

VALORACIÓN IN VITRO DE LA ACTIVIDAD DE DOS MOLECULAS ORGANOSULFORADAS PROCEDENTES DEL AJO (*Allium sativum*), PTS y PTSO, Y SU COMBINACIÓN, FRENTE A SALMONELLA ENTERICA Y ESCHERICHIA COLI.

Arandilla E.¹, Argüello, H.², López R.¹, Coscojuela P.¹, Carvajal, A.², Rubio P.²

¹Prebia Feed Extracts SL. Plaza del Pan, Nº11. Oficina 3.6. Apartado de correos 45600 Talavera de la Reina (Toledo).España.

² Departamento de Sanidad Animal. Facultad de Veterinaria. Universidad de León.E-mail: earandilla@prebia.es

INTRODUCCIÓN

Las enfermedades digestivas son en la actualidad uno de los principales problemas de la ganadería y condicionan muchas veces su rentabilidad. Los agentes etiológicos de estas enfermedades son muy diversos, y varían entre las especies afectadas. En el ganado porcino, *Escherichia coli*, *Salmonella enterica* y *Brachyspira hyodysenteriae*, son agentes bacterianos que con frecuencia se encuentran en las granjas asociados a cuadros diarreicos y/o con empeoramiento de los índices productivos. A menudo estos agentes se encuentran causando infecciones mixtas. La intensificación de la ganadería y, en muchos casos, unas inadecuadas prácticas de manejo e higiene agravan las consecuencias productivas de las enfermedades digestivas. El uso de antibióticos, muchas veces inadecuado, ha originado problemas de resistencia bacteriana, que hace más difícil aún, el control de estos patógenos en las granja. Por otra parte, la disponibilidad de antibióticos se ve cada día más limitado por cuestiones legales.

Las propiedades antimicrobianas de muchos extractos vegetales han sido ampliamente estudiadas por numerosos autores. (Domingo & López Brea, 2003; Suppakul et al, 2003; Wallace, 2004) En lo que se refiere al ajo (*Allium sativum*), la primera referencia de su uso se encuentra en el Código de Ebers, un papiro egipcio fechado en 1550 a. C., donde se citan muchos medicamentos elaborados con el ajo para combatir picaduras de insectos, tumores, cardiopatías, dolor de cabeza y dolores generales. Hasta el momento los diferentes estudios que se han llevado a cabo con especies vegetales del género *Allium*, especialmente el ajo, han demostrado poseer un amplio espectro de actividad antimicrobiana, frente a bacterias Gram-positivas y Gram-negativas (Cavallito & Baiely, 1944; Reuter et al, 1996). El ajo no solo tiene actividad antibacteriana, también tiene actividad antivírica, antifúngica y antiprotozoaria (Harris et al, 2001). Hidalgo et al, han demostrado la actividad de dos tiosulfatos, PTS (propil propano tiosulfato) y PTSO (propil propano tiosulfonato) frente a *Brachyspira hyodysenteriae*.

El objetivo de este trabajo fue comprobar la actividad antimicrobiana de esas dos moléculas organosulfuradas, procedentes de la destilación del ajo, el propil propano tiosulfato (PTS) y el propil propano tiosulfonato (PTSO), y su combinación en un producto comercial (Garlicon® Prebia Feed Extracts SL, Talavera de la Reina) frente a una colección de aislados de *Escherichia coli* y de diferentes serovares de *Salmonella enterica*.

MATERIAL Y MÉTODOS

Se probaron 20 aislados de *Escherichia coli*, procedentes de muestras tomadas en explotaciones porcinas distribuidas por la geografía española, y remitidas al laboratorio de la Unidad de Enfermedades Infecciosas del Departamento de Sanidad Animal de la Facultad de Veterinaria de León

Del mismo modo, se probaron 67 aislados de *Salmonella enterica*. De ellos, 60 pertenecían a la colección de aislados de la Unidad de Enfermedades Infecciosas citada y procedían de muestras tomadas en explotaciones de ganado porcino de todo el territorio español. Los 7 aislados restantes procedían de la Colección Española de

Cultivos Tipo (CECT). En todos los casos, el aislamiento de Salmonella de muestras de campo se llevó a cabo siguiendo el protocolo marcado por la normativa ISO (6579:2002). Los aislados positivos fueron serotipados siguiendo el esquema propuesto por Kauffman-White en 1930, empleando antisueros comerciales (Bio-Rad y Statens Serum Institut).

