EVALUACIÓN DE LA EFICACIA DE DOS SALES SÓDICAS DE BUTIRATO Y HEPTANOATO FRENTE UN DESAFÍO ORAL CON ESCHERICHIA COLI (ECET) K88 EN LECHONES DESTETADOS

López-Colom[1], P., Castillejos[1], L., Puyalto[2], M., Mallo[2], J.J. y Martín-Orúe[1], S.M.
[1]Servicio de Nutrición y Bienestar Animal, Departament de Ciència Animal i dels Aliments. Universitat Autònoma de Barcelona. 08193 Bellaterra, Barcelona. susana.martin@uab.cat
[2]Norel S.A., Jesús Aprendiz, 19, 1ºA. 28007 Madrid.

INTRODUCCIÓN

Escherichia coli enterotoxigénica (ECET) es el mayor patógeno causante de la diarrea post-destete (DPD) (Moredo *et al*., 2015). El uso abusivo de antibióticos para hacer frente a esta patología, entre otras, y el creciente y amplio rango de resistencias (EFSA, 2013) llevaron a la UE a prohibir su uso como promotores del crecimiento en el 2006.

Existen diversas estrategias alternativas para optimizar la salud intestinal del lechón. Nuestro interés se centra en el uso de ácidos orgánicos, por su actividad antibacteriana (Heo *et al*., 2013) y protección hacia patógenos (den Besten *et al*., 2013). En el presente trabajo, se han valorado dos sales sódicas: butirato sódico, con beneficios sobre el tracto gastrointestinal (Mazzoni *et al*., 2008; den Besten *et al*., 2013) y modulador de la respuesta inmune (Weber y Kerr, 2008; Melo *et al*., 2016); y heptanoato sódico, con actividad bactericida (Grilli *et al*., 2012; Bhattarai *et al*., 2007). Nuestro objetivo fue el de valorar su eficacia frente a ECET K88 utilizando un modelo experimental de colibacilosis post-destete.

MATERIAL Y MÉTODOS

Se utilizaron 72 lechones machos (Large White x Landrace) destetados a 21 días (5,4±0,73 kg peso vivo) procedentes de una granja comercial y de madres sin vacunar frente a *E. coli*. Los animales se distribuyeron en 3 salas con 8 corrales (3 animales/corral) entre los que se adjudicaron 3 dietas (n = 8): (i) dieta base (CTR); (ii) dieta base con GUSTOR BP70® (BUT; 3 kg/t); y (iii) dieta base con HEPT'ON® (HPT; 3 kg/t). Los aditivos contenían butirato y heptanoato en su forma de sal sódica (al 70%) protegidos con grasa vegetal (NOREL S.A.).

Tras una semana de adaptación, se realizó una doble inoculación oral con ECET K88 en días consecutivos ($3x10^9$ y $3x10^{10}$ ufc). Se registró el consumo y el peso de los animales y se evaluaron los parámetros clínicos de consistencia fecal y temperatura rectal. A día 4 y 8 post-inoculación (PI) se extrajo sangre de un animal por corral para evaluar la respuesta inflamatoria (factor de necrosis tumoral alfa (TNF-α) y proteína de fase aguda mayor porcina (PigMAP)) y tras su sacrificio se muestreó contenido de estómago, duodeno, íleon y colon proximal a fin de determinar el pH y productos de la fermentación (amoníaco, ácidos grasos de cadena corta (AGCC) y ácido láctico). Se hicieron recuentos de enterobacterias, coliformes y del patógeno en digesta de íleon y colon y también en raspados de la mucosa ileal. Asimismo, se obtuvieron muestras de tejido ileal para el análisis histomorfométrico.

Se utilizó el programa R v1.9 para el análisis estadístico. Se realizó el análisis de la varianza en las medidas puntuales siguiendo un modelo lineal de dos factores (tratamiento y sala) con el paquete stats, mientras que las medidas repetidas (consistencia fecal y temperatura rectal) siguieron un modelo lineal mixto con interacción (tratamiento y tiempo) con el paquete nlme. La significación se estableció a $\alpha<0,05$ y la tendencia a $\alpha<0,10$. En caso de efecto significativo ($P<0,05$), se realizó la corrección de Tukey con el paquete stats para medidas puntuales o con el paquete multcomp para medidas repetidas.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Durante la adaptación los animales presentaron un buen estado de salud. La inoculación produjo un cuadro clínico leve que remitió de forma espontánea.

La inoculación resultó en una caída del consumo a día 2 PI y la aparición de hipotermia y empeoramiento de la consistencia fecal ($P<0,001$) sin diferencias al añadir las sales ácidas.

