

Efecto de una combinación de un derivado del ácido butírico y aceites esenciales en la carga cecal de *Campylobacter* en broiler

R. SYGALL; J. M. ROS FELIP*; G. WIELSMA

Perstorp Feed&Food, Industrieweg 8 NH Waspik, Países Bajos.

*E-mail: josemaria.rosfelip@perstorp.com

Se realizó una prueba con desafío para estudiar la eficacia de un aditivo para piensos (Producto Experimental (EXP)) contra *Campylobacter* en broilers inoculados oralmente. Un total de 108 aves Ross 308 de 1 día se asignaron aleatoriamente en 3 tratamientos experimentales: T1, Control negativo (dieta base + no infectado); T2: Control positivo (dieta base + infectado); T3: (dieta base + EXP (combinación de un derivado del ácido butírico y aceites esenciales + infectado). Las aves de alojaron en 36 jaulas dentro de una habitación en condiciones de presión negativa. Cada tratamiento se suministró a 36 broilers ubicados en 12 cajas.

La cantidad media, expresada en \log_{10} , de colonias de *Campylobacter* encontradas en el ciego de los broilers del grupo control positivo a los 21 días (1 semana post-inoculación) fue de 8,07. Todas las aves de los grupos tratados resultaron colonizadas. Sin embargo, los broilers suplementados con EXP, tuvieron recuentos de *Campylobacter* en ciego muy inferiores a las aves del grupo control, incluso al comparar exclusivamente las muestras positivas (6.53 vs 9.07 \log_{10} CFU/g; P = 0.0303). Sin embargo, este efecto desaparece a continuación y las diferencias entre T3 y T2 desaparece. No se observan diferencias significativas entre tratamientos en consumo y conversión de pienso en el total de la prueba, indicando que el tratamiento no tiene efectos adversos.

Los resultados de la prueba sugieren que EXP es eficaz en la reducción del número de *Campylobacter* en el ciego de los broilers. Sin embargo, a pesar de los resultados prometedores a los 7 días post-inoculación, el efecto desaparece al final de la prueba quizás por una tolerancia a EXP o por una modificación de la flora cecal.

Palabras claves: *Campylobacter*; ácido butírico; aceites esenciales; aditivo; avicultura

A challenge trial was carried out to study the efficacy of a feed additive (Experimental Product (EXP)) against *Campylobacter* in broilers orally inoculated. A total of 108 Ross 308 1-d old broilers from 1 to 42 days of age were used and allocated at random to the experimental treatments. The experimental design was completely randomised with 3 treatments: T1, Negative control (basal diet + non infected); T2: Positive control (basal diet + infected); T3: (basal diet + EXP (a butyric acid derivative and essential oils) + infected). The experiment was carried out in 36 cages of a room under negative pressure conditions. Each treatment was applied to 36 broilers allocated in 12 cages. The mean \log_{10} value of the number of *Campylobacter* colonies found in the caeca of broilers raised on the control diet amounted to 8.07 at 21 days of age (1 week post-inoculation). Also, all broilers in the treatment groups were found to be colonized. However, broilers supplemented with EXP, had much lower *Campylobacter* in their caeca than control birds, even when comparing only the positive samples (6.53 vs 9.07 \log_{10} CFU/g; P = 0.0303). However, the effect was lost thereafter and differences between EXP and Controls disappeared. No significant differences were found between

treatments for feed intake and feed conversion ratio for the whole trial, indicating no adverse effects of the treatment.

The results of the trial suggest that EXP is effective in reducing the number of *Campylobacter* in caeca of broilers. However, despite promising results 7 days post-inoculation, a tolerance to the EXP or maybe a gut flora shift may have occurred and the effect disappeared at the end of the trial.

Keywords: *Campylobacter*; butyric acid; essential oils; feed additive

Introducción

Campylobacteriosis es una de las más importantes infecciones alimentarias en humanos. La enfermedad es habitualmente causada por *Campylobacter jejuni*, un patógeno alimentario de amplia difusión (Ailes et al., 2008). *Campylobacter* es una bacteria gram negativa muy extendida en avicultura y que se transmite por vía fecal-oral (Beery et al., 1988). Las aves infectadas tienen una alta carga bacteriana en el ciego que puede contaminar las canales durante el sacrificio (Beery et al., 1988; Herman et al., 2003). Las manadas se infectan a partir de la segunda semana mediante transmisión horizontal directa e indirecta (Rasschaert et al., 2007). Las medidas de prevención actuales en producción primaria tienen un efecto limitado e imprevisible (Wagenaar et al., 2006) por lo que se necesitan otras estrategias para prevenir la transmisión de *Campylobacter jejuni*. Es posible reducir el riesgo de Campylobacteriosis en humanos mediante la reducción de la carga bacteriana en el ciego de las aves.

