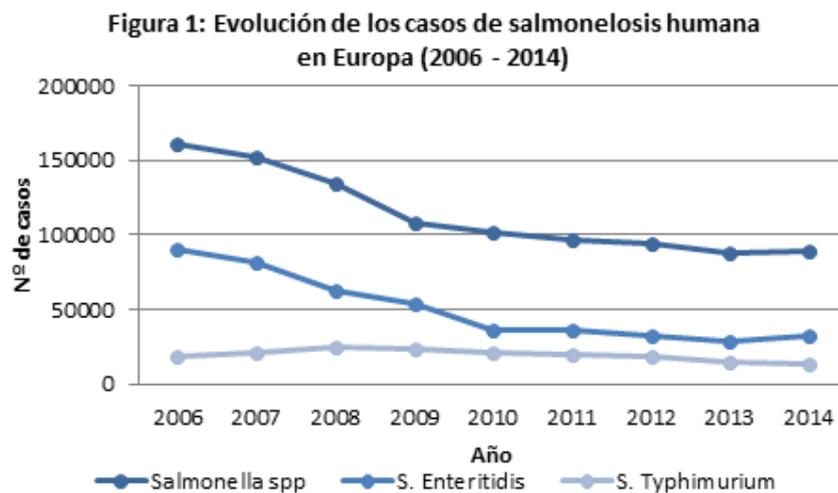
Los casos de salmonelosis humana han ido disminuyendo en el conjunto de la UE en años consecutivos de forma general para todas las especies que comprende el género *Salmonella* (Figura 1). Así pues, desde 2006 a 2013, ha habido una tendencia a la disminución estadísticamente significativa en los casos de salmonelosis en el conjunto de Europa. Sin embargo, el número de casos de salmonelosis declarados en 2014 debidos al consumo de alimentos han experimentado un ligero aumento respecto a 2013.

El pasado 2014 se declararon un total de 90.238 casos de salmonelosis por parte de los 28 estados miembros, siendo 88.715 de los casos confirmados y suponiendo una tasa de notificación en la UE de 23,4 casos por cada 100.000 habitantes (EFSA, 2015). Esto representó un aumento del 15,3% en la tasa de notificación de la UE en comparación con 2013 (20,3 casos por cada 100.000 habitantes). En 2014, el número de casos producidos por los serotipos mayoritarios, *S. Enteritidis* y *S. Typhimurium*, representaron el 70% de los casos humanos con



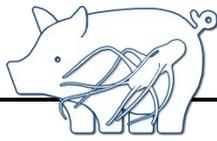
serotipo conocido, manteniéndose como los serotipos más comunes, al igual que en años anteriores.

Si nos fijamos en la notificación de los casos por *S. Enteritidis*, ha sufrido un descenso significativo entre los años 2006 y 2013, pero en 2014 los casos debidos a este serotipo en humanos aumentaron ligeramente. En el caso de *S. Typhimurium* y sus variantes la tendencia es muy distinta. Los niveles se han mantenido más estables entre los años 2006 y 2013, presentando incluso un ligero aumento del número de casos producidos por este serotipo en los años 2008 y 2009. A partir de 2010, la tendencia ha sido presentar un ligero descenso, hasta los presentes datos de 2014.



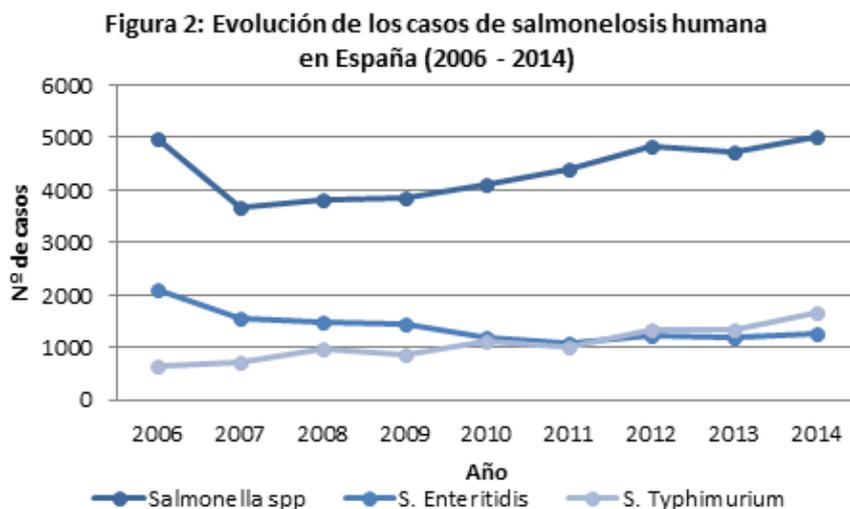
A pesar de la representativa reducción en el número de casos presentados, la salmonelosis sigue siendo la segunda zoonosis más común en los seres humanos en la UE. Es por esto que los Estados miembros no deben bajar la guardia y seguir trabajando día a día por mejorar estos valores, ya que la salmonelosis es un problema real y vigente dentro de Europa.

En el caso de España la situación es muy distinta a la del conjunto de la UE, ya que las infecciones por *Salmonella* se han mantenido mucho más estables en el periodo de años que va desde 2006 a 2014 (**Figura 2**). En el año 2007 sí que se observó una bajada significativa del número de casos respecto al año anterior, pero durante los años 2008 y 2009 se produjo un ligero ascenso de la casuística respecto a 2007. A partir de aquí se fue produciendo un marcado ascenso de los casos, llegando en 2012 a rozar el número de casos producidos en 2006 y llegando a superarlos en 2014. En este año se confirmaron en España 5.008 casos de salmonelosis humana (RENAVE, 2015), lo que representa una subida del 6,33% respecto a 2013 (4.710). Del total de casos producidos en ese año en España por *Salmonella*, el 58,67% correspondieron a los serotipos *S. Enteritidis* y *S. Typhimurium*, suponiendo los serotipos más



importantes igual que en el resto de la UE, pero siendo este segundo más importante dentro de España.

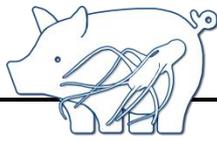
A diferencia que en el resto de los países miembros, el serotipo con mayor casuística en el año 2014 fue *S. Typhimurium* con un total de 1.661 casos, suponiendo un 33,17% del total de los mismos. La tendencia del número de casos provocados por este serotipo ha sido al alza desde 2006, con un ligero descenso en 2009 y en 2011, pero ganando importancia en nuestro país poco a poco. En el caso de *S. Enteritidis*, durante 2014 supuso un total de 1.277 infecciones (25,50%) de los casos de salmonelosis españoles y suponiendo el segundo serotipo más importante del país. Este serotipo muestra en España una ligera tendencia a la baja con el paso de los años, pero sin ser muy marcada y con un ligero repunte de casos en 2012 y 2013. La tendencia del descenso de casos en España producidos por este serotipo se viene produciendo desde años atrás, desde aproximadamente el año 2007.



Los cuadros de salmonelosis son la segunda causa de gastroenteritis bacteriana notificada al SIM (Servicio de Investigación Microbiológica) en España, por detrás de los causados por *Campylobacter*, que continúa representando la principal causa de infecciones de transmisión alimentaria. La tasa de casos confirmados continúa siendo bastante alta (47,6 casos por 100.000 habitantes) comparada con la de la Unión Europea (23,4 casos por 100.000 habitantes en 2014 en la Unión Europea) (EFSA, 2015).

### 2.1.3. Principales fuentes de infección

*Salmonella* se puede encontrar en un gran abanico de animales, tanto domésticos como salvajes y se pueden producir casos en humana por contacto con animales infectados que



generalmente no presentan signos de la enfermedad. Es prevalente en animales de abasto tales como aves, suidos y vacunos, pero también en animales de compañía como perros, gatos, pájaros y reptiles. Estos últimos suponen una fuente significativa de infección debido a que son hospedadores naturales de algunos serotipos de *Salmonella* (Mermin *et al.*, 2004), siendo los niños menores de 5 años el principal grupo de riesgo por entrar en contacto con estos animales o su ambiente y no lavarse posteriormente las manos (CDC, 2015). También se puede producir entre personas la transmisión fecal-oral.

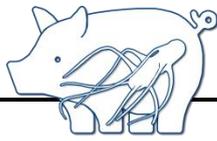
De todos modos, el principal riesgo de infección en humana está asociado al consumo de alimentos contaminados, sobre todo los de origen animal (generalmente huevos, carne de aves, carne de mamíferos y leche), pero también está vinculada a otros alimentos como hortalizas y frutas contaminadas por estiércol (OMS, 2013; EFSA, 2015). *Salmonella* Enteritidis y *S. Typhimurium* son los serotipos mayoritariamente implicados en la infección humana, pudiendo atravesar toda la cadena alimentaria desde los piensos para los animales hasta los consumidores (ya sea en alimentos preparados en casa o en establecimientos de restauración colectiva).

*S. Enteritidis* (cuyo origen son principalmente las aves) ha ido descendiendo en casuística dentro de Europa. El descenso se ha ido produciendo desde la implementación de los programas de control de la salmonelosis aviar por parte de los estados miembros de la UE. En cambio, *S. Typhimurium* (serotipo más predominante sobre todo en el cerdo) se ha mantenido más estable y en el caso de España ha llegado a ser el serotipo más importante, situación que justifica el importante papel que el cerdo parece desempeñar como transmisor de la infección al hombre.

