

Situación epidemiológica y sanitaria de la salmonelosis porcina en la C.F. de Navarra y contribución al conocimiento de la patogénesis



Samanta Rita Sánchez Alarcón
Pamplona 2015



Departamento de Producción Agraria
Universidad Pública de Navarra



instituto de agrobiotecnología
agrobioteknologiako institutua



CSIC

CONSEJO SUPERIOR DE INVESTIGACIONES CIENTÍFICAS



Gobierno
de Navarra

Instituto de Agrobiotecnología
Departamento de Producción Agraria
Universidad Pública de Navarra

Situación epidemiológica y sanitaria de la salmonelosis porcina en la C.F. de Navarra y contribución al conocimiento de la patogénesis

Samanta Rita Sánchez Alarcón

Directoras:

Dra. María Jesús Grilló Dolset, Científico Titular del CSIC

Dra. Beatriz San Román Aberasturri, Contratado JAE Doc del CSIC

Tutora:

Dra. Inmaculada Farran Blanch

Pamplona/Iruña, 2015

MIEMBROS DEL TRIBUNAL

Presidente

Dr. Lorenzo José Fraile Sauce
Departamento de Producción Animal
Universidad de Lleida

Secretaria

Dra. Pilar María Muñoz Álvaro
Unidad de Sanidad Animal
Centro de Investigación y Tecnología Agroalimentaria (CITA) de Aragón

Vocal

Dra. Juncal Garmendia García
Instituto de Agrobiotecnología
Consejo Superior de Investigaciones Científicas (CSIC)

Suplente

Dra. Cristina Solano Goñi
Instituto de Agrobiotecnología
Universidad Pública de Navarra (UPNA)

Revisores externos

Dr. José María Blasco Martínez
Unidad de Sanidad Animal
Centro de Investigación y Tecnología Agroalimentaria (CITA) de Aragón

Dra. Virginia Aragón Fernández

Departamento de Enfermedades Endémicas
Centre de Recerca en Sanitat Animal (CRESA)

Suplente

Dr. Juan Pablo Vico Salamone
Facultad de Ciencias Agropecuarias
Universidad de Córdoba (Argentina)

Dra. MARÍA JESÚS GRILLÓ DOLSET, Científico Titular del Consejo Superior de Investigaciones Científicas (CSIC) y **Dra. BEATRIZ SAN ROMÁN ABERASTURRI**, contratado JAE Doc del CSIC,

INFORMAN:

Que la presente memoria de Tesis Doctoral **“Situación epidemiológica y sanitaria de la salmonelosis porcina en la C.F. de Navarra y contribución al conocimiento de la patogénesis”** elaborada por SAMANTA RITA SÁNCHEZ ALARCÓN ha sido realizada bajo su dirección y cumple las condiciones exigidas por la legislación vigente para optar al grado de Doctor.

Y para que así conste, lo firman en Pamplona, a 27 de Abril de 2015

Fdo.: María Jesús Grilló Dolset

Fdo.: Beatriz San Román Aberasturi

La realización de esta Tesis Doctoral ha sido posible gracias a la beca predoctoral del programa Erasmus Mundus External Cooperation Window-EMUNDUS18 concedida por la Unión Europea y disfrutada en el Instituto de Agrobiotecnología (Centro Mixto del Consejo Superior de Investigaciones Científicas -CSIC-, la Universidad Pública de Navarra -UPNA- y el Gobierno de Navarra) por mediación de la UPNA. Asimismo, los trabajos realizados han sido financiados por los proyectos de investigación del Gobierno de Navarra (proyectos IIQ14064.R11) y la Fundación Caja Navarra (Convenio VAPC-20140411) y con la inestimable colaboración del Instituto Navarro de Tecnología e Infraestructuras Agroalimentarias S.A. (Contrato CSIC-INTIA CAM2011030054).

La presente Tesis Doctoral está organizada según el modelo sugerido por la Comisión de Doctorado del Departamento de Producción Agraria de la Universidad Pública de Navarra. De esta manera, los resultados obtenidos durante la realización de la misma se agrupan en capítulos, que se corresponden con los artículos científicos a los que ha dado o dará lugar el desarrollo de los objetivos planteados.

Así, cada capítulo contiene su propio resumen, una introducción específica, la descripción de los materiales y métodos utilizados, los resultados obtenidos, la discusión de los mismos y, por último, la bibliografía que le corresponde. Por lo tanto, cada capítulo agrupa la información necesaria relacionada al tema que en él se desarrolla permitiendo su lectura de manera independiente al resto de los capítulos.

Este documento incluye además distintos apartados con: (i) un resumen en español y un summary en inglés; (ii) una introducción general en la que se describen de manera más amplia distintos aspectos sobre la salmonelosis porcina; (iii) los objetivos planteados durante la elaboración de la Tesis Doctoral; (iv) una discusión general de los resultados obtenidos; y (v) las conclusiones obtenidas durante el presente trabajo de investigación.

DEDICATORIA

El presente trabajo se lo dedico a: mi mamá Rita Alarcón, quien desde mi infancia supo pincelar en mi espíritu, esta vocación hacia la ciencia, con esa su peculiar forma de narrar el pasado; a mi papá Rodolfo Sánchez, por ser paciente para con mis decisiones y estar allí a pesar de todo, a mi hermana Claudia por su compañía constante como mujer y amiga, a mi hermano Marcelo por tan bellos recuerdos de nuestra niñez, los cuales me alentaron para seguir adelante.

"Nunca consideres el estudio como una obligación sino, como una oportunidad para penetrar en el bello y maravilloso mundo del saber"

Albert Einstein (1879-1955)

AGRADECIMIENTOS

Enumerar las relaciones progresivas a través de los cuales me ha sido favorable la realización de la presente Tesis, se hacen en mi persona, innumerables, ya que en todo el tiempo transcurrido, para dicho cometido, cada uno de ellas, supo adecuadamente coadyuvar en este noble recorrido.

Seguidamente quedo con el corazón lleno de gratitud a las personas que a continuación detallo: En primer lugar, quiero nombrar a mis directoras de tesis, a la Dra. María Jesús Grilló y a la Dra. Beatriz San Román, sin los cuales no hubiera sido posible la realización de este proyecto. A la Dra. María Jesús Grilló por darme la oportunidad de formar parte de su grupo de investigación de Sanidad Animal, por la confianza depositada durante todos estos años y por su continua enseñanza y orientación durante esta Tesis. A la Dra. Beatriz San Román, por ser mi guía en la prosecución doctoral, tanto practica como teóricamente; a la Dra. Inmaculada Farrán, por el asesoramiento académico; a los Dres. Beatriz Amorena y Damián De Andrés; al grupo de Sanidad Animal, Victoria, Ana, Leticia, Ramsés, Helena, Ximena, Idoia, Paula, Naroa, Antonio, Cristina, Begoña, Javier, Mireya e Inés; a María José Villafranca; a todo el personal técnico; a Miriam, Oscar y María; a todas las personas de los grupos de investigación del Instituto de Agrobiotecnología, Agrobiotecnología Vegetal, Biofilms Bacterianos, Bioinsecticidas Microbianos y Metabolismo de Carbohidratos; a los Dr. Raúl Mainar-Jaime y Sara Andrés de Zaragoza; a la Dra. Cristina de Frutos, del Centro Nacional de Referencia de Salmonelosis Animales (MAGRAMA) y su personal de apoyo; a Javier Labairu y a todo el personal de apoyo del INTIA; al personal en los mataderos de La Protectora (Pamplona), FIPSO (Francia) y Cinco Villas (Zaragoza).

Posteriormente quiero agradecer a: mis padres y hermanos, quienes constantemente me han ofrecido su apoyo incondicional y consejos, para seguir siempre adelante, gracias por todo su amor y cariño.

Para finalizar a todos ustedes: docentes, compañeros, amigos y familiares, de quienes recibí tanta enseñanza y amistad, solo puedo retribuirles todo lo recibido con la realización del presente trabajo investigativo, sean merecedores de mis mejores sentimientos de

gratificación, a ustedes y todos a quienes no pude mencionar en los párrafos presentes,
muchas gracias.

ÍNDICE GENERAL

Índice de Figuras	v
Índice de Tablas	vii
Abreviaturas	ix
Resumen/Summary	xi
Resumen	xiii
Summary	xv
Introducción	1
Importancia de la salmonelosis	3
Etiología de la infección, transmisión y taxonomía de <i>Salmonella</i> spp.	4
Patogénesis de la infección por <i>Salmonella</i> spp	7
Formas clínicas y tratamiento de la salmonelosis	9
Resistencias antimicrobianas en cepas de <i>Salmonella</i> de origen animal	11
Importancia y gestión de la salmonelosis porcina en el contexto europeo	14
Importancia del sector porcino de España	15
El sector porcino en Navarra	19
Diagnóstico de la salmonelosis porcina	21
Control de la salmonelosis porcina	26
Bibliografía	28
Objetivos	37
Chapter 1: Relationship between <i>Salmonella</i> infection and shedding in paired samples from fattening pigs of a low prevalence region of Spain.....	41
Abstract	43
Introduction	44
Material and Methods	45
Experimental design and sampling	45
<i>Salmonella</i> spp. isolation and characterization	46
Serological study	47

Questionnaire data and statistical analysis	47
Results	48
<i>Salmonella</i> spp. prevalence, shedding, serology and concordance between them	48
Risk factors associated to <i>Salmonella</i> infection or shedding	54
Characterization of <i>Salmonella</i> strains	56
Relationship between <i>Salmonella</i> MLN infection and IC shedding	57
Discussion	60
Acknowledgements	63
References	64
Chapter 2: Salmonellosis in sows: mesenteric lymph node infection, fecal shedding and serology.....	69
Abstract	71
Introduction	72
Material and Methods	73
Sampling design	73
<i>Salmonella</i> isolation and characterization	74
Antimicrobial resistance	74
Serological study	75
Questionnaire data and statistical analysis	75
Results	76
<i>Salmonella</i> MLN infection	76
<i>Salmonella</i> in feces of sows	80
Seroprevalence	84
Risk factor analysis of <i>Salmonella</i> spp. in sows	84
Discussion	85
Acknowledgments	89
References	90
Chapter 3: Simultaneous infections by different <i>Salmonella</i> strains in mesenteric lymph nodes of finishing pigs	95
Abstract	97

Background	98
Methods	99
Experimental design, <i>Salmonella</i> spp. isolation and serotyping	99
Antimicrobial resistance	99
Pulsed-Field Gel Electrophoresis	100
Results	100
Discussion	103
Conclusions	105
References	106
Discusión general	109
Discusión general	111
Bibliografía	117
Conclusiones	119

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Distribución del origen de los brotes de salmonelosis humana en la UE durante el año 2012.....	5
Figura 2. Adaptación al huésped y formas clínicas inducidas por la infección con algunos serotipos de <i>Salmonella</i> spp.	7
Figura 3. Representación gráfica de la patogénesis de <i>Salmonella</i> spp. en el tracto intestinal ...	8
Figura 4. Principales países europeos (izda.) y del mundo (dcha.) productores de carne de cerdo en 2013	16
Figura 5. Censo porcino existente por CC.AA. en España en 2012	16
Figura 6. Resultados de prevalencia de salmonelosis porcina obtenidos en los estudios de referencia realizados en la UE	18
Figura 7. Distribución del número (%) de (a) explotaciones y (b) cerdas reproductoras existentes en Navarra en el año 2011	20
Figura 8. Distribución del número (%) de (a) explotaciones y (b) cerdos de engorde existentes en Navarra en el año 2011	20
Figura 9. Protocolo para el aislamiento de <i>Salmonella</i> en GLM y heces de animales domésticos mediante la técnica microbiológica UNE-EN ISO 6579:2002/Amd 1:2007	23
Figura 10. Técnica de Kirby-Bauer. (a) Halo de inhibición indicado con una flecha. 1: sensible, 2: intermedio; y 3: resistente. (b) Ejemplo de crecimiento de colonias resistentes dentro del halo de inhibición	24
Figure 11. Distribution of <i>Salmonella</i> spp. prevalence at farm level (% of positive pigs/farm) in 698 fattening pigs from the 30 farms analyzed	49
Figure 12. Percentage of <i>Salmonella</i> -seropositive pigs, at the different % of optical density (OD) cut-off values recommended by the manufacturer	51
Figure 13. Distribution (% of farms showing $\leq 10\%$, 11-20% or $>20\%$ individual prevalence) of <i>Salmonella</i> spp. in breeding sows from the intensive production system of Navarra (Spain). MLN (white bars) and IFS (black bars) were analyzed by ISO 6579, and blood serum (grey bars) by ELISA at 40% OD cut-off	78

Figure 14. Distribution (% of farms) showing *Salmonella* in ≤ 2 , 3 or 4 out of 10 rooms by farm, regarding IFS (black bars) or PFS (streaked bars)80

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Clasificación taxonómica, nomenclatura y número de serotipos de <i>Salmonella</i> spp. identificados en cada subespecie	6
Tabla 2. Clasificación de los agentes antimicrobianos recomendados para la vigilancia y control de las cepas de <i>Salmonella</i> spp. de origen porcino, según la familia a la que pertenecen y el mecanismo de acción antibacteriana	14
Table 3. Prevalence of <i>Salmonella</i> spp. in MLN, IC and blood serum (ELISA at 40% OD cut-off) samples from vertically-integrated fattening pigs of Navarra (Spain)	50
Table 4. Distribution of serological and microbiological (MLN, IC or at least one of them) salmonellosis prevalence at farm level. The three types of samples were analyzed simultaneously in pigs belonging to 19 farms	53
Table 5. Variables significantly associated with <i>Salmonella</i> prevalence in fattening pigs, by a multivariable random-effect logistic regression analysis after clustering pigs by farm of origin, and considering either MLN or IC infection	55
Table 6. Phenotypic characteristics of the <i>Salmonella</i> strains isolated from MLN or IC of fattening pigs of Navarra (Spain). Strains are grouped by antimicrobial resistance (AR) pattern	58
Table 7. Phenotypic characterization of <i>Salmonella</i> strains isolated simultaneously in MLN and IC samples from fattening pigs	59
Table 8. Prevalence of <i>Salmonella</i> in MLN, IFS and PFS from sows of Navarra (Spain)	77
Table 9. <i>Salmonella</i> spp. strains isolated in MLN samples from breeding sows representative of the intensive production system of Navarra (Spain)	78
Table 10. Summary of antimicrobial resistance (AR) and serotype of <i>Salmonella</i> strains isolated in MLN, IFS or PFS of breeding sows of Navarra (Spain)	79
Table 11. Prevalence and characteristics of <i>Salmonella</i> spp. strains isolated in fecal samples processed either individually (IFS) or in pool (PFS), from breeding sows representative of the intensive production system of Navarra (Spain)	82

Table 12. Table of concordance of the detection of <i>Salmonella</i> spp. by ISO 6579 in fecal cultures processed either individually (IFS; 25 grams/animal) or in pool (PFS; 25 grams made-up with 5 grams/IFS and 5 IFS/pool). One culture was considered positive when <i>Salmonella</i> was isolated from PFS or from at least one IFS constituting the PFS	83
Table 13. Variables significantly associated with <i>Salmonella</i> prevalence in sows, by multivariable random-effect logistic regression analysis after clustering pigs by farm of origin and considering either MLN or IFS	85
Table 14. Serotypes and antimicrobial resistance (AR) patterns of <i>Salmonella</i> strains isolated from fattening pig MLN	102
Tabla 15. Análisis comparativo de los resultados obtenidos en los estudios de referencia de la UE, en un trabajo con idéntica metodología realizado en Aragón y en esta Tesis, utilizando muestras de MLN y/o heces de porcino de engorde y reproductor	112

ABREVIATURAS

ADN/DNA	Ácido Desoxirribonucleico
BPW	Agua de Peptona Tamponada
BGA	Agar Verde Brillante
CC.AA.	Comunidad Autónoma
C.F.	Comunidad Foral
CS	Secuencia conservada
D.O./O.D.	Densidad Óptica
ELISA	Ensayo de Inmuno-Absorción Ligado a Enzimas
GLM/MLN	Ganglio Linfático Mesentérico
HPA	Agencia para la Protección de la Salud
IC1	Integrones Clase 1
IL-1	Interleucina 1
ISO 6579	UNE-EN ISO 6579:2002/Amd 1:2007
LB	Agar Luria-Bertani
LPS	Lipopolisacárido
MAGRAMA	Ministerio de Agricultura, Alimentación y Medio Ambiente
MSRV	Medio Semisólido Rappaport-Vassiliadis Modificado
PCR	Reacción en Cadena de la Polimerasa
RA/AR	Resistencia a agentes antimicrobianos
SGI1	Isla Genómica 1 de <i>Salmonella</i>
TNF- α	Factor de Necrosis Tumoral alfa
UE	Unión Europea
XLD	Agar Xilosa-Lisina Deoxicolato

RESUMEN/SUMMARY

RESUMEN

La salmonelosis causada por cepas no tifoideas de *Salmonella* spp. es una de las principales zoonosis extendidas mundialmente que se transmite a través de alimentos contaminados. Tras los huevos y productos de aves, el porcino y sus derivados son las principales fuentes de infección para el ser humano. La emergencia en todo el mundo de cepas de *Salmonella* de origen animal con elementos genéticos móviles portadores de múltiples resistencias antimicrobianas constituye un serio problema de Salud Pública que obliga al control y especial vigilancia epidemiológica desde su origen. Con el ánimo de proteger la salud de los consumidores, la actual normativa europea recomienda el control exhaustivo de *Salmonella* en todas las fases de la cadena alimentaria “de la granja a la mesa”, contemplando la inminente imposición de medidas restrictivas para aquellos países que no cumplan los objetivos de prevalencia que se establezcan. Estas medidas pueden tener importantes repercusiones económicas en nuestro país, puesto que el sector porcino es un pilar fundamental de los recursos ganaderos de España, siendo el cuarto país con mayor producción porcina del mundo. Asimismo, el sector porcino es un pilar fundamental de la economía de Navarra, donde la mayor parte de la producción debe ser exportada. Para mantener un sector competitivo tanto al nivel nacional como internacional, es esencial conocer el estado de esta importante zoonosis e instaurar medidas de control sostenibles y adecuadas a la situación epidemiológica y productiva de la región. Por ello, el objetivo general de esta Tesis Doctoral fue analizar la situación epidemiológica y sanitaria de las infecciones por *Salmonella* spp. en una población representativa del ganado porcino de cebo y en cerdas reproductoras de producción intensiva de la C.F. de Navarra, así como analizar en los mismos animales distintos aspectos de la infección con trascendencia epidemiológica.

Este trabajo de Tesis se presenta en tres capítulos, agrupados por las publicaciones científicas que se encuentran en fase de revisión (Capítulo 1), en elaboración (Capítulo 2) o publicada (Capítulo 3). En ellas, se abordan distintos aspectos que permiten: (i) conocer, por primera vez, la prevalencia de salmonelosis en el porcino intensivo de la C.F. de Navarra, las características fenotípicas de las cepas de *Salmonella* circulantes y los factores de riesgo asociados a la presencia del patógeno en el ganado porcino de producción intensiva de Navarra, tanto en cerdos de engorde (Capítulo 1) como en cerdas reproductoras (Capítulo 2); (ii) determinar la utilidad del diagnóstico serológico para detectar la infección en animales jóvenes y adultos en este contexto epidemiológico (Capítulos 1 y 2); (iii) determinar la posible

relación existente entre las infecciones por *Salmonella* y la excreción del patógeno en heces de cerdos de engorde que llegan a matadero, pertenecientes a un sistema de producción altamente industrializado y con baja prevalencia, como es Navarra (Capítulo 1); (iv) realizar un estudio novedoso para conocer el estado de las infecciones por *Salmonella* en cerdas reproductoras llevadas a matadero tras el destete y su relación con la diseminación del patógeno en granja, a través de las heces (Capítulo 2); (v) identificar los principales factores de riesgo asociados a la infección y/o excreción del patógeno en ambos tipos productivos de la C.F. de Navarra; y (vi) demostrar la existencia de infecciones simultáneas por diferentes cepas de *Salmonella* en el porcino destinado a consumo humano (Capítulo 3).

Como resultado de todo ello, en general, se observó una baja prevalencia de salmonelosis tanto en los cerdos de engorde como en las cerdas reproductoras de Navarra y tanto en MLN como en heces. Esto garantiza un estado sanitario satisfactorio para la obtención de productos alimenticios de buena calidad sanitaria, situando al sector porcino de la C.F. de Navarra en un nivel competitivo, tanto al nivel nacional como internacional. El ganado reproductor no se pudo relacionar como fuente de infección activa de *Salmonella* para los cerdos de engorde. La serología mostró muy escasa concordancia con la microbiología, tanto a nivel individual como de granja, lo que limita su utilidad práctica para el control de la salmonelosis, aún menor en las cerdas reproductoras. Además, sólo en una pequeña proporción (10,5%) de los cerdos de engorde analizados se pudo sospechar una posible relación entre la infección ganglionar y la excreción del patógeno en heces. En el último Capítulo, se demuestra la existencia de infecciones simultáneas por varias cepas de *Salmonella*, lo que puede plantear distintas cuestiones sobre la epidemiología y patogénesis/inmunogenicidad de las infecciones por este patógeno en el ganado porcino, así como sobre la posibilidad de un origen común para múltiples cepas en los brotes de salmonelosis humana.

SUMMARY

Salmonellosis caused by non-typhoid strains of *Salmonella* spp. is a major foodborne zoonosis distributed worldwide. After eggs and poultry products, pork and its derivatives are the main source of human infections. Moreover, the emergence of *Salmonella* strains from animal origin with mobile genetic elements carrying multiple antimicrobial resistance genes is a public health problem that requires control and special surveillance from the origin. In order to protect the health of consumers, the current European legislation recommends the comprehensive control of *Salmonella* at all stages of the food chain "from farm-to-table", warning on the imminent establishment of commercial restrictive measures for countries that do not accomplish with the objectives of prevalence to be established. These measures can have a significant economical impact in our country, since pig sector is the base of livestock resources in Spain, being the fourth largest producer country worldwide. The pig sector of Navarra is also a base of the regional economy, where most of the pig production should be exported. In order to maintain a competitive sector at both the national and international levels, it is essential to know the status of this important zoonosis and, then, to establish a control sustainable and adequate to the epidemiological and productive situation of the region. Therefore, the general objective of this Doctoral Thesis was to analyze the sanitary and epidemiological situation of infections by *Salmonella* spp. in a representative population of pigs, fattening and breeding sows in intensive production of Navarra as well as analysis of the different aspects of infection with epidemiological significance.

This work of Thesis is presented in three chapters, grouped by scientific publications that are under revision (Chapter 1), being drafted (Chapter 2) or published (Chapter 3). These manuscripts dealt with different aspects of salmonellosis allowing: (i) to know the prevalence of *Salmonella* in Navarra, circulating strains of *Salmonella*, and risk factors associated with the presence of the pathogen in the vertically-integrated production system of Navarra, in both fattening pigs (Chapter 1) and breeding sows (Chapter 2); (ii) to determine the usefulness of serological diagnosis to detect infection in young and adult animals in this epidemiological context (Chapters 1 and 2); (iii) to determine the possible relationship between *Salmonella* infection and shedding in fattening pigs at the abattoir, belonging to a production system highly industrialized and with low prevalence, such as Navarra (Chapter 1); (iv) to perform a novel study on *Salmonella* infections in breeding sows after weaning and its relationship to spread of the pathogen through feces on the farm (Chapter 2); (v) to identify the main risk

factors associated to infection and/or shedding of the pathogen in both production systems of Navarra; and (vi) demonstrate the existence of simultaneous infections by different strains of *Salmonella* in pigs intended for human consumption (Chapter 3).

In general, there was a low prevalence of *Salmonella* in both fattening pigs and breeding sows of Navarra, in both MLN and feces samples, providing a good sanitary status of pigs and pig products, placing the swine sector of Navarra in a highly competitive level, both nationally and internationally. Breeding sows could not be established as a source of active infection of *Salmonella* for fattening pigs. Serology showed little consistency with microbiology, neither at individual nor farm level, limiting its practical utility for the control of salmonellosis. Moreover, a possible relationship between infection and shedding of the pathogen through feces, only could be suspected in a small proportion (10.5%) of the analyzed fattening pigs. In the last chapter, simultaneous infections by different *Salmonella* strains are demonstrated in pig MLN, raising questions on epidemiology and pathogenesis/immunogenicity of these infections in swine, as well as on a possible common origin of multiple strains in human salmonellosis outbreaks.

INTRODUCCIÓN

Importancia de la salmonelosis

La salmonelosis causada por cepas no tifoideas de *Salmonella* spp. es una zoonosis extendida mundialmente, con graves repercusiones económicas y sanitarias, tanto para los animales como para el ser humano (1). Se trata de una de las toxiinfecciones alimentarias más frecuentes en el ser humano (2-4) en todo el mundo, con mayor prevalencia en áreas de producción intensiva de animales, especialmente de cerdos y aves (1). De hecho, la salmonelosis es la enfermedad transmitida por alimentos más frecuente en EEUU, habiéndose registrado 1.027.561 de casos humanos de salmonelosis no tifoideas en 2011, de los que 19.336 (1,9%) precisaron hospitalización y, de esos, 378 (1,9%) fueron mortales (4). En la Unión Europea (UE), la salmonelosis es, tras la campilobacteriosis, la segunda zoonosis más frecuente, habiéndose registrado 91.034 casos humanos en 2012 (3), con una tasa de mortalidad del 0,14% (3). Esta cifra supone una tendencia decreciente en el número de casos de salmonelosis humana registrados durante la última década, debida esencialmente al éxito de las medidas de control implementadas en los productos avícolas (3) y también a la concienciación del consumidor sobre la importancia de las medidas higiénico-sanitarias frente a las infecciones transmitidas por los alimentos. Las infecciones suelen presentarse con una elevada morbilidad y una tasa de mortalidad variable, según factores propios del huésped (los niños, ancianos y personas inmunodeprimidas son la población más vulnerable) y factores de la cepa de *Salmonella* en cuestión, como son el serotipo (ver apartado de Etiología de la infección, transmisión y taxonomía de *Salmonella* spp.) y la resistencia a diversos agentes antimicrobianos (RA). La emergencia en todo el mundo de cepas de *Salmonella* de origen animal con múltiples RA (ver apartado Resistencias antimicrobianas en cepas de *Salmonella* de origen animal) constituye un serio problema de Salud Pública, que obliga al control y especial vigilancia epidemiológica desde su origen (5). Todo ello conlleva un elevado coste sanitario, debido a hospitalizaciones y tratamientos.