El control de *Campylobacter* en granja mediante el uso de aditivos en pienso podría ser una opción. En este estudio examinamos el efecto de una combinación de derivados de ácido butírico y aceites esenciales. Se sabe poco de los efectos in vivo del ácido butírico y los aceites esenciales sobre *Campylobacter jejuni*. Lo que conocemos es que el ácido butírico juega un papel activo optimizando la salud digestiva y modulando la flora intestinal; también es conocido por sus propiedades antimicrobianas. El ácido butírico ya ha demostrado su efecto preventivo frente a *Salmonella*, otra gran amenaza para la salud humana (Fernández-Rubio et al., 2009; Van Immerseel et al., 2006). No existe esta información frente a *Campylobacter jejuni*. Los aceites esenciales han demostrado efecto antimicrobiano frente a *Campylobacter jejuni* en estudios in vitro (Kurekci et al., 2013) demostrando que compuesto de aceites esenciales son efectivos frente a *Campylobacter jejuni* a dosis altas (0.05%) sin alterar el perfil fermentativo de la microbiota cecal del pollo. Se sabe poco sobre la eficacia de las combinaciones del ácido butírico y aceites esenciales en animales.

El objetivo de este estudio es investigar los efectos de un derivado del ácido butírico combinado con aceites esenciales sobre la carga cecal de *Campylobacter* en avicultura.

Material y Métodos

Animales experimentales

Se emplearon 108 pollos Ross 308 de 1 día que se distribuyeron de forma aleatoria en los tratamientos experimentales.

Inoculación de los broilers

En el día 14, antes de la inoculación, se seleccionan 12 aves al azar para comprobar que están libres de *Campylobacter*. A los 14 días de vida todas las aves, excepto las del grupo control negativo, son inoculadas oralmente con 100 µl de una solución que contiene una mezcla de 2 genotipos distintos de *C. jejuni* con una concentración objetivo de 1×10^5 CFU/ml.

Cepas bacterianas y condiciones de crecimiento

El Laboratorio Central de Veterinaria, Ctra. Madrid-Algete km 8,00 proporciona el inóculo con *Campylobacter jejuni*, cepas ST-21 y ST-45.

Diseño experimental

El ensayo se realiza en 36 jaulas de una sala en condiciones de presión ambiental negativa. El diseño experimental consta de 3 tratamientos experimentales distintos: Tratamiento 1.-Control negativo (no infectado); Tratamiento 2.- Control positivo (infectado, no tratado); Tratamiento 3.- Grupo experimental (infectado, tratado con EXP).Cada grupo consta de 36 aves alojadas en 12 jaulas, 3 aves por jaula.

El día 1 de la prueba, las aves se dividen en 36 grupos de 3 broilers y se alojan en sus respectivas jaulas. A todas las aves se les suministra agua corriente y una dieta igual. El grupo Tratamiento 3 recibe el mismo pienso suplementado con el aditivo EXP durante todo el periodo experimental (0-42 días).

Tabla 1. Tratamientos experimentales.

Tratamiento	Descripción	Inoculación con <i>Campylobacter</i>	Dietas experimental
1	Control Negativo	--	Standard
2	Control Positivo	Día 14	Standard
3	Producto EXP	Día 14	Standard + EXP (5 kg/ton)

Dietas

Las dietas experimentales fueron formuladas por Imasde Agroalimentaria S.L. Para cada periodo (arranque, de 1 a 21; acabado de 22 a 42 días de edad), las dietas se calcularon para ser isonutritivas y alcanzar o exceder las recomendaciones de NRC (1994) para pollos de engorde. Los piensos de arranque se suministraron hasta el día 21 de vida, las de acabado hasta el día 42 (Tabla 2). Pienso y agua se proporcionaron ad libitum desde el día 1 hasta el 42. Los piensos se presentaron en harina.

Tabla 2. Composición y cálculo de nutrientes de las dietas experimentales.