#### 2.1.4. Importancia del cerdo como fuente de infección

Aunque la salmonelosis humana se sigue produciendo sobre todo por el consumo de huevos y carne de ave contaminados, en los últimos años se ha relacionado también con el consumo de carne de cerdo (EFSA, 2015). Esto ha determinado que el cerdo y sus derivados sean considerados una fuente importante de esta infección para el hombre. En este sentido, la UE ha implementado normas que obligan a los Estados miembros a establecer programas nacionales de control para serotipos específicos de *Salmonella* en las aves de corral y los cerdos para proteger la salud humana contra las infecciones por esta bacteria (Reglamento (CE) Nº 2160/2003).

En el caso del cerdo, el porcentaje total de muestras positivas obtenidas a través del control bacteriológico para *Salmonella* en 2014 fue del 7,9% (dato ligeramente inferior al de 2013,



8,1%) y a nivel del rebaño la prevalencia de *Salmonella* fue del 10,1%. El estudio se realizó en granjas de cría y engorde, efectuando el muestreo en distintas etapas del proceso productivo (granja, matadero o etapa no especificada) y mediante distintos tipos de muestras (heces, ganglios linfáticos, muestras de órganos o tejidos, muestras de la canal y muestras ambientales). La prevalencia en las canales y la carne disminuye, siendo positivas a *Salmonella* 0,5% de las muestras de carne fresca de cerdo, que supuso una bajada del 0,2% respecto a 2013 (EFSA, 2015). *S. Typhimurium* ha sido el serotipo predominante aislado tanto en cerdos como en sus canales durante los últimos 5 años. Del total de aislamientos de *Salmonella* que se efectuaron en 2014, el 54,7% correspondió a *S. Typhimurium* (EFSA, 2015).

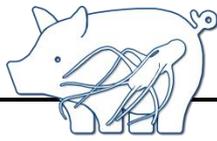
El hecho de que hasta el momento no se haya llevado a cabo ninguna estrategia de control sobre esta infección en el porcino a nivel comunitario, como sí se hizo en su momento en las aves, ha permitido el mantenimiento e incluso su aumento en la cabaña porcina europea, convirtiendo el consumo de cerdo en un posible peligro para la salud humana. Debido a esto, se hace necesario conocer cómo se comporta *Salmonella* en nuestros suidos e implementar medidas de prevención y control para que la presencia de esta bacteria disminuya en la producción primaria.

## 2.2. La salmonelosis en el cerdo

Generalmente, la principal ruta de infección de los animales es por vía oral, tras el contacto con heces de individuos infectados, pero también otros mamíferos, aves, roedores, insectos, el hombre, el agua o el alimento contaminado y el ambiente de la granja (heces, polvo, equipos, suelos, etc.). También se puede producir la infección por vía aerógena, pero es menos común que la vía oral. Pueden infectarse desde los cerdos recién destetados hasta los mayores de 5 meses. Dosis altas de bacterias (mayores a  $10^5$  bacterias) son capaces de superar la acidez del estómago y la acción bacteriostática de las sales biliares y alcanzar el intestino delgado.

El periodo de incubación es variable, puede durar desde varias semanas a pocas horas, multiplicándose las bacterias en las células epiteliales de la mucosa del íleon, apareciendo en la lámina propia y submucosa del intestino una reacción inflamatoria aguda con daño vascular y trombosis que provoca la necrosis de la mucosa. Suelen atravesar la pared intestinal e invadir los ganglios linfáticos mesentéricos, donde suelen acantonarse.

En los casos en que consigue evadir las defensas intracelulares, pasar a sangre y multiplicarse en los macrófagos, las bacterias alcanzarán distintos órganos como hígado, bazo, pulmones, etc., y provocarán una infección generalizada y septicemia. La sintomatología de la enfermedad, según los órganos afectados y el serotipo de *Salmonella* implicado, cursa con



fiebre continua o intermitente, diarrea líquida amarillenta, síntomas respiratorios y cianosis, e incluso síntomas nerviosos. Si el animal no muere a causa de la infección, se produce una evolución a la forma subclínica.

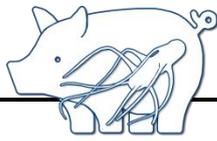
En los casos subclínicos, la infección queda localizada en los ganglios mesentéricos. En la mayoría de los casos se da esta forma asintomática, de modo que los animales afectados se comportan como reservorios de la infección. Esto es así porque la localización intracelular de la bacteria actúa en muchos casos como una barrera frente a los antibióticos de uso común. En los casos subclínicos, la excreción de *Salmonella* se ve favorecida por el estrés. Así, los portadores asintomáticos son una de las principales fuentes de salmonelosis, tanto para los animales como para los productos cárnicos elaborados a partir de ellos (Mainar-Jaime *et al.*, 2010).

Los cerdos son susceptibles a la infección por una gran variedad de serotipos de *Salmonella*, sin embargo los que se presentan con mayor frecuencia son *S. Choleraesuis* y *S. Typhimurium*. El serotipo *S. Choleraesuis* está adaptado al cerdo y es capaz de provocar infecciones con tasas de morbilidad y mortalidad altas, pero presenta una escasa o nula casuística en España y Europa. Por el contrario, *S. Typhimurium*, produce mayoritariamente infecciones que cursan de forma asintomática, por lo que no suelen resultar un problema sanitario importante para el ganadero y no son reconocibles ni en el cebadero ni tras el sacrificio en matadero. Sin embargo, ante cepas de *S. Typhimurium* de mayor virulencia o estados de inmunosupresión de los animales, este serotipo puede llegar a causar graves problemas que se identifican primordialmente con un síndrome enterocolítico, que suele afectar a cerdos desde el destete hasta los cuatro meses de edad.

En la infección por *S. Typhimurium* la mortalidad suele ser baja, pero la morbilidad puede llegar a ser alta. En la necropsia se observa principalmente una colitis necrótica focal o difusa, pero también puede observarse en la mucosa del íleon, ciego y colon, una enteritis ulcerativa o necrotizante (Plonait y Bickhardt, 2001). Los nódulos linfáticos mesentéricos están infartados, y en la mucosa intestinal se observan zonas enrojecidas que pueden tener restos amarillento-grisáceos. El contenido en ciego y colon suele ser escaso y teñido con restos de bilis.

### 2.3. Programas de control

Uno de los principales objetivos del control de *Salmonella* en el ganado porcino es la reducción de la prevalencia de la misma en los cebaderos. La reducción de la presencia de la misma al final del cebo se traduce en la disminución del potencial riesgo que supone el consumo de carne de cerdo. Este ha sido el pilar de los programas de control que iniciaron algunos países

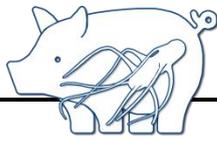


Europeos, que se han centrado en controlar la presencia de *Salmonella* en las explotaciones (Argüello *et al.*, 2016).

Varios estudios indican que la *Salmonella* aislada en canales a nivel de matadero proviene sobre todo de infecciones ocurridas durante la fase de engorde (Visscher *et al.*, 2011; Argüello *et al.*, 2012). Los anticuerpos maternos proporcionan protección frente a la infección, pero la llegada al engorde coincide prácticamente con niveles nulos de anticuerpos calostrales, ya que estos no suelen persistir más allá de las 8 semanas de edad. Esto hace especialmente vulnerables a los animales en este momento, que entrarán en contacto por primera vez con la flora endémica presente en las granjas y con nuevas fuentes de infección, situación que se agudizará si coincide con la mezcla de múltiples procedencias (Mainar-Jaime *et al.*, 2010).

La mayor parte de las infecciones tendrían lugar entre el final del primer tercio e inicio del segundo tercio del engorde, etapa en la que los animales ya han tenido oportunidad de entrar en contacto con el agente y este de multiplicarse hasta los niveles necesarios para causar infección. Teniendo en cuenta que tras la infección un animal tarda una media de 15 días en producir anticuerpos, el pico de seroconversión frente a *Salmonella* en explotaciones infectadas suele ocurrir entre el segundo y el tercer tercio del periodo de cebo. En este punto será donde se puede detectar la presencia de *Salmonella* en los animales, suponiendo esto que los mismos pueden llegar a matadero excretando la bacteria. Estos nuevos ciclos de infección en el engorde, constituyen la principal fuente de infección en este periodo de cebo y determinan que el engorde sea considerado como una etapa crítica para la presencia de *Salmonella* en los animales que se destinan al matadero. Por esta razón, a partir de ahora nos vamos a centrar en el control de la salmonelosis a nivel de cebadero, ya que en otras etapas del ciclo productivo las medidas a tomar podrían ser otras o un poco distintas.

De acuerdo con las directrices de la UE, los distintos países deberían haber establecido en 2012 programas de vigilancia y control para cumplir los objetivos de reducir la prevalencia de *Salmonella*, sin embargo aún no se han concretado. Este hecho es el principal motivo por el que en la actualidad países como España, al no ser obligatoria la implantación del programa nacional de control de *Salmonella* en porcino, todavía no han desarrollado el mismo. Aun así, la importancia que tiene a nivel sanitario y como posible barrera comercial para limitar las importaciones, hacen necesario que este plan se tenga que poner en marcha en un futuro próximo.



### 2.3.1. Situación actual de la salmonelosis en cebaderos Españoles

Debido a la importancia que tiene *Salmonella* para la salud humana (como ya hemos visto anteriormente), se han ido realizando en los últimos años estudios para conocer la prevalencia de *Salmonella* spp. en las poblaciones de cerdos de distintos países. La EFSA llevó a cabo un estudio de referencia entre los años 2006 y 2007 con objetivo de estimar, a partir de muestras de matadero, la prevalencia de cerdos infectados por este género bacteriano y la distribución de las distintas serovariedades. En este estudio se observó que la prevalencia fue muy variable entre los distintos países de Europa, oscilando desde valores nulos como en el caso de Finlandia (0%), hasta los valores más altos del conjunto de países presentados por España (29%). La prevalencia media de cerdos infectados por *Salmonella* spp. en la UE fue del 10,3% (EFSA, 2008 Parte A), lo que sitúa a España muy por encima de la media europea.