En los animales, las infecciones clínicas por *Salmonella* spp. tienen un gran impacto, tanto desde el punto de vista de la salud y bienestar de los animales como desde el punto de vista económico, debido a la repercusión en diversos factores productivos como la elevada mortalidad, el coste de los tratamientos, la pérdida de peso, el retraso del crecimiento, el retraso en la salida a matadero y la heterogeneidad de las canales. Además, los animales constituyen un importante problema de Salud Pública por ser un reservorio natural del patógeno, a menudo difícil de detectar, y la principal fuente de contaminación para el ser humano (3).

La prevención de la salmonelosis humana pasa por el control de la infección en los alimentos de origen animal. Las aves de puesta (huevos y derivados) y los cerdos (carne y derivados) son las principales fuentes de salmonelosis humana. Tras la implementación con éxito de medidas de control en aves, el control de la salmonelosis porcina se ha convertido en una cuestión prioritaria en numerosos países, incluida la UE.

Etiología de la infección, transmisión y taxonomía de *Salmonella* spp.

Las bacterias del género *Salmonella* son bacilos Gram-negativos, anaerobios facultativos, portadores de flagelos peritricos y no formadores de esporas. Es una bacteria muy sensible a la acidez, por lo que es destruida en gran medida en el estómago, salvo que existan factores que contrarresten el pH ácido natural. El principal nicho ecológico de *Salmonella* spp. es la pared intestinal de un amplio rango de hospedadores, desde donde se libera al medio ambiente a través de las heces. En determinadas condiciones ambientales, es una bacteria altamente resistente, pudiendo contaminar agua, superficies y alimentos, desde donde se transmite a otros animales y al ser humano, por ingestión o por contacto directo. Se trata de una bacteria ubicuitaria, muy frecuente en animales de abasto, cuya carne y productos derivados son la principal fuente de infección para el ser humano. La ingestión de huevos y sus derivados, seguidos del cerdo y sus derivados son los alimentos mayoritariamente implicados en los casos de salmonelosis humana (Figura 1). Asimismo, la infección puede contraerse por la ingestión de leche de vaca no pasteurizada, de carne de pollo, pavo, ternera o pescado, y también a través de vegetales contaminados de forma exógena e incluso hortalizas contaminadas a través del estiércol (3, 6, 7). Además, se pueden producir casos por contacto directo con animales infectados asintómicamente, incluidas las mascotas que, al igual que las tortugas, reptiles, roedores y aves de vida libre pueden contaminarse y contribuir a la infección en humanos (8-11).

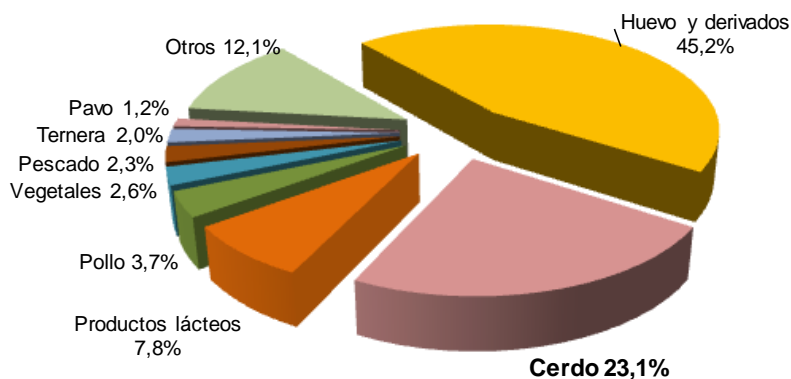


Figura 1. Distribución del origen de los brotes de salmonelosis humana en la UE durante el año 2012 (3).

Dentro de la Familia *Enterobacteriaceae*, la clasificación taxonómica de *Salmonella* ha sido compleja debido al constante aislamiento de nuevos serotipos. Actualmente, todas las cepas se agrupan en dos únicas especies: *S. bongori* (no patógena para el ser humano) y *S. enterica* (12). A su vez, *S. enterica* se clasifica en 6 subespecies: *enterica*, *salamae*, *arizonae*, *diarizonae*, *houtenae* e *indica*, inicialmente nombradas con números romanos según se muestra en la Tabla 1. Estas subespecies se diferencian por ciertas características bioquímicas y de susceptibilidad a la lisis por el bacteriófago Félix O1 (13). Generalmente, la subespecie *enterica* (I) se encuentra habitualmente en animales de sangre caliente y humanos, mientras que *S. bongori* y las demás subespecies de *S. enterica* se encuentran en poiquiloterms y en el medio ambiente. Hasta el momento, se han identificado un total de 51 serogrupos y más de 2.600 serotipos diferentes de *S. enterica* (14), como se resume en la Tabla 1. Los serogrupos se han ido nombrando por orden de aparición, de forma que los 35 primeros se nombraron con letras de la A a la Z, más la subdivisión de los serogrupos C, D y E en 4 subgrupos (nombrando del 1 al 4 cada uno de ellos); y los 16 serotipos siguientes se nombraron con números del 51 al 67. Las cepas más frecuentemente aisladas en casos clínicos de salmonelosis humana pertenecen a los serogrupos A, B, C1, C2, D y E (3).

Tabla 1. Clasificación taxonómica, nomenclatura y número de serotipos de *Salmonella* spp. identificados en cada subespecie.

Especie ^a	Subespecie ^a	Serogrupo	No. serotipos
<i>S. bongori</i> (V)		D1, G, H, R, V, Y, 60, 61, 66	22
<i>S. enterica</i>			2.637
	<i>enterica</i> (I)	A-C4, D1, D2, E1-E4, F-Z, 51-54, 57, 67	1.586
	<i>salamae</i> (II)	B-C2, C4, D1-D3, E1, E2, F-Z, 51-53, 55-60, 65	522
	<i>arizonae</i> (IIIa)	F, G, I-L, O, P, R-Z, 51, 53, 56, 59, 62, 63	102
	<i>diarizonae</i> (IIIb)	C1, C3, C4, F-M, O, P, R-V, X-Z, 51-53, 57-61, 63, 65	338
	<i>houtenae</i> (IV)	C1, F, H-L, P, R-Z, 51, 53, 57	76
	<i>indica</i> (VI)	C1, F, H, K, S, W, Y, Z, 59	13

^a Denominación actual e (inicial) de las especies y subespecies de *Salmonella*

La clasificación de los serotipos de *Salmonella* spp. se realiza siguiendo la fórmula antigénica descrita en el esquema de Kauffman-White (13), según las características de los antígenos: *i*) somáticos de superficie (antígenos O), expresados por el polisacárido O del lipopolisacárido (LPS); *ii*) flagelares (antígenos H), expresados por proteínas flagelares, móviles y antígenos de 1ª y 2ª fase; y *iii*) capsulares (antígenos Vi). De acuerdo con esto, las cepas de *Salmonella* se nombran indicando, primero, la especie, luego, la subespecie y, por último, la fórmula antigénica completa o, si existe, el nombre del serotipo (13). Así, por ejemplo, *Salmonella enterica* subespecie *enterica* serotipo 1,4,[5],12:i:1,2 puede denominarse también *Salmonella enterica* subespecie *enterica* serotipo Typhimurium. Puesto que estas nomenclaturas resultan muy extensas, a efectos prácticos (como haremos en esta Tesis Doctoral) se utiliza una denominación abreviada que consiste en nombrar *Salmonella* como “S.” (en cursiva y mayúscula) seguida del nombre del serotipo sin cursiva y con la primera letra en mayúsculas (en el ejemplo anterior, *S. Typhimurium*).

Prácticamente todos los serotipos son considerados potencialmente patógenos para el ser humano, pero tienen distinto grado de adaptación al hospedador (Figura 2) (2) de forma que hay: *(i)* serotipos “restringidos”, como *S. Typhi*, *S. Paratyphi A* y *S. Sendai*, que son específicos del ser humano, *S. Gallinarum*, en aves de corral, y *S. Abortusovis*, en ganado ovino, causando una enfermedad sistémica muy severa; *(ii)* serotipos “adaptados” a una especie animal (como *S. Choleraesuis* al porcino y *S. Dublin* al vacuno) y sólo afectan al hombre ocasionalmente, pero

cuando lo hacen suelen ocasionar enfermedad grave, poniendo en peligro la vida del individuo (15, 16); y (iii) serotipos “generalistas” o que no están adaptados a ningún hospedador (como *S. Enteritidis*, *S. Typhimurium* o *S. Infantis*, pero también la gran mayoría de los serotipos) que, afectan a un amplio rango de animales y al ser humano, son ubicuarios y son los más relevantes como zoonosis (3). Así, *Enteritidis* y *Typhimurium* representan el 63,4% del total de los serotipos notificados en la UE y comúnmente se asocian a la ingestión de productos de origen aviar y porcino, respectivamente (3).

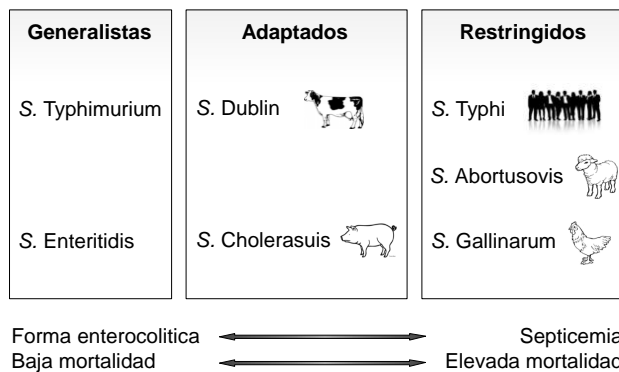


Figura 2. Adaptación al huésped y formas clínicas inducidas por la infección con algunos serotipos de *Salmonella* spp. Adaptado de Feasey y cols. (2).

Patogénesis de la infección por *Salmonella* spp.

Salmonella penetra en el organismo mediante el consumo de alimentos o agua contaminados, recorre la cavidad bucal y el esófago hasta llegar al estómago, donde el microambiente ácido destruye una gran proporción del microorganismo ingerido, con menor eficacia en caso de ir acompañado de alimentos que neutralicen el pH gástrico. Las bacterias que sobreviven pasan al intestino, se adhieren al epitelio intestinal (fundamentalmente, en la parte distal del íleon y el ciego) y lo atraviesan, alcanzando las placas de Peyer a través de las células M, que además facilitan el procesamiento del patógeno en las células fagocíticas y la presentación antigénica al sistema inmune (17). En este momento, *Salmonella* produce efectos citotóxicos que conllevan: (i) destrucción de células M y enterocitos adyacentes con liberación masiva del patógeno a la luz intestinal; (ii) apoptosis de macrófagos (células diana de esta infección) e inflamación aguda debida a la liberación de elevados niveles de citoquinas como el factor de necrosis tumoral alfa (TNF- α) y la interleucina 1 (IL-1); y (iii) invasión y supervivencia del

patógeno en macrófagos que lo vehiculizan hasta los ganglios linfático mesentéricos (GLM) y, en caso de no controlarse la infección a ese nivel, pasa al torrente sanguíneo, sistema retículoendotelial y al resto del organismo provocando septicemia (Figura 3).

A nivel celular, el primer reconocimiento de *Salmonella* por parte del sistema inmune innato es mediado por el receptor TLR-4 existente en macrófagos y otras células presentadoras de antígenos para reconocer específicamente moléculas de LPS, activando una respuesta transcripcional frente a patógenos extracelulares (18). La estimulación de este receptor potencia la expresión en macrófagos de citoquinas proinflamatorias como TNF- α y IL-1 y de proteínas tipo enzimas proteolíticas y péptidos catiónicos antimicrobianos (Figura 3) (19). A continuación, otros mecanismos contribuyen al control de *Salmonella* por parte el sistema inmune, como la acidificación de los compartimentos intracelulares que contienen al patógeno, la producción de defensinas y la secreción de reactivos intermediarios del oxígeno (20). Tras la infección, tanto la respuesta humoral (principalmente, frente al LPS y a determinadas proteínas de membrana externa de *Salmonella*) como la respuesta celular T específica pueden ser detectadas en animales domésticos y humanos.

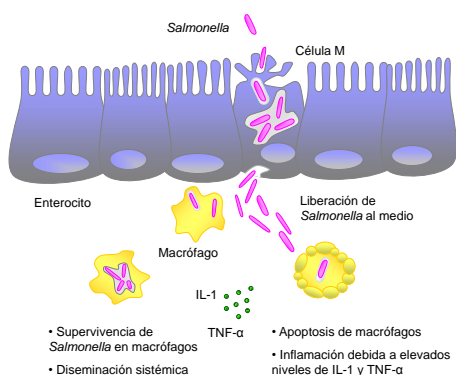


Figura 3. Representación gráfica de la patogénesis de *Salmonella* spp. en el tracto intestinal.

IL-1: interleucina 1; TNF- α : factor de necrosis tumoral α .

Durante la infección entérica aguda, el patógeno es excretado masivamente a través de las heces y, eventualmente, puede inducir infecciones persistentes de carácter subclínico, con excreción intermitente en las heces durante largos períodos de tiempo. Así, los huéspedes infectados de manera asintomática actúan como fuente de infección para los huéspedes sanos, bien por contacto directo o por contaminación indirecta a través de la comida. Por el

contrario, en los casos clínicos más agresivos, el patógeno pasa a la corriente linfática y sanguínea, se disemina a los GLM, bazo, hígado y otros órganos, provocando una infección sistémica o septicemia.

A lo largo del proceso de patogénesis de *Salmonella*, las relaciones que se establecen entre el huésped y el patógeno forman un entramado complejo en el que cada organismo exhibe diversas herramientas de supervivencia. Por una parte, el huésped despliega su respuesta inmune innata para eliminar la infección de su organismo y, por otra parte, *Salmonella* compete con la microbiota del huésped para alcanzar su célula diana y, así, desplegar estrategias de supervivencia en ambientes extremos (21). De hecho, se ha descrito que las fimbrias y las adhesinas son expuestas en un intento del patógeno por mantenerse dentro del tracto intestinal (22). De forma similar, las estrategias de supervivencia frente al ambiente ácido del estómago (modificación de la composición en ácidos grasos de la membrana bacteriana, existencia de distintos sistemas homeostáticos, producción de proteínas de choque ácido) (23) y la habilidad del patógeno para utilizar metabolitos relacionados con la inflamación proporcionan una ventaja competitiva en su crecimiento con respecto a la microbiota del huésped (24). Además, otros factores externos, como la administración reciente de un tratamiento antibiótico, podrían favorecer el establecimiento de la infección por *Salmonella* y prolongar su excreción, al quedar inhibida la microbiota propia del huésped (25).

Formas clínicas y tratamiento de la salmonelosis

La salmonelosis humana suele cursar con síntomas de gastroenteritis aguda (diarrea, vómitos, dolor abdominal y fiebre) que aparecen entre 6 y 72 horas (generalmente, entre 12 y 36 horas) después de la ingestión del alimento contaminado y suele remitir antes de una semana. Durante esta fase, se recomienda únicamente el tratamiento paliativo de los síntomas, basado en dieta blanda, rehidratación, control de la hipertermia y una higiene personal meticulosa, quedando los tratamientos antibióticos limitados exclusivamente a los casos de complicación por septicemia. Esta complicación es particularmente peligrosa e incluso fatal en pacientes inmunodeprimidos (por infecciones con VIH, diabetes, cáncer o tratamiento con quimioterápicos), pacientes con alteraciones en la flora intestinal endógena y para niños o personas de edad avanzada. En estos casos, la efectividad del tratamiento antibiótico aplicado es esencial para la supervivencia del paciente, por lo que se requiere determinar el perfil de

RA del patógeno durante la fase inicial de la infección (5), máxime teniendo en cuenta la particular facilidad de *Salmonella* para adquirir genes de RA y la creciente emergencia de cepas con RA a productos utilizados para el tratamiento de personas (ver apartado Resistencias antimicrobianas en cepas de *Salmonella* de origen animal).

En los animales, la infección puede afectar a prácticamente todas las especies, siendo más susceptibles los más jóvenes y los animales gestantes. La manifestación clínica más común es la enfermedad entérica, que a menudo se presenta como una diarrea sanguinolenta o profusa acompañada de fiebre, pero se puede observar un amplio espectro de signos clínicos, como septicemia aguda, aborto, artritis, necrosis de las extremidades y enfermedad respiratoria.

Desde el punto de vista zoonótico, las infecciones animales por *Salmonella* más relevantes son las de aves y cerdos, por ser las principales fuentes de contaminación humana. En ambos casos, la infección puede cursar en forma clínica o subclínica y, a su vez, las formas clínicas pueden ser septicémicas o enterocolíticas. La forma septicémica suele estar causada por *S. Gallinarum* en aves y por *S. Cholerasuis* en cerdo, afectando a animales jóvenes (en el porcino, suele darse en el inicio de la transición, siendo muy rara en lechones lactantes). Se produce una enteritis necrosante caracterizada por diarrea profusa, fiebre, deshidratación, rápida pérdida de peso, debilidad general y, en ausencia de un tratamiento adecuado, puede dar lugar a una infección sistémica por septicemia y una elevada tasa de mortalidad. Los animales sometidos a tratamiento que se recuperan suelen quedar como portadores asintomáticos y continúan eliminando la bacteria a través de las heces, durante largos periodos de tiempo. Por otro lado, la forma enterocolítica está causada principalmente por *S. Enteritidis* (aves), *S. Typhimurium* (cerdos) y otros serotipos generalistas, pudiendo darse en cualquier momento de la vida productiva (en cerdos, se da con mayor frecuencia al inicio del cebo, i.e. 4-5 meses de edad). Se caracteriza por una gastroenteritis aguda con enteritis catarral, que se manifiesta con diarrea como síntoma principal. Los animales suelen recuperarse de forma espontánea, excretando el patógeno en heces durante largos periodos de tiempo (meses o incluso años) de forma intermitente, con lo que actúan como portadores asintomáticos del patógeno difícilmente detectables (26).

Las infecciones subclínicas o totalmente asintomáticas son la forma más frecuente de presentación de la salmonelosis tanto en aves como en ganado porcino, implicando a una gran variedad de serotipos. En estos casos, las bacterias se alojan durante largos periodos en los GLM y tracto intestinal y, desde allí, en determinadas circunstancias, se replican

activamente y son excretadas por las heces, de forma intermitente (26, 27). Estos animales constituyen los reservorios más importantes del patógeno ya que, mientras que las formas clínicas son fácilmente detectables, los portadores asintomáticos no siempre son detectados en los programas de control rutinarios (ver apartado Diagnóstico de la salmonelosis porcina), lo que implica un riesgo de infección importante para otros animales y el ser humano (28).

Resistencias antimicrobianas en cepas de *Salmonella* de origen animal

Un problema adicional a la salmonelosis es la aparición de cepas de *Salmonella* con múltiples RA, que comprometen la eficacia de los tratamientos y, con ello, el pronóstico de las infecciones humanas. Los agentes antimicrobianos no sólo dejan de ser efectivos en tratamientos posteriores sino que además aumentan la gravedad de la enfermedad por alterar la flora intestinal saprofita y la tasa de mortalidad, predisponen a recidivas y favorecen la aparición de portadores asintomáticos. Así, se ha descrito que niños tratados frecuentemente con ampicilina o amoxicilina excretaron *Salmonella* durante períodos de tiempo más largos y sufrieron recaídas más graves que aquellos que no recibieron ningún tratamiento antibiótico, debido a la eliminación de la microbiota endógena y, en consecuencia, el incremento de *Salmonella* a lo largo del tracto intestinal (29). Por ello, es necesario conocer el perfil de RA del agente etiológico, para poder instaurar un tratamiento antibiótico efectivo, en caso de hospitalización.

El uso indiscriminado de antibióticos, tanto en humanos como en animales, está considerado como la principal fuente de emergencia de cepas bacterianas resistentes a varios antibióticos (30). En la década de los 80, aparecieron numerosas cepas bacterianas con RA como resultado del uso excesivo e indebido, tanto por prescripción médica innecesaria como por uso incorrecto por parte de los pacientes, de antibióticos como ampicilina, cloranfenicol y trimetoprim-sulfometoxazol en personas (31). Actualmente, los antibióticos utilizados para el tratamiento de las salmonelosis humanas son fluoroquinolonas en adultos y cefalosporinas de tercera generación en niños (32, 33). Los animales son considerados la principal fuente de cepas de *Salmonella* con múltiples RA, como consecuencia de la presión selectiva derivada del uso sistemático de antibióticos en la dieta (como promotores del crecimiento) y en el tratamiento de múltiples procesos infecciosos (34). En el año 2012, los mayores niveles de tetraciclina, ampicilina y sulfonamidas en cepas de *Salmonella* de origen animal en la UE fueron detectados en ganado porcino y vacuno (32). Asimismo, en un estudio realizado en

Cataluña, la mayor parte de las cepas de *Salmonella* aisladas de porcino presentaron RA a tetraciclina, ampicilina y sulfonamidas (35). En Aragón, el 73,4% de las cepas aisladas de GLM de cerdos de engorde analizadas presentó RA frente a algún agente antimicrobiano y, de ellas, el 75% presentaban RA frente a 3 o más agentes de diferentes familias (36). Además, en los últimos años, se ha notificado la aparición de cepas de origen animal con RA a cefalosporinas de tercera generación, de elección para el tratamiento de salmonelosis infantiles (32, 37). Por ello, la reglamentación europea vigente requiere la vigilancia de las RA en las cepas de *Salmonella* spp. que se aíslan (38). En consecuencia, las regulaciones europeas actuales prohíben el uso de agentes antimicrobianos como promotores del crecimiento desde el 1 de Enero de 2006, recomiendan un uso limitado de los antibióticos en animales y establecen como obligatoria la vigilancia epidemiológica de las RA en todos los aislados de *Salmonella* (39).

Además de la presión selectiva, la adquisición de RA puede deberse a otros factores, como la predisposición de algunos serotipos de *Salmonella* a desarrollar, fijar y transmitir dichas RA. Un ejemplo reciente es la expansión mundial, en animales y humanos, de la cepa *S. Typhimurium* fagotipo DT104 portadora de penta-RA que, si bien podría haber surgido por el uso de antimicrobianos, se considera que el comercio nacional e internacional de animales infectados ha jugado un papel decisivo en su diseminación (40, 41). La aparición de cepas multi-RA de *Salmonella* con RA a fluoroquinolonas y cefalosporinas de tercera generación constituye un serio problema de Salud Pública. No obstante, se requiere un mayor conocimiento de los principales agentes antimicrobianos implicados en las RA de cepas de *Salmonella* spp. de origen animal, así como de los factores que intervienen en su aparición, persistencia y propagación en las explotaciones porcinas, de forma que se puedan establecer programas de reducción de *Salmonella* más eficaces y un uso más racional de los antibióticos en el sector porcino.

Desde un punto de vista genético, *Salmonella* puede adquirir genes de RA mediante transmisión vertical (de célula madre a célula hija) u horizontal (de célula a célula a través de plásmidos). En *Salmonella*, existe una gran cantidad de genes capaces de conferir RA, que pueden localizarse en el cromosoma o en elementos genéticos móviles (como plásmidos o transposones) y disponerse en integrones y/o islas genómicas (42).

Los integrones son sistemas no móviles de captura de genes, mediante integración de uno o varios genes cassette, que además de otras funciones pueden codificar una o múltiples RA

(43). Los integrones presentan una estructura particular formada invariablemente por tres elementos necesarios: un gen que codifica una integrasa responsable de la recombinación de genes cassette; un lugar de recombinación sitio-específico; y un promotor para la integrasa y, a veces, un segundo promotor para los genes cassette integrados (44). Se clasifican, en función de la secuencia de la integrasa, en nueve clases, de las cuales las clases 1, 2, 3 y 9 están relacionadas con RA. Los integrones clase 1 (IC1) son los más frecuentes en casos de salmonelosis clínica (45) y poseen una secuencia conservada (CS) en posición 5' (5'CS) con el gen de la integrasa y, generalmente, también una CS en 3' (3'CS) que confiere resistencia a sulfonamidas y compuestos de amonio cuaternario.

Por otro lado, las islas genómicas son elementos generalmente móviles formados por un conjunto flexible de genes capaces de modificar funciones no esenciales para la célula, pero que confieren ventajas selectivas (como producción de toxinas, factores de adherencia, etc.) en determinadas condiciones (46). Generalmente, se localizan en el cromosoma, pero se han descrito también en plásmidos, transportando grupos de genes que se incorporan al nuevo DNA en bloque. En *Salmonella*, la isla genómica más frecuentemente relaciona con genes RA es la SGI1 (del inglés, *Salmonella Genetic Island*), cuya estructura está flanqueada por secuencias repetidas directas (*Left junction* y *Right junction*) e incluye dos IC1, denominados *InC* e *InD*, portadores de diversos genes de RA (47). Estos integrones pueden alojarse bien en el cromosoma bacteriano, mediante la SGI1 (como ocurre en *S. Typhimurium*) o bien en un plásmido, como ocurre en la variante monofásica de *S. Typhimurium* ó *S. 4,5,12:i:-* (48).