Ingredientes, %	Arranque	Acabado
Maíz	12.5000	--
Trigo	43.6365	61.7274
Hna. de soja	35.8308	28.9135
Grasa animal 3-5°	2.2971	6.1237
Aceite de soja	2.0760	--
Carbonato cálcico	1.3978	1.2913
Fosfato Monocálcico	1.0165	0.8038
Sal	0.3673	0.3654
DL-Metionina	0.2460	0.1813
L-Lisina	0.1682	0.1483
L-Treonina	0.0439	0.0253
Premix Vit&Min. ¹	0.4000	0.4000
Análisis Calculado²		
AMEn, kcal/kg	2,975	3,119
Materia seca, %	88.95	89.44
Proteína bruta, %	22.2	20.1
Fibra bruta, %	3.6	3.4
Extracto etereo, %	6.3	7.8
Almidón, %	33.8	36.6
Lisina total, %	1.27	1.09
Lisina digestible, %	1.11	0.96
Metionina total, %	0.55	0.46
Metionina digestible, %	0.52	0.43
Met+Cis total,	0.92	0.80
Met+Cis digestible	0.83	0.72

Treonina total, %	0.85	0.73
Treonina digestible, %	0.71	0.61
Triptófano total, %	0.27	0.25
Triptófano digestible, %	0.23	0.21
Cenizas, %	5.6	5.0
Calcio, %	0.98	0.88
Fósforo total, %	0.74	0.67
Fósforo disponible, %	0.48	0.44
Cloro, %	0.30	0.30
Sodio, %	0.16	0.16

¹ Por kilogramo de pienso: Vitamina A (E 672): 10,000 IU; Vitamina D3 (E 671): 2,000 IU; Vitamina E (a-tocopherol): 30.0 mg; Vitamina K3: 2.0 mg; Vitamina B1: 2.0 mg; Vitamina B2: 5.0 mg; Vitamina B6: 3.0 mg; Vitamina B12: 12.0 µg; Ac. Nicotínico: 40.0 mg; Pantotenato cálcico: 10.0 mg; Ac. Fólico: 1.0 mg; Biotina: 0.1 mg; Cloruro de colina: 400 mg; Cu (CuSO4·5H2O): 8.0 mg; Fe (FeCO3): 60.0 mg; I (IK): 2.0 mg; Mn (MnO): 70.0 mg; Se (Na2SeO3): 0.15 mg; Zn (ZnO): 80.0 mg.

² Basado en tablas FEDNA (2010).

Los piensos no contenían ningún promotor de crecimiento, antibiótico o coccidiostato, y su homogeneidad nutricional fue analizada: humedad (horno de secado (930.15)), cenizas (incineración (942.05)), proteína bruta (Kjeldahl (984.13)), fibra bruta (Weende) y extracto etéreo (Soxhlet (920.39)) según AOAC (2000)). Contenido en calcio y fósforo se valoraron en el Laboratorio de Mouriscade antes de la prueba.

Producto experimental (EXP)

Combinación de derivados del ácido butírico y aceites esenciales. La concentración de las sustancias activas es: ácido butírico, 23%; aceite de orégano 5%.

Instalaciones experimentales y alojamiento

La prueba se realizó en la Unidad experimental de Bioseguridad II de Imasde, en la Universidad de Murcia. Al inicio de la prueba se lavaron y desinfectaron las instalaciones (Sala, salas y materiales auxiliares, sistemas de alimentación y bebida). Las aves se mantuvieron en jaulas de 0,21 m² (0,50 m x 0,42 m). La densidad máxima fue de 30 kg/m². El edificio dispone de iluminación artificial programable, calefacción eléctrica automatizada y ventilación forzada. La temperatura en el interior del edificio fue de 33-35°C al inicio y disminuyendo en 3°C cada semana. A partir del día 28 y hasta el final la temperatura se programa 22°C. El programa de luz fue de 18 horas de luz y 6 de oscuridad cada 24 horas durante toda la prueba. El edificio dispone de presión negativa para prevenir contaminación microbiana exterior.

Toma de muestras, determinaciones y observaciones

Se sacrificaron 12 broilers seleccionados al azar en el día 14 de vida, antes de la inoculación de *Campylobacter*, sus ciegos fueron extraídos y depositados en 6 recipientes separados y estériles (Ciegos de 2 aves en cada recipiente), se mantuvieron refrigerados y se transportaron al laboratorio. En las muestras cecales se analizó la presencia/ausencia de *Campylobacter* dentro de las 24 horas desde la extracción.

7 y 28 días después de la inoculación (21 y 42 días de edad), se sacrificaron 10 aves por tratamiento y sus ciegos extraídos para enumeración de *Campylobacter* (CFU/g en contenido cecal). En los días de muestreo, las aves del grupo control negativo se analizaron para presencia/ausencia de *Campylobacter*. Los ciegos de cada una de las 10 aves sacrificadas en cada grupo (Control Positivo y Experimental) se depositaron en recipientes (Ciegos de 2 aves en cada recipiente). Las 20 muestras cecales tomadas (10 muestras x 2 tratamientos) en cada día de muestreo fueron analizadas para recuento de *Campylobacter* dentro de las 24 horas desde la extracción.