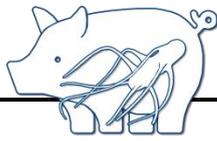
En un estudio realizado en la Comunidad Autónoma de Aragón, se analizaron los nódulos linfáticos mesentéricos de 1.997 cerdos de un total de 80 explotaciones de cebo (25 animales de media por cada granja). En esta experiencia se aisló *Salmonella* spp. en el 31% de los animales y el 94% de las explotaciones, observándose una prevalencia en los rebaños positivos comprendida entre el 4 y el 88%, siendo en la mayoría de ocasiones mayor del 10% (Vico et al, 2011).

Los cerdos infectados parecen ser la principal causa de contaminación por *Salmonella* en el matadero (Visscher *et al.*, 2011), por lo que no es difícil de entender la alta prevalencia de contaminación de canales porcinas observada en España en los últimos años. Un estudio realizado en el año 2012 en cuatro mataderos españoles observó que el 39,7% de las canales de porcino analizadas estaban contaminadas por *Salmonella* spp. (Argüello *et al.*, 2012). Por todo ello resulta imprescindible tomar medidas que reduzcan la incidencia de *Salmonella* en la granja para minimizar su transmisión a la cadena alimentaria.

### 2.3.2. Principales estrategias del control en granja

Podemos considerar a una granja de producción porcina como una unidad que presenta unos límites definidos y con numerosos compartimentos, ya sean biológicos (cerdos, personas y vectores) y no biológicos (pienso, instalaciones, agua, vehículos, etc.) (Barber *et al.*, 2002). Considerando las posibles vías de infección de *Salmonella* (feco-oral y aerógena), no resulta difícil entender el papel que muchos de estos factores pueden tener en la diseminación del patógeno.

Para realizar cualquier estrategia de control, el punto de partida es conocer el grado de implicación que va a tener el personal, tanto los ganaderos como los veterinarios. Teniendo en



cuenta que el control de los puntos críticos de la infección se asocia primordialmente con la implementación de estrictas medidas de bioseguridad e higiene en las granjas, el primer problema que surge es, el correcto cumplimiento de esas medidas básicas dependientes directamente del ganadero (Mainar-Jaime *et al.*, 2010).

Por ello es fundamental la formación del personal de granja. Los ganaderos deberán entender las razones por las que se realiza el control (importancia de la infección, problema de Salud Pública, demanda del consumidor, posible barrera comercial, bioseguridad, mecanismos de transmisión de *Salmonella* y herramientas de control a su disposición) y recibir apoyo para llevarlo a cabo. Ante una infección que cursa de forma subclínica, que es invisible a los ojos del ganadero, estos aspectos serán más que necesarios.

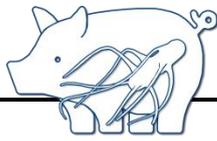
El segundo nivel de actuación es la formación del veterinario. Deben ser los responsables de supervisar un plan de control específico para cada granja en función de los conocimientos científicos de que se dispone sobre la salmonelosis y la situación de la explotación. Además será el responsable de aportar el apoyo que necesita el ganadero y animar al mismo a trabajar de forma adecuada para que las medidas de control aplicadas sean un éxito.

A continuación, procederemos a analizar de forma más detallada los principales factores de riesgo y estrategias de prevención que hay que tener en cuenta en una explotación para garantizar el control de salmonelosis en nuestras granjas de cebo. En las granjas se establecen continuamente contactos con diferentes factores externos que pueden introducir el patógeno en las instalaciones. Es por ello que dispondremos de una serie de medidas generales (que contribuyen a prevenir la aparición de cualquier enfermedad) y por otra parte una serie de medidas más específicas (encaradas ya específicamente a la prevención de la salmonelosis).

Las **medidas generales** de control no son más que prácticas correctas tanto de bioseguridad como de higiene. Sin estos dos pilares, complementados por un plan de formación específico sobre estos aspectos, el plan de control muy probablemente será un fracaso. A continuación trataremos los aspectos más relevantes y básicos, todos igual de importantes para el adecuado funcionamiento de la explotación.

#### **Medidas de bioseguridad pasivas**

Disponer de vallado completo de la explotación que evite la entrada de personas o animales, de un muelle de carga que permita evitar el contacto directo de la explotación con la caja del camión, un vestuario con una correcta delimitación de zona sucia y limpia, garantizar la descarga de pienso, materiales o la recogida de cadáveres desde fuera del perímetro de la explotación, realizar un correcto control de visitas y la utilización de indumentaria exclusiva de



la explotación son unas muy buenas prácticas higiénicas para garantizar la seguridad de la explotación desde el minuto cero.

### **Limpieza y desinfección**

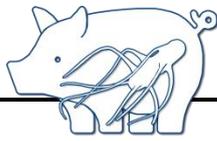
En los locales vacíos habrá que realizar estas prácticas después de la salida de cada lote, incluyendo comederos, bebederos y, a ser posible, fosas de purín. Hay que prestar especial atención en prevenir la acumulación de suciedad bien sea en corrales o en equipos. Se entiende por limpieza a la acción de eliminar la suciedad visible y debemos eliminarla porque es útil para los microorganismos, que la utilizan de soporte, elemento nutritivo y elemento de protección (Marco, 2012). Se entiende por desinfección la eliminación o destrucción de los microorganismos presentes en las superficies, objetos o ambiente y que pueden afectar desfavorablemente a la salud de las personas, animales o a la seguridad de sus productos derivados (Mainar-Jaime *et al.*, 2011).

### **Control de vectores**

*Salmonella* puede vehicularse a través de múltiples vectores presentes en las explotaciones. Pájaros, roedores, insectos e incluso otros mamíferos (ya sean domésticos o salvajes) pueden actuar como reservorios de la bacteria (Funk *et al.*, 2004). Dentro de todos estos vectores, cabría destacar aves y roedores como de los más significativos. Son varios los estudios que describen una asociación significativa entre la seropositividad a *Salmonella* con la falta de barreras (redes, telas, etc.) para controlar la entrada de pájaros en las instalaciones y la falta de programas de control frente a roedores (Mejía *et al.*, 2006; Andrés-Barranco *et al.*, 2014). De todos modos, no podemos olvidarnos del resto de vectores anteriormente mencionados. Mantener un correcto control de insectos y evitar la entrada de otros animales en las naves (perros y gatos sobre todo), también ayudará en controlar la propagación de la enfermedad.

### **Agua y Alimentación**

La administración de agua contaminada a los animales, es otra de las causas responsable de la seropositividad de la granja. Por este motivo, resulta indispensable tratar el agua mediante cloración, uso de peróxidos, etc., para prevenir la contaminación del agua, ya sea en origen (principalmente si procede de fuentes subterráneas), por empleo de depósitos o por culpa de los sistemas de distribución de la granja. La calidad bacteriológica del agua sigue siendo una asignatura pendiente en muchas granjas, ya que consiste en tener una fuente de agua de bebida de calidad (no siempre se cumple) y en evitar que esta calidad empeore a lo largo del sistema de distribución (depósitos, canalizaciones, etc.).



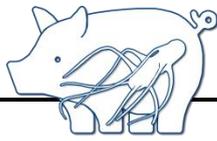
Referente al alimento, hay que extremar la vigilancia en las explotaciones para garantizar que el pienso no entre en contacto con restos de producto en mal estado, polvo, agua, piensos sin tratar y también con los vectores anteriormente mencionados, ya que suponen un claro riesgo para que éste se contamine. Por ello es muy importante asegurar el cerrado de la tapa de los silos, además de controlar la aparición de fisuras o agujeros en las cubiertas. Se deberán realizar vaciados periódicos de los silos para llevar a cabo una limpieza y desinfección, con el fin de prevenir que restos de producto se pudieran adherir y fermentaran en las paredes. Estos últimos años se ha mejorado en lo que a higiene del pienso se refiere y los ganaderos cada vez están más concienciados de la importancia que tiene almacenarlo correctamente en granja (Marco, 2012). También deberá extremarse la higiene en tolvas y comederos, ya que por su contacto directo con las heces y las secreciones de los animales suponen una importante fuente de infección.

#### **Prácticas de manejo y logística de la explotación:**

Una práctica indispensable en las explotaciones de engorde, es la minimización del número de procedencias de los animales que van a entrar en la explotación. Si realizamos esto, ganaremos en sanidad en nuestra explotación, pues se ha descrito una asociación clara entre la entrada en las granjas de engorde de animales procedentes de múltiples orígenes y una mayor seropositividad a *Salmonella* (Creus *et al.*, 2014). También debemos alojar los animales en las mejores condiciones posibles, ajustando la densidad en su número justo por corral de acuerdo a su peso vivo y proporcionando las condiciones ambientales adecuadas para cada fase de producción, en especial la temperatura, evitando grandes oscilaciones térmicas.

El manejo de animales por lotes y la aplicación de la técnica del Todo dentro-Todo fuera (TD/TF), como mínimo por salas o edificios, también contribuye a reducir el riesgo de contaminación por *Salmonella*. Utilizar esta dinámica de trabajo combinada con las otras medidas ya mencionadas, es idóneo no sólo para el control de la infección, sino para el control del estado sanitario en general en las explotaciones. Estos sistemas no evitan la entrada del patógeno, pero permiten una profunda limpieza y desinfección y reducen las continuas reinfecciones procedentes del ambiente. Claramente, la efectividad de los sistemas TD/TF vienen condicionada por la duración del vacío sanitario. En este sentido, periodos de vaciado y limpieza inferiores a un día serían insuficientes, además se ha visto que incrementan el riesgo de excreción de *Salmonella* en cerdos de engorde (Mainar-Jaime *et al.*, 2010).