La presencia de cepas de *Salmonella* con múltiples RA es motivo de vigilancia epidemiológica, por su grave riesgo de diseminación y las consiguientes complicaciones a la hora de aplicar terapias hospitalarias. Los antibióticos recomendados para los estudios epidemiológicos de *Salmonella* spp. de origen porcino en la UE (39) son los más utilizados en los tratamientos de infecciones humanas, algunos de ellos comunes a los utilizados en veterinaria y otros homólogos a los usados en animales (Tabla 2). Estos compuestos pertenecen a 7 familias diferentes de antimicrobianos, que atendiendo a su mecanismo de acción y estructura química son: β -lactámicos (aminopenicilinas y cefalosporinas), anfenícolos, aminoglucósidos, tetraciclinas, quinolonas, sulfamidas y diaminopirimidinas (49). En la Tabla 2, se muestran los principales antibióticos utilizados para la caracterización de las cepas de *Salmonella* de origen porcino, la familia de antimicrobianos a la que pertenecen y su principal mecanismo de acción.

Tabla 2. Clasificación de los agentes antimicrobianos recomendados para la vigilancia y control de las cepas de *Salmonella* spp. de origen porcino, según la familia a la que pertenecen y el mecanismo de acción antibacteriana.

Antimicrobianos		
Agentes utilizados en tratamientos humanos / animales	Familia de antimicrobianos	Mecanismo de acción
Ampicilina / Amoxicilina	Aminopenicilinas	Inhibición de la síntesis de la pared bacteriana
Amoxicilina-Clavulánico		
Cefotaxima / Ceftiofur		
Cloranfenicol	Anfenicoles	
Estreptomicina / Espectinomina	Aminoglucósidos	Inhibición de la síntesis proteica
Gentamicina / Neomicina		
Tetraciclina / Doxiciclina		
Ácido nalidíxico	Quinolonas	Alteración del metabolismo o la estructura de los ácidos nucleicos
Ciprofloxacino / Ciprofloxitina		
Sulfisoxazol / Sulfometoxazol	Sulfamidas	Bloqueo de la síntesis de factores metabólicos
Trimetoprim	Diaminopirimidinas	
Trimetoprim-Sulfametoxazol		

Importancia y gestión de la salmonelosis porcina en el contexto europeo

En la UE, el porcino es la segunda fuente más importante de infección por *Salmonella* spp. para el ser humano, después de los huevos y sus derivados (Figura 1) (3). Tras el éxito de las medidas implementadas en aves de corral, la salmonelosis porcina está cobrando una relevancia creciente como zoonosis (3). En cerdos, las infecciones subclínicas por *Salmonella* spp. son las más frecuentes, constituyendo un gran problema de Salud Pública. Además de la dificultad para detectar a los animales portadores del patógeno, se trata de una infección de difícil control en los cerdos, puesto que están expuestos a múltiples fuentes de infección por *Salmonella*, tanto a lo largo de toda su vida productiva en la granja (agua, pienso, roedores y otros animales de vida libre que actúan como vectores (50)) como durante el transporte y espera en matadero (51). Además, son animales muy susceptibles al estrés del transporte y

del manejo al que se ven sometidos en los sistemas de explotación intensiva, generándoles mayor vulnerabilidad frente a la infección y a la multiplicación del patógeno en GLM, con la consiguiente excreción del patógeno al medio ambiente a través de las heces. En el matadero, los animales infectados y/o excretores contaminan otras canales, introduciendo así el patógeno en la cadena alimentaria.

Con la finalidad de proteger la salud de los consumidores, las autoridades sanitarias de la UE, a través de la Directiva 2003/99/CE sobre la vigilancia de las zoonosis y los agentes zoonóticos (52) y del Reglamento CE 2160/2003 sobre el control de *Salmonella* y otros agentes zoonóticos transmitidos por los alimentos (5), establecieron la obligatoriedad de poner en marcha programas específicos para la detección y el control de *Salmonella* spp. mediante un control exhaustivo de todas las fases de la cadena alimentaria "de la granja a la mesa". Antes de establecer medidas de control de la salmonelosis porcina en todo el entorno europeo, se han realizado estudios de referencia en 25 Estados Miembros y en Noruega, utilizando idéntica metodología, para conocer la prevalencia y el tipo de cepas circulantes en el ganado porcino de los distintos países (53). Con la información recopilada (51, 53-55), está previsto fijar en breve unos objetivos comunitarios de reducción de la prevalencia de la salmonelosis porcina, que contemplan medidas restrictivas en el comercio internacional para aquellos países que no los cumplan (5). De hecho, países como Holanda y Dinamarca ya han logrado eliminar esta infección de su población de ganado porcino; y otros países como Alemania (primer productor europeo de carne de cerdo) y Reino Unido están aplicando programas de control que les permitan mejorar la seguridad alimentaria de sus productos del cerdo. Para que el sector porcino español siga siendo competitivo al nivel internacional, urge establecer las medidas más efectivas para el control de la alta tasa de infección existente en nuestro país.

Importancia del sector porcino de España

El sector porcino español es un pilar fundamental de los recursos ganaderos de nuestro país, que es el segundo mayor productor europeo de porcino y cuarto del mundo, sólo superado por EEUU, China y Alemania (56) (Figura 4). En 2013, se produjeron 3.439.466 toneladas de carne de cerdo en nuestro país, lo que supone un 15,7% del total de la carne producida por los 28 países de la UE. De ellas, 1.074.350 de toneladas de carne fueron exportadas a otros países de la UE y 281.697 toneladas a países terceros (56), por lo que somos un país eminentemente exportador de carne de cerdo.

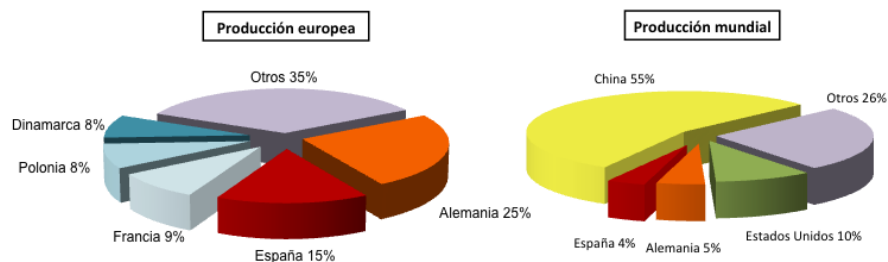


Figura 4. Principales países europeos (izda.) y del mundo (dcha.) productores de carne de cerdo en 2013 (56).

Además, el sector porcino de España ha experimentado un notable desarrollo durante la última década. Según los datos facilitados por el Ministerio de Agricultura, Alimentación y Medio Ambiente (MAGRAMA), la producción de carne de cerdo en España se incrementó en un 7,8% (56, 57) y las exportaciones de este producto en un 172,9%, superando los 1,3 millones de toneladas en el año 2013 (56). Asimismo, cabe destacar el incremento experimentado en la exportación de despojos dentro de la UE (71,8%) y a terceros países (397,8%) entre los años 2006 y 2013 (56).

Actualmente, las principales Comunidades Autónomas (CC.AA.) productoras de porcino son Cataluña (con una producción de 1.502.490 toneladas de carne, en 2013) seguida de lejos por Castilla-León (444.447 toneladas, en el mismo año), lo que supone el 56,6% de la producción total nacional (Figura 5) (56).

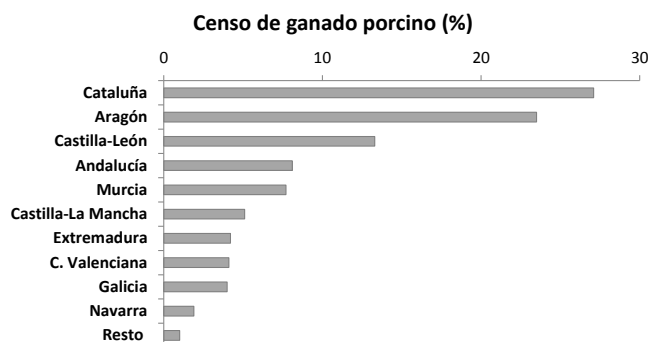


Figura 5. Censo porcino existente por CC.AA. en España en 2012.

Teniendo en cuenta la importancia del sector porcino en nuestro país y las exigencias europeas en materia de salmonelosis, el control de la salmonelosis en el porcino producido en España debe ser considerado como una herramienta económica y de internacionalización que evitará la depreciación de nuestros productos y sin duda redundará en beneficio del sector. El éxito y la viabilidad de las medidas a establecer dependen de numerosos factores de riesgo (ver apartado Control de la salmonelosis porcina) propios de cada contexto epidemiológico, que influyen tanto en la facilidad de transmisión del patógeno como en la predisposición a la infección de los animales, determinando todo ello la prevalencia existente en cada país. De hecho, en los estudios de referencia europeos, se observó que España es el país de la UE con mayores niveles de prevalencia de salmonelosis porcina, detectándose el patógeno en el 29% de los GLM de cerdos de engorde analizados (Figura 6) (54). Resultados similares se encontraron en un estudio más detallado realizado en Aragón, con un 31% de los animales infectados (36). Al nivel de granja, España también se situó a la cabeza de los Estados Miembros en los estudios de referencia realizados con heces que demostraron la presencia de *Salmonella* spp. en un 53% y 64% de granjas de cerdos engorde y de cerdas reproductoras, respectivamente (53, 54).

Como puede apreciarse en la Figura 6, existe una gran variabilidad en la prevalencia de salmonelosis porcina entre regiones europeas muy próximas. Por lo tanto, es necesario conocer la situación epidemiológica y sanitaria particular de cada región productora, para instaurar las medidas de control adecuadas a sus circunstancias epidemiológicas y así reducir de forma eficaz la prevalencia de esta importante zoonosis en nuestro país. El estudio de referencia realizado en España para la UE refleja únicamente la prevalencia y condiciones de las CC.AA. con mayor censo porcino (Cataluña y Aragón, en el momento del estudio europeo; ver Figura 5), por ser las que han contribuido con mayor número de muestras. Sin embargo, se desconoce totalmente cuál es la situación epidemiológica y sanitaria de la salmonelosis porcina en otras CC.AA., como en Navarra, en las que el sector porcino es clave en la economía ganadera regional.

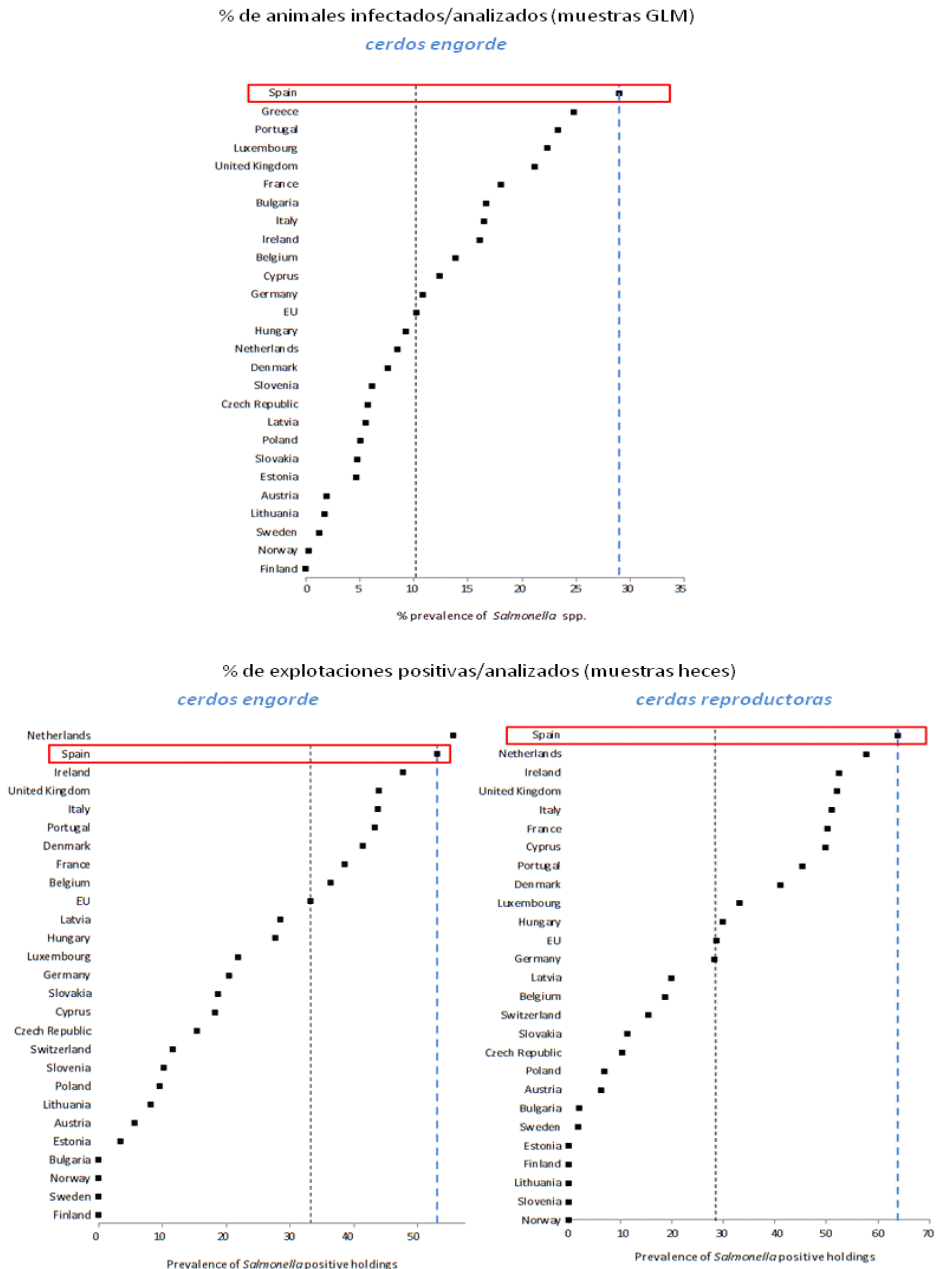


Figura 6. Resultados de prevalencia de salmonelosis porcina obtenidos en los estudios de referencia realizados en la UE. La línea de puntos fina indica la prevalencia media en la UE y la línea de puntos gruesa indica la prevalencia en España.

El sector porcino en Navarra

La C.F. de Navarra, a pesar de ser uniprovincial, es la décima CC.AA. con mayor censo de cebo (unos 400.000 cerdos) y la quinta con mayor censo de reproductoras (unas 65.000 cerdas) de España (57). La producción porcina, tanto de cebo como de reproductoras, supone una de las principales fuentes de ingresos de la actividad ganadera de Navarra, donde la mayoría de los animales criados y de la carne producida es exportada. Por ejemplo, en 2011, se exportaron a otras CC.AA. un total de 1.196.930 de los lechones nacidos en Navarra, de los cuales aproximadamente la mitad se utilizaron para cebo (558.048 animales) y la otra mitad (638.882 animales) se utilizaron para sacrificio y producción cárnica (58). Además, las granjas y censos porcinos de la C.F. de Navarra tienen la particularidad de seguir una distribución geográfica característica, acorde a la orografía del terreno y a factores socio-económicos. Así, en la Zona Norte y Oeste las explotaciones porcinas presentan un sistema de producción extensivo o semi-intensivo, con un bajo número de individuos por granja que, a su vez, conviven con animales de distintas especies. Este sistema de explotación contribuye de forma muy importante al mantenimiento y desarrollo de las zonas rurales del Norte de Navarra. Por el contrario, en la Zona Media y Ribera de la C.F., las explotaciones tienen un carácter altamente industrializado con un elevado número de cerdos (tanto ganado reproductor como de engorde) alojados en un reducido número de explotaciones. En particular, cuando se planteó este trabajo, el censo de cerdas reproductoras en Navarra era de 65.308 madres, distribuidas en 763 explotaciones con mucha heterogeneidad de tamaños, predominando (93%) las explotaciones de pequeño tamaño (con menos de 200 cerdas/explotación) localizadas en la zona Norte y Oeste, que contenían tan sólo el 16% del censo total (Figura 7). Por el contrario, más de la mitad (58%) del censo total se encontraba agrupado en tan sólo 16 explotaciones industrializadas (2% de las explotaciones totales existentes) de gran tamaño (con más de 1.200 cerdas/explotación) situadas en la Zona Media y Ribera de la C.F. de Navarra (Figura 7).

De forma similar, el porcino de engorde se encuentra concentrado en sólo 158 explotaciones altamente industrializadas situadas en la Zona Media y Ribera de Navarra. Todas ellas presentaban un tamaño medio de unos 2.900 animales/explotación, superando siempre un mínimo de 1000 cabezas por explotación (Figura 8).

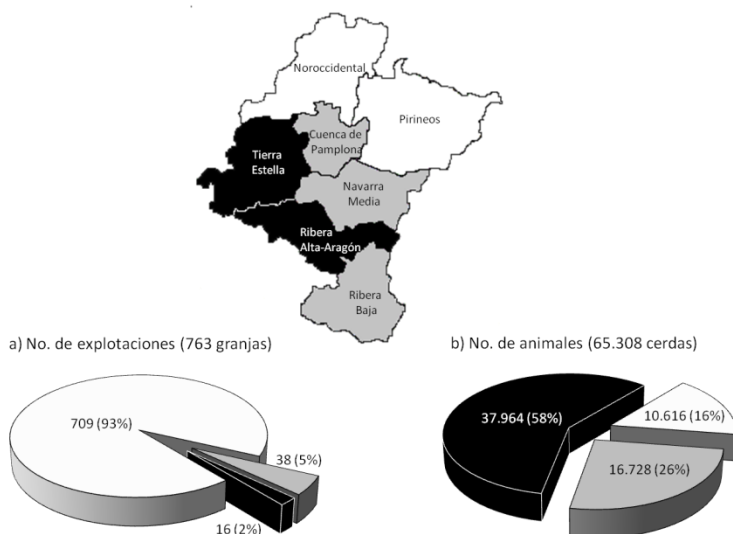


Figura 7. Distribución del número (%) de (a) explotaciones y (b) cerdas reproductoras existentes en Navarra en el año 2011.

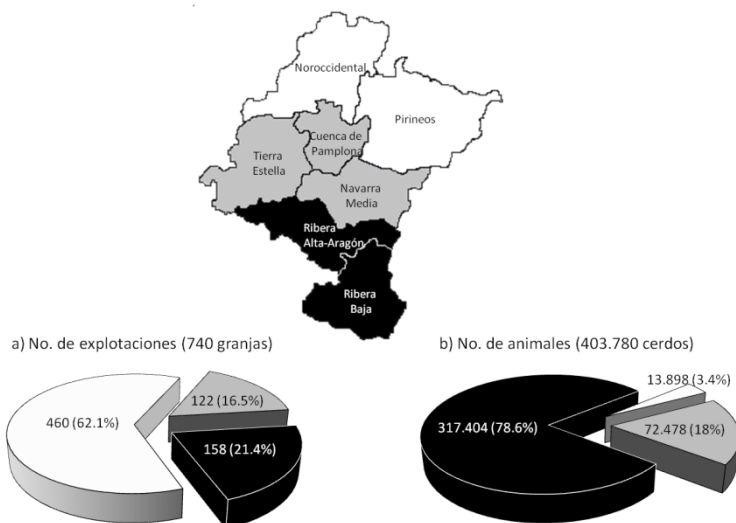


Figura 8. Distribución del número (%) de (a) explotaciones y (b) cerdas de engorde existentes en Navarra en el año 2011.

Diagnóstico de la salmonelosis porcina

La elección de herramientas diagnósticas adecuadas es esencial para el éxito de los programas de control de la salmonelosis porcina.

A) Diagnóstico microbiológico. El procedimiento recomendado internacionalmente para el seguimiento y control epidemiológico de las cepas de *Salmonella* de origen porcino es el aislamiento y caracterización microbiológica del patógeno (5, 38). Las muestras de elección para el aislamiento del microorganismo son heces (*in vivo*) y GLM (*post-mortem*). Ambos tipos de muestras tienen distinto significado biológico y epidemiológico. Así, el aislamiento del patógeno en GLM es la única prueba indiscutible de la existencia de infección real en el individuo, que puede actuar como reservorio y fuente de excreción intermitente del patógeno, transmitiéndolo a otros animales y al ser humano. Aunque sólo permite realizar el diagnóstico *post mortem* (en el matadero), este tipo de muestras indica la presencia del patógeno dentro de los tejidos del animal y, por lo tanto, una alta probabilidad de transmisión humana a través de los alimentos, directamente y/o mediante contaminación cruzada con otros productos de la cadena alimentaria. Por el contrario, la presencia de la bacteria en muestras de heces puede deberse no sólo a una excreción activa a partir de enterocitos infectados, sino también a contaminaciones ambientales (muestras recogidas del suelo o del exterior del ano) o a la presencia pasiva del microorganismo en el contenido intestinal (muestras recogidas del ano) como consecuencia de la ingestión sin causar infección en el animal. Además, las muestras de heces tienen el inconveniente de que (i) la excreción de *Salmonella* en heces es intermitente; (ii) se produce en muy baja concentración; (iii) va acompañada de gran cantidad de enterobacterias saprofitas (preferentemente *E. coli*); y (iv) las técnicas existentes tienen una baja sensibilidad para este tipo de muestras (64). A nivel epidemiológico, generalmente se mezclan heces de varios animales para hacer un diagnóstico al nivel de granja.

El aislamiento de *Salmonella* spp. a partir de muestras veterinarias (generalmente acompañadas de contaminantes ambientales, además de la microbiota saprofita propia del animal) que poseen bajo número de *Salmonella* (como ocurre en las infecciones subclínicas del ganado porcino) requiere técnicas específicas de enriquecimiento y selección del microorganismo. En la literatura se han descrito numerosas estrategias para el aislamiento microbiológico de *Salmonella* que difieren en distintos aspectos, como el tipo y la cantidad de muestra de origen, la realización de un pre-enriquecimiento no selectivo (65), el período de

incubación y la composición del medio de enriquecimiento no selectivo (66) o de los medios de enriquecimiento selectivo (67). Aunque todas ellas favorecen el aislamiento de *Salmonella* en determinadas circunstancias, las técnicas de elección para los estudios epidemiológicos de referencia deben implicar la utilización de técnicas bien estandarizadas que garanticen la fiabilidad y comparación de los resultados obtenidos, como ocurre con las Normas de Calidad tipo ISO (*International Standardization Organization*) o tipo HPA (*Health Protection Agency* de Reino Unido) (53, 54). La técnica recomendada internacionalmente para el análisis comparativo de la prevalencia de la salmonelosis porcina en distintas áreas y/o países (1, 38) es la norma UNE-EN ISO 6579:2002/Amd 1:2007 (en adelante, ISO 6579) con pequeñas variaciones, dependiendo del tipo de muestra a analizar (68). La norma ISO 6579 comprende un uso escalonado de medios de cultivo, desde nada hasta altamente selectivos, para lograr un aislamiento satisfactorio de *Salmonella* (Figura 9) realizando, en primer lugar, un pre-enriquecimiento bacteriano no-selectivo en agua de peptona tamponada (BPW, del inglés *Buffered Peptone Water*), seguido de un enriquecimiento semi-selectivo en el medio semisólido Rappaport-Vassiliadis modificado (MSRV, del inglés *Modified Semisolid Rappaport Vassiliadis*) y un cultivo selectivo final en dos medios sólidos, como son el de agar Xilosa Lisina Deoxicolato (XLD, del inglés *Xilose Lysine Deoxycholate*) y el de agar Verde Brillante (BGA, del inglés *Brilliant Green Agar*). Tras la purificación de colonias individuales sospechosas en placas de agar nutritivo, además de los criterios morfológicos, se realizan diversas pruebas bioquímicas, como las pruebas de la Ureasa, Indol, Agar Lisina Hierro y Agar Triple Azúcar Hierro, para la identificación presuntiva de las colonias sospechosas. Finalmente, los aislados deben ser confirmados mediante serotipado por aglutinación in porta con sueros monoclonales bien estandarizados para identificar las variantes de los antígenos O, H y Vi (ver apartado Etiología de la infección, transmisión y taxonomía de *Salmonella* spp.). Existen más de 150 sueros específicos para el serotipado de *Salmonella* spp. y, para tener validez internacional, debe ser llevada a cabo por personal técnico acreditado en los Centros de Referencia de *Salmonella* de cada país.

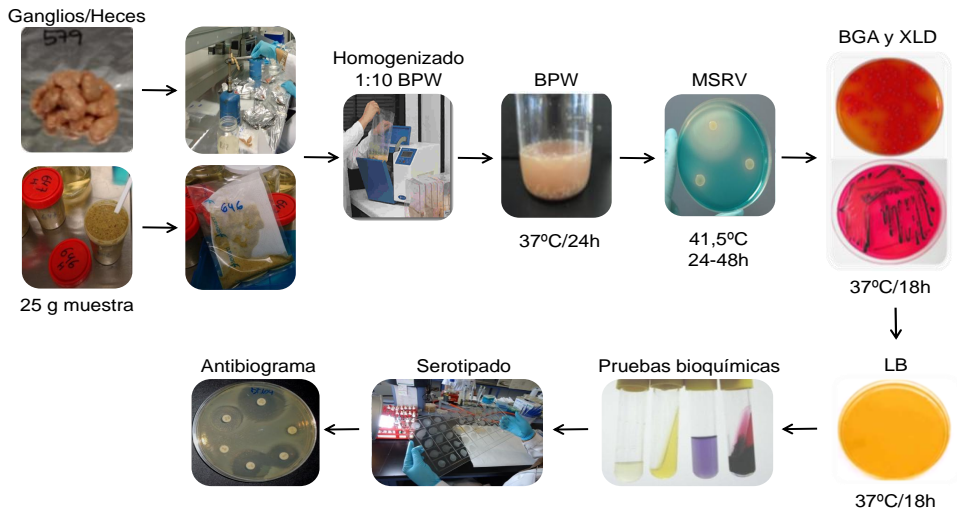


Figura 9. Protocolo para el aislamiento de *Salmonella* en GLM y heces de animales domésticos mediante la técnica microbiológica UNE-EN ISO 6579:2002/Amd 1:2007. BPW: Agua de peptona tamponada; MSRV: Medio Semisólido Rappaport-Vassiliadis Modificado; BGA: Agar Verde Brillante; XLD: Agar Xilosa-Lisina Deoxicolato; LB: Agar Luria-Bertani.