Los animales se mantuvieron sanos, no se registró ninguna baja ni otras circunstancias negativas durante el periodo de prueba.

Análisis estadístico de los datos

Los resultados han sido tratados estadísticamente mediante análisis de varianza (ANOVA). Los datos han sido analizados con un diseño aleatorio IBM SPSS Statistics v. 19.0. La significación estadística se declara a $P \leq 0.05$. Cuando se establecen diferencias significativas, los valores medios se comparan mediante el test Duncan's Multiple Range.

Resultados

Datos productivos

La salud de los animales se consideró normal durante toda la prueba y no se observaron circunstancias negativas. El peso vivo de los animales se muestra en la Tabla 3. No se observan diferencias significativas entre los tratamientos.

Tabla 3. Resultados de peso corporal (g) de los distintos tratamientos.

Tratamiento	Descripción	Peso vivo, g		
		0 día	21 día	42 día
T1	Control Negativo	41.70	948	3,039
T2	Control Positivo	41.70	973	2,879
T3	Producto EXP	41.70	941	2,953

Los resultados de consumo de pienso e índice de conversión para el total de la prueba se muestran en la Tabla 4. No se observan diferencias significativas en consumo de pienso e índice de conversión entre tratamientos.

Tabla 4. Resultados en consumo diario de pienso (ADFI) e índice de conversión (FCR).

Tratamiento	Descripción	Datos productivos, 0-42 d	
		ADFI, g/d	FCR, g/g
T1	Control Negativo	143.0	2.02
T2	Control Positivo	140.8	2.05
T3	Producto EXP	147.3	2.06

Recuento de *Campylobacter* en muestras cecales

El efecto de los distintos tratamientos sobre la recuperación de *Campylobacter* en el ciego de broilers se detalla en las Tablas 5 y 6. La Tabla 5, detalla los datos promedio del total de las 10 muestras cecales por día de muestreo analizadas. Estos datos reflejan el valor medio del recuento cecal de *Campylobacter* en toda la población, por tratamiento.

Tabla 5. Resultados de los recuentos de *Campylobacter* recuperados en los 2 grupos desafiados (T2 y T3) a los 21 y 42 días de edad (7y 28 días post-inoculación).

Tratamiento	Descripción	21 días de vida	42 días de vida
		Log CFU	Log CFU
T2	Control Positivo	8.07 ^b	7.45
T3	Producto EXP	2.61 ^a	8.27
SEM ¹ (n = 10)		1.027	0.687
Probabilidad ²		0.0016	0.2269

¹Error estándar de la media (n: número de observaciones).
² Distintas letras (a-b) en la misma columna indican diferencias significativas (P<0.05).

En la Tabla 6 solamente se incluyen los resultados de las muestras positivas. Consecuentemente, los datos reflejan la media de los recuentos de *Campylobacter* en ciegos de la población infectada (aves con más de 100 CFU/g). El número de animales negativos por tratamiento fue de 3 y 5 al día 21; y de 0 y 0 el día 42, respectivamente para los tratamientos T2 y T3. Las muestras negativas en el día 21 (7 días después de la inoculación) pueden deberse a inmunidad maternal y/o al efecto de los aditivos.

Tabla 6. Resultados de los recuentos de *Campylobacter* recuperados en aves positivas de los 2 grupos desafiados (T2 y T3) a los 21 y 42 días de edad (7y 28 días post-inoculación)

Tratamiento	Descripción	21 días de vida	42 días de vida
		Log CFU	Log CFU
T2	Control Positivo	9.07 ^b	7.45
T3	Producto EXP	6.53 ^a	8.27
SEM ¹ (n = 10)			0.266
Probabilidad ²			0.0925

¹Error estándar de la media (n: número de observaciones).
² Distintas letras (a-b) en la misma columna indican diferencias significativas (P<0.05).

El valor medio del número de colonias de *Campylobacter* (expresadas como Log₁₀) encontradas en el ciego de los broilers del tratamiento T2 alcanzó los 8.07 a los 21 días de vida (1 semana post-inoculación), frente a 2.61 del tratamiento T3. Estos mejores resultados también se observan al considerar solamente las muestras positivas (9.07 vs 6.53). Sin embargo, estas diferencias desaparecen posteriormente.