Otro aspecto a tener en cuenta es el control sanitario de los animales, especialmente la prevención de problemas entéricos. El riesgo de excreción de *Salmonella* se incrementa



claramente ante la presencia de otros patógenos digestivos causantes de brotes de diarrea, como por ejemplo *Lawsonia intracellularis*, *Brachyspira hyodysenteriae*, *Escherichia coli*, etc., y en especial si previamente se han producido brotes clínicos de salmonelosis (Mainar-Jaime *et al.*, 2010).

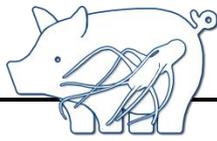
Por último, si en nuestra explotación tenemos animales de distintas edades, es importante que cada fase de producción disponga de su material, ropa y calzado específico y organizar las rutinas de trabajo siguiendo el sentido de menor a mayor edad, para de este modo reducir el posible nivel de exposición a *Salmonella* por parte de los individuos más jóvenes y que posiblemente no estén inmunizados.

Por **medidas específicas** de control, entendemos la serie de medidas dirigidas expresamente al control de *Salmonella* y diseñadas individualmente para cada granja tras la realización de una auditoría sanitaria y una toma de muestras. Existirán granjas que por sus características particulares deberán atender a factores concretos que no existen en otras explotaciones. Estas medidas pueden ir desde cambiar la presentación del pienso (de granulado a harina), el tamaño de partícula del mismo, la inclusión de ciertas materias primas fibrosas, la utilización de dietas acidificadas (mediante ácidos orgánicos o por fermentación previa), el uso de probióticos, administración de vacunas, etc. Se trata de medidas muy diversas que serán implantadas atendiendo a las necesidades específicas de la explotación y dependiendo de su estatus sanitario.

Una vez iniciadas las medidas frente al control de *Salmonella*, es indispensable la monitorización continua de las mismas, y más tratándose de una enfermedad con un patrón de infección tan cambiante como ésta. Periódicamente deberían revisarse las medidas de control implementadas para supervisar que se están aplicando y también para verificar que se están realizando correctamente. El estudio de la evolución de la prevalencia de la infección en la explotación también se realizará de forma periódica mediante vigilancia serológica y su frecuencia variará en función del manejo de la explotación.

### 2.3.3. Dificultades para el control de la infección en el cerdo

La salmonelosis es una infección con una dinámica muy variable, lo que la hace por ello más imprevisible. *Salmonella* se trata de una bacteria resistente que hace que la podamos encontrar no sólo en los numerosos hospedadores sino también en los ambientes contaminados por ellos. Esta característica de persistencia y ubicuidad en el ambiente determina que en cada explotación se generen dinámicas de transmisión particulares, ya que

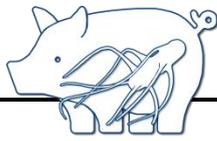


pueden variar en función de las características de las explotaciones dependiendo de su tipo, del manejo de los animales o incluso de la época del año en que nos encontremos (en verano y otoño suelen ser épocas de mayor riesgo).

Además se trata de una infección de difícil detección, ya que cursa generalmente de forma subclínica y por lo tanto es asintomática (excreción intermitente y además con bajos recuentos microbianos), siendo las técnicas de diagnóstico de las que disponemos de limitada sensibilidad y especificidad. A día de hoy, las explotaciones españolas presentan unos niveles muy elevados de prevalencia, lo que dificulta que se puedan obtener unos logros inmediatos tras el inicio de un programa de control y por lo tanto su control debe abordarse con una perspectiva a medio-largo plazo. Todas estas cualidades que presenta *Salmonella* y sus niveles de prevalencia, hacen que su control sea muy complicado, incluso ejecutando de forma correcta las estrategias de control mencionadas en el apartado anterior.

En 2003 entró en vigor en Europa el Reglamento CE nº 1831, mediante el cual se establecía que al inicio de 2006 se prohibía la utilización de antibióticos en la UE como promotores del crecimiento. La administración de forma continuada de los mismos a dosis subterapéuticas, facilitó la aparición de resistencias antibióticas por parte de las bacterias (Witte, 1998), lo que condujo a que los estados miembros tomaran esta decisión. La aparición de cepas de *Salmonella* resistentes se ha incrementado en los últimos años y muchos de los casos en humana se producen por vía alimentaria debido al consumo de alimentos de origen animal (Arlet *et al.*, 2006). La EFSA cada año realiza estudios a nivel europeo para detectar las resistencias que han desarrollado las bacterias frente a los antibióticos disponibles en el mercado. Para 2014 los porcentajes más elevados de resistencia frente a antibióticos por parte de *Salmonella* spp fueron descritos en tetraciclinas (30,3%), sulfonamidas/ sulfametoxazol (28,6%) y ampicilina (28,2%). Aunque en menor medida, también se detectaron resistencias frente ciprofloxacina, cefotaxima, ceftazidima, colistina y trimetoprima-sulfametoxazol (EFSA, 2016). Se hace por ello imprescindible la vigilancia de la evolución de las resistencias a los antimicrobianos en este género bacteriano, ya que si estas siguen aumentando podría convertirse en un problema de Salud Pública aún mayor.

Actualmente, una de las posibles estrategias de control que existen en granja para ejercer el control frente a *Salmonella* es la estimulación del sistema inmunitario mediante la aplicación de vacunas. Existe una extensa literatura referente a este tema, ya que se ha trabajado mucho sobre ello (de Ridder *et al.*, 2014). Al vacunar frente *Salmonella*, la utilización de vacunas vivas atenuadas presenta ciertas ventajas frente a las inactivadas, ya que promueven una respuesta de base celular que *a priori* es ideal para los patógenos intracelulares facultativos como



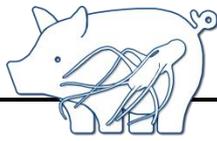
*Salmonella*. Además si las administramos oralmente vamos a conseguir que se produzcan inmunoglobulinas A (IgA) en el intestino, el principal componente del sistema inmunitario en el control de patógenos digestivos. Sin embargo, estas vacunas presentan desventajas como la necesidad de retirar cualquier tratamiento con antibióticos durante la administración oral de la vacuna, su coste y el potencial riesgo de virulencia o bioseguridad. Por ello, el desarrollo de vacunas inactivadas sigue siendo una alternativa de menor coste, fácil administración y mayor seguridad. La vacunación mediante vacuna inactivada al comienzo del cebo con revacunación a las 3 semanas consigue reducir drásticamente la eliminación de *Salmonella* en heces y su presencia en ganglios linfáticos mesentéricos cuando el serotipo de la infección coincide con el de la vacuna (Argüello *et al.*, 2016).

Esto significa que las vacunas subministran protección homóloga, sin necesidad de administrar una autovacuna, pero cuando el serotipo de la vacuna y el de la infección no coinciden, la vacuna no ofrece protección frente a la infección, siendo la prevalencia de eliminación en heces muy parecida a la de animales sin vacunar (Argüello *et al.*, 2016). Que no haya protección heteróloga supone una desventaja para la vacunación, ya que en una misma explotación puede que estén presentes varios serotipos de *Salmonella*. Otro aspecto negativo asociado a la vacunación, es el desarrollo de anticuerpos frente a la bacteria que no se pueden diferenciar de los producidos por el transcurso de una salmonelosis, suponiendo esto un problema para el análisis serológico.

Así pues, el control de la salmonelosis porcina requerirá de métodos alternativos que eviten en lo posible el uso de antibióticos y que apoyen a la vacunación (puede reducir la presión de infección pero su efecto es insuficiente) y las estrategias generales de control anteriormente mencionadas. Entre las medidas de control propuestas para mejorar la resistencia de los animales a las salmonelosis destacan determinadas estrategias de alimentación, que han demostrado ser efectivas y deberían servir de complemento en las explotaciones.

#### **2.4. Estrategias de alimentación para el control de la salmonelosis porcina**

El principio común de estas herramientas es el de promover un ambiente en el tracto digestivo que, por un lado, favorezca la flora beneficiosa y que, por otro, sea hostil para las bacterias patógenas como *Salmonella*. A continuación haremos una descripción de algunas de las propuestas que se han mostrado como más eficaces y que han despertado mayor interés como complemento al control de *Salmonella* en las explotaciones porcinas.



#### 2.4.1. Probióticos

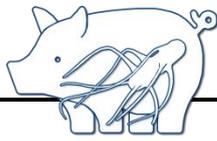
Se definen como microorganismos viables de diferentes especies de *Bacillus*, *Lactobacillus*, *Bifidobacterium*, *Saccharomyces*, etc. que suplementados en la dieta en cantidades adecuadas ejercen un efecto beneficioso sobre la salud (FAO/WHO, 2002). Generalmente se utilizan mezclas de distintos microorganismos, ya que su combinación ha demostrado ser más efectiva debido a su efecto sinérgico. Estas cepas probióticas presentan varios mecanismos mediante los cuales actuarían contra patógenos como *Salmonella*.