Como se ha comentado anteriormente, la emergencia y propagación de cepas de *Salmonella* spp. de origen porcino con múltiples RA es un problema de gran trascendencia, tanto a efectos clínicos como epidemiológicos. Por ello, una vez aislado el patógeno, los estudios de referencia incluyen analizar los perfiles de RA frente a diferentes agentes antimicrobianos (Tabla 2). Las pruebas más utilizadas para ello son el test de Concentración Mínima Inhibitoria y el test de difusión de disco en gel de agar o de Kirby-Bauer (69), ambas recomendadas por la UE (38). El método de Kirby-Bauer es el más utilizado en los laboratorios de microbiología clínica cuando se analiza la resistencia frente a varios antibióticos sobre una misma cepa (conocido como antibiograma), por tratarse de una prueba sencilla, reproducible, de bajo coste, con la que se tiene amplia información y que permite comparar los resultados obtenidos en distintos laboratorios. Este método ha sido validado con una amplia variedad de microorganismos y agentes antimicrobianos y es el recomendado por el Instituto de Estándares Clínicos y de Laboratorio, que publica periódicamente los estándares recomendados para valorar la susceptibilidad de cada microorganismo (70). Así, las cepas se clasifican como sensibles, intermedias o resistentes, de acuerdo con el diámetro del halo de

inhibición obtenido para un determinado antibiótico (Figura 10). En ocasiones, algunas cepas bacterianas pueden presentar colonias resistentes dentro del halo de inhibición. En estos casos, la cepa debe clasificarse como resistente al antimicrobiano en cuestión, si bien puede tratarse de un cultivo mixto (animales infectados por más de una cepa bacteriana) o de cepas con mutaciones de alta frecuencia (70).

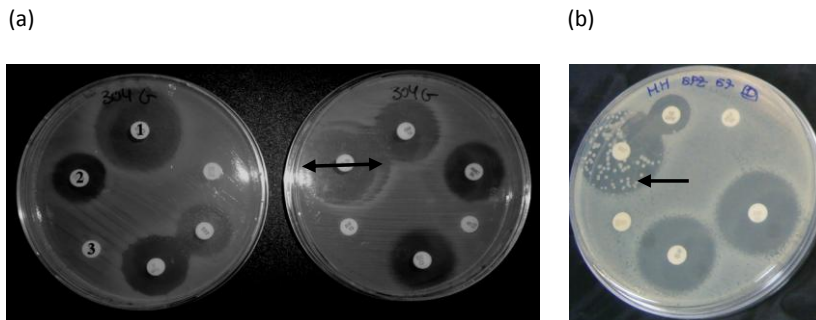


Figura 10. Técnica de Kirby-Bauer. (a) Halo de inhibición indicado con una flecha. 1: sensible, 2: intermedio; y 3: resistente. (b) Ejemplo de crecimiento de colonias resistentes dentro del halo de inhibición.

Para una caracterización más exhaustiva de las cepas de *Salmonella* aisladas, pueden utilizarse técnicas adicionales como el fagotipado y el genotipado, de gran utilidad en trabajos de vigilancia epidemiológica y seguimiento de brotes infecciosos. El fagotipado permite clasificar las cepas de *Salmonella* spp. de acuerdo con la actividad de fagos líticos o lisogénicos de determinadas colecciones, como la familia de 17 fagos para tipado de *S. Enteritidis* (71) o la familia de 34 fagos para tipado de *S. Typhimurium* (72) y otros para los serotipos Hadar, Virchow y Typhi, según las indicaciones de la HPA. En cuanto al tipado molecular, el desarrollo de nuevas técnicas moleculares posibilita el conocimiento de las cepas al nivel genético de manera muy rápida. Dentro de estas técnicas, destacan el Análisis de Número Variable de Repeticiones en Tándem y la Electroforesis en Gel de Campo Pulsado (73), siendo ésta última la más ampliamente aceptada para la caracterización molecular de cepas en estudios filogenéticos y en brotes infecciosos. La Electroforesis en Gel de Campo Pulsado es relativamente económica pero es laboriosa y necesita una elevada estandarización, mostrando diferente sensibilidad en función del serotipo analizado. Otras técnicas moleculares emergentes dentro del tipado molecular son el genotipado mediante el análisis

de genes que codifican los antígenos O y H, utilizando la Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR) multiplex (74), los análisis basados en microarrays con micropartículas (75) o las comparaciones del conjunto de los marcos de lectura abierta del genoma bacteriano (76, 77).

B) Diagnóstico serológico. El método de diagnóstico serológico más utilizado para la detección de anticuerpos frente a *Salmonella* es el ELISA indirecto utilizando distintos tipos de antígenos. Existen 4 pruebas de ELISA con distintos antígenos que permiten la detección de las infecciones humanas por *S. Typhi*, sin embargo los tests para diagnóstico de *Salmonella* no tifoidea son escasos. De hecho, actualmente muchos laboratorios utilizan sus propios tests de fabricación casera con resultados moderadamente satisfactorios, por lo que la necesidad de un ELISA estandarizado universal ha dejado de ser una prioridad o, en algunos casos, es una opción descartada en favor de técnicas de identificación del patógeno en el momento del muestreo mediante diversas técnicas moleculares, de inmunocentración (59) u otras.

En el ámbito veterinario, existe una gran variedad de tests ELISA comerciales para monitorizar la infección en cerdos, aves y alimentos. Existen varios ELISA comerciales que han sido ampliamente utilizados en condiciones de campo y que tienen cierta utilidad en determinados contextos epidemiológicos (60). Estos tests permiten un diagnóstico rápido, a partir de muestras tanto de suero (en condiciones *in vivo*) como de jugo muscular (*post-mortem*) recogidas en las campañas rutinarias de vigilancia epidemiológica de sanidad animal. Sin embargo, únicamente permiten detectar anticuerpos frente a determinados serotipos o serogrupos de *Salmonella* spp. lo que limita enormemente la utilidad de los tests ELISA para el diagnóstico de la salmonelosis porcina, considerando la enorme variabilidad de serotipos de *Salmonella* spp. que pueden afectar al ganado porcino (61). En este contexto, diversos autores han sugerido la combinación de varias moléculas de LPS pertenecientes a distintos serotipos, para aumentar el número de serotipos detectados (62). Aún con todo, otro factor que limita la utilidad del diagnóstico serológico es que, generalmente, la serología no se considera un buen indicativo de la infección por *Salmonella* en el momento del muestreo, puesto que (i) la infección por *Salmonella* es muy rápida, precediendo mucho a la existencia de respuesta serológica; y (ii) la respuesta inmune humoral persiste en el organismo durante periodos de tiempo mucho más prolongados que la propia bacteria. Por lo tanto, pocas veces la seroprevalencia concuerda con el estatus infeccioso del animal en el momento de la toma de la muestra, aspecto que limita seriamente la utilidad del ELISA, limitándolo a áreas con muy

baja o nula prevalencia de *Salmonella*, y siempre utilizándolo en combinación con otras herramientas de diagnóstico de la infección (63).

Control de la salmonelosis porcina

El control eficaz y sostenible de la salmonelosis porcina debe basarse en conocer y minimizar los factores de riesgo asociados a la presencia de infección y/o del patógeno, tanto al nivel de la producción primaria como en matadero. La valoración cuantitativa de riesgos microbiológicos realizada en la UE estimó que los países con alta prevalencia de salmonelosis porcina, podrían reducirla en un 70-80%, simplemente, utilizando reproductoras libres de infección (51). Además del control del agua, el pienso y las desinfecciones en las zonas de reproducción para evitar las infecciones (78), se ha comprobado que el traslado de las hembras de reposición a las unidades de gestación aumenta la diseminación fecal de *Salmonella* (78, 79). Las investigaciones sobre el papel de las madres en la transmisión vertical de *Salmonella* han demostrado la existencia de infección temprana de los lechones (78) por lo que una de las prácticas recomendadas es el destete y separación de los animales (80). En el momento del destete, tanto los lechones como sus madres son más susceptibles a la adquisición de infecciones (26). Además, el estrés y las condiciones asociadas al transporte a matadero y espera en los corrales favorecen la infección o reactivación de la infección y el incremento de la excreción de *Salmonella* con la consiguiente diseminación del patógeno (51). Esto, junto con el hecho de que las hembras de desvieje son enviadas a matadero inmediatamente después del destete, las convierte en un tipo de animales que podría contribuir de forma importante a la diseminación horizontal del patógeno en la cadena alimentaria, causando brotes de salmonelosis humana. Sin embargo, se desconoce la prevalencia de la infección por *Salmonella* en GLM de cerdas reproductoras, así como el papel real que juegan estas infecciones subclínicas en la transmisión y diseminación del patógeno.

Puesto que los factores de riesgo asociados a la salmonelosis porcina varían de una región a otra, antes de establecer la estrategia de control más adecuada en una zona o sistema de explotación, debe realizarse un estudio detallado de ellos “de la granja a la mesa” (51, 55). Para ello, una herramienta fundamental son las encuestas epidemiológicas, tanto al nivel de la producción primaria como en matadero. Las encuestas epidemiológicas posibilitan una recolección de datos ordenada y fiable para su posterior procesamiento y análisis estadístico, uni- o multivariable. En consecuencia, un correcto manejo de la información recogida a través

de las encuestas epidemiológicas puede transformarse en valiosas recomendaciones al nivel práctico a tener en cuenta en los programas de prevención y tratamiento de la salmonelosis porcina (81).

Complementariamente a la aplicación de medidas higiénico-sanitarias y al control de los factores de riesgo identificados en cada unidad epidemiológica, se han propuesto o utilizado distintas medidas para la prevención de la salmonelosis, alternativas al uso de antibióticos, como son el uso de dietas con prebióticos y probióticos para la exclusión competitiva de *Salmonella* (82, 83) o la administración de bacteriófagos específicos (84). También se ha propuesto el uso de distintas vacunas frente a la salmonelosis porcina, incluyendo vacunas vivas atenuadas, inactivadas y subcelulares (17). Estas vacunas, al igual que ocurre con las de salmonelosis aviar, pueden tener utilidad para prevenir los casos de salmonelosis clínica causados por especies de *Salmonella* “adaptadas” o “restringidas” a un hospedador (Figura 2). Así, se han utilizado vacunas de *S. Gallinarum* en pollos y de *S. Cholerasuis* en lechones con resultados satisfactorios (1). Sin embargo, la protección frente a especies “generalistas” de *Salmonella* que apenas afectan al ganado porcino (como es el caso de *S. Typhimurium* y *S. Enteritidis*) tiene escasa efectividad y poco interés para el productor de porcino, puesto que la salmonelosis porcina no supone un problema clínico. A escala experimental, existen numerosos estudios de desarrollo y evaluación de vacunas frente a este tipo de salmonelosis, indicando que las más eficaces son las elaboradas con microorganismos vivos atenuados (17, 85). Sin embargo, el uso de este tipo de vacunas implica la introducción de nuevas infecciones subclínicas en porcino destinado al consumo humano y de microorganismos modificados genéticamente en la cadena alimentaria, que sí podrían afectar al ser humano. En definitiva, la vacunación frente a la salmonelosis porcina no se contempla como un pilar esencial para combatir esta zoonosis, sino como una herramienta secundaria cuya aplicación es, actualmente, muy limitada.

En este contexto, la ubicuidad de la bacteria, su resistencia en el medio ambiente y la ausencia de efectividad de las vacunas, hacen que las medidas de control de la salmonelosis porcina deban basarse en el conocimiento de la epidemiología de la infección, establecer pautas adecuadas de limpieza y desinfección, medidas de bioseguridad y un manejo que evite el estrés de los animales y la contaminación cruzada. En consecuencia, el estado sanitario del ganado porcino en la C.F. de Navarra en cuanto a la infección por *Salmonella* cumplirá con éxito los requerimientos sanitarios establecidos por las Autoridades Competentes al nivel europeo.

BIBLIOGRAFÍA

1. OIE. 2014. Office International des Épizooties: Manual of Diagnostic Tests & Vaccines for Terrestrial Animals. Available at: <http://www.oie.int/en/manual-of-diagnostic-tests-and-vaccines-for-terrestrial-animals/>.
2. Feasey N.A., Dougan G., Kingsley R.A., Heyderman R.S., Gordon M.A. 2012. Invasive non-typhoidal *Salmonella* disease: an emerging and neglected tropical disease in Africa. *Lancet* 379:2489-2499.
3. EFSA-ECDC. 2014. The European Union Summary Report on Trends and Sources of Zoonoses, Zoonotic Agents and Food-borne Outbreaks in 2012. *EFSA J* 10:312.
4. CDC. 2012. CDC 2011 Estimates of Foodborne Illness in the United States National Center for Emerging and Zoonotic Infectious Diseases p. 2.
5. DOUE. 2003. Regulation (EC) No 2160/2003 of the European Parliament and of the council on the control of *Salmonella* and other species food-borne zoonotic agents. *Official J Eur Union*.
6. Pires S.M., de Knecht L., Hald T. 2011. Estimation of the relative contribution of different food and animal sources to human *Salmonella* infections in the European Union. Scientific/Technical Report submitted to EFSA. *EFSA J*.
7. CDC. 2010. Multiple-serotype *Salmonella* gastroenteritis outbreak after a reception Connecticut, 2009. *MMWR Morb Mortal Wkly Rep* 59:1093-1097.
8. CDC. 2012. Infections with *Salmonella* I 4, [5],12:i:- linked to exposure to feeder rodents-United States, August 2011-February 2012. *Clinical infectious diseases : an official publication of the Infectious Diseases Society of America* p. i-ii. Available at: <http://www.cdc.gov/mmwr/preview/mmwrhtml/mm6115a6.htm> (accessed Jul).
9. Hernandez E., Rodriguez J.L., Herrera-Leon S., Garcia I., de Castro V., Muniozuren N. 2012. *Salmonella* Paratyphi B var Java infections associated with exposure to turtles in Bizkaia, Spain, September 2010 to October 2011. *Euro Surveill:bulletin European sur les maladies transmissibles=European communicable disease bulletin* 17.

10. Lowther S.A., Medus C., Scheftel J., Leano F., Jawahir S., Smith K. 2011. Foodborne outbreak of *Salmonella* subspecies IV infections associated with contamination from bearded dragons. *Zoonoses Public Health* 58:560-566.
11. Andrés-Barranco S., Vico J.P., Garrido V., Samper S., Herrera-León S., de Frutos C., Mainar-Jaime R.C. 2014. Role of wild bird and rodents in the epidemiology of subclinical salmonellosis in finishing pigs. *Foodborne Path Dis* 11:689-697.
12. Tindall B.J., Grimont P.A., Garrity G.M., Euzéby J.P. 2005. Nomenclature and taxonomy of the genus *Salmonella*. *Int J Syst Evol Microbiol* 55:521-524.
13. Grimont P.A., Weill F.X. 2007. Antigenic formulae of the *Salmonella* serovars. In: I. P. a. WHO. (ed.). Institute Pasteur and World Health Organization. Collaboration Centre for Reference Research on *Salmonella*.
14. Issenhuth-Jeanjean S., Roggentin P., Mikoleit M., Guibourdenche M., de Pinna E., Nair S., Fields P.I., Weill F.X. 2014. Supplement 2008-2010 (no. 48) to the White-Kauffmann-Le Minor scheme. *Res Microbiol* 165:526-530.
15. Stevens M.P., Humphrey T.J., Maskell D.J. 2009. Molecular insights into farm animal and zoonotic *Salmonella* infections. *Philos T R Soc B* 364:2709-2723.
16. Nielsen L.R. 2012. Review of pathogenesis and diagnostic methods of immediate relevance for epidemiology and control of *Salmonella* Dublin in cattle. *Vet Microbiol*. 162(1):1-9.
17. San Román B., Garrido V., Grilló M.J. 2013. Non-typhoidal Salmonellosis. In: Springer-Verlag (ed.), *Molecular Vaccines: From Prophylaxis to Therapy*. Wien.
18. Miller S.I., Ernst R.K., Bader M.W. 2005. LPS, TLR4 and infectious disease diversity. *Nat Rev Microbiol* 3:36-46.
19. Inohara N., Chamailard, McDonald C., Nunez G. 2005. NOD-LRR proteins: role in host-microbial interactions and inflammatory disease. *Annu Rev Biochem* 74:355-383.
20. Prost L.R., Sanowar S., Miller S.I. 2007. *Salmonella* sensing of anti-microbial mechanisms to promote survival within macrophages. *Immunol Rev* 219:55-65.

21. Bearson B.L., Wilson L., Foster J.W. 1998. A low pH-inducible, PhoPQ-dependent acid tolerance response protects *Salmonella* typhimurium against inorganic acid stress. *J Bacteriol* 180:2409-2417.
22. Wagner C., Hensel M. 2011. Adhesive mechanisms of *Salmonella* enterica. *Adv Exp Med Biol* 715:17-34.
23. Álvarez-Ordoñez A., Begley M., Prieto M., Messens W., López M., Bernardo A., Hill C. 2011. *Salmonella* spp. survival strategies within the host gastrointestinal tract. *Microbiol* 157:3268-3281.
24. Winter S.E., Thiennimitr P., Winter M.G., Butler B.P., Huseby D.L., Crawford R.W., Russell J.M., Bevins C.L., Adams L.G., Tsois R.M., Roth J.R., Baumler A.J. 2010. Gut inflammation provides a respiratory electron acceptor for *Salmonella*. *Nature* 467:426-429.
25. Hohmann E.L. 2001. Nontyphoidal salmonellosis. *Clin Infect Dis: an official publication of the Infectious Diseases Society of America* 32:263-269.
26. Nollet N., Houf K., Dewulf J., De Kruif A., De Zutter L., Maes D. 2005. *Salmonella* in sows: a longitudinal study in farrow-to-finish pig herds. *Vet Res* 36:645-656.
27. Merialdi G., Barigazzi G., Bonilauri P., Tittarelli C., Bonci M., D'Incau M., Dottori M. 2008. Longitudinal study of *Salmonella* infection in Italian farrow-to-finish swine herds. *Zoonoses Public Health* 55:222-226.
28. Mousing J., Jensen P.T., Halgaard C., Bager F., Feld N., Nielsen B., Nielsen J.P., Bech-Nielsen S. 1997. Nation-wide *Salmonella enterica* surveillance and control in Danish slaughter swine herds. *Prev Vet Med* 29:247-261.
29. Nelson J.D., Kusmiesz H., Jackson L.H., Woodman E. 1980. Treatment of *Salmonella* gastroenteritis with ampicillin, amoxicillin, or placebo. *Pediatr* 65:1125-1130.
30. FAO/WHO/OIE. 2003. Joint FAO/OIE/WHO Expert Workshop on Non-Human Antimicrobial Usage and Antimicrobial Resistance: Scientific assessment.
31. Velge P., Cloeckert A., Barrow P. 2005. Emergence of *Salmonella* epidemics: the problems related to *Salmonella* enterica serotype Enteritidis and multiple antibiotic resistance in other major serotypes. *Vet Res* 36:267-288.

32. EFSA-ECDC. 2014. The European Union Summary Report on antimicrobial resistance in zoonotic and indicator bacteria from humans, animals and food in 2012. *EFSA J* 12(3):3590.
33. Molbak K. 2005. Human health consequences of antimicrobial drug-resistant *Salmonella* and other foodborne pathogens. *Clin Infect Dis: an official publication of the Infectious Diseases Society of America* 41:1613-1620.
34. Tello A., Austin B., Telfer T.C. 2012. Selective pressure of antibiotic pollution on bacteria of importance to public health. *Environ Health Perspect* 120:1100-1106.
35. Mejía 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* 159:271-276.
36. 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 Prot* 74:1070-1078.
37. Rodríguez I., Barownick W., Helmuth R., Mendoza M.C., Rodicio M.R., Schroeter A., Guerra B. 2009. Extended-spectrum beta-lactamases and AmpC beta-lactamases in ceftiofur-resistant *Salmonella* enterica isolates from food and livestock obtained in Germany during 2003-07. *J Antimicrob Chemother* 64:301-309.
38. DOUE. 2006. Commission Decision of 29 September 2006 concerning a financial contribution from the Community towards a baseline survey on the prevalence of *Salmonella* in slaughter pigs to be carried out in the Member States. 2006/668/EC. Official J Eur Union.
39. DOUE. 2007. Commission Decision of 12 June 2007 on a Harmonised monitoring of antimicrobial resistance in *Salmonella* in poultry and pigs. 2007/407/EC. Official J Eur Union.
40. Besser T.E., Goldoft M., Pritchett L.C., Khakhria R., Hancock D.D., Rice D.H., Gay J.M., Johnson W., Gay C.C. 2000. Multiresistant *Salmonella* Typhimurium DT104 infections of humans and domestic animals in the Pacific Northwest of the United States. *Epidemiol Infect* 124:193-200.

41. Helms M., Ethelberg S., Molbak K. 2005. International *Salmonella* Typhimurium DT104 infections, 1992-2001. *Emerg Infect Dis* 11:859-867.
42. Michael G.B., Butaye P., Cloeckaert A., Schwarz S. 2006. Genes and mutations conferring antimicrobial resistance in *Salmonella*: an update. *Microbes Infect/Institut Pasteur* 8:1898-1914.
43. Partridge S.R., Tsafnat G., Coiera E., Iredell J.R. 2009. Gene cassettes and cassette arrays in mobile resistance integrons. *FEMS Microbiol Rev* 33:757-784.
44. Wiesner M., Zaidi M.B., Calva E., Fernandez-Mora M., Calva J.J., Silva C. 2009. Association of virulence plasmid and antibiotic resistance determinants with chromosomal multilocus genotypes in Mexican *Salmonella enterica* serovar Typhimurium strains. *BMC Microbiol* 9:131.
45. Cabrera R. 2008. Epidemiología y caracterización molecular de los mecanismos de resistencia a diversos agentes antimicrobianos en aislamientos clínicos de *Salmonella* spp., Microbiología y Parasitología Sanitarias. Universitat de Barcelona, 2008.
46. Que F., Wu S., Huang R. 2013. *Salmonella* pathogenicity island 1(SPI-1) at work. *Curr Microbiol* 66:582-587.
47. Mulvey M.R., Boyd D.A., Olson A.B., Doublet B., Cloeckaert A. 2006. The genetics of *Salmonella* genomic island 1. *Microbes Infect/Institut Pasteur* 8:1915-1922.
48. Guerra B., Soto S.M., Arguelles J.M., Mendoza M.C. 2001. Multidrug resistance is mediated by large plasmids carrying a class 1 integron in the emergent *Salmonella enterica* serotype [4,5,12:i:-]. *Antimicrob Agents Chemother* 45:1305-1308.
49. OIE. 2009. Office International des Épizooties: List of antimicrobials of veterinary importance. Available at: http://web.oie.int/download/Antimicrobials/OIE_list_antimicrobials.pdf.
50. Andrés S., Vico J.P., Garrido V., Grilló M.J., Samper S., Gavin P., Herrera-León S., Mainar-Jaime R.C. 2013. Epidemiology of subclinical salmonellosis in wild birds from an area of high prevalence of pig salmonellosis: phenotypic and genetic profiles of *Salmonella* isolates. *Zoonoses Public Health* 60:355-365.

51. EFSA. 2010. Scientific opinion on a quantitative microbiological risk assessment of *Salmonella* in slaughter and breeding pigs. EFSA J 8:1547.
52. DOUE. 2003. Directive 2003/99/EC of the European Parliament and of the Council of 17 November 2003 on the monitoring of zoonoses and zoonotic agents, amending Council Decision 90/424/EEC and repealing Council Directive 92/117/EEC.
53. EFSA. 2009. Analysis of the baseline survey on the prevalence of *Salmonella* in holdings with breeding pigs in the EU, 2008. Part A: *Salmonella* prevalence estimates. EFSA J 7:93 pp.
54. 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. Part A. EFSA J 135:1-111.
55. EFSA. 2011. Analysis of the baseline survey on the prevalence of *Salmonella* in holdings with breeding pigs, in the EU, 2008 - Part B: factors associated with *Salmonella* pen positivity EFSA J 9:159 pp.
56. MAGRAMA. 2014. El sector de la carne de cerdo en cifras: Principales indicadores económicos en 2013. In: Subdirección General de Productos Ganaderos (ed.). www.eurocarne.com/pdf/informes/indicadores_porcino_2014.pdf.
57. MARM. 2012. El sector de la carne de cerdo en cifras: Principales indicadores económicos en 2011. In: Subdirección General de Productos Ganaderos (ed.). <http://www.eurocarne.com/informes/pdf/indicadores-economicos-carnede-ce76.pdf>.
58. Gobierno-de-Navarra. 2012. Movimiento Comercial Pecuario.
59. bioMérieux. 2015. www.biomerieux.es.
60. Narayanappa D., Sripathi R., Jagdishkumar K., Rajani H.S. 2010. Comparative study of dot enzyme immunoassay (Typhidot-M) and Widal test in the diagnosis of typhoid fever. Indian Pediatr 47:331-333.
61. Vico J.P., Engel B., Buist W.G., Mainar-Jaime R.C. 2010. Evaluation of three commercial enzyme-linked immunosorbent assays for the detection of antibodies against *Salmonella* spp. in meat juice from finishing pigs in Spain. Zoonoses Public Health 57 Suppl 1:107-114.