Discusión

A pesar de que la Campylobacteriosis sigue siendo una amenaza importante para los humanos, no se han desarrollado estrategias eficaces para reducir la presencia de *Campylobacter* en aves (Hermans et al., 2003). Broilers infectados con *Campylobacter* son una amenaza para la salud humana ya que la contaminación intestinal puede favorecer la contaminación de canales durante su procesamiento en el matadero (Herman et al., 2003).

Los resultados de los recuentos de *Campylobacter* en las muestras de ciego sugieren que EXP es eficaz en la reducción de *Campylobacter* en el ciego de los broilers. Sin embargo, el efecto se pierde y las diferencias entre los dos grupos desafiados desaparecen. Esta circunstancia podría ser debida al desarrollo de alguna tolerancia a EXP o a una modificación en el perfil de la flora intestinal.

La clara reducción de la carga de *Campylobacter* en el ciego 7 días después de la inoculación demuestra que el producto EXP tiene un efecto, aunque solo permanece durante un corto periodo. La aplicación del tratamiento en una etapa posterior en la vida del broiler, como la última semana antes del sacrificio, podría ser más eficaz en la reducción de la carga de *Campylobacter* en las aves en el momento del sacrificio. Para demostrar este efecto se requiere de más estudios e investigación.

Las producciones de los animales tratados no difirieron entre los grupos, por lo que se puede concluir la ausencia de efectos adversos del producto EXP a pesar de que la dosis de inclusión (5 kg/tn) fue muy superior a las dosis habituales de los aditivos basados en ácido butírico.

Referencias

AILES, E., L. DEMMA, S. HURD, J. HATCH, T. F. JONES, D. VUGIA, A. CRONQUIST, M. TOBIN-D'ANGELO, K. LARSON, E. LAINE, K. EDGE, S. ZANSKY, AND E. SCALLANV (2008) Continued decline in the incidence of *Campylobacter* infections, FoodNet 1996-2006. Foodborne Pathog. Dis. 5:329-337.

- BEERY J. T, HUGDAHL M. B, AND DOYLE M. P.** (1988) Colonization of Gastrointestinal Tracts of Chicks by *Campylobacter jejuni*. *Appl. Environ. Microbiol.*, **54**(10): 2365.
- FERNÁNDEZ-RUBIO C, ORDÓÑEZ C, ABAD-GONZÁLEZ J, GARCIA-GALLEGO A, PILAR HONRUBIA M., JOSE MALLO J. AND BALAÑA-FOUCE R.** (2009) Butyric acid-based feed additives help protect broiler chickens from *Salmonella* Enteritidis infection. *Poultry Science* **88** (5):943-948.
- HERMAN L, HEYNDRIKX M, GRIJSPEERDT K, VANDEKERCHOVE D, ROLLIER I AND DE ZUTTER L.** (2003) Routes for *Campylobacter* contamination of poultry meat: epidemiological study from hatchery to slaughterhouse. *Epidemiol. Infect.*, **131**:1169–1180.
- HERMANS D, VAN DEUN K, MESSENS W, MARTEL A, VAN IMMERSEEL F, HAESBROUCK F, RASSCHAERT G, HEYNDRIKX M, PASMANS F** (2011) *Campylobacter* control in poultry by current intervention measures ineffective: Urgent need for intensified fundamental research. *Veterinary microbiology*, **152**:219-228.
- IMMERSEEL VAN F, RUSSELL J. B, FLYTHE M. D, GANTOIS I, TIMBERMONT L, PASMANS F, HAESBROUCK F. AND DUCATELLE R.** (2006) The use of organic acids to combat *Salmonella* in poultry: a mechanistic explanation of the efficacy. *Avian Pathology*, **35**(3), 182-188
- KUREKCI C, PADMANABHA J, BISHOP-HURLEY S. L, HASSAN E, AL JASSIM R. A. M, MCSWEENEY C. S.** (2013) Antimicrobial activity of essential oils and five terpenoid compounds against *Campylobacter jejuni* in pure and mixed culture experiments. *International journal of food microbiology*, V166, Issue 3, 16:450–457
- RASSCHAERT G, HOUF K, VAN HENDE J & DE ZUTTER L** (2007) Investigation of the concurrent colonization with *Campylobacter* and *Salmonella* in poultry flocks and assessment of the sampling site for status determination at slaughter. *Veterinary Microbiology*, **123**:104-109.
- WAGENAAR, J.A.** (2006) *Campylobacter* in primary animal production and control strategies to reduce the burden of human campylobacteriosis. *Revue Scientifique et technique*, **25**(2): 581-594.