La elección de los aislados de la colección de la Unidad de Enfermedades Infecciosas se llevó a cabo teniendo en cuenta aislados más frecuentemente en ganado porcino en España. Se incluyeron los siguientes aislados: S. Typhimurium (28 aislados), S. Rissen (10 aislados), S.4,[5],12:i:- (8 aislados), S. Derby (7 aislados), S. Enteritidis (5 aislados), S. Anatum (3 aislados), S. Cholerasuis (2 aislados), S. Infantis (1 aislado), S. Newport (1 aislado), S. London (1 aislado) y S. Kapemba (1 aislado).

Los aislados se sembraron en placas de agar triptonsoja y se incubaron en aerobiosis a 37°C durante 24 horas, tras las cuáles se preparó el cultivo líquido empleando 25 ml de caldo infusión cerebro corazón en los que se resuspendió una colonia de cada aislado. El cultivo líquido se mantuvo a una temperatura de 37°C y en agitación a 150 rpm durante 6 horas hasta alcanzar una concentración de 10⁸ UFC/ml.

Para determinar la sensibilidad antimicrobiana de los productos estudiados, Garlicon[®] PTS y PTSO, se realizó un sistema de dilución en microplaca de 48 pocillos con concentraciones crecientes de cada producto. Tanto para S. enterica como para E.coli se probaron las concentraciones siguientes: Garlicon[®] (0,83 a 5 µl/ml), PTS y PTSO (0,063 a 0,63 µl/ml). Las placas fueron inoculadas con 0,1 ml por pocillo de una suspensión bacteriana con 10⁶ UFC/ml e incubadas a 37°C y 140 rpm durante 20 horas. Seguidamente se procedió a determinar la concentración mínima inhibitoria (CMI), concentración más baja que inhibió la multiplicación bacteriana y la concentración mínima bactericida (CMB), concentración más baja con efecto letal sobre las bacterias, obteniéndose los resultados que se muestran a continuación.

RESULTADOS

En la tabla 1 se muestran los resultados obtenidos de la actividad antimicrobiana de los compuestos objeto de este estudio frente a E. coli. La tabla 2 muestra los resultados frente a S. enterica, indicando además los serotipos, de los que al menos se han probado tres aislados diferentes. Frente a E.coli, el PTSO es la molécula más activa, seguida del PTS. El producto comercial Garlicon[®] tiene una actividad inferior con respecto a las dos moléculas que lo forman, debido a que la proporción que representan ambas moléculas en su composición es del 40%, siendo el 60% restante excipientes.

Tabla 1. Concentración mínima inhibitoria (CMI µl/ml) y concentración mínima bactericida (CMB µl/ml) 50 y 90 de Garlicon[®], PTS y PTSO frente a diferentes aislados de Escherichia coli de origen porcino.

Escherichia coli					
CMI90 / CMB90 (µl/ml)			CMI50 / CMB50 (µl/ml)		
GARLICON [®]	PTS	PTSO	GARLICON [®]	PTS	PTSO
0,25/0,5	0,25/1	0,063/0,125	0,25/0,5	0,25/1	0,063/0,125

Del mismo modo, el PTSO es la molécula que mayor actividad tiene frente a todos los serotipos de S. enterica, seguido por el PTS y del producto comercial Garlicon[®]. Los resultados son bastante homogéneos para los diferentes serotipos y no existen diferencias significativas de sensibilidad entre ellos. La actividad antimicrobiana de ambas moléculas y del producto comercial frente a E.coli fue ligeramente inferior a la observada frente a S.enterica.