Se ha descrito un incremento en los productos de fermentación, ácido láctico y ácidos grasos de cadena corta, que provocarían la disminución del pH intestinal, y a su vez producirían compuestos antibacterianos (agua oxigenada, bacteriocinas) que inhibirían el crecimiento de otras bacterias. También se ha descrito que podrían promover fenómenos de exclusión competitiva al competir con las bacterias patógenas tanto por nutrientes como por receptores de adhesión de la mucosa intestinal. Por último, no se descarta un efecto inmunoestimulador tanto a nivel de la mucosa intestinal como sistémico, debido a la interacción de estas bacterias probióticas con la membrana de la mucosa. Las últimas tecnologías de encapsulación están ayudando a solucionar algunas de las limitaciones que presenta la incorporación de probióticos en los piensos como su viabilidad durante el proceso de fabricación y almacenaje del pienso, así como durante el tránsito por el tracto intestinal convirtiéndolos en una opción apetecible en un futuro próximo, pero que a día de hoy no es eficaz del todo.

#### 2.4.2. Prebióticos

Se trata de 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). Son especialmente interesantes por su actividad protectora frente a *Salmonella* los oligosacáridos no digeribles y, concretamente, los fructooligosacáridos y la inulina, los galactooligosacáridos, los transgalactooligosacáridos y la lactulosa. Se caracterizarían por presentar tres propiedades principales: no se absorben o hidrolizan en estómago o intestino delgado; son selectivos para las bifidobacterias; y su fermentación tiene efectos beneficiosos a nivel luminal y sistémico.

El principal mecanismo de acción de los prebióticos se atribuye a su efecto sobre la fermentación al servir los productos de la misma como substratos selectivos que promueven el crecimiento de bacterias beneficiosas que presentan una actividad competitiva frente a *Salmonella*. También se ha descrito su efecto inmunoestimulador a nivel de la mucosa



intestinal y sistémico (Delzenne, 2003) y de mejora en las defensas del intestino, como por ejemplo incrementando el grosor de las mucinas.

#### 2.4.3. Aceites esenciales (AE)

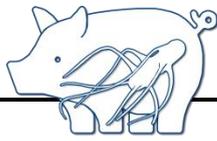
Son esencias volátiles extraídas de plantas aromáticas por medio de vapor, destilación, prensado o extracción con disolventes. Su mecanismo de acción no está bien definido, al tratarse de una mezcla de distintos compuestos volátiles con distinta naturaleza química, es muy probable que su actividad antimicrobiana se deba a la combinación de varios efectos. En general, parece que actúan aumentando la permeabilidad de la membrana citoplasmática bacteriana, lo que conlleva a la salida de iones y la muerte celular (de Lange *et al.*, 2010). Sus efectos mejoran con niveles bajos de pH y oxígeno, condiciones generadas por los lactobacilos y otras bacterias intestinales.

Existen una gran cantidad de estudios realizados en *broilers*, pero en porcino los trabajos que valoran *in vivo* sus efectos como método de control de *Salmonella* se han centrado en determinar mejoras en los rendimientos productivos en lechones destetados y modificaciones de la microbiota intestinal. Aunque a veces estos aditivos han mostrado una gran efectividad en experimentos *in vitro*, los resultados no se ha trasladado a las pruebas *in vivo* (de Lange *et al.*, 2010). Así pues, los AE podrían servir como método de prevención a la presentación de salmonelosis en cerdos, no obstante se requieren más estudios en condiciones naturales de explotación sobre animales mayores y periodos de tratamiento más largos que evalúen la eficacia de estos productos.

#### 2.4.4. Ácidos orgánicos

Se trata de compuestos que se pueden adicionar tanto en alimento como en agua de bebida y mejoran la salud intestinal y promueven el desarrollo de la microbiota beneficiosa en el intestino. Su adición puede resultar efectiva no solamente por su actividad antimicrobiana en el pienso o agua sino, también por sus efectos en el tracto gastrointestinal de los animales. Su importante actividad antimicrobiana se produciría por dos mecanismos principales: por la alteración del pH extracelular; y por el efecto de la forma no disociada de los ácidos que, tras penetrar al interior celular de la bacteria, se disocian y disminuyen el pH intracelular provocando la muerte celular (este sería el efecto más importante).

Los mecanismos que podrían explicar este efecto contra *Salmonella* son varios. Diversos estudios atribuyen a los ácidos un refuerzo de la barrera gástrica frente a la entrada de *Salmonella*, debido al incremento en la concentración total de ácidos y a la consiguiente



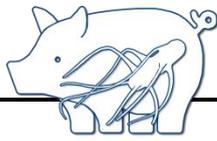
reducción en el pH ocurrida principalmente en tramos anteriores del tracto gastrointestinal, donde normalmente son absorbidos los ácidos. Además, modularían el equilibrio intestinal favoreciendo la proliferación de bacterias lácticas (mucho más tolerantes a un ambiente ácido que *Salmonella*), productoras de bacteriocinas y competidoras directas de *Salmonella* por los sustratos y los receptores de adhesión al epitelio (Creus *et al.*, 2014). También se ha descrito que algunos ácidos, principalmente el butírico y el caprílico, reducirían la expresión de determinados genes de patogenicidad de *Salmonella*, por lo que disminuirían su capacidad para colonizar el epitelio (Van Immerseel *et al.*, 2004 y 2006).

Una importante limitación de los ácidos orgánicos para el control de *Salmonella*, reside en su rápida absorción en los tramos proximales del intestino, siendo los tramos distales del intestino (íleon, ciego y colon) donde mayoritariamente la bacteria suele adherirse y colonizar. Esta desventaja actualmente se puede superar mediante tecnologías de microencapsulación, evitando la disolución total del ácido al inicio del tracto digestivo. Consiguiendo de este modo, que llegue al tramo distal.

Existen numerosos estudios que indican el efecto inhibitor sobre *Salmonella* de los ácidos, aunque los resultados de eficacia obtenidos hasta ahora son muy variables. La eficiencia de los tratamientos con ácidos orgánicos varía de unos estudios a otros, y los resultados dejan entrever que el éxito depende del ácido o de la mezcla empleada, de su concentración y de la duración del tratamiento. Con el objetivo de profundizar en el conocimiento sobre su utilidad para controlar *Salmonella*, a lo largo de los últimos años se han realizado varias pruebas de campo.

En este sentido, Argüello y colaboradores publicaron a inicios de 2016 los datos de varias pruebas en las que limitaron la duración y concentración de los tratamientos. Se administraron los compuestos al final del periodo de cebo, para reducir la prevalencia en granja y buscar un efecto en el momento del sacrificio. Los resultados globales de estas pruebas demostraron que los tratamientos con ácidos orgánicos reducían la presencia de *Salmonella* en la granja, ya que se redujo de forma significativa tanto el número de cerdos eliminadores en heces, como el porcentaje de cerdos positivos en muestras de sangre.

Sin embargo, el efecto no fue inmediato en los animales que recibieron este tratamiento, requiriendo al menos de 4 semanas de administración para conseguir efectos positivos a estas concentraciones y, aunque se consiguió la reducción de la tasa de eliminación, seguía habiendo animales eliminadores en granja que contaminaban el ambiente. Es por esto que son necesarios más trabajos que permitan determinar mezclas, formas, dosis y pautas de



administración óptimas, ya que su efecto es muy variable y el éxito del tratamiento depende de ello.

### 3. Justificación y objetivos

#### 3.1. Justificación

La salmonelosis es la segunda zoonosis de transmisión alimentaria más importante de Europa. El cerdo está considerado la 2ª fuente más importante de infección de salmonelosis humana en Europa e incluso podría ser la 1ª fuente de infección en los países del sur de Europa. España es líder en prevalencia de salmonelosis porcina, con un 29% de los cerdos de cebo infectados (EFSA, 2008), resultados que se han ido corroborando en estudios posteriores.

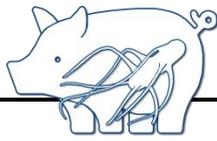
El control de *Salmonella* supondrá uno de los principales retos a asumir por el sector porcino español a corto-medio plazo, ya que nuestro país es uno de los principales exportadores de carne de cerdo. Con unas exportaciones de 1,73 millones de toneladas de carne y despojos es uno de los mayores exportadores mundiales, tan solo superado por Alemania, EE.UU. y Países Bajos (INTERPORC, 2016). El presente trabajo se enmarca en este contexto, es decir, en la búsqueda de estrategias para el control de la salmonelosis porcina en las explotaciones.

Entre estas estrategias se encuentra el uso de aditivos alimentarios con propiedades antimicrobianas, y más concretamente el uso del butirato sódico. Estos principios activos son relativamente recientes y no se han estudiado suficientemente en ensayos de campo, con lo que estudios como el que presentaremos a continuación son necesarios para conocerlos mejor y ver el alcance de su eficacia potencial en el control de la salmonelosis porcina.

#### 3.2. Objetivos

El objetivo principal de esta experiencia es **evaluar la eficacia de la adición de butirato sódico a la dieta de los cerdos de cebo para controlar la salmonelosis porcina en esta fase de producción**. Otros objetivos más específicos son **determinar si la adición de butirato sódico:**

- **Reduce la excreción de *Salmonella* spp. en los corrales de cerdos de cebo.**
- **Disminuye la exposición de los animales a *Salmonella* spp.**, es decir, el número de animales seropositivos (con anticuerpos anti-*Salmonella*).
- **Reduce la prevalencia general de infección de los cerdos que llegan a matadero.**



## 4. Metodología

### 4.1. Producto utilizado

GUSTOR BP70 (Norel S.A., Madrid) es una forma protegida de butirato sódico en base a una grasa vegetal que persigue una liberación gradual a lo largo del tracto gastrointestinal (Puyalto *et al.*, 2015) y que ha mostrado su eficacia en la reducción de *Salmonella* en pollos (Fernández-Rubio *et al.*, 2009).