Con respecto a la fermentación, no se apreciaron diferencias entre tratamientos en la concentración de amoníaco ni en el pH. Cuando se evaluó la permanencia de ambos aditivos a lo largo de tracto digestivo, el ácido heptanoico fue detectado en el estómago de la mayoría de los animales tratados con HPT (13/15) y también en dos casos excepcionales

de los CTR (1/15) y BUT (1/15) (P<0,001). A nivel de duodeno también prevaleció en animales con HPT (11/14) (P<0,001) y fue detectado en dos animales aislados con CTR (1/14) y BUT (1/15) (P<0,001). En los tramos posteriores, íleon y colon, no se pudo detectar ácido heptanoico en ningún animal. En paralelo, el ácido butírico se encontró en el estómago en un mayor número de animales tratados con BUT (11/15) frente a los CTR (6/15) y HPT (2/15) (P=0,005). En duodeno no se detectó en ninguno de ellos y en íleon sólo apareció de forma anecdótica en un lechón del BUT a día 8 PI (1/7). En colon, la concentración de ácido butírico no se vio afectada por los tratamientos (11,57, 9,92 y 8,35 mmol/kg MF para CTR, BUT y HPT, respectivamente; P=0,580).
En la Figura 1 se muestra la evolución del ácido láctico y del total de AGCCs a lo largo del tracto digestivo. Llama la atención la importante actividad fermentativa detectada en el estómago, con rangos de los ácidos acético y láctico entre 3,3 y 22,1 mmol/kg MF y 2,1 y 86,1 mmol/kg MF, respectivamente. La adición de butirato fue capaz de reducir la concentración de ácido láctico en estómago a día 8 PI (P=0,016) y también disminuirla del total de AGCCs en colon (P=0,023). Por otro lado, el h eptanoato modificó el perfil de fermentación gástrica reduciendo numéricamente (P=0,124) la proporción de animales con ácido propiónico detectable (6/15 vs. 11/15 y 11/15 para HPT, CTR y BUT, respectivamente) y de ácido valérico (P=0,044) (1/15 vs. 6/15, 7/15 para HPT, CTR y BUT, respectivamente).

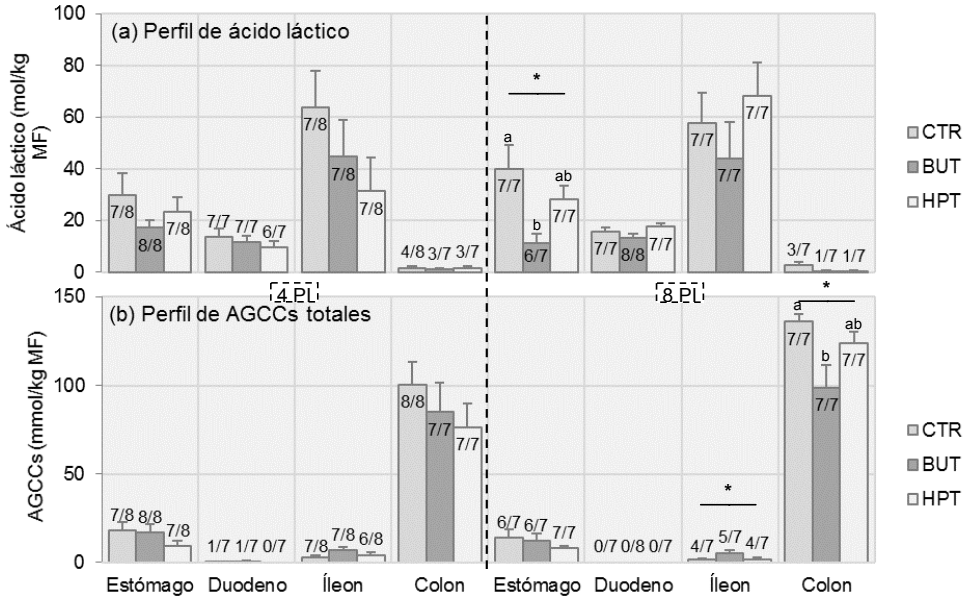


***Figura 1**. Concentración de: (a) ácido láctico; y (b) AGCCs (mmol/kg de materia fresca (MF)), en estómago, duodeno, íleon y colon a días 4 y 8 PI. Fracción: Número de animales con ácido cuantificable/número total de animales muestreados. *P<0,05.*

En cuanto al análisis microbiológico (Tabla 1), se observaron mayores recuentos de enterobacterias y coliformes en los animales tratados con BUT y HPT en los raspados de mucosa ileal a día 4 PI (P=0,016 y P=0,003, respectiva mente) y tendencias en la digesta ileal a día 8 PI (P=0,107 y P=0,062, respectivamente). No obstante, estas diferencias no se apreciaron en digesta cólica y la cuantificación por qPCR de ECET K88 tampoco mostró mayor adherencia en mucosa ileal en los tratamientos frente el grupo CTR (P=0,358).
El estudio histomorfométrico no mostró diferencias significativas entre dietas a pesar del incremento de las poblaciones de enterobacterias y coliformes observadas, lo que sugiere que, a pesar de una mayor presencia del patógeno, no hubo daño epitelial ni cambios en la respuesta inflamatoria local. Tampoco se registraron cambios en la respuesta inflamatoria sistémica analizada como niveles plasmáticos de TNF-alfa y PigMAP.