62. Kuhn K.G., Falkenhorst G., Ceper T.H., Dalby T., Ethelberg S., Molbak K., Krogfelt K.A. 2012. Detecting non-typhoid *Salmonella* in humans by ELISAs: a literature review. *J Med Microbiol* 61:1-7.
63. Vico J.P., Mainar-Jaime R.C. 2011. The use of meat juice or blood serum for the diagnosis of *Salmonella* infection in pigs and its possible implications on *Salmonella* control programs. *J Vet Diagn Invest* 23:528-531.
64. Mainar-Jaime R.C., Andrés S., Vico J.P., San Román B., Garrido V., Grilló M.J. 2013. Sensitivity of the ISO 6579:2002/Amd 1:2007 standard method for detection of *Salmonella* spp. on mesenteric lymph nodes from slaughter pigs. *J Clin Microbiol* 51:89-94.
65. Hoorfar J., Baggesen D.L. 1998. Importance of pre-enrichment media for isolation of *Salmonella* spp. from swine and poultry. *FEMS Microbiol Lett* 169:125-130.
66. Jensen A.N., Sorensen G., Baggesen D.L., Bodker R., Hoorfar J. 2003. Addition of Novobiocin in pre-enrichment step can improve *Salmonella* culture protocol of modified semisolid Rappaport-Vassiliadis. *J Microbiol Methods* 55:249-255.
67. Park S.H., Ryu S., Kang D.H. 2012. Development of an improved selective and differential medium for isolation of *Salmonella* spp. *J Clin Microbiol* 50:3222-3226.
68. ISO. 2007. International Organisation for Standardisation. ISO 6579:2002/DAM 1:2007. Microbiology of Food and Animal Feeding Stuffs. Horizontal Method for the Detection of *Salmonella* spp. Annex D: Detection of *Salmonella* spp. in Animal Faeces and in Samples from the Primary Production Stage. Geneve, Switzerland.
69. Versalovic J., Carroll K.C., Funke G., Jorgensen J.H., Landry M.L., Warnock D.W. 2011. *Manual of Clinical Microbiology*.
70. CLSI. 2005. Approved standard M2-A7 in performance standards for antimicrobial disk susceptibility tests. Wayne, Pa, USA.
71. De Lappe N., Doran G., O'Connor J., O'Hare C., Cormican M. 2009. Characterization of bacteriophages used in the *Salmonella* enterica serovar Enteritidis phage-typing scheme. *J Med Microbiol* 58:86-93.

72. Baggesen D.L., Wegener H.C. 1994. Phage types of *Salmonella* enterica ssp. enterica serovar typhimurium isolated from production animals and humans in Denmark. *Acta Vet Scand* 35:349-354.
73. Foley S.L., Lynne A.M., Nayak R. 2009. Molecular typing methodologies for microbial source tracking and epidemiological investigations of Gram-negative bacterial foodborne pathogens. *Infect Genet Evol: journal of molecular epidemiology and evolutionary genetics in infectious diseases* 9:430-440.
74. Herrera-León S., Ramiro R., Arroyo M., Díez R., Usera M.A., Echeita M.A. 2007. Blind comparison of traditional serotyping with three multiplex PCRs for the identification of *Salmonella* serotypes. *Res Microbiol* 158:122-127.
75. McQuiston J.R., Waters R.J., Dinsmore B.A., Mikoleit M.L., Fields P.I. 2011. Molecular determination of H antigens of *Salmonella* by use of a microsphere-based liquid array. *J Clin Microbiol* 49:565-573.
76. Porwollik S., Boyd E.F., Choy C., Cheng P., Florea L., Proctor E., McClelland M. 2004. Characterization of *Salmonella* enterica subspecies I genovars by use of microarrays. *J Bacteriol* 186:5883-5898.
77. Arrach N., Porwollik S., Cheng P., Cho A., Long F., Choi S.H., McClelland M. 2008. *Salmonella* serovar identification using PCR-based detection of gene presence and absence. *J Clin Microbiol* 46:2581-2589.
78. Funk J.A., Davies P.R., Nichols M.A. 2001. Longitudinal study of *Salmonella* enterica in growing pigs reared in multiple-site swine production systems. *Vet Microbiol* 83:45-60.
79. Davies P.R., Funk J.A., Morrow W.E.M. 2000. Fecal shedding of *Salmonella* by gilts before and after introduction to a swine breeding farm. *Swine Health Prod* 8:25-29.
80. Dahl J., Wingstrand A., Nielsen B., Baggesen D.L. 1997. Elimination of *Salmonella* typhimurium infection by the strategic movement of pigs. *Vet Rec* 140:679-681.
81. Mainar-Jaime R.C., Iguácel F. 2011. Bases para el control de la salmonelosis en las explotaciones porcinas. *Informaciones Técnicas*.
82. Sonnenburg J.L., Chen C.T., Gordon J.I. 2006. Genomic and metabolic studies of the impact of probiotics on a model gut symbiont and host. *PLoS Biol* 4:e413.

83. Andrés-Barranco S., Vico J.P., Grilló M.J., Mainar-Jaime R.C. 2015. Reduction of subclinical *Salmonella* infection in fattening pigs after dietary supplementation with a ss-galactomannan oligosaccharide. *J Appl Microbiol* 118(2):284-294.
84. Albino L.A., Rostagno M.H., Hungaro H.M., Mendonca R.C. 2014. Isolation, characterization, and application of bacteriophages for *Salmonella* spp. biocontrol in pigs. *Foodborne Pathog Dis* 11:602-609.
85. Karasova D., Sebkova A., Vrbas V., Havlickova H., Sisak F., Rychlik I. 2009. Comparative analysis of *Salmonella enterica* serovar Enteritidis mutants with a vaccine potential. *Vaccine* 27:5265-5270.

OBJETIVOS

El **objetivo general** de esta Tesis Doctoral fue analizar la situación epidemiológica y sanitaria de las infecciones por *Salmonella* spp. en una población representativa del ganado porcino de cebo y reproductor de producción intensiva de la C.F. de Navarra, así como analizar distintos aspectos de la infección en los mismos animales.

Para ello, se plantearon los siguientes **objetivos específicos**:

1. Estudio de salmonelosis en porcino de engorde de producción intensiva de Navarra (Capítulo 1):
 - 1.1. Realizar un estudio de referencia, siguiendo las indicaciones de la UE, para determinar la prevalencia y características de las cepas de *Salmonella* que infectan a los cerdos de engorde llevados a matadero.
 - 1.2. Analizar la posible relación entre la infección ganglionar, la excreción del patógeno en heces y la serología en los mismos cerdos de engorde analizados en matadero.
 - 1.3. Evaluar diversos factores de riesgo asociados a la infección y a la excreción de *Salmonella* spp. en los cerdos de engorde analizados.
2. Estudio de salmonelosis en porcino reproductor de producción intensiva de Navarra (Capítulo 2):
 - 2.1. Realizar un estudio de referencia, siguiendo las indicaciones de la UE, para determinar la prevalencia y características de las cepas de *Salmonella* presentes en heces de cerdas en distintas etapas del ciclo reproductivo en la granja.
 - 2.2. Analizar la prevalencia y características de las cepas de *Salmonella* involucradas en la infección de cerdas de matadero, así como su posible papel como reservorio de la infección para los lechones y la utilidad del diagnóstico serológico en los mismos animales.
 - 2.3. Evaluar diversos factores de riesgo asociados a la infección y a la excreción de *Salmonella* spp. en las cerdas reproductoras analizadas.
3. Estudio de infecciones simultáneas por distintas cepas de *Salmonella* en porcino de engorde destinado a consumo (Capítulo 3).

CHAPTER 1

Relationship between *Salmonella* infection and shedding in paired samples from fattening pigs of a low prevalence region of Spain

This chapter is under review to be published as: San Román B., Sánchez S., Mainar-Jaime R.C., Garrido V., Grilló M.J. Relationship between *Salmonella* infection and shedding in paired samples from fattening pigs of a low prevalence region of Spain. Appl Environ Microbiol (AEM00876-15).

ABSTRACT

Salmonellosis is a major foodborne zoonosis worldwide. Pigs asymptomatically infected are intermittent shedders of the pathogen through feces to the environment and pig products, and are thus considered a major source of human infection. Here, we study the concordance between pig infection and shedding by using paired samples of mesenteric lymph nodes (MLN) and intestinal content (IC) from fattening pigs of the vertically-integrated system of Navarra (Spain). Serology was also used as an indicator of previous exposure to the pathogen. The prevalence, circulating strains, and risk factors associated to the presence of *Salmonella* in these animals were determined. The overall *Salmonella* prevalence was similar in MLN (7.3%), IC (8.4%) and serum (9.6%) samples, suggesting a low incidence of salmonellosis compared to other Spanish regions. However, no correlation was found between the different type of samples. Most (92%) of pigs infected were not identified as shedders, and only 6.8% of shedders seemed to be infected at MLN level. In both MNL and IC, the most prevalent strain was Typhimurium with antimicrobial resistance profile ACSSuT±Nx or ASSuT, significantly more frequent in MLN than in IC (70.9% vs. 33.9%, respectively; $p < 0.01$). Multivariable analysis showed different risk factors associated to infection at MLN or shedding. Overall, these results indicated that subclinical pig infections at farm level might have low impact in the dissemination of the pathogen through feces in this region of low *Salmonella* prevalence, and suggest the need for control strategies based on good hygiene practices before slaughter.

Keywords: *Salmonella*, infection, shedding, serology, fattening pigs.

INTRODUCTION

Salmonella is one of the zoonotic agents most frequently related to foodborne diseases worldwide, and considered as a major cause of morbidity in industrialized areas such as USA (1) and EU (2). In USA, salmonellosis is the first cause of foodborne disease registering 1,027,561 of non-typhoid human cases in 2011, from which 19,336 (1.9%) required hospitalization and 378 were fatal (1). Also, salmonellosis is the second (after campylobacteriosis) most frequent zoonosis in EU, with 82,694 confirmed cases in 2013 (2).

Laying hens have been considered as the most important (43.8% of the cases) source of human infections. Recent implementation of *Salmonella* control programs on fowl populations have resulted in a decreasing occurrence of *Salmonella* in eggs in EU Member States (2) and thus a clear decrease of human salmonellosis since 2007 (3). *Salmonella*-infected pigs are considered the second major source of human infections (3, 4). Pigs asymptomatically infected can contaminate the environment and other pigs, and infect humans through consumption of contaminated pig products (2). To preserve health consumers, current EU efforts are being focused on the control of pig salmonellosis based on “from farm to fork” control programs (5). For this purpose, pig infection studies were carried out on mesenteric lymph node (MLN) from slaughtered animals under the assumption that the presence of *Salmonella* in this type of samples is an incontestable evidence that a pig is infected (6, 7). Alternatively, fecal samples have been widely used for determining the prevalence of this infection in live animals at farm level, but the presence of *Salmonella* in feces could be attributed not only to an intermittent excretion of the pathogen from MLN but also to a passive ingestion of the pathogen. To our knowledge, the true relationship between *Salmonella* spp. infection at MLN and shedding through feces has not been thoroughly studied using methodologically comparable procedures.

Serological studies are an alternative for salmonellosis surveillance studies, since pig serum samples are systematically collected in routine surveillance programs for other infectious diseases such as Aujeszky's disease. Serology has been proposed as a valuable tool for control programs in countries with very low (<3%) pig salmonellosis prevalence but of limited use in high prevalence areas (8). In fact, since the infection precedes seroconversion and the pathogen may be cleared further (8), serology is considered a poor indicator of the actual infection status. Thus, the presence of antibodies is considered to be an indicator of past exposure to *Salmonella*.

Results of EU baseline studies on fattening pig salmonellosis have shown large differences on prevalence at both individual and farm levels among Member States (6, 9). Whereas a few northern countries (Finland, Norway, Sweden) showed very low prevalence (<3%) of salmonellosis in fattening pigs, it was notably higher in the remaining countries, particularly those in southern EU such as Spain (6). The presence of *Salmonella* may be of particular impact on the international trade of pig products for large pig production regions, but also of importance for local economies in other regions with lower pig production. Some recent studies support the high level of *Salmonella* contamination of pig carcass at slaughter in Spain (11, 12), but it may reflect mostly the epidemiological situation of the main pig producing areas of Spain. The epidemiological situation of pig salmonellosis in less-important pig-production regions of Spain but with a locally important pig production such as our area of work Navarra (North of Spain, border with France) remains unknown.

The main objective of this study was to estimate the prevalence of *Salmonella* spp, the characteristics of circulating strains, and potential risk factors associated to their presence in fattening pigs from intensive vertically-integrated pig farms of Navarra (Spain). In addition, within this epidemiological context, we investigated the concordance between MLN infection and fecal shedding in paired samples, as well as the proportion of fattening pigs that were infected at farm or during transport to the abattoir and/or lairage before slaughter.

MATERIAL AND METHODS

Experimental design and sampling

Official data for 2011 indicated that the Navarra region (North of Spain) presented a total of 403,780 fattening pigs (13). Most (78.6%) of these animals belonged to the 158 farms (average of 2,900 pigs/farm) located in the Middle-South area of the region (around 3,500 km²). This farm population was the sampling frame. Pigs were raised under an intensive vertically-integrated regime, managed by 6 major pig companies that slaughtered all animals in 3 main abattoirs located within 300 km radius. The number of total farms and pigs sampled were calculated according to the expected herd and individual prevalence of salmonellosis, i.e. around 50% farms with at least one pig infected and 30% pigs infected per farm (6), and assuming a 10% error with a 95% confidence interval (95% CI). Thus, a randomly selected sample of 30 farms (19% sampling fraction) proportionally distributed according to company,

abattoir, geographical location of farms, and season of the year (from February 2011 to June 2012) were considered for the study.

Intestinal content (IC) and MLN paired samples were collected at the slaughter line from a total of 25 randomly selected pigs per farm, except for 4 farms where only 12 IC samples/farm were collected due to logistic sampling limitations. Thus, a total of 698 IC and 750 MLN samples were finally obtained for bacteriological purposes. Blood samples (12 per farm) from the same animals were collected during bleeding at slaughter line in 19 of the farms sampled for bacteriology. These 228 blood samples did not match with bacteriological samples due to the management of carcasses in the slaughter line. Collected sera were stored at -20°C until its use.

***Salmonella* spp. isolation and characterization**

To determine the presence of *Salmonella* spp. in both MLN (n=750) and IC (n=698) samples were processed following the ISO 6579:2002/Amd 1:2007 procedure (hereafter ISO 6579) (14), as recommended by the EU authorities for swine salmonellosis reference studies (6). Briefly, 25 grams of at least 5 defatted MLN from each animal, were individually weighed, externally decontaminated by flaming, and homogenized in 225 mL (1:10 vol:vol) of Buffered Peptone Water (BPW). Similarly, 25 g of each IC sample were collected in a sterile container, individually weighed in Stomacher[®] filter bags (Seward Medical LabSystem, UK) with help of a sterile spatula, and homogenized in 225 mL (1:10 dilution) of BPW, with special caution to prevent cross-contamination. The BPW homogenates were incubated (37°C, 18h) and, then, 3 drops (equivalent to 100 µL) of the interphase air-liquid BPW culture were transferred to Modified Semisolid Rappaport-Vassiliadis plates for a semi-selective enrichment by incubation of plates at 41.5°C, for 24 h or 48 h (if negative at 24 h). Finally, 1 µL of suspected positive samples (presence of a characteristic white halo) was transferred to selective Xylose-Lysine-Deoxycholate and Brilliant Green agar plates, and incubated at 37°C for 24 h. Presumptive *Salmonella* colonies (4 colonies/sample) were transferred to Luria Bertani agar plates and incubated at 37°C for 24 h. After this purification step, biochemical analysis was assessed by Triple Sugar Iron agar, Urea agar, L-lysine decarboxylation and Indol tests, and *Salmonella* strains were stored in 10% skimmed milk at -20°C. All microbiological products were provided by Laboratorios Conda, S.A. (Spain).

Systematically, one representative colony of each culture were sent to the National Reference Laboratory for Animal Salmonellosis (Algete, Madrid, Spain) for *Salmonella* confirmation and

serotyping, following the Kaufmann-White scheme (15). Moreover, animals that showed *Salmonella* spp. simultaneously in both MLN and IC samples were thoroughly studied by serotyping the remaining 3 *Salmonella* spp. presumptive colonies kept from each sample and phagotyping all the *S. Typhimurium* colonies with the 34 STM phage collection, following the standard procedures (16, 17) in the National Centre of Microbiology (Instituto de Salud Carlos III, Madrid, Spain).

All the *Salmonella* spp. confirmed strains were submitted to the Kirby-Bauer disk diffusion test (18) against 12 antimicrobials belonging to 7 different antimicrobial families, i.e. A, Aminopenicillins (ampicillin and amoxicillin-clavulanic acid); C, Phenicol (chloramphenicol); S, Aminoglycosides (streptomycin and gentamycin); Su, Sulfonamides (sulphisoxazole, trimethoprim and trimethoprim-sulphometoxazole); T, Tetracyclines (tetracycline); Nx, Quinolones (nalidixic acid); Fluoroquinolones (ciprofloxacin); Cephalosporins Third Generation (cefotaxime). Antimicrobial concentrations used were those recommended by the European legislation (19). *Salmonella* susceptibility was determined by measuring the inhibition halo induced by the correspondent antimicrobial disk (BD, Spain) in Mueller-Hinton (BD, Spain) plates, and each strain was classified as resistant or susceptible, according to the Clinical and Laboratory Standards Institute instructions (18). Reference strains *E. coli* ATCC 25922, *S. Typhimurium* ATCC 14028 and *S. Typhimurium* ATCC DT104 were used as controls in each experiment.

Serological study

Sera (n=228) were obtained after blood incubation (room temperature, 4 h) and centrifugation (Multifuge 3 L-R, SORVALL, Heraeus; 4°C, 10 min, 1,500 × g.), and stored at -20°C until its use. The Herd-Check® Swine *Salmonella* ELISA test (IDEXX™ Laboratories, Inc., Switzerland) was used following the manufacturer's instructions. The results were expressed as normalized Optical Density percentage (OD%) and three cut-off values (10%, 20% and 40%) were used, as indicated by the manufacturer.

Questionnaire data and statistical analysis

A farm was considered positive when *Salmonella* was isolated in at least one of the pigs tested. Mean prevalences and their correspondent 95% confidence intervals (95%CI) were calculated at farm and individual level and separately for MLN and IC. Concordance analyses

between infection (MLN positive) and shedding (IC positive) and between each bacteriological and serological results were carried out by calculating the Kappa statistic (κ).

Information on abattoir, pig company, and farm was recorded for each pig herd through a questionnaire containing 8, 8, and 62 variables, respectively. Abattoir data was related to animal origin, travel time to slaughter and animal management previous to slaughtering. The pig company provided information on different aspects related to the type of diet and antibiotics (if any) administered. Information on the farm dealt with data on basic infrastructures, biosecurity measures, animal health, feeding practices, antibiotic administration, and farmer's information (20). In order to provide more reliable information, the farmers were asked to fill out the questionnaires with the assistance of their corresponding veterinarians.

One farm was considered positive when *Salmonella* was isolated in at least one of the pigs tested. Mean and 95% CI values of prevalence were then calculated, at both farm (i.e. number of farms affected) and individual (i.e. number of animals affected within a farm) levels considering separately either MLN or IC microbiological results. Concordance analysis was carried out by the Kappa index (k), either between infection (MLN) and shedding (IC) or between each bacteriological and serological results.

Questionnaire information was used to assess potential risk factors for *Salmonella* prevalence or shedding. A univariable *Chi*-square test was performed first as a screening step to detect possible relationships between the variables recorded in the questionnaire and the presence of *Salmonella*. After that, significant variables ($p \leq 0.05$) were further considered in a multivariable random-effect logistic regression model in which (i) the outcome variable was being "culture positive"; (ii) the explanatory variables included in the model as fixed effect were those from the questionnaire; and (iii) the random effect was the herd. The STATA software (StataCorp, L.P., College Station, TX) was used for these statistical analyses.

RESULTS

***Salmonella* spp. prevalence, shedding, serology and concordance between them**

Broadly, *Salmonella* spp. infection was detected in MLN of 7.3% (55/750) pigs that came from 15 (50%) farms (Table 3). The mean prevalence within positive herds (i.e. those showing at least one pig infected) was 14.7% (95% CI: 11.4-18.6%) but with wide differences amongst

farms, since only two farms showed individual prevalence higher than 20% (Table 3), i.e. 40% and 48%.

In 698 out of these 750 pigs, both IC and MLN paired samples were analyzed, and *Salmonella* spp. was found in a similar proportion of both MLN (50/698; 7.2%) and IC (59/698; 8.4%) samples belonging to 15 (50%) and 21 (70%) farms, respectively, with a mean prevalence of 13.3% and 11.5% samples, respectively, within herd (Table 3). As for MLN, most (93.3%) of farms showed less than 20% of shedders but, unlike infection, a slightly higher proportion of shedders than infected animals was observed, since 26.7% of farms showed 11-20% of shedders (Figure 11).

In spite of quantitative percentages were statistically similar, large discordance was qualitatively observed between infection and shedding, since a total of 95 pigs were positive in MLN (n=36), IC (n=45) or in both (n=14) samples, given a 13.6% overall combined prevalence (Table 3) that was statistically higher ($p < 0.005$) than that observed when each type of sample was considered separately. Accordingly, no concordance ($\kappa = -0.19$) could be established between infection and fecal shedding.

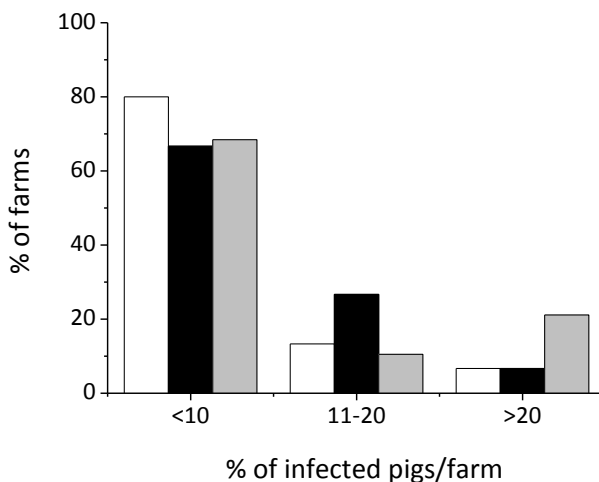


Figure 11. Distribution of *Salmonella* spp. prevalence at farm level (% of positive pigs/farm) in 698 fattening pigs from the 30 farms analyzed. White bars: MLN; dark bars: IC; grey bars: blood sera.

Table 3. Prevalence of *Salmonella* spp. in MLN, IC and blood serum (ELISA at 40% OD cut-off) samples from vertically-integrated fattening pigs of Navarra (Spain).

<i>Salmonella</i> spp. isolation	MLN	IC	MLN and/or IC	Serology (40% OD)
No. (%; CI ^a) of positive pigs ^b / total pigs analyzed	55/750 (7.3%; 6.4-8.2)	59/698 (8.4%; 7.3-9.5)	95/698 (13.6%; 11.2-16.3)	22/228 (9.6%; 6.4-14.2)
No. (%; CI) of positive farms/ total farms studied	15/30 (50.0%; 33.9-66.1)	21/30 (70.0%; 53.8-86.1)	25/30 (83.3%; 70.0-96.6)	10/19 (52.6%; 31.7-72.6)
No. (%; CI) of positive pigs/ pigs in positive farms	55/375 (14.7%; 11.4-18.6)	59/512 (11.5%; 9.0-14.6)	95/586 (16.2%; 13.4-19.4)	22/120 (18.3%; 13.8-28.9)
No. (%) farms below 20% prevalence/ total farms	28/30 (93.3%)	28/30 (93.3%)	24/30 (80%)	15/19 (78.9%)

^aCI: 95% Confidence Interval; ^bpigs or farms with pigs where at least 1 CFU of *Salmonella* spp. was isolated

From 228 out of these 698 pigs, ELISA results obtained at different cut-off values are presented in Figure 12. Much higher seroprevalence than infection or shedding was found at 10% and 20% ELISA cut-off values, since around 60% and 28% of pigs were serologically positive, respectively. This percentage decreased drastically when the 40% OD cut-off value was considered, showing a 9.6% (22/228) of seropositive pigs that belonged to 10/19 (52.6%) farms (Table 3). Since this seroprevalence was similar to the bacteriological prevalence, either in MLN or in IC samples, the 40% OD ELISA cut-off was considered for further analysis (Table 3). In such condition, a mean of 18.3% reactors were found within positive farms but most (78.9%) of these farms showed less than 20% of pigs seropositive, including 9 (47.4%) farms completely free from reactors (Table 3). Moreover, no concordance could be established at farm-level between serology and infection ($\kappa=0.05$) or fecal shedding ($\kappa=-0.14$).