### 4.2. Diseño del estudio

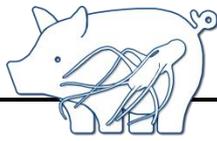
El estudio se realizó en un cebadero comercial infectado por *Salmonella* spp. Dicho cebadero constaba de una nave con 8 corrales (12-13 animales por corral) que se distribuían mitad y mitad a lo largo de un pasillo central. A cada lado del pasillo se localizaron de forma aleatoria 2 corrales que fueron alimentados con pienso sin butirato sódico (grupo C) y 2 a los que se les administró el mismo pienso con butirato sódico a una dosis de 3 kg/Tm (grupo T). Así, cada uno de los dos grupos estaba constituido por 50 animales distribuidos en 4 cuadras. El tratamiento se inició el 6 de junio de 2014 (24 días después de iniciado el cebo) tras haber finalizado el tratamiento con colistina, antibiótico usado habitualmente a la entrada de los cerdos (15 días de tratamiento con colistina).

### 4.3. Muestreo y análisis laboratoriales

Se realizaron 3 análisis microbiológicos (norma ISO 6579:2002/Amd 1:2007; **Anexo I**) para el aislamiento de *Salmonella* spp. a partir de heces (directamente del recto) de un mínimo de 20 animales de cada grupo tras 30, 60 y 90 días de cebadero.



También se llevaron a cabo 4 muestreos serológicos mediante un ELISA indirecto (Herdcheck *Salmonella*<sup>®</sup>, Laboratorios IDEXX) tras 30, 60 y 90 días de cebadero y previo al sacrificio. Se



utilizó como punto de corte (cutoff) para determinar si un animal era seropositivo un porcentaje de densidad óptica (%DO)  $\geq 40$ . Por último se realizó un análisis microbiológico (norma ISO 6579:2002/Amd 1:2007) para el aislamiento de *Salmonella* spp. a partir de los linfonodos mesentéricos (LNM) y de contenido fecal obtenido tras el sacrificio de todos los animales de ambos grupos. Un esquema del muestreo se presenta en la **Figura 3**.

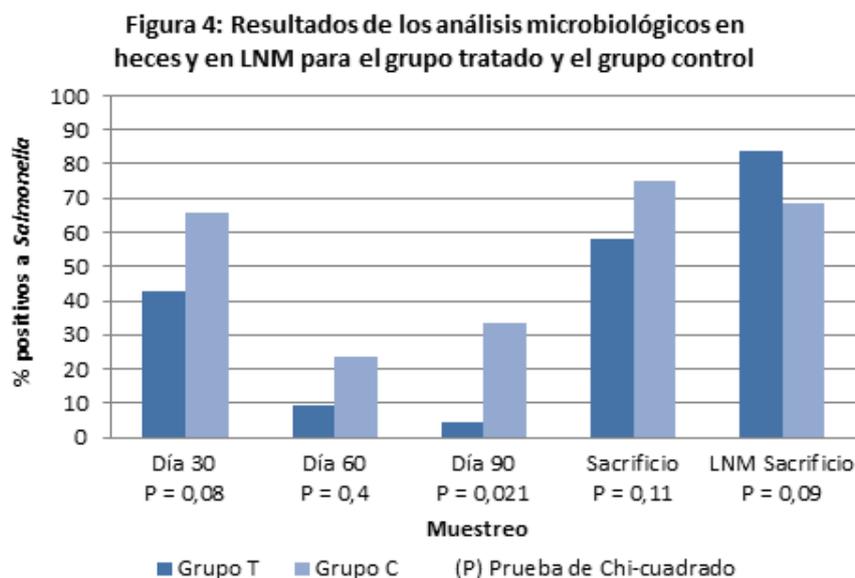
#### 4.4. Análisis estadístico

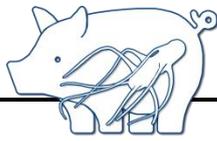
Se realizaron comparaciones de los resultados microbiológicos y serológicos entre los dos grupos para cada muestreo mediante el análisis de *Chi*-cuadrado. Los resultados serológicos también se analizaron mediante un modelo mixto de medidas repetidas (comando *xtmixed* en STATA software) para estimar diferencias en valores medios de %DO teniendo en cuenta los tiempos de muestreo y la interacción entre tratamiento y tiempo. Se consideró un valor de  $P \leq 0,05$  para establecer una diferencia como significativa.

## 5. Resultados

### 5.1. Bacteriología

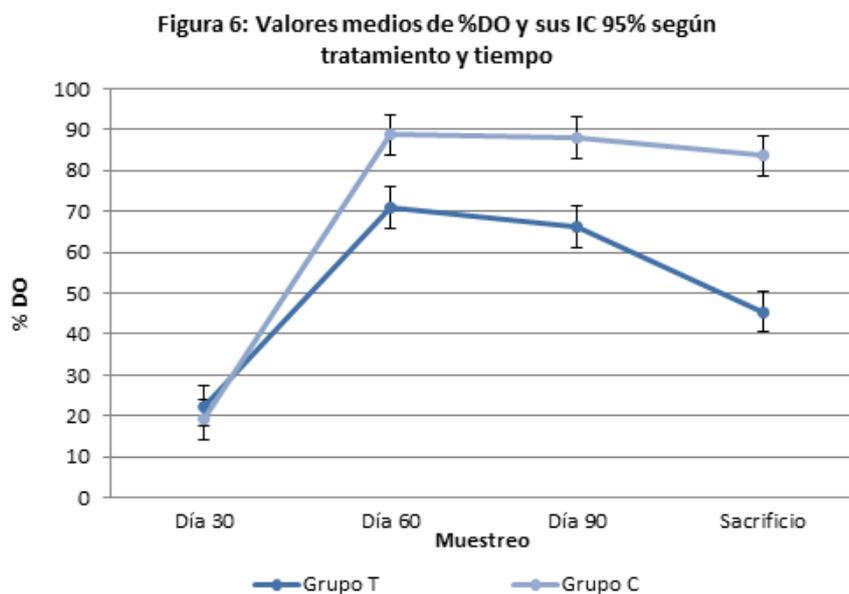
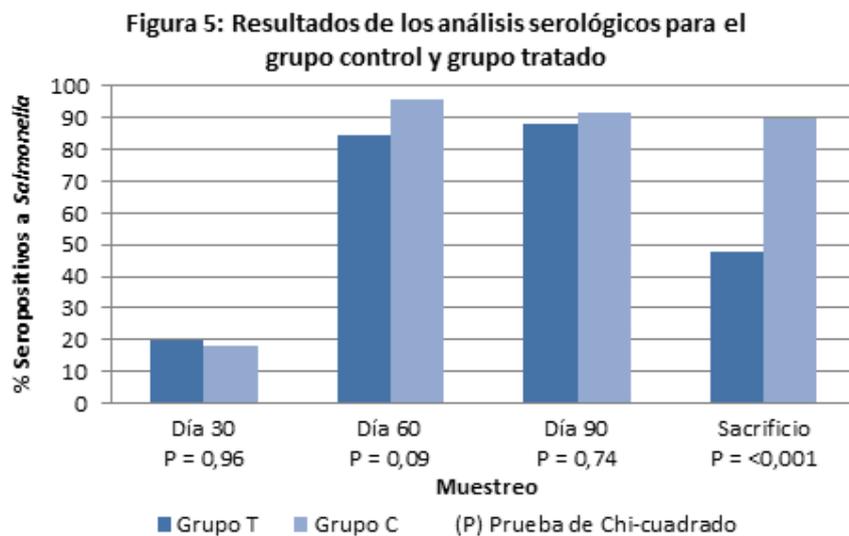
Los resultados de los muestreos microbiológicos en heces realizados durante el periodo de cebo y los resultados de los análisis microbiológicos en LNM para ambos grupos, se presentan en la **Figura 4**. Los niveles de excreción en heces de *Salmonella* spp. fueron siempre inferiores en el grupo tratado con respecto al grupo control, aunque solo en el muestreo del día 90 esas diferencias fueron claramente significativas. En matadero se observó una menor excreción en el grupo tratado, pero el número de animales infectados (presencia de *Salmonella* spp. en los LNM) fue significativamente superior en este grupo.



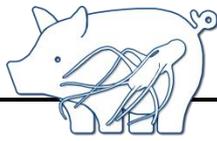


## 5.2. Serología

Los resultados de los muestreos serológicos para el grupo control y el grupo tratado con butirato sódico se presentan en la **Figura 5**. Se observaron diferencias claramente significativas en el último muestreo previo al sacrificio. El número de animales seropositivos en el grupo tratado fue significativamente inferior (48%) que el número de seropositivos en el grupo control (89,6%).



Las variables tratamiento, tiempo y la interacción entre ambas, se asociaron significativamente con los valores de %DO (**Figura 6**). Se observó un menor valor medio del %DO en el grupo tratado comparado con el grupo control para los muestreos de los días 60, 90 y al sacrificio. Así mismo, se observó una reducción del valor medio del %DO conforme pasaba el tiempo en el grupo tratado que apenas fue observada en el grupo control. Sin embargo, destacar que en



ambos grupos los valores medios de %DO estuvieron por encima del 40% a partir del segundo muestreo.

## 6. Discusión

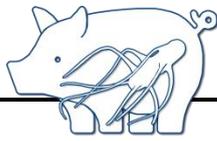
El nivel de excreción de *Salmonella* en heces por parte de los animales tratados siempre fue inferior al de los animales del grupo control, y su excreción disminuyó de forma considerable en los días 60 y 90 de muestreo, siendo la diferencia claramente significativa respecto al grupo C en este último. El porcentaje de animales excretadores fue de 9,5% y 4,5% respectivamente. Sí es cierto que el porcentaje de excreción de *Salmonella* por parte del grupo T subió hasta niveles del 58% en el momento del sacrificio, pero también subió para el grupo C (el 75% de los animales excretaban la bacteria). Es por esto que podemos atribuir esta subida a factores externos a los suidos y al tratamiento, siendo posiblemente la causa el estrés (debido al transporte y la llegada al matadero) y la consecuente caída de las defensas producida por el mismo.