Tabla 2. Concentración mínima inhibitoria (CMI $\mu\text{l/ml}$) y concentración mínima bactericida (CMB $\mu\text{l/ml}$) 50 y 90 de Garlicon[®], PTS y PTSO frente a diferentes serotipos de Salmonella enterica aislados de porcino.

<i>Salmonella enterica subsp. enterica</i>						
Serotipo	CMI90/CMB90 ($\mu\text{l/ml}$)			CMI50/CMB50 ($\mu\text{l/ml}$)		
	Garlicon [®]	PTS	PTSO	Garlicon [®]	PTS	PTSO
Typhimurium	2,5/5	0,4/0,5	0,13/0,25	2/2,5	0,25/0,42	0,13/0,25
Rissen	1,25/2,75	0,31/0,63	0,13/0,26	1,25/2,5	0,31/0,5	0,13/0,25
Derby	2,5/5	0,31/0,5	0,13/0,25	2,081/2,5	0,31/0,42	0,13/0,25
O:4[5],12:i:-	1,67/2,5	0,34/0,48	0,13/0,25	1,25/1,67	0,31/0,42	0,13/0,25
Enteritidis	2,25/4,1	0,13/0,25	0,25/0,31	1,46/1,83	0,13/0,25	0,19/0,28
Anatum	2,5/5	0,42/0,5	0,13/0,25	2,5/5	0,42/0,5	0,13/0,25
Resultados globales	2,5/5	0,42/0,5	0,13/0,25	1,67/2,5	0,31/0,42	0,13/0,25

DISCUSIÓN

Este estudio muestra la actividad de moléculas de origen natural frente a dos bacterias causantes de importantes infecciones digestivas en el ganado porcino. En líneas generales, el producto comercial tiene una CMB 90 frente a *E. coli* de 5 $\mu\text{l/ml}$ (ppm), mientras que para los diferentes serovares de *S. entérica* la CMB 90 varía entre los 2,5 y los 5 $\mu\text{l/ml}$ (ppm). Los datos presentados abren la posibilidad de recurrir a productos de origen vegetal, eficaces y económicos para el control de estas infecciones.

Es especialmente destacable la actividad de los productos probados frente a los serovares de *Salmonella enterica* más prevalentes en la Unión Europea. Según los datos de la agencia Europea de Seguridad Alimentaria (EFSA), actualmente la salmonelosis es la segunda zoonosis en importancia por el número de casos anuales diagnosticados en el hombre. La salmonelosis en la Unión Europea está sometida a control obligatorio en la producción avícola y en un futuro próximo también lo estará en la producción porcina, según indica el Reglamento (CE) 2160/2003.

Nuestros datos abren la posibilidad de realizar estudios in vivo que validen los resultados in vitro.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Cavallito CJ, Baiely JH. 1944. Science. 100 (2600): 390
- Domingo D, López-Brea M. 2003. Rev Esp Quimioter. 16 (4): 385-393.
- Harris JC, et al., 2000. Microbiology. 146 Pt 12: 3119-27.
- Hidalgo A. et al, 2011. Proc. III Simposio sobre Microbiología Digestiva, Zaragoza.
- Reuter HD, et al., 1996. The Science and Therapeutic Applications of *Allium sativum* L. and Related Species 2nd ed. (Koch HP & Lawson DL, eds.), pp 135-212. William & Wilkins, Baltimore, MD.
- Suppakul P, et al., 2003. J Agric Food Chem. 51(11): 3197-3207.
- Wallace RJ. 2004. Proc Nutr Soc. 63: 621-629.

IN VITRO EVALUATION OF THE ACTIVITY OF TWO GARLIC COMPOUNDS (PTS and PTSO) AND ITS COMERCIAL PREPARATION FACED ON DIFFERENTS PORCINE DIGESTIVE PATOGENS.

ABSTRACT This study shows the antimicrobial activity of two garlic compounds (PTS and PTSO), and its commercial preparation called Garlicon[®]. Data from this study shows clear bactericidal effect in vitro, faced against *Salmonella enterica* and *Escherichia coli* isolates from Spanish porcine farms.

Keywords: *Salmonella enterica*, *Escherichia coli*, garlic, antimicrobial activity.