***Tabla 1**. Recuentos de enterobacterias y coliformes (log ufc/g de materia fresca) en raspados de mucosa ileal, digesta ileal y digesta cólica a día 4 y 8 post-inoculación (PI).*

	Parámetro	Día	CTR	BUT	HPT	RSE*	P
Mucosa ileal	Enterobacterias	4 PI	4,97[a]	6,15[b]	6,13[b]	0,812	0,016
		8 PI	5,35	5,88	5,29	0,784	0,282
	Coliformes	4 PI	4,30[a]	5,88[b]	5,46[b]	0,776	0,003
		8 PI	4,74	5,16	4,62	1,155	0,624
Digesta ileal	Enterobacterias	4 PI	7,98	9,11	8,96	1,641	0,349
		8 PI	6,36	7,14	6,84	0,697	0,107
	Coliformes	4 PI	7,24	8,50	8,29	1,340	0,159
		8 PI	6,08	6,90	6,65	0,659	0,062
Digesta cólica	Enterobacterias	4 PI	7,95	8,67	8,77	1,160	0,325
		8 PI	6,89	7,23	6,92	1,008	0,757
	Coliformes	4 PI	7,44	7,78	8,13	1,029	0,428
		8 PI	6,24	6,78	6,61	0,968	0,535

*Error estándar residual (*Residual Standard Error* en inglés).

En resumen, con el modelo experimental presentado, los aditivos no fueron capaces de mitigar los efectos negativos de ECET K88 sobre los parámetros clínicos o productivos. Los animales tratados aumentaron los recuentos de enterobacterias y coliformes en íleon, pero sin alteraciones en la arquitectura del tejido intestinal ni en la respuesta inflamatoria. Ambas sales ácidas demostraron tener un impacto en la fermentación gástrica que podría estar detrás de los efectos beneficiosos descritos por otros autores para este tipo de aditivos.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

• den Besten, G. *et al*. 2013. J. Lipid. Res. 54:2325-37. • Bhattarai, H.D. *et al*. 2007. J. Environ. Biol. 28:857-63. • EFSA & ECDC. 2015. EFSA J. 13:4036. • Grilli, E. *et al*. 2012. J. App. Microbiol. 114:308-17. • Heo, J.M. *et al*. 2013. J. Anim. Physiol. Anim. Nutr. 97:207-37. • Mazzoni, M. *et al*. 2008. J. Nutr. 138:1426-31. • Melo, A.D.B. *et al*. 2016. Genet. Mol. Res. 15:gmr15048875. • Moredo, F.A. *et al*. 2015. Foodborne Pathog. Dis. 12:704-12. • Weber, T.E. & Kerr, B.J. 2008. J. Anim. Sci. 86:442-50.

Agradecimientos: Financiado por Norel S.A. dentro del proyecto "PORCDIGEST" subvencionado por el CDTI y el Ministerio de Ciencia e Innovación del Gobierno de España.

EVALUATION OF THE EFFICACY OF SODIUM BUTYRATE OR HEPTANOATE IN FRONT OF AN ESCHERICHIA COLI (ETEC) K88 ORAL CHALLENGE IN PIGLETS

ABSTRACT: Two new protected forms of sodium butyrate or sodium heptanoate (NOREL S.A.) were tested against an ETEC K88 oral challenge in weanlings. 72 piglets were distributed into 24 pens and 3 diets: plain diet (CTR); with GUSTOR-BP70® (BUT); or with HEPT'ON® (HPT) at 3 kg/t each. Animal performance and clinical parameters were monitored before (7 days) and after inoculation (PI) (8 days). In addition, microbial counts, fermentation, histomorphometry and immune response were analyzed on days 4 and 8PI.
Inoculation promoted a moderate diarrhea and reduced feed consumption with no significant differences between diets. Enterobacteria and coliforms were increased in ileum with both salts on day 4PI ($P<0.05$) although ileal histomorphometry and inflammatory (TNF-alpha, PigMAP) response remained unaffected. Besides this both acids shaped gastric fermentation, BUT reduced lactic acid concentration on day 8PI ($P=0,016$) and HPT modified fermentation pattern. Under our experimental model, the tested additives were not able to reduce the impairment of the ETEC K88 challenge in performance and diarrhea prevalence, however it was recorded a significant impact on stomach with reductions in its fermentative activity (BUT) and modulation of its profile (HPT). This gastric impact could be behind the beneficial effects reported by other authors for these additives.

Keywords*:* sodium butyrate, sodium heptanoate, weanling, ETEC K88.