La proporción de animales excretando al principio del cebo fue muy alta para ambos grupos, lo que sugería que los animales se habían infectado durante esos primeros días de cebo (tras el tratamiento con colistina). El hecho de que el grupo T presentara un mayor porcentaje de cerdos infectados (84%) en el matadero, comparado con el grupo C (68,75%), podría ser consecuencia de un mayor número de infecciones ocurridas antes de iniciar el tratamiento con el butirato sódico en el grupo T.

El porcentaje de animales seropositivos (nivel de exposición) en el grupo T fue menor al llegar al matadero comparado con el grupo C (47% vs. 89,6%, respectivamente). La existencia de un menor porcentaje de animales seropositivos en el grupo T podría relacionarse con el hecho de que los cerdos hubieran tenido un menor contacto con la bacteria debido al tratamiento, generando así menos anticuerpos. La reducción de los niveles medios de %DO a lo largo del tiempo en el grupo T, mientras que se mantenían casi constantes en el grupo C, apoyaría esta hipótesis.

## 7. Conclusión

A la vista del presente estudio, podemos concluir que la forma protegida de butirato sódico administrada (GUSTOR BP70), podría resultar efectiva para el control de *Salmonella* en cerdos de engorde, pues permitiría reducir la excreción de la bacteria en los animales infectados y por lo tanto la exposición de los no infectados. La alta incidencia de la infección ocurrida previamente al tratamiento con el butirato sódico impidió determinar si podría considerarse



eficaz para reducir la prevalencia general de la infección en los animales en el momento del sacrificio. Serán necesarios más estudios para poder obtener un resultado más concluyente.

---

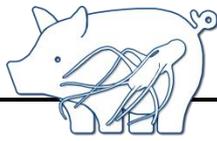
The protected sodium butyrate (GUSTOR BP70) may be effective for the control of *Salmonella* spp. infection in fattening pigs. It could reduce the bacterial shedding in infected animals, and so the exposure of the non-infected pigs. Due to the high incidence of the infection before the treatment with the sodium butyrate, it was not possible to determine whether it could be considered effective to reduce the general prevalence of the infection in the animals at slaughter. More researches will be needed in order to obtain more conclusive results.

## 8. Valoración personal

La realización de este trabajo ha supuesto un aprendizaje y una experiencia a varios niveles, todos ellos útiles e interesantes para nuestro futuro como profesionales en el campo de la veterinaria. Durante su desarrollo hemos aprendido más sobre las enfermedades zoonóticas y el problema que suponen para las personas, ya que pueden producir enfermedades en nuestra especie procediendo de distintos animales, incluyendo los de abasto. Dentro de estas patologías, cabe destacar las que se transmiten por vía alimentaria, ya que causan enfermedad a muchas personas a lo largo del año.

Tanto las zoonosis como las enfermedades de transmisión alimentaria suponen un reto para los veterinarios, haciendo que nuestra labor sea muy importante para controlarlas y para evitar su transmisión. Por estos motivos, aprender más sobre estas enfermedades, y en mayor profundidad sobre la salmonelosis, ha sido muy útil y productivo. Además, *Salmonella* es un agente muy importante en la producción porcina, un sector que nos apasiona y en el que nos gustaría centrar nuestra carrera profesional.

A su vez, la redacción del presente trabajo nos ha mostrado el trabajo que hay detrás de la elaboración de un texto científico, y nos ha ayudado a comprender mejor como realizarlo de forma apropiada. Por último, pero no menos importante, la colaboración en este proyecto dirigido por Raúl Carlos Mainar Jaime y gracias a trabajar con Sara Andrés Barranco, nos ha ayudado a conocer el día a día del trabajo de los investigadores y su labor, tan importante para las personas y el desarrollo de la ciencia.



## 9. Bibliografía

**Andrés-Barranco S., Vico J.P., Garrido V., Samper S., Herrera-León S., de Frutos C., Mainar-Jaime R.C. (2014).** Role of wild birds and rodents in the epidemiology of subclinical salmonellosis in finishing pigs. *Foodborne Pathog Dis*, 11(9):689-97.

**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.

**Argüello H., Carvajal A., Rubio P. (2016).** Avances en el control de la salmonelosis porcina en España. Estrategias de control en granja: la utilidad de los ácidos orgánicos y la vacunación. *SUIS*, 124: 28-35.

**Arlet G., Barrett T.J., Butaye P., Cloeckert A., Mulvey M.R., White D.G. (2006).** *Salmonella* resistant to extended-spectrum cephalosporins: prevalence and epidemiology. *Microbes Infect* 8 (7): 1945-1954.

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

**CDC (2015).** Healthy Pets Healthy People. *Salmonella* Infection. Disponible en línea: <http://www.cdc.gov/healthypets/diseases/salmonella.html>

**Creus E., Andrés-Barranco S., y Mainar-Jaime R.C. (2014).** Actualización en el control de la salmonelosis porcina a través de la alimentación (I). *Av Tecnol porc*, XI (10): 36-47.

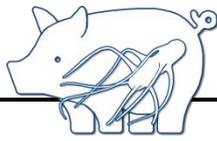
**Creus E., Andrés-Barranco S., y Mainar-Jaime R.C. (2014).** Actualización en el control de la salmonelosis porcina a través de la alimentación (II). *Av Tecnol porc*, XI (11): 34-45.

**de Lange C.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.

**de Ridder L., Maes D., Dewulf J., Butaye P., Pasmans F., Boyen F., Haesebrouck F., van der Stede Y. (2014).** Use of a live attenuated *Salmonella* enterica serovar Typhimurium vaccine on farrow-to-finish pig farms. *Vet J*, 202 (2): 303-308.

**Delzenne N.M. (2003).** Oligosaccharides: state of the art. *Proceedings of the Nutrition Society*, 62: 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 (2015).** The European Union summary report on trends and sources of zoonoses, zoonotic agents and food-borne outbreaks in 2014. EFSA Journal, 4329: 32-67.

**EFSA (2016).** The European Union summary report on antimicrobial resistance in zoonotic and indicator bacteria from humans, animals and food in 2014. EFSA Journal, 4380: 25-180.

**FAO/WHO (2002).** Guidelines for the evaluation of probiotics in food. Food and Agriculture Organization of the United Nations and World Health organization Working Group Report. Disponible en línea: [http://www.fao.org/es/ESN/food/foodandfood\\_probio.en.stm](http://www.fao.org/es/ESN/food/foodandfood_probio.en.stm).

**Fernández-Rubio C., Ordóñez C., Abad-González J., García-Gallego A., Honrubia M.P., Mallo J.J., Balaña-Fouce R. (2009).** Butyric acid-based feed additives help protect broiler chickens from *Salmonella* Enteritidis infection. Poultry Sci, 88 (5): 943-948.

**Funk J.A., Gebreyes W.A. (2004).** Risk factors associated with *Salmonella* prevalence on swine farms. Swine Health Prod, 12: 246-251.

**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.

**INTERPORC (2016).** Actualidad INTERPORC. España se consolida como uno de los principales países exportadores de carne y elaborados de cerdo. Disponible en línea: <http://interporc.com/20160301evolucionexportaciones2015.htm>

**Issenhuth-Jeanjean S., Roggentin P., Mikoleit M., Guibourdenche M., De Pinna E., Nair S., I. Fields P., Weill F.X. (2014).** Supplement 2008e2010 (no. 48) to the WhiteeKauffmanLe Minor scheme. Res Microbiol, 165 (7): 526-530.

**Mainar-Jaime R.C., Creus E. (2010).** Salmonelosis en las explotaciones porcinas. Características e importancia de la infección en el cerdo. SUIS, 67: 52-58.

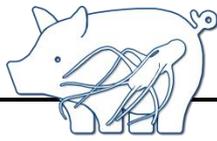
**Mainar-Jaime R.C., Creus E. (2010).** Salmonelosis en las explotaciones porcinas. Dinámica de la transmisión en las explotaciones porcinas. SUIS, 68: 40-48.

**Mainar-Jaime R.C., Creus E. (2010).** Salmonelosis en las explotaciones porcinas. Métodos de diagnóstico. SUIS, 69: 44-53.

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

**Mainar-Jaime R.C., Iguácel-Soteras F., et al. (2011).** Bases para el control de la salmonelosis en las explotaciones porcinas. Dirección General de Desarrollo Rural, 231: 2-19.

**Marco E. (2012).** Fuentes de contaminación por Salmonela en granja. Disponible en línea: [https://www.3tres3.com/salmonela/salmonela-fuentes-de-contaminacion-en-granja\\_30624/](https://www.3tres3.com/salmonela/salmonela-fuentes-de-contaminacion-en-granja_30624/)



**Marco E. (2012).** Prevención y control de Salmonela en granja. Disponible en línea: [https://www.3tres3.com/salmonela/prevencion-y-control-de-salmonela-en-granja\\_30625/](https://www.3tres3.com/salmonela/prevencion-y-control-de-salmonela-en-granja_30625/)

**Mejia 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.

**Mermin J., Hutwagner L., Vugia D., Shallow S., Daily P., Bender J., Koehler J., Marcus R., Angulo, F.J. (2004).** Reptiles, Amphibians, and Human *Salmonella* Infection: A Population-Based, Case -Control Study. *Clin Infect Dis*, 38 (3): S253-S261.