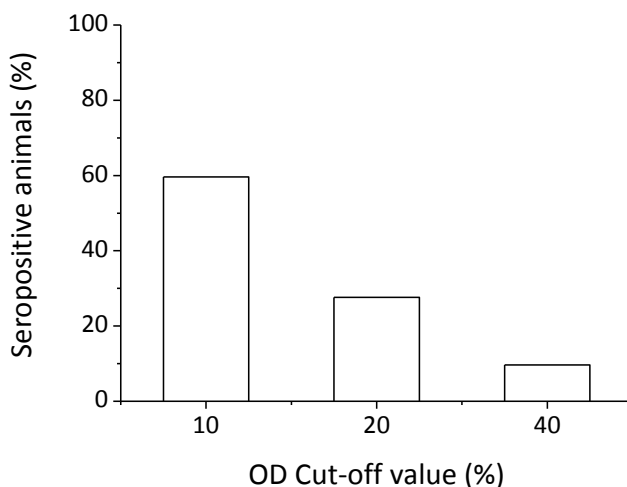


Figure 12. Percentage of *Salmonella*-seropositive pigs, at the different % of optical density (OD) cut-off values recommended by the manufacturer.

As shown in Table 4, some usefulness of serodiagnosis could be supposed at farm level regarding that 9 out of the 10 farms displaying ELISA-positive pigs showed *Salmonella* spp. in any MLN and/or IC sample as well; however, other 6 out of 9 farms showed all the animals seronegative but carrying *Salmonella* spp. in IC, and 4 of these farms had animals infected in MLN as well. These pigs likely would be recently contaminated either during transport and/or during lairage. In contrast, pigs detected as seropositive in the abattoir should be considered as infected in the farm. Interestingly, these results at farm level indicated that likely a 44.4% (48/108 pigs from 4/9 farms; Table 4) and almost a 42.8% (72/168 pigs from 6/14 farms) of pigs carrying *Salmonella* in MLN or IC, respectively, acquired the infection just before arriving to slaughter line.

Table 4. Distribution of serological and microbiological (MLN, IC or at least one of them) salmonellosis prevalence at farm level.

The three types of samples were analyzed simultaneously in pigs belonging to 19 farms.

No. of farms	MLN		IC		MLN and/or IC		Total farms	
	Positive ^a	Negative	Positive ^a	Negative	Positive ^a	Negative		
Serology	Positive	5	5	8	2	9	1	10
	Negative	4	5	6	3	6	3	9
Total farms		9	10	14	5	15	4	19

^a One farm was considered positive when at least one pig showed a positive result in the correspondent analysis

Risk factors associated to *Salmonella* infection or shedding

Only 23 out of 30 (76.7%) farms filled all the three questionnaires (farm, company and slaughterhouse) and, thus, were eventually included in the statistical model. Regarding the discrepancy of results found between both bacteriological procedures, risk factors associated to MLN infection or to fecal shedding were processed separately. The 23 farms eventually included in the statistical model maintained the wide differences in *Salmonella* prevalence in MLN, since only 2 (8.7%) farms contained more than 50% of infected pigs, while all pigs from 14 (60.9%) farms were found free from *Salmonella* infection. Similarly, 45.7% of shedders belonged to 4 farms, while 7 (30.4%) farms were free from *Salmonella* in feces.

A total of 56 variables (42 of farm level and other 14 of both integrator and slaughterhouse levels) were initially associated with *Salmonella* spp. infection in the univariable analysis, from which only 6 variables remained in the final multivariable model (Table 5): pigs (i) with body weight at slaughter below 106 kg (“final weight” parameter); (ii) from farms with less than 1,800 animals (“farm size”); (iii) slaughtered in winter (“season”); (iv) allocated in farms with only occasional or no rodent control programs (“rodent control”); (v) without a changing room and shower for workers (“existence of changing room and shower”); and (vi) fed with fine-floured instead of pelleted feed (“food type”).

In contrast, only 20 variables (15 significant at farm level and 5 significant at integrator level) were associated with *Salmonella* fecal shedding in the screening univariable analysis from which only 3 were kept in the final model (Table 5): (i) “food type” (see above); (ii) administration of feed mixed with water in contrast to dry feed (“food administration”); and (iii) to perform only occasional water analysis per year in contrast to one or more yearly analysis (“water analysis frequency”) (Table 5). Surprisingly, only one variable (i.e. “food type”) was a common risk factor identified in both MLN and IC multivariable models. These differences in the type of risk factors associated to MLN infection or fecal shedding explained the qualitative discrepancy between bacteriological results of prevalence in each type of sample.

Table 5. Variables significantly associated with *Salmonella* prevalence in fattening pigs, by a multivariable random-effect logistic regression analysis after clustering pigs by farm of origin, and considering either MLN or IC infection.

Variable	Logistic regression parameters for				
	MLN			IC	
	P	OR ^b	(95% CI)	P	OR ^b (95%)
1. Final weight	≥106kg ^a		1	NS	- -
	<106kg	0.000	0.02 (0.01-0.12)		
2. Farm size	≥1,800 pigs ^a		1	NS	- -
	<1,800 pigs	0.000	0.09 (0.04-0.26)		
3. Season	Winter ^a		1	NS	- -
	Spring	0.000	0.07 (0.03-0.16)		
	Summer	0.028	0.23 (0.06-0.85)		
	Autumn	0.046	7.41 (1.03-53.15)		
4. Rodent control	Sometimes/Never ^a		1	NS	- -
	Continuous	0.000	0.05 (0.01-0.18)		
5. Existence of changing room and shower	Yes ^a		1	NS	- -
	No	0.005	11.92 (2.08-68.05)		
6. Food type	Meal ^a		1	0.000	0.23 (0.10-0.51)
	Pelleted	0.021	0.17 (0.03-0.76)		
7. Food administration	Dry ^a	NS	- -	0.001	1 (0.10-0.56)
	Mixed with water				
8. Water analysis frequency	≥1/year ^a	NS	- -	0.001	3.6 (0.52-2.07)
	<1/year				
Constant		0.09	3.1 (0.80-11.9)	0.000	0.15 (0.09-0.25)

^a Reference category assigned as OR=1 for statistical purposes; ^b Odds Ratio; NS: Not Significant.

Characterization of *Salmonella* strains

According to the ISO 6579 method, one bacterial colony from each positive sample was used for confirming *Salmonella* as well as for further characterization by serotyping and AR studies. From the 1,448 samples analyzed, a total of 114 (7.87%) *Salmonella* strains were isolated from 100 pigs, either in MLN (n=55) or IC (n=59) samples (Table 3). Among them, 9 different *Salmonella* serotypes were detected in MLN whereas more variability (14 serotypes) were found in IC samples (Table 6). *Salmonella* Typhimurium was the most frequent serotype isolated either in MLN (39/55; 70.9%) or IC (20/59; 33.9%) samples, being significantly ($p < 0.0001$) more frequent in the former. Other common serotypes were the monophasic variant 1,4,[5],12:i:- (6 strains) in MLN, and *S.* Derby (10 strains), *S.* Anatum (8 strains), 1,4,[5],12:i:- (7 strains) and *S.* Rissen (4 strains) in IC (Table 6). Overall, *Salmonella* serogroup B strains were the most prevalent by far, representing the 87.3% (n=48) and 67.8% (n=40) of strains isolated from MLN and IC, respectively (Table 6).

A total of 77 out of 114 (67.5%) *Salmonella* strains (31 from MLN and 46 from IC samples) isolated from 21 farms showed AR to at least one antimicrobial agent. The drugs that most commonly generated AR were tetracycline and streptomycin (83.1%; 64 strains each drug), sulfisoxazole (74%; 57 strains) and ampicillin (62.3%; 48 strains). Most (79.2%; 61 strains) of *Salmonella* strains showing AR were resistant to 2 or more drugs, being ACSSuT±Nx (27 strains) and ASSuT (16 strains) the most prevalent multi-AR patterns (55.8% of AR strains) in both MLN and IC samples (Table 6). Furthermore, multi-AR strains were widely distributed in 16/21 (76.2%) of the farms showing *Salmonella* AR strains. In general, IC strains showed more AR phenotype variability than MLN strains (15 vs. 8 AR patterns, respectively; Table 6). Most of these AR patterns (11/15 in IC 7/8 and in MLN) involved multiple antimicrobial agents belonging to 6 different families, but none including ciprofloxacin or cefotaxime. Noteworthy, AR to quinolones (nalidixic acid) was frequently associated to ACSSuT multi-AR pattern. At farm level, *Salmonella* strains susceptible to all the antibiotics tested were distributed in 14/25 (56%) of the farms where *Salmonella* was isolated, but only 4 of these farms showed all the *Salmonella* strains susceptible to all the antimicrobials tested. Interestingly, by serotype, around 52% of the strains showing AR were Typhimurium while less common serotypes found in pigs, such as Bardo, Enteritidis and Urbana, showed susceptibility to all the antibiotics tested (Table 6).

Relationship between *Salmonella* MLN infection and IC shedding

Only 14 pigs (i.e. 2% of pigs analyzed and 14.7% of the 95 total pigs that showed *Salmonella* spp. in at least one type of sample) showed the pathogen simultaneously in both MLN and IC samples. In order to analyze a possible relationship between *Salmonella* infection and shedding, additional 84 colonies (3 colonies from each type of sample) from these 14 pigs were thoroughly characterized by serotyping, AR and Typhimurium phage typing. Shedding was considered associated with MLN infection when at least one *Salmonella* strain showing identical serotype, AR pattern and phage type (when applicable) was detected simultaneously in both MLN and IC samples from a pig. Under this premise, only 10/95 (10.5%) pigs showed identical *Salmonella* spp. in MLN and IC (Table 7), indicating that these animals could be infected either recently from gut to MLN or chronically excreting the pathogen from MLN to IC, depending on previous exposure to the pathogen. This extent could be elucidated, at least partially, by serology as a good estimator of the previous exposure to *Salmonella*. In our study, 5 out of 9 pigs infected by phenotypically identical *Salmonella* spp. belonged to farms where all pigs were seronegative, thus shedding from MLN only could be suspected in the remaining 4 pigs, representing a 6.78% (4/59) of shedders. More interestingly, this result entails that a 92% (46/50) of pigs infected did not excrete the bacterium from MLN to intestinal lumen. Noteworthy, 3 out of 14 (21.4%) pigs studied (animal codes 5, 11 and 12; Table 7) showed simultaneously different *Salmonella* spp. in MLN, corroborating the relative frequency of simultaneous infections by different *Salmonella* strains in a single pig (21).

Table 6. Phenotypic characteristics of the *Salmonella* strains isolated from MLN or IC of fattening pigs of Navarra (Spain). Strains are grouped by antimicrobial resistance (AR) pattern.

AR pattern (No. of strains) ^a	Serogroup-Serotype (No. of strains) ^a	
	MLN (n=750)	IC (n=698)
ACSSuT (16)	B-Typhimurium (7)	B-Typhimurium (8) C1-Rissen (1)
ACSSuTNx (11)	B-Typhimurium (5)	B-Typhimurium (6)
ASSuT (16)	B-Typhimurium (5) B-1,4,[5],12:i:- (5)	B-Typhimurium (1) B-1,4,[5],12:i:- (5)
ASSuTNx (1)	NA	B-Typhimurium (1)
ACSSu (1)	NA	B-Wien (1)
CSSuT (1)	NA	B-Derby (1)
ASSu (3)	B-1,4,[5],12:i:- (1)	B-1,4,[5],12:i:- (2)
SSuT (3)	NA	B-Derby (3)
STNx (1)	NA	B-Derby (1)
SSu (1)	B-Typhimurium (1)	NA
ST (4)	E1-Anatum (1)	E1-Anatum (3)
SuT (3)	B-Derby (1)	B-Agona (1) B-Derby (1)
Nx (1)	NA	I-Nottingham (1)
S (6)	B-Typhimurium (5)	B-S. <i>salamae</i> (1)
Su (1)	NA	E1-Anatum (1)
T (8)	NA	B-Typhimurium (1) C1-Rissen (3) B-Derby (2) E1-Anatum (2)
Susceptible (37)	B-Typhimurium (16) C2/C3-Bardo (2) D1-Enteritidis (2) B, C1, Y-Other (4)	B-Typhimurium (3) E1-Anatum (2) B-Derby (2) N-Urbana (2) C1, E1-Other (4)
6 antibiotic families	6 serogroups	5 serogroups
16 AR profiles (77)	9 serotypes (55)	14 serotypes (59)

^aA: ampicillin and/or amoxicillin-clavulanic acid; C: chloramphenicol; S: streptomycin; Su: sulfisoxazole and/or trimethoprim-sulfometoxazole; T: tetracycline; Nx: nalidixic acid; NA: not applicable

Table 7. Phenotypic characterization of *Salmonella* strains isolated simultaneously in MLN and IC samples from fattening pigs.

Animal Code	Sample analyzed	<i>Salmonella</i> phenotype			Possible relationship infection and shedding
		Serotype	AR pattern	Typhimurium phagetype	
1	MLN IC	Typhimurium	ACSSuTNx	104B	Yes
2	MLN IC	Typhimurium	ACSSuTNx	104B	Yes
3	MLN IC	Typhimurium	ACSSuTNx	104B	Yes
4	MLN IC	Typhimurium	ACSSuT	104B	Yes
5	MLN IC	Typhimurium	S/Sensible	193	Yes
6	MLN IC	Typhimurium Typhimurium Rissen	S S ACSSuT	193 193 NA	Yes
7	MLN IC	Derby	SuT	NA	Yes
8	MLN IC	Derby	Sensible	NA	Yes
9	MLN IC	Anatum	ST	NA	Yes
10	MLN IC	Typhimurium	ACSSuT	193/104B/U302 104B	Yes
11	MLN IC	Typhimurium	ACSSuT/Sensible	104B 137/56	No
12	MLN IC	Typhimurium 1,4,[5],12:i:-	S/Sensible ASSu	193 U311	No
13	MLN IC	Typhimurium Wien	Sensible ACSSu	137 NA	No
14	MLN IC	Typhimurium <i>S. salamae</i>	ACSSuT S/Sensible	104B NA	No

A: ampicillin; C: chloramphenicol; S: streptomycin; Su: sulfisoxazole; T: tetracycline; Nx: nalidixic acid. NA: not applicable

DISCUSSION

Results from this study show that the prevalence of salmonellosis in the fattening pigs from vertically-integrated production system from Navarra was lower than that reported for major pig producer areas of Spain. Comparison among different studies should be carefully done since prevalence estimates are affected by sampling design factors, such as sample size (23), type of sample (24, 25) or the bacteriological procedure used, which leads to sensitivity and specificity variations (26, 27). The MLN study performed here was comparable to both the EU baseline study (6) and the previous study in the neighbor region of Aragón (20), thus, differences in *Salmonella* prevalence estimates (7.3% in Navarra vs. 29% -EU- or 31.3% -Aragón-) may be likely so. Large differences between studies were also observed regarding the number of the *Salmonella* serotypes (9 in Navarra and 37 in Aragón), the AR prevalence (56.4% in Navarra and 73.4% in Aragón), and with regard to the predominant serotype (Typhimurium and its monophasic variant were the most prevalent (45/55; 81.8%) in this study in contrast to 49% in Aragón) (306/625; 49.0%) (20).

All these differences may be attributed to differences in animal and herd management. Unlike major producing regions, Navarra has an important local gilt production that allows self-replacements without need of a large pig exchange with other regions. It also raises mostly piglets from specific local breeding farms, which probably contributes to reduce the mix of piglets from different origins and subsequently *Salmonella* prevalence (20, 28) and serotype diversity. On the contrary, trade movements of gilts and piglets with other Spanish and European regions are very common in Aragón (29), which could have contributed to the observed differences.

Other more subtle factors may have also played a role in the observed differences between these neighboring regions. In order to assess them, we used the same questionnaire and analyzed the data in the same way than in the previous study in Aragón. The results from the multivariable model (Table 3) also differed between the two regions except for one variable, i.e. the absence of a continuous rodent control program in the farms, emphasizing the important role that rodents may play in the maintenance of the infection within the farm (30). Other potential risk factor found in this study, the lack of changing rooms and shower for the farm staff, was also significantly related with a higher *Salmonella* prevalence (OR=11.9; 95% CI=2.08-68.05) (Table 3). This variable has been already found associated with pig salmonellosis elsewhere (31, 32) and it is considered a reflection of the farmer's level of

awareness on farm hygienic practices. By contrast, heavier pigs did not show higher risk of infection, as it appeared to occur in Aragón in animals that spent more time in the fattening unit (20). In contrast, in the present study, pigs with body weight below 106 Kg had a higher risk of infection. This finding may likely be related to an overall lower level of exposure to *Salmonella* during the fattening period in Navarra compared to that in Aragón.

Pelleted feed has been associated with higher levels of infection (31). In fact, this type of feed would modify the physical conditions of the gut content in a way that would favor the survival of *Salmonella*. Given the likely low level of exposure to *Salmonella* no negative effect was expected from the use of pelleted feed. In addition, the way the pellets are processed will guaranty its safety compared to less processed meals, which would support its negative relationship with *Salmonella* infection or *Salmonella* presence on intestinal content under this environmental characteristics (Table 3).

The stress induced by the pre-slaughter transport and lairage period in the abattoir's pens has been proposed as a factor that favors the pathogen multiplication in pigs and subsequently the shedding through feces, contributing to the contamination of other pigs and pig carcasses and meat (33, 34). Paired MLN and IC samples (n=698) were analyzed to estimate how frequent a well-established *Salmonella* infection (i.e. detection on MLN) ended up in shedding under stress conditions. Shedding from MLN positive pigs could be demonstrated only in 4 (8%) pigs out of the 50 found previously infected, suggesting a low impact of these stress factors in the dissemination of the pathogen in these pigs.

Around 91.5% (54 out of 59) of the pigs appeared to carry the pathogen in their feces without being MLN positive. Differences attributable to bacteriological culture are unlikely, since sensitivity of the ISO method has been reported lower in feces than in MLN (24). This could be attributable to a non-infectious ingestion of the bacteria through feed, water and/or environmental/floor contamination at lairage, emphasizing the importance of control measures focused on hygienic measures.

In this context of low salmonellosis prevalence, a great discrepancy was observed (at any cut-off) between serology and bacteriology, with regard to both MLN and fecal samples. In fact, a significant proportion of farms showing all animals sero-negative had animals carrying the pathogen either in MLN (4 farms) and/or in feces (6 farms), suggesting that the presence of specific antibodies against *Salmonella* is a poor indicator of the current status of infection in this epidemiological situation. Although some authors have suggested that discrepancies

between serology and microbiology in pig salmonellosis could be attributable to serogroup differences between the antigens used in the ELISA test and the *Salmonella* serotypes prevalent in the region (20, 27), this cannot explain our results since most of *Salmonella* isolates (87.3%) belonged to serogroup B (Table 4), the main target of the Herd-Check[®] Swine *Salmonella* ELISA test. It seems that serology should be considered of limited usefulness for the control and monitoring of pig salmonellosis in these low-prevalence areas, and it should be always accompanied by microbiology to obtain a proper picture of the epidemiological situation in the area.

Most (92%) infected animals did not excrete the pathogen from MLN to feces, suggesting the limited importance of infected pigs in the transmission of the pathogen in this population. Likely, this could be due the low degree of stress in the population of pigs studied as result of good management practices and animal welfare accomplished in the region during transport to abattoir and lairage.

In conclusion, *Salmonella* prevalence in fattening pigs from vertically-integrated production system from Navarra was lower than that of the main producing areas of Spain, showing low diversity of *Salmonella* serotypes and AR profiles. The particular characteristic of this system (low proportion of animal exchange and feed producing) could contribute positively to the relative control of this important zoonosis in the region. Asymptomatic pigs infected subclinically in the farm seemed not to play an important role in the dissemination of the pathogen through feces at slaughter under this scenario. This finding encourages the control strategies based on good hygiene practices.

ACKNOWLEDGEMENTS

This work and V. Garrido post-doctoral contract, were supported by Departamento de Industria, Energía e Innovación of Gobierno de Navarra (project reference IIQ14064.RI1). B. San Román post-doctoral contract was granted by CSIC-Fondo Social Europeo (Subprogram JAE-Doc). S. Sánchez fellowship was financed by Erasmus-Mundus 18 international program.

We are grateful to C. de Frutos (Laboratorio Nacional de Referencia para Salmonelosis Animales, Spain) and A. Echeíta (Instituto de Salud Carlos III, Spain) for their kind collaboration on *Salmonella* spp. typing. Collaboration of directors and workers from the Instituto Navarro de Tecnologías e Infraestructuras Agroalimentarias (INTIA) and swine abattoirs was also greatly acknowledged.

REFERENCES

1. CDC. 2012. CDC Estimates of foodborne illness in the United States. National Center for Emerging and Zoonotic Infectious Diseases, <http://www.cdc.gov/foodborneburden/2011-foodborne-estimates.html>.
2. EFSA-ECDC. 2015. The European Union summary report on trends and sources of zoonoses, zoonotic agents and food-borne outbreaks in 2013. EFSA J 13(1):3991:1-312.
3. EFSA-ECDC. 2012. The European Union summary report on trends and sources of zoonoses, zoonotic agents and food-borne outbreaks in 2010. EFSA J 10(3):2597:1-442.
4. Pires S.M., de Knecht L., Hald T. 2011. Estimation of the relative contribution of different food and animal sources to human *Salmonella* infections in the European Union. EFSA J.
5. DOUE. 2003. Regulation (EC) No 2160/2003 of the European Parliament and of the council on the control of *Salmonella* and other species food-borne zoonotic agents. Official J Eur Union.
6. 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. Part A: *Salmonella* prevalence estimates. EFSA J 135:1-111.
7. EFSA. 2009. Analysis of the baseline survey on the prevalence of *Salmonella* in holdings with breeding pigs in the EU, 2008. Part A: *Salmonella* prevalence estimates. EFSA J 7(12):1377:1-93.
8. Vico J.P., Engel B., Buist W.G., Mainar-Jaime R.C. 2010. Evaluation of three commercial enzyme-linked immunosorbent assays for the detection of antibodies against *Salmonella* spp. in meat juice from finishing pigs in Spain. Zoonoses Public Health 57 Suppl 1:107-114.
9. EFSA. 2008. Scientific report on the analysis of the baseline survey on the prevalence of *Salmonella* in slaughter pigs, in the EU, 2006-2007. Part B: factors associated with *Salmonella* infection in lymph nodes, *Salmonella* surface contamination of carcasses, and the distribution of *Salmonella* serovars. EFSA J 206:1-111.

10. MAGRAMA. 2014. El sector de la carne de cerdo en cifras: Principales indicadores económicos en 2013. Subdirección General de Productos Ganaderos. www.eurocarne.com/pdf/informes/indicadores_porcino_2014.pdf.
11. De Busser E.V., Maes D., Houf K., Dewulf J., Imberechts H., Bertrand S., De Zutter L. 2011. Detection and characterization of *Salmonella* in lairage, on pig carcasses and intestines in five slaughterhouses. *Int J Food Microbiol* 145:279-286.
12. Arguello H., Carvajal A., Collazos J.A., García-Felíz 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.
13. Gobierno-de-Navarra. 2009. Censo de ganado a 31 de Diciembre 2009. Departamento de Desarrollo Rural y Medio Ambiente. <http://www.navarra.es/NR/rdonlyres/0C24BD13-4CDC-4731-9AA3-223FCA7F68D1/147783/714003.pdf>.
14. ISO. 2007. Microbiology of food and animal feeding stuffs. Horizontal method for the detection of *Salmonella* spp. Annex D: Detection of *Salmonella* spp. in animal faeces and in samples from the primary production stage. ISO 6579:2002/DAM 1:2007.
15. Grimont P.A., Weill F.X. 2007. Antigenic formulae of the *Salmonella* serovars. Institute Pasteur.
16. Anderson E.S., Ward L.R., Saxe M.J., de Sa J.D. 1977. Bacteriophage-typing designations of *Salmonella typhimurium*. *J Hyg (Lond)* 78:297-300.
17. Echeíta M.A., Aladueña A.M., Díez R., Arroyo M., Cerdán F., Gutierrez R., de la Fuente M., González-Sanz R., Herrera-León S., Usera M.A. 2005. Serotype and phage type distribution of human *Salmonella* strains isolated in Spain, 1997-2001. *Enferm Infec Microbiol Clin* 23:127-134.
18. CLSI. 2006. Performance standards for antimicrobial disk susceptibility tests; Approved Standard M2-A9. Clinical and Laboratory Standards Institute.
19. DOUE. 2007. Commission Decision of 12 June 2007 on a harmonised monitoring of antimicrobial resistance in *Salmonella* in poultry and pigs. Official J Eur Union.

20. 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 Prot* 74:1070-1078.
21. Garrido V., Sánchez S., San Román B., Zabalza-Baranguá A., Díaz-Tendero Y., de Frutos C., Mainar-Jaime R.C., Grilló M.J. 2014. Simultaneous infections by different *Salmonella* strains in mesenteric lymph nodes of finishing pigs. *BMC Vet Res* 10:59.
22. García-Feliz C., Collazos J.A., Carvajal A., Vidal A.B., Aladueña A., Ramiro R., de la Fuente M., Echeíta M.A., Rubio P. 2007. *Salmonella* enterica infections in Spanish swine fattening units. *Zoonoses Public Health* 54:294-300.
23. Funk J.A., Davies P.R., Nichols M.A. 2000. The effect of fecal sample weight on detection of *Salmonella* enterica in swine feces. *J Vet Diagn Invest* 12:412-418.
24. Mainar-Jaime R.C., Atashparvar N., Chirino-Trejo M. 2008. Estimation of the diagnostic accuracy of the *invA*-gene-based PCR technique and a bacteriological culture for the detection of *Salmonella* spp. in caecal content from slaughtered pigs using Bayesian analysis. *Zoonoses Public Health* 55:112-118.
25. Mainar-Jaime R.C., Andrés S., Vico J.P., San Román B., Garrido V., Grilló M.J. 2013. Sensitivity of the ISO 6579:2002/Amd 1:2007 standard method for detection of *Salmonella* spp. on mesenteric lymph nodes from slaughter pigs. *J Clin Microbiol* 51:89-94.
26. Davies P.R., Turkson P.K., Funk J.A., Nichols M.A., Ladely S.R., Fedorka-Cray P.J. 2000. Comparison of methods for isolating *Salmonella* bacteria from faeces of naturally infected pigs. *J Appl Microbiol* 89:169-177.
27. Steinbach G., Blaha T., Methner U. 2002. Estimating the prevalence of *Salmonella* spp. in swine herds - Influence of sensitivity and specificity of *Salmonella* detection. *J Vet Med B Infect Dis Vet Public Health* 49:438-444.
28. Lo Fo Wong DM., Dahl J., Stege H., van der Wolf PJ., Leontides L., von Altrock A., Thorberg BM. 2004. Herd-level risk factors for subclinical *Salmonella* infection in European finishing-pig herds. *Prev Vet Med* 62:253-266.
29. Gobierno-de-Aragón. 2012. Movimiento comercial pecuario en Aragón, año 2009-2012. Departamento de Agricultura, Ganadería y Medio Ambiente.

http://www.aragon.es/DepartamentosOrganismosPublicos/Departamentos/AgriculturaGanaderiaMedioAmbiente/AreasTematicas/EstadisticasAgrarias/ci.01_Estadisticas_GANADERAS.detalleDepartamento?channelSelected=1cfbc8548b73a210VgnVCM100000450a15acRCRD.

30. Andrés-Barranco S., Vico J.P., Garrido V., Samper S., Herrera-León S., de Frutos C., Mainar-Jaime R.C. 2014. Role of wild bird and rodents in the epidemiology of subclinical salmonellosis in finishing pigs. *Foodborne Pathog Dis* 11:689-697.
31. Funk J., Gebreyes W.A. 2004. Risk factors associated with *Salmonella* prevalence on swine farms. *J Swine Health Prod* 12:246-251.
32. Lo Fo Wong D.M., Dahl J., Stege H., van der Wolf P.J., Leontides L., von Altröck A., Thorberg B.M. 2004. Herd-level risk factors for subclinical *Salmonella* infection in European finishing-pig herds. *Prev Vet Med* 62:253-266.
33. Callaway T.R., Edrington T.S., Brabban A.D., Keen J.E., Anderson R.C., Rossman M.L., Engler M.J., Genovese K.J., Gwartney B.L., Reagan J.O., Poole T.L., Harvey R.B., Kutter E.M., Nisbet D.J. 2006. Fecal prevalence of *Escherichia coli* O157, *Salmonella*, *Listeria*, and bacteriophage infecting *E. coli* O157:H7 in feedlot cattle in the southern plains region of the United States. *Foodborne Pathog Dis* 3:234-244.
34. Larsen S.T., McKean J.D., Hurd H.S., Rostagno M.H., Griffith R.W., Wesley I.V. 2003. Impact of commercial preharvest transportation and holding on the prevalence of *Salmonella enterica* in cull sows. *J Food Prot* 66:1134-1138.

CHAPTER 2

Salmonellosis in sows: mesenteric lymph node infection, fecal shedding and serology

This chapter is a draft prepared to be published as: Garrido V., Sánchez S., San Román B., Grilló M.J.
Salmonellosis in sows: mesenteric lymph node infection, fecal shedding and serology.

ABSTRACT

Sows are considered the main responsible for *Salmonella* infection in piglets. True infection could only be assessed by isolating the pathogen in mesenteric lymph nodes (MLN). Since it is quite difficult to accomplish in sows, all studies in breeding holdings are on feces. Here, a study on *Salmonella* infection in sows was carried out in which paired blood samples were also collected. In addition, individual and pooled fecal samples (IFS and PFS, respectively) were analyzed to determine both the prevalence of fecal shedding and the possible role of MLN as the source of shedding. The sow population belonged to the vertically-integrated production system from Navarra (North of Spain). *Salmonella* was detected in 6.1% of MLN samples belonging to sows from 40% of sampled farms. *S. Typhimurium* and *S. Derby* were the most frequent serotypes, but *S. Enteritidis* was also identified in MLN. Most of Typhimurium were DT104B, resistant to ACSSuT, and belonged to one farm. One DT195 resistant to ASSuT-Nx-Cfx was also found. Almost 45% of the isolated strains were susceptible to all antimicrobials tested and were distributed in all but one positive farm. A similar overall prevalence was shown in IFS (5.5%) with *S. Derby* and *S. London* as the most common serotypes. Interestingly, *S. Typhimurium* was not detected in IFS suggesting an origin different than MLN. *Salmonella* was more prevalent in PFS (10.8%) than in IFS, showing only moderate concordance ($k=0.49$). Seroprevalence (100% farms and $\geq 41.8\%$ sows positive) largely disagree with microbiology. Finally, risk factors associated to *Salmonella* infection or shedding in sows were identified.

Keywords: *Salmonella*, prevalence, lymph nodes, feces, antimicrobial resistance, risk factors, sows.

INTRODUCTION

Non-typhoidal salmonellosis is a worldwide-distributed zoonosis caused by *Salmonella*, a pathogen of public health relevance. After fowl *Salmonella* control, pig products are emerging as an important source of *Salmonella* for humans (1). In this context, the EU legislation foresees the *Salmonella* reduction in food and animals, including breeding sows as transmitters of the pathogen to piglets (2). Moreover, sows are a source of human infection through the food chain, mainly by sow offal, which exportation from Spain are on the rise in the international market, and have experienced an increment of 392.7% in the 2006-2011 period (3). Results of EU baseline studies indicated that Spain was on the top of *Salmonella* prevalence at herd level, showing the bacterium in pooled fecal samples (PFS) from the 53% and 64% of fattening and breeding holdings, respectively (4, 5). Since the presence of *Salmonella* in fecal samples could be due to external contamination by contact with *Salmonella* wildlife vectors or to passive ingestion of bacteria, the actual infectious status of sows could only be determined in mesenteric lymph nodes (MLN). Accordingly, reference studies on fattening pigs were performed in MLN obtained at abattoir and analyzed by ISO 6579:2002/Amd 1:2007 (hereafter, ISO 6579) (6), as actual and individual indicator of animal salmonellosis (7). However, information on MLN infection in sows is very scarce, since sampling of sows in abattoir is quite difficult to accomplish, mainly due to the low number of individuals included in each slaughtering process.

Serological diagnosis is considered as an alternative in *Salmonella* control programs in some EU countries (8-10). Nevertheless, great differences in anti-*Salmonella* antibodies detection were observed depending on the commercial ELISA test used (11) and the usefulness of these tests in sows has never been compared to actual MLN infection in sows.

Spain is the fourth major pig producer of the world, after USA, China and Germany. In Spain, breeding pig production is unevenly distributed among regions, and Navarra (North of Spain) ranks as the fifth region with higher number of sow herds (3). The regional vertically-integrated production system of self-reposition consists in only few herds involving high sow population (i.e. 85 farms with at least 100 sows/farm contained 59,291 sows, in 2011) that not only allows to a highly efficient swine production but also favors the control of the infectious diseases dissemination.

In this context, the present study was designed to evaluate: (i) the individual and herd

prevalence of salmonellosis in sows, as well as the phenotype of *Salmonella* strains (i.e. serotypes, phage-types and antimicrobial resistance (AR) profiles) involved in MLN infection; (ii) the individual and herd prevalence of *Salmonella* sow shedders at farm, as well as the phenotype of circulating strains; (iii) the seroprevalence and ELISA performance in sows with respect to MLN infection using blood paired samples; and (iv) the main salmonellosis risk factors associated to either infection and shedding. All these objectives were carried out in a representative population of breeding pigs of the vertically-integrated production system of Navarra.

MATERIAL AND METHODS

Sampling design

In 2011, a total of 65,308 breeding sows belonging to 763 farms was censused in Navarra, the region of Spain selected for this study (INTIA, personal communication). Most (37,964 sows) of these animals belonged to only 16 breeding holdings that contained more than 1,200 sows per farm, and that were managed by 7 integrator companies. On this framework, 15 out of these 16 holdings containing 33,545 sows were included in the study. Since no previous data on *Salmonella* MLN infection in sows were available, and considering the replacement rate, 15-20 gilts/farm were considered representative to estimate sows salmonellosis prevalence, assuming a 7% error (12). Accordingly, a total of 264 MLN samples were collected in the abattoir, from June 2011 to January 2012. Moreover, blood samples from 237 of these sows belonging to 14 out of 15 farms (one farm could not be sampled) were collected at the slaughter line, for serological studies.

On the other hand, shedding of *Salmonella* in feces was determined at farm in the breeding sows maintained in 12 out of the 15 farms previously analyzed, by harvesting individual fecal samples (IFS) from the rectum of sows (at least 30 grams/sow), paying particular attention to avoid cross contamination by using double glove and individual sterile containers for each IFS. Sampling was design to obtain fecal samples proportionally to the number of rooms of each reproductive unit (i.e. gestation, farrow, reposition and welfare park) and to the number of sows kept in each room, as representative of the different reproductive cycle stages of sows. Accordingly, gestation (n=340) and farrow (n=205) sows were sampled in all farms, but reposition (n=30) and park allocated (n=25) sows only could be analyzed in 4 and 3 out of 12

farms, respectively. Since IFS were obtained from 5 sows per room and 10 rooms per farm, a total of 600 IFS was eventually obtained. These IFS were processed both individually (600 IFS; 25 grams/sample) and pooled (5 grams/IFS × 5 IFS/pool from sows kept in a same breeding room, i.e. 120 PFS), since the latter gave results comparable with those of the EU baseline study (5).

Salmonella isolation and characterization

All MLN, IFS and PFS samples were kept under refrigeration until processing in the laboratory within the workday following the ISO 6579 (6) as previously detailed (13, 14). Briefly, 25 grams of defatted MLN were individually weighed, externally decontaminated by flaming, and homogenized in 225 mL (1:10 w:vol) of sterile Buffered Peptone Water (BPW). Similarly, 25 grams of feces (IFS or PFS) were weighed with a disposable sterile spatula and homogenized in 1:10 BPW by using stomacher bags fitted with filter (Seward Medical Labsystem, UK). After non-selective enrichment (37°C, 18±2 h) of BPW homogenates, a semi-selective enrichment was carried out by inoculating 100 µL of the interphase air-liquid BPW culture, distributed in three drops, into Modified Semisolid Rappaport-Vassiliadis plates. After incubation (41.5°C, 24 h or 48 h, if negative at 24 h), 1 µL of suspected positive samples (presence of a characteristic white halo) was transferred to selective Xylose-Lysine-Deoxycholate and Brilliant Green agar plates, and plates were incubated (37°C, overnight). Presumptive *Salmonella* colonies were purified in Luria-Bertani agar plates and biochemically analyzed by Triple Sugar Iron agar, Urea agar, L-lysine decarboxylation and Indol tests. All products were provided by Conda (Spain). *Salmonella* isolates were stored in 10% skimmed milk at -20°C, and one colony/sample was confirmed by serotyping at the National Centre for Animal Salmonellosis (Madrid, Spain) according to its antigenic formula by the Kauffman-White Scheme (15). Monophasic isolates of *S. Typhimurium* were assessed by molecular serotyping according to the PCR identification guidelines published by EFSA (16). All *S. Typhimurium* strains were phagetyped by standardized protocols in the National Centre of Microbiology at Instituto de Salud Carlos III (Madrid, Spain) according to standard protocols (17).

Antimicrobial resistance

Well-identified *Salmonella* spp. strains were analysed by the Kirby-Bauer disk diffusion test method (18) against 12 antimicrobials (BD, Spain), at standard doses for swine salmonellosis reference studies (19), belonging to 7 different antimicrobial families, i.e. A, ampicillin and

amoxicillin-clavulanic acid (Aminopenicillins); C, chloramphenicol (Phenicols); S, streptomycin and gentamycin (Aminoglucozidos); Su, sulphisoxazole, trimethoprim and trimethoprim plus sulphometoxazole (Sulfonamidos); T, tetracycline (Tetracyclinos); Nx, nalidixic acid (Natural Quinolones); Cip, ciprofloxacin (Fluoride Quinolones); Cfx, cefotaxime (Third Generation Cephalosporins). *Salmonella* susceptibility was determined by measuring the inhibition halo induced by the correspondent antibiotic in Mueller-Hinton (BD, Spain) plates, and strains were classified as resistant or susceptible, according to the Clinical and Laboratory Standards Institute (20) instructions. Reference strains *E. coli* ATCC 25922, *S. Typhimurium* ATCC 14028 and *S. Typhimurium* ATCC DT104 were used as controls in each experiment.

Serological study

Individual sera (n=237) were obtained after incubation (RT, 4h), centrifugation (Multifuge 3 L-R Sorvall, Heraeus; 4°C, 10 min, 1,500 x g) and stored at -20°C until its use. The Herd-Check® Swine *Salmonella* indirect ELISA test (IDEXX™ Laboratories, Switzerland) was used. This test had shown an optimal sensitivity and specificity in fattening pig sera (88% and 74%, respectively) compared with other commercial kits (11). Optical density (OD) values were normalized and expressed at different cut-off values (i.e. 10%, 20% and 40%), according to the manufacturer's instructions.

Questionnaire data and statistical analysis

Questionnaire consisted in 70 variables, thus the farm survey was divided into 5 main sections: (i) farm general characteristics: herd size, number of gestation units, number of full-time workers, etc.; (ii) biosecurity: existence and maintenance of outside fence and pediluvium, use of specific clothes, entrance restrictions, rodent control programmes, presence of cats, dogs and wild birds, etc.; (iii) feeding: type of feed, number of diets, water supplier, etc.; (iv) use of antimicrobial agents: type, number and length of treatments, etc.; and (v) farmer's personal information: age, educational level, additional training on pig production, etc. In order to provide reliable information all the surveys were asked to be filled out with the assistance of their corresponding veterinarians.

Questionnaire information was used to assess possible risk factors associated to *Salmonella* MLN infection and/or fecal shedding. First, a screening of possible risk factors was carried out by a univariable *Chi*-square test; second, significant variables ($p \leq 0.05$) were further considered in a multivariable random-effect logistic regression model in which the outcome variable was

the “culture positive”; the explanatory variables included in the model as fixed effect were those from the questionnaire; and the random effect was the farm. Multivariable analysis was performed by the STATA software (StataCorp, L.P., College Station, TX). An odds ratio (OR) >1 indicated that animal exposure to the factor increases the risk of *Salmonella* positivity, whereas an OR<1 indicates a reduced risk of animals positivity due to exposure to the factor.

Considering the 100% specificity of bacteriology, a farm was considered positive when *Salmonella* was confirmed in at least one sample (MLN, IFS or PFS). Concordance analysis was performed using the Kappa test (k) either in paired samples (MLN infection vs. serology) or in IFS vs. PFS. To perform the latter, the results obtained with IFS were considered in groups of 5 IFS/group to make a proper concordance analysis with 120 final samples. One final sample was considered positive when at least one out of 5 involved was positive. Descriptive statistics and prevalence were estimated with a 95% confidence interval (CI_{95%}). Statistical comparison of percentages was performed by a *Chi-square* test with Fisher’s correction ($p \leq 0.05$) when required, using the SPSS 15.0.1 statistical software (SPSS Inc., Chicago, IL).

RESULTS

Salmonella MLN infection

As shown in Table 8, *Salmonella* spp was found in MLN of 16 out of 264 (6.1%) sows that belonged to 6 out of 15 (40%) breeding farms showing a 14.5% of mean prevalence within farm. However, most (80%) of farms showed less than 10% of animals infected, displaying a marked left-biased distribution of the infection (Figure 13).

In these samples, a total of 6 serotypes (from 4 different serogroups) were detected, being Typhimurium (43.7%), Derby (18.7%), Enteritidis (12.5%) and Montevideo (12.5%) the most common serotypes (Table 9; Table 10). *S.* Typhimurium strains were found in three different farms, showing DT104B, DT193 and DT195 phagetypes one in each farm.

Table 8. Prevalence of *Salmonella* in mesenteric lymph nodes (MLN), individual fecal samples (IFS) and pooled fecal samples (PFS) from sows of the vertically-integrated production system of Navarra (Spain).

<i>Salmonella</i> spp. isolation	MLN (mean %; CI ₉₅ ^a)	IFS (mean %; CI ₉₅)	PFS (mean %; CI ₉₅)
No. positive ^b / total samples	16/264 (6.1; 3.7-9.6)	33/600 (5.5; 3.9-7.6)	13/120 (10.8; 6.4-17.6)
No. positive/ total farms	6/15 (40; 19.8-64.2)	8/12 (66.7; 39.0-86.1)	6/12 (50.0; 25.3-74.6)
No. of positive pigs/ total pigs in positive farms	16/110 (14.5; 9.1-22.3)	33/400 (8.2; 5.9-11.3)	13/60 (21.6; 13.1-33.6)
No. (%) farms with ≤10% prevalence/ total farms	12/15 (80.0)	11/12 (91.6)	7/12 (58.3)

^aCI₉₅: 95% Confidence Interval; ^bPigs or farms where at least 1 CFU of *Salmonella* spp. was isolated

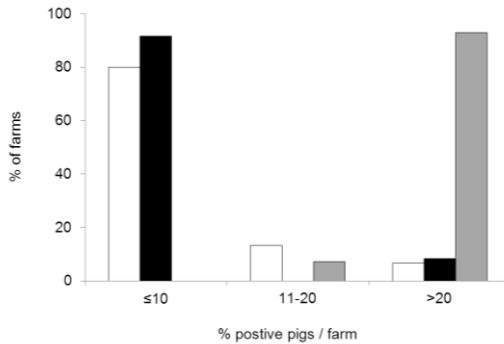


Figure 13. Distribution (% of farms showing $\leq 10\%$, 11-20% or $>20\%$ individual prevalence) of *Salmonella* spp. in breeding sows from the intensive production system of Navarra (Spain). MLN (white bars) and IFS (black bars) were analyzed by ISO 6579; blood serum samples (grey bars) were analyzed by ELISA and the results at 40% O.D. cut-off were represented.

Table 9. *Salmonella* spp. strains isolated in MLN samples from breeding sows representative of the intensive production system of Navarra (Spain).

Farm (integrator) codes	MLN			Serology
	No. (%) of positive/ total samples	Serotype/phagetype ^a (No. of strains)	AR ^b profile (No. of strains)	No. (%) of positive ^c / total samples
1 (A)	6/20 (30%)	Typhimurium DT104B (5) Rissen (1)	ACSSuT (5) Susceptible (1)	16/20 (80%)
2 (B)	3/15 (20%)	Derby (2) Enteritidis (1)	SSuT (2) Susceptible (1)	4/15 (26.6%)
3 (C)	3/20 (15%)	Montevideo (2) Muenchen (1)	Susceptible (2) Susceptible (1)	NA
4 (D)	2/20 (10%)	Typhimurium DT195 (1) Derby (1)	ASSuT-Nx-Cfx (1) SSuT (1)	11/20 (55%)
5 (E)	1/20 (5%)	Typhimurium DT193 (1)	Susceptible (1)	3/13 (23.1%)
6 (B)	1/15 (6.7%)	Enteritidis (1)	Susceptible (1)	7/15 (46.6%)
7-15 (A, D, E-)	0/154 (0%)	NA	NA	58/154 (15%-80%) ^d
Total: 13 (7)	16/264 (6.1%)	6 serotypes (16)	3 AR profiles; Susceptible (7)	99/237 (41.8%)

^aOnly for Typhimurium strains; ^bA: ampicillin and/or amoxicillin-clavulanic acid; C: chloramphenicol; S: streptomycin; Su: sulfisoxazole, trimethoprim, and/or trimethoprim-sulfamethoxazole; T: tetracycline; Nx: nalidixic acid; Cfx: cefotaxime; ^c40% OD cut-off; ^dmean positive samples in 9 farms with individual seroprevalence from 15% to 80%; NA: not applicable

Table 10. Summary of antimicrobial resistance (AR) and serotype of *Salmonella* strains isolated in MLN, IFS or PFS of breeding sows of Navarra (Spain).

MLN (n=239)	Serotype (No. of strains) ^a		AR pattern (No. of strains) ^a
	IFS (n=600)	PFS (n=120)	
Typhimurium (7)	NA	NA	ACSSuT (5); ASSuT-Nx-Cfx (1); Susceptible (1)
Derby (3)	Derby (13)	Derby (5)	SSuT (10); ST (2); S (5); Susceptible (4)
Enteritidis (2)	NA	NA	Susceptible (2)
NA	London (14)		Susceptible (10); S (2); A (1); T (1);
		London (4)	Susceptible (3); ST (1)
NA	Bovismorbificans (3)		ASuT (2); AT (1)
		Bovismorbificans (1)	AST (1)
NA	Tennessee (1)	NA	ST (1)
NA	NA	Mishmarhaemek (1)	S (1)
NA	Anatum (2)		S (1); Susceptible (1)
		Anatum (1)	S (1)
Montevideo (2); Muenchen (1); Rissen (1)	NA	Lexington (1)	Susceptible (5)
6 serotypes (16)	5 serotypes (33)	6 serotypes (13)	7 antimicrobial families; 11 AR profiles (61)

^aA: ampicillin and/or amoxicillin-clavulanic acid; C: chloramphenicol; S: streptomycin; Su: sulfisoxazole, trimethoprim, and/or trimethoprim-sulfamethoxazole; T: tetracycline; Nx: nalidixic acid; Cfx: cefotaxime; N.A.: not applicable

Nine (56.3%) of MLN isolates belonging to serotypes Typhimurium or Derby showed AR to 3 (SSuT) or more (ACSSuT and ASSuT-Nx-Cfx) antimicrobials leading to 3 different multi-AR patterns of *Salmonella* strains, which were distributed in 3 different breeding farms (Table 9). Curiously, strains susceptible to all the antimicrobials tested were distributed in all but one farm, the SSuT multi-AR profile of *S. Derby* strains (n=3) was common to Farms 2 and 4, and the two *S. Typhimurium* multi-AR profiles were restricted each to one origin. In fact, the 5 Typhimurium DT104 strains isolated in Farm 1 showed the typical ACSSuT penta-AR profile, and the DT195 strain of Farm 4 showed a particular ASSuT-Nx-Cfx multi-AR profile. Interestingly, 43.7% strains isolated in MLN showed susceptibility to all the antimicrobials tested.

Salmonella in feces of sows

Individual fecal samples. Thirty-three out of 600 (5.5%) rectal IFS showed *Salmonella* spp. from sows distributed in 8 out of 12 (66.6%) different farms with a 8.2% (CI_{95%}: 5.9%-11.3%) of shedders in positive breeding holdings (Table 8). In fact, all but one farm (91.6%) contained ≤10% of shedders (Figure 13). Short spread of the pathogen within the farms was observed, since most (66.7%) of them showed shedders in ≤2 out of 10 rooms analyzed per farm (Figure 14). By reproductive cycle stage, low and equivalent proportion of shedder sows was observed in all rooms, i.e. gestation (22/340; 6.4%), farrow (7/205; 3.4%), reposition of young females (3/30; 10%) and park (1/25; 4%).

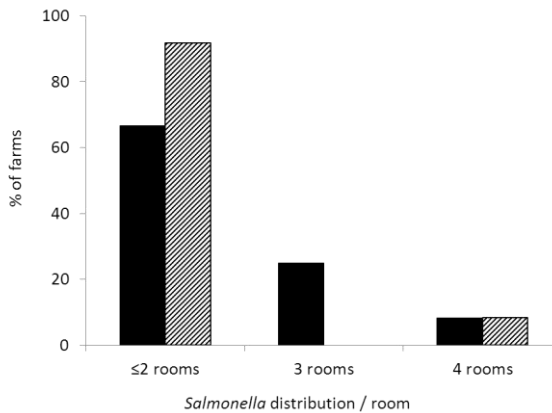


Figure 14. Distribution (% of farms) showing *Salmonella* in ≤2, 3 or 4 out of 10 rooms by farm, regarding IFS (black bars) or PFS (streaked bars).

A total of 5 different serotypes were detected, being *S. London* (14 strains distributed in 3 farms) and *S. Derby* (13 strains distributed in 5 farms) the most prevalent and widespread (Table 11). Curiously, other three less frequent serotypes (*Bovismorbificans*, *Anatum* and *Tennessee*) (Table 10) coexisted simultaneously in a single farm (Farm 6, Table 11). In contrast to MLN, the serotypes found in feces differed greatly from those found in MLN and Typhimurium and Enteritidis serotypes were not found in feces (Table 10).

Regarding AR, 60.6% (20/33) IFS strains were resistant to at least one antibiotic tested, particularly to streptomycin (n=15; 45.5%) and tetracycline (n=12; 36.4%), and strains carrying

both AR were widely distributed by farms (i.e. in 6 and 6 out of 12 farms, respectively; Table 10). A total of 4 multi-AR profiles were detected, being the ST (2 Derby and 1 Tennessee strains) profile present in 3 farms, while SSuT (5 Derby strains), ASuT (2 Bovismorbificans strains) and AT (1 Bovismorbificans strain) were found only in a single farm (Table 10). Interestingly, 39.4% strains isolated in MLN showed susceptibility to all the antimicrobials tested.

Pooled fecal samples. As shown in Table 8, 13 out of 120 (10.8%) PFS belonging to 6 farms were positive to *Salmonella* spp., being this percentage significantly ($p=0.029$) higher than that obtained in IFS (5.5%). Within positive farms, mean prevalence was 21.6% with a narrow dispersion between farms, since the 4/6 of positive farms showed a 20% of positive PFS/farm (Table 9). As for IFS, short spread of the pathogen within the farms was observed, since most (91.7%) of farms showed shedders in ≤ 2 out of 10 rooms analyzed per farm (Figure 14), mainly in gestation and reposition rooms (not shown).

Table 11. Prevalence and characteristics of *Salmonella* spp. strains isolated in fecal samples processed either individually (IFS) or in pool (PFS), from breeding sows representative of the intensive production system of Navarra (Spain).

Type of sample	Farm (integrator) code	No. positive/ total samples (%)	Serotype (No. strains)	AR ^a profile (No. strains)
IFS	2 (B)	11/50 (22)	London (11)	Susceptible (10); A (1)
	13 (G)	5/50 (10)	Derby (5)	Susceptible (1); S (4);
	4 (D)	5/50 (10)	Derby (5)	SSuT (5)
	11 (F)	3/50 (6)	London (2); Derby (1)	S (2); ST (1)
	12 (F)	3/50 (6)	Derby (1); Anatum (1); London (1)	Susceptible (2); T (1)
	6 (B)	3/50 (6)	Anatum (1); Bovismorbificans (1); Tennessee (1)	S (1); AT (1); ST (1)
	10 (E)	2/50 (4)	Bovismorbificans (2)	ASuT (2)
	3 (C)	1/50 (2)	Derby (1)	ST (1)
	1, 5, 7, 8 (A, E)	0/200 (NA)	NA	NA
	Total	8/12	33/600 (5.5)	5 serotypes
PFS	11 (F)	4/10 (40)	London (3), Derby (1)	Susceptible (4)
	13 (G)	2/10 (20)	Derby (2)	Susceptible (1); S (1)
	4 (D)	2/10 (20)	Derby (2)	SSuT (2)
	12 (F)	2/10 (20)	London (1); Anatum (1)	ST (1); S (1)
	6 (B)	2/10 (20)	Bovismorbificans (1); Mishmarhaemek (1)	AST (1); S (1)
	2 (B)	1/10 (10)	Lexington (1)	Susceptible (1)
	1, 3, 5, 7, 8, 10 (A, C, E)	0/60 (NA)	NA	NA
Total	6/12	13/120 (10.8)	6 serotypes	3 multi-AR profiles (4); Susceptible (6)

^a A: ampicillin and/or amoxicillin-clavulanic acid; S: streptomycin; Su: sulfisoxazole, trimethoprim, and/or trimethoprim-sulfamethoxazole; T: tetracycline; NA: not applicable

At population level, the main serotypes found and the proportion of strains of each serotype found in PFS were similar ($p \geq 0.05$) to those found in IFS, being *S. Derby* (38.5%) and *S. London* (30.8%) the most frequently identified (Table 10). However, causally, a single colony of exotic serotypes such as Lexington and Mishmarhaemek were detected in PFS rather than in IFS, and inversely Tennessee was only detected in IFS. As in IFS and MLN, a high proportion (46.1%) of strains found in PFS showed susceptibility to all the antimicrobials tested. Also, AR against streptomycin was present in all strains carrying some AR and was widely distributed among farms.

Concordance between IFS and PFS. *Salmonella* was isolated from a total of 26/120 final samples, 13 of them detected in PFS (see above) and 23 detected in IFS (i.e. considering one final sample positive, when at least one out of 5 IFS involved was positive). A total of 16 discordant samples was detected, 3 of them not detected in IFS and 13 not detected in PFS (Table 12). Concordance analysis indicated an 86.7% of observed concordance (i.e. 10 positive and 94 negative results in both IFS and PFS) with a kappa value of $k=0.49$ ($CI_{95\%}=0.27-0.70$), indicating a moderate concordance between IFS and PFS results.

Table 12. Table of concordance of the detection of *Salmonella* spp. by ISO 6579 in fecal cultures processed either individually (IFS; 25 grams/animal) or in pool (PFS; 25 grams made-up with 5 grams/IFS and 5 IFS/pool). One culture was considered positive when *Salmonella* was isolated from PFS or from at least one IFS constituting the PFS.

Isolation of <i>Salmonella</i>		IFS		Total
		+	-	
PFS	+	10	3	13
	-	13	94	107
Total		23	97	120

On the other hand, considering the 100% of bacteriology specificity (26 final samples positives), sensitivity of the ISO 6579 in PFS was 66.7% while in IFS was 89.7%. Accordingly, PFS failed to detect 2 positive farms where 1 and 2 positive samples were detected by IFS analysis (Farms 3 and 10 in Table 11), as well as to detect 13 final samples that contained at least one positive IFS (Table 12). Differences in the percentage of positive results obtained in PFS (10.8%) vs. IFS (5.5%) could be attributable not only to the number of samples tested but

also to differences in ISO 6579 sensitivity. In fact, if one final sample would be considered positive when at least one out of 5 IFS was positive, 23 (19.2%) instead 13 (10.83%) out of 120 PFS would be considered as positive.

Seroprevalence

At least one seropositive sow was detected in each of the 14 farms analyzed, no matter the cut-off value (i.e. 10%, 20% or 40% OD) considered (Table 9). The 95.4% (226/237) and the 86.9% (206/237) of sows were positive at 10% and 20% OD cut-off, respectively (not shown). Although a more drastic ($p < 0.0001$) reduction of seroprevalence was observed at 40% cut-off, the percentage of positive sows (41.8%) was still higher than that of infection (6.1%; Table 9 and Figure 13). To determine the usefulness of this serological tool, ELISA results were compared with *Salmonella* infection by the ISO 6579 method in MLN samples from the same sows, as “gold standard” technique. Accordingly, serology indicated that 100% farms and at least 41.8% of sows were seropositive vs. 40% of positive farms and 6.1% of MLN infected, indicating the large discrepancy between diagnostic techniques. Moreover, farms allocating uninfected sows showed seroprevalences from 15% to 80% within the farm (Table 9). Accordingly, the absence of concordance between serology and microbiology was statistically confirmed by a Kappa index ($k = 0.000$) indicating a large disagreement between both techniques.

Risk factor analysis of *Salmonella* spp. in sows

Most (13 out of 15) of farms filled correctly the questionnaire to detect the risk factors associated to *Salmonella* spp. infection, maintaining the prevalence, since those 2 farms that did not participate in the survey showed absence of *Salmonella* in all its analyzed animals. Risk factors analyses on MLN and on IFS were carried out separately.

A total of 12 out of 70 variables were initially associated with *Salmonella* spp. MLN infection in the univariate scrutiny. From them, only 2 variables remained as significant in the logistic regression multivariable model (Table 13): (i) “food administration” either mixed with water or dry; and (ii) the accomplishment of “building reforms” or improvement of the facilities in the last 5 years. In contrast, 21 variables were associated with *Salmonella* shedding of sows in the univariate analysis, and 5 of them remained significant in the final multivariable model (Table 13): (i) “age of sows” at slaughter, i.e. less than vs. at least 3 years old; (ii) the existence of “self reposition” vs. acquisition of foreign sows from other farms; (iii) “farm’s age higher than 10 years” i.e. farms with less than vs. at least 10 years of activity; (iv) “doxycycline

treatment”; and (v) “number of different diets” i.e. less than vs. at least 4 different feed dietary changes per year.

Table 13. Variables significantly associated with *Salmonella* prevalence in sows, by multivariable random-effect logistic regression analysis after clustering pigs by farm of origin and considering either MLN or IFS.

Sample	Variable	Logistic regression parameters	
		P value	OR ^a (95% CI)
MLN:			
	Food administration ^b		
	Dry		1
	Mixed with water	0.005	0.11 (0.02-0.52)
	Building reforms		
	Yes		1
	No	0.042	3.01 (1.04-8.73)
	Constant	0.000	0.09 (0.04-0.21)
IFS:			
	Age of sows		
	≥3 years old		1
	≤3 years old	0.000	0.08 (0.03-0.24)
	Self-reposition		
	Yes		1
	No	0.000	8.24 (2.66-25.61)
	Farm’s age higher than 10 years old		
	No		1
	Yes	0.000	0.02 (0.01-0.08)
	Doxycycline treatment		
	Yes		1
	No	0.000	0.52 (0.45-0.61)
	Number of different diets		
	≥4/year		1
	<4/ year	0.014	0.23 (0.07-0.74)
	Constant	0.143	2.31 (0.75-7.19)

^aOR: Odds ratio; ^bReference category assigned as OR=1 for statistical purposes

DISCUSSION

Salmonella isolation in MLN is the only reliable way to demonstrate infection in asymptomatic swine (21), since the presence of *Salmonella* in feces could be due not only to excretion from MLN but also to cross-contamination or to a passive ingestion and surviving of the pathogen in the intestinal tract without causing infection. Also, MLN infection is considered as reservoir and source of intermittent excretion and dissemination of the pathogen to piglets (22). However, little information on sows MLN infection is available, likely due to intrinsic

limitations of sampling sows in abattoir, such as availability of representative number of animals for each sampling. Here, we present a novel study of salmonellosis in MLN of sows and its concordance with serology in paired samples, as well as with respect to the individual fecal shedding at farm.

To our knowledge, only one work on sows MLN infection has been published, showing higher prevalence (58.2% sows) of *Salmonella* infection than in our study (23). This high prevalence not only in sows but also in the cohort of hogs studied (31.3%) could be influenced by some experimental conditions, such as the maintenance of animals for 10 days in lairage before slaughter and analysis (23). In our study, sows infection was very low (6.1%) and similar to that observed in fattening pigs (7.3% pigs) of the same framework, i.e. the vertically-integrated production system of Navarra (13). However, large disagreement between *Salmonella* infection (6.1%) and seropositivity (41.8% at 40% OD cut-off) was observed in these sows, being higher than that observed for fattening pigs (13). As previously suggested, this disagreement could be attributed, at least partially, to a higher chance of infection in sows than in young pigs (11, 24, 25) and also to a longer persistence of humoral immune response than infection itself (26). Other hypothesis such as a lack of sensitivity and specificity of serology (25, 27) or absence of exotic serogroups in the coating of ELISA plates (28) did not justify the disagreement observed in our study. Serology has been applied to salmonellosis control in low prevalence scenarios where infection and humoral immune response against infection are considered as highly correlated (8, 10, 24). However, in our study serological diagnosis seemed of limited interest (if any) to control salmonellosis in sows.

Besides MLN infection, individual shedding was studied in sows of the same farms. The use of fecal samples obtained in farm has the advantage to avoid an increased shedding due to transport stress (29). In fact, although the presence of the pathogen was in a similar proportion of IFS (5.5% sows) and MLN samples of cohorts, the bacterial serotypes (except Derby) identified in each type of sample were different, indicating other bacteria origin than MLN, e.g. passive ingestion of the pathogen. Sows shedding was also similar to that observed in the intestinal content of fattening pigs (8.4% pigs) of Navarra (13), corroborating the low prevalence of swine salmonellosis in this region of Spain, in contrast to the main producers such as Cataluña and Aragón (4, 5).

All the previous epidemiological studies have been carried out in fecal samples, either PFS (obtained either from the floor or from the rectum) or in IFS. Fecal samples at farm are easy to

obtain and give valuable epidemiological information; also, pools are preferred since allow to analyze high number of animals. However, the ISO 6579 has shown lower sensitivity in feces than in MLN (30) and pooled samples also could contribute to a loss of sensitivity (22). Here, we observed around a 23% loss of sensitivity by processing PFS instead of IFS, according to EFSA estimates (22). In fact, PFS under-detected *Salmonella* in 2 out of 8 farms, showing both only 1-2 positive IFS. Moreover, the number of samples tested could also bias the microbiological results obtained in IFS vs. PFS, as suggested by the higher percentage of positivity observed with 120 PFS (10.8% positives) than with 600 IFS (5.5% positives). This result did not contradict the loss of sensitivity in PFS vs. IFS, since the 19.2% of PFS would be positive, if one PFS would be considered positive when at least one of the individual samples included in the pool was positive (Table 11), indicating a considerable reduction (from 19.2% to 10.8%) of the number of positive PFS. In spite of these limitations, results of PFS allowed to compare more accurately our results to those obtained in most of surveillance studies, including the wide EU baseline study. In fact, Navarra showed breeding herd prevalence (50%) lower than that reported in Spain (64%) to the EU baseline study (5) and also lower than that recently found in UK, showing 69% positive breeding herds even though only 10-15 grams of PFS were analyzed (31).

Only few countries analyzed IFS to determine the prevalence within holdings, and results indicated a variability of positive samples ranking from 0.1% (Sweden) to 20.7% (UK). In Navarra, this prevalence (5.5%) was slightly lower than in Denmark (8.3%) or Czech Republic (6.4%) (22). Other studies showing lower prevalence (3.4%) in sows IFS were carried out by non-standardized microbiological techniques (e.g. using other non-selective enrichment than BPW (32)) that are not comparable with our results, since probably entails lower level of detection of the pathogen than the ISO 6579, as current reference technique used here.

In the EU, more than 50 serotypes were detected in feces of breeding holdings, being Derby (23.9%) and Typhimurium (17.9%) the most frequently isolated (5). Surprisingly, Typhimurium was not identified in none of the 46 strains isolated from fecal samples of sows in our study, even though it was the most frequent phenotype identified in sows MLN.

Besides foodborne hazard, the inappropriate use of antimicrobial agents in humans (33) and animals (34) leads to a quick emergence of multi-AR *Salmonella* strains of special epidemiological surveillance (2). Accordingly, several EU studies have been conducted for multi-AR emergence surveillance (35, 36). In our study, AR occurrence in PFS from sows of

Navarra (46.1%) was similar to that reported in EU at country level (48.8%) (36). In contrast to the main pork producers of the EU (63% and 74.5% multi-AR strains in Spain and Germany, respectively) (36), surprisingly, only few multi-AR strains (30.5% of the AR isolates) were detected in sows of Navarra. In fact, around 42% of total strains isolated here were susceptible to all the antibiotics tested. Noteworthy, we isolated one *S. Typhimurium* phagetype DT195 resistant to five different families of antimicrobials and also to third generation cephalosporins. This finding represents a proportion of cefotaxime-resistant strains (0.4%) similar to that observed at both EU (0.8%) and Spain (0.6%) levels (36), however, it should be particularly monitored, since this AR has emerged during last years, and represents the treatment of choice in humans, particularly to children.

Previous information indicated that a main risk factor associated to *Salmonella* fecal shedding in sows was a high replacement rate by external gilts (37). In Navarra, the intensive production of breeding sows was based on a close self-replacement that could contribute positively to the low prevalence of *Salmonella* in sows observed in our study. In fact, most (66.6%) of breeding farms analyzed made self-replacement. However, in agreement with previous observations, farms of Navarra that acquired foreign sows showed a risk 8.24 times higher of *Salmonella* shedding than the former. Moreover, in this context of low prevalence, risk factors associated to MLN infection in sows differed from those associated to fecal shedding. Besides administration of dry food (instead of mixed with water), sows kept in non-reformed farms showed 3 times higher risk of *Salmonella* MLN infection than those kept in upgraded facilities. Probably, this could be related to inefficient disinfection of spoiled surfaces of rooms and water/food dispensers, and/or to a frequent presence of *Salmonella* vectors, such as lizards, birds, rodents, etc. Since some studies suggested a vertical dissemination of *Salmonella* from breeding to fattening pigs (22), correction of risk factors associated to sows salmonellosis would contribute to improve the epidemiological status and, thus, to minimize the risk of pork food contamination from farm to table.

Overall, low prevalence of *Salmonella* was observed in both MLN and feces from sows of the vertically-integrated production system of Navarra, in agreement with the low prevalence observed in fattening pigs from the same production system (13). These results indicated that Navarra is a swine production area of Spain competitive at international level, which offers pork products with a minimum risk as *Salmonella* source of infection for humans. However, correction of the risk factors identified here would contribute to improve the control this important zoonosis at farm level and, thus, the competitiveness of this economical sector.

ACKNOWLEDGMENTS

The work was financed by “Departamento de Innovación, Empresa y Empleo” of the Navarra Government (reference IIQ14064.RI1) and “Instituto Navarro de Tecnología e Infraestructuras Agroalimentarias S.A.” -INTIA- (contract CSIC-INTIA reference CAM2011030054), and Fundación Caja Navarra.

VG, SS and BSR contracts were funded by UPNA (postdoctoral fellowship), Erasmus Mundus (EMUNDUS18 Program), and CSIC (JAE-Doc Program and Fondo Social Europeo), respectively. We are grateful to farmers, veterinaries and slaughterhouse workers enrolled in this work for its valuable support and to temporal students Naroa Remondegui (meritorious), June Landa (JAE-Intro CSIC-FEDER fellowship), Ruth Erro and Mirian Samblas (meritorious students of Fundación Empresa Universidad de Navarra-CSIC agreement).

REFERENCES

1. EFSA-ECDC. 2015. The European Union summary report on trends and sources of zoonoses, zoonotic agents and food-borne outbreaks in 2013. EFSA J 13:1-312.
2. DOUE. 2003. Regulation (EC) No 2160/2003 of the European Parliament and of the council on the control of *Salmonella* and other species food-borne zoonotic agents. Official J Eur Union.
3. MARM. 2012. El sector de la carne de cerdo en cifras: Principales indicadores económicos en 2011. In: Subdirección General de Productos Ganaderos (ed.). <http://www.eurocarne.com/informes/pdf/indicadores-economicos-carnede-ce76.pdf>.
4. 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. Part A. EFSA J 135:1-111.
5. EFSA. 2009. Analysis of the baseline survey on the prevalence of *Salmonella* in holdings with breeding pigs in the EU, 2008. Part A: *Salmonella* prevalence estimates. EFSA J 7:93 pp.
6. ISO. 2007. International Organisation for Standardisation. ISO 6579:2002/DAM 1:2007. Microbiology of Food and Animal Feeding Stuffs. Horizontal Method for the Detection of *Salmonella* spp. Annex D: Detection of *Salmonella* spp. in Animal Faeces and in Samples from the Primary Production Stage. Geneve, Switzerland.
7. EFSA. 2006. Opinion of the scientific panel on biological hazards on “Risk assessment and mitigation options of *Salmonella* in pig production”. EFSA J 341:1-131.
8. Merle R., Kusters S., May T., Portscht U., Blaha T., Kreienbrock L. 2011. Serological *Salmonella* monitoring in German pig herds: results of the years 2003-2008. Prev Vet Med 99:229-233.
9. Meroc E., Strubbe M., Vangroenweghe F., Czaplicki G., Vermeersch K., Hooyberghs J., Van der Stede Y. 2012. Evaluation of the *Salmonella* surveillance program in Belgian pig farms. Prev Vet Med 105:309-314.

10. Mousing J., Jensen P.T., Halgaard C., Bager F., Feld N., Nielsen B., Nielsen J.P., Bech-Nielsen S. 1997. Nation-wide *Salmonella enterica* surveillance and control in Danish slaughter swine herds. *Prev Vet Med* 29:247-261.
11. Vico J.P., Engel B., Buist W.G., Mainar-Jaime R.C. 2010. Evaluation of three commercial enzyme-linked immunosorbent assays for the detection of antibodies against *Salmonella* spp. in meat juice from finishing pigs in Spain. *Zoonoses Public Health* 57 Suppl 1:107-114.
12. Martin S.W., Meek A.H., Willeberg P. 1987. Sampling methods. In: A. Iowa State University Press (ed.), *Veterinary epidemiology: principles and methods*.
13. San Román B., Sánchez S., Garrido V., Grilló M.J. 2015. Relationship between *Salmonella* infection and shedding in paired samples from fattening pigs of a low salmonellosis prevalence region of Spain. *Appl Environ Microbiol* (under review).
14. 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 Prot* 74:1070-1078.
15. Grimont P.A., Weill F.X. 2007. Antigenic formulae of the *Salmonella* serovars. In: I. P. a. WHO. (ed.). *Institute Pasteur and World Health Organization. Collaboration Centre for Reference Research on Salmonella*.
16. EFSA. 2010. Scientific opinion on a quantitative microbiological risk assessment of *Salmonella* in slaughter and breeding pigs. *EFSA J* 8:1547.
17. Echeita M.A., Aladuenza A.M., Diez R., Arroyo M., Cerdan F., Gutierrez R., de la Fuente M., Gonzalez-Sanz R., Herrera-Leon S., Usera M.A. 2005. Serotype and phage type distribution of human *Salmonella* strains isolated in Spain, 1997-2001. *Enferm Infecc Microbiol Clin* 23:127-134.
18. Murray P.R., Baron E.J., Jorgensen J.H., Phaller M.A., Tenover F.C. 2003. *Manual of Clinical Microbiology*, p. 1212. ASM, Press, Washington, D.C.
19. DOUE. 2007. Commission Decision of 12 June 2007 on a Harmonised monitoring of antimicrobial resistance in *Salmonella* in poultry and pigs. 2007/407/EC. Official J Eur Union.

20. CLSI. 2006. Performance standards for antimicrobial disk susceptibility tests; Approved Standard M2-A9. Clinical and Laboratory Standards Institute.
21. DOUE. 2006. Commission Decision of 29 September 2006 concerning a financial contribution from the Community towards a baseline survey on the prevalence of *Salmonella* in slaughter pigs to be carried out in the Member States. 2006/668/EC. Official J Eur Union.
22. EFSA. 2011. Analysis of the baseline survey on the prevalence of *Salmonella* in holdings with breeding pigs, in the EU, 2008. Part B: factors associated with *Salmonella* pen positivity EFSA J 9(7):2329.
23. Keteran K., Brown J., Shotts E.B., Jr. 1982. *Salmonella* in the mesenteric lymph nodes of healthy sows and hogs. Am J Vet Res 43:706-707.
24. Meroc E., Strubbe M., Vangroenweghe F., Czaplicki G., Vermeersch K., Hooyberghs J., Van der Stede Y. 2012. Evaluation of the *Salmonella* surveillance program in Belgian pig farms. Prev Vet Med 105:309-314.
25. Vico J.P., Mainar-Jaime R.C. 2011. The use of meat juice or blood serum for the diagnosis of *Salmonella* infection in pigs and its possible implications on *Salmonella* control programs. J Vet Diagn Invest 23:528-531.
26. Scherer K., Szabo I., Rosler U., Appel B., Hensel A., Nockler K. 2008. Time course of infection with *Salmonella* Typhimurium and its influence on fecal shedding, distribution in inner organs, and antibody response in fattening pigs. J Food Prot 71:699-705.
27. Mainar-Jaime R.C., Andrés S., Vico J.P., San Román B., Garrido V., Grilló M.J. 2013. Sensitivity of the ISO 6579:2002/Amd 1:2007 standard method for detection of *Salmonella* spp. on mesenteric lymph nodes from slaughter pigs. J Clin Microbiol 51:89-94.
28. Van Winsen R.L., Van Nes A., Keuzenkamp D., Urlings H.A., Lipman L.J., Biesterveld S., Snijders J.M., Verheijden J.H., van Knapen F. 2001. Monitoring of transmission of *Salmonella enterica* serovars in pigs using bacteriological and serological detection methods. Vet Microbiol 80:267-274.

29. Williams L.P., Jr., Newell K.W. 1967. Patterns of Salmonella excretion in market swine. Am J Public Health Nations Health 57:466-471.
30. Mainar-Jaime R.C., Atashparvar N., Chirino-Trejo M. 2008. Estimation of the diagnostic accuracy of the invA-gene-based PCR technique and a bacteriological culture for the detection of *Salmonella* spp. in caecal content from slaughtered pigs using Bayesian analysis. Zoonoses Public Health 55:112-118.
31. Wales A., Weaver J., McLaren I.M., Smith R.P., Mueller-Doblies D., Davies R.H. 2013. Investigation of the Distribution of *Salmonella* within an Integrated Pig Breeding and Production Organisation in the United Kingdom. ISRN Vet Sci 2013:943126.
32. Mejía 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 159:271-276.
33. ECDC. 2013. Surveillance of antimicrobial consumption in Europe, 2010. Stockholm.
34. EMA E.M.A. 2012. ESVAC reflection paper on collecting data on consumption of antimicrobial agents per animal species, on technical units of measurement and indicators for reporting consumption of antimicrobial agents in animals EMA/286416/2012-Consultation.
35. EFSA-ECDC. 2012. European Union Summary Report Antimicrobial resistance in zoonotic and indicator bacteria from humans, animals and food in the European Union in 2010. EFSA J 10:233.
36. EFSA-ECDC. 2013. The European Union summary report on antimicrobial resistance in zoonotic and indicator bacteria from humans, animals and food in 2011. EFSA J 11 (5): 3196, 359 pp.
37. Davies P.R., Funk J.A., Morrow W.E.M. 2000. Fecal shedding of *Salmonella* by gilts before and after introduction to a swine breeding farm. Swine Health Prod 8:25-29.

CHAPTER 3

Simultaneous infections by different Salmonella strains in mesenteric lymph nodes of finishing pigs

This chapter has been published as: Garrido V., Sánchez S., San Román B., Zabalza-Baranguá A., Díaz-Tendero Y., de Frutos C., Mainar-Jaime R.C., Grilló M.J. 2014. Simultaneous infections by different *Salmonella* strains in mesenteric lymph nodes of finishing pigs. BMC Veterinary Research 10:59.

ABSTRACT

Background: Salmonellosis is a major worldwide zoonosis, and *Salmonella*-infected finishing pigs are considered one of the major sources of human infections in developed countries. Baseline studies on salmonellosis prevalence in fattening pigs in Europe are based on direct pathogen isolation from mesenteric lymph nodes (MLN). This procedure is considered the most reliable for diagnosing salmonellosis in apparently healthy pigs. The presence of simultaneous infections by different *Salmonella* strains in the same animal has never been reported and could have important epidemiological implications.

Results: Fourteen finishing pigs belonging to 14 farms that showed high salmonellosis prevalence and a variety of circulating *Salmonella* strains, were found infected by *Salmonella* spp., and 7 of them were simultaneously infected with strains of 2 or 3 different serotypes. Typhimurium isolates showing resistance to several antimicrobials and