**OMS (2013).** Centro de prensa. *Salmonella* (no tifoidea). Nota descriptiva, 139. Disponible en línea: <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs139/es/>

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

**Puyalto M., Mainar-Jaime R.C., Andrés-Barranco S., Creus E., Mallo J.J. (2015).** Protected sodium butyrate to fight *Salmonella*. *All About Feed*, 23: 6-7.

**RENAVE (2006).** Boletín Epidemiológico Semanal. 2006. Semana 52. Centro Nacional de Epidemiología. Instituto de Salud Carlos III, 14: 1-2.

**RENAVE (2007).** Boletín Epidemiológico Semanal. 2007. Semana 52. CNE. Instituto de Salud Carlos III, 15: 1-2.

**RENAVE (2008).** Boletín Epidemiológico Semanal. 2008. Semana 53. CNE. Instituto de Salud Carlos III, 16: 1-2.

**RENAVE (2009).** Boletín Epidemiológico Semanal. 2009. Semana 52. CNE. Instituto de Salud Carlos III, 17: 1-2.

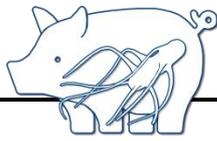
**RENAVE (2010).** Boletín Epidemiológico Semanal. 2010. Semana 52. CNE. Instituto de Salud Carlos III, 18: 1-2.

**RENAVE (2013).** Resultados de la vigilancia epidemiológica de las enfermedades transmisibles. Informe anual. Año 2011. CNE. Instituto de Salud Carlos III: 24-26.

**RENAVE (2014).** Resultados de la vigilancia epidemiológica de las enfermedades transmisibles. Informe anual. Año 2012. CNE. Instituto de Salud Carlos III: 29-31.

**RENAVE (2015).** Informe anual del sistema de información microbiológica 2014. CNE. Instituto de Salud Carlos III: 43-45.

**Van Immerseel F., Fievez V., de Buck J., Pasmans F., Martel A., Haesebrouck F., Ducatelle R. (2004).** Microencapsulated short-chain fatty acids in feed modify colonization and invasion early after infection with *Salmonella* Enteritidis in young chickens. *Poult Sci*, 83 (1): 69-74.

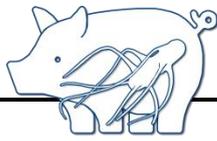


**Van Immerseel F., Russell J.B., Flythe M.D., Gantois I., Timbermont L., Pasmans F., Haesebrouck F., Ducatelle R. (2006).** The use of organic acids to combat *Salmonella* in poultry: a mechanistic explanation of the efficacy. *Avian Pathol*, 35(3): 182-188.

**Vico 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.

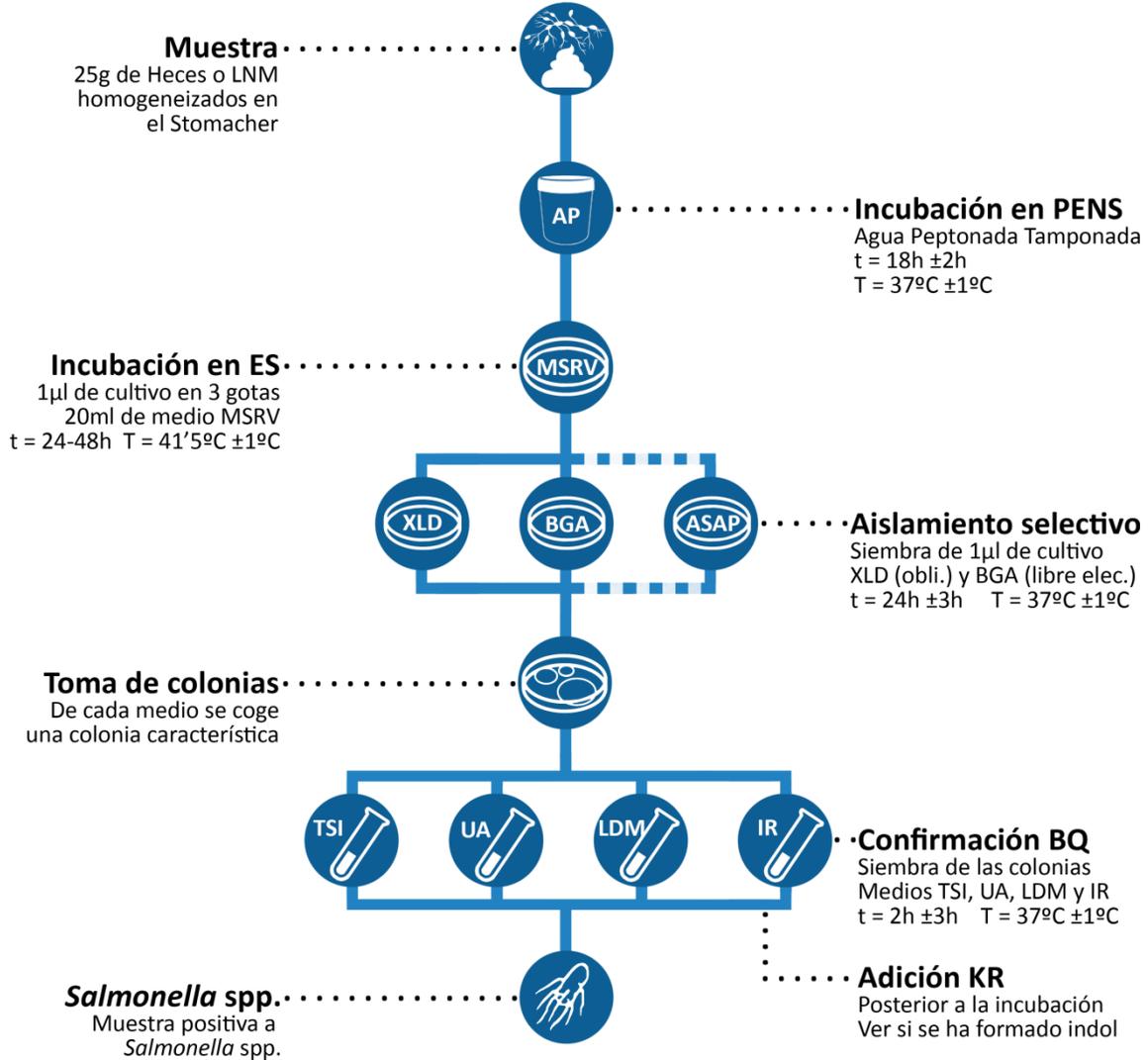
**Witte W. (1998).** Medical consequences of antibiotic use in agriculture. *Science*, 279: 996-997.



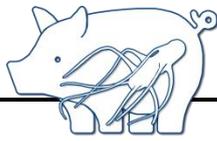
## 10. Anexos

### 10.1. Anexo I: Esquema del protocolo del cultivo bacteriológico

**Figura 7: Norma ISO 6579:2002/Amd 1:2007**



El análisis bacteriológico se realizó en LNM y heces siguiendo el protocolo marcado por la norma ISO 6579:2002/Amd 1:2007 (**Figura 7**). Se extirpan de los animales los LNM del paquete intestinal, libres de grasa o tejido conectivo y en el laboratorio los descontaminamos antes de su análisis sumergiéndolos en alcohol absoluto y flameando a la llama la superficie exterior de los mismos. Realizamos esta operación hasta obtener 25g de LNM descontaminados. A continuación, procedemos a realizar la fase de Pre-Enriquecimiento No Selectivo (PENS). Para ello, añadimos a la muestra (LNM o Heces) 225ml de Agua de Peptona Tamponada (AP) y la homogeneizamos utilizando un Stomacher. Seguidamente, se incubaron durante 18 ±2h a 37 ±1°C.



Tras esta incubación, se inoculan tres gotas (33µl cada una) del AP en el medio de Enriquecimiento Selectivo (ES), Rappaport-Vassiliadis Semisólido Modificado (MSRV), y se incuban las placas durante  $24 \pm 3$ h a  $41,5 \pm 1^\circ\text{C}$ . Las muestras negativas se vuelven a incubar 24h adicionales para asegurarnos que no crece *Salmonella*. Tomamos 1µl del presunto crecimiento de *Salmonella* de cada una de las muestras (se detecta porque las colonias generan un halo en el MSRV después de 24 o 48 h) y se transfiere a dos medios de aislamiento selectivo, los cuales se siembran por agotamiento. Utilizamos el obligatorio marcado por la ISO, Lisina Xilosa Desoxicolato (XLD); el segundo medio es de libre elección y, en nuestro caso, elegimos Verde Brillante (BGA).

Por último, hay que confirmar las colonias sospechosas mediante técnicas bioquímicas. Para ello, sembramos 4 colonias de cada uno de los medios anteriores en agar Hierro Triple Azúcar (TSI), Agar Urea (UA), Medio de Descarboxilación de L-lisina (LDM), y en medio para la Reacción de Indol (IR). Después de  $24 \pm 3$ h a  $37 \pm 1^\circ\text{C}$  (y de añadir el Reactivo de Kovacs (KR) a la reacción de indol para comprobar si se ha formado o no indol), comprobamos el resultado de estas pruebas. Si la prueba de la ureasa, la producción de indol, la fermentación de lactosa y sacarosa dan resultado negativo (en el 99, el 98,9% y el 99,5% de los casos, respectivamente), y en el medio TSI la producción de  $\text{H}_2\text{S}$  es positiva (91,6% de los casos), así como la fermentación de la glucosa (100%) y la descarboxilación de la lisina (94,6%), estamos frente a una muestra positiva de *Salmonella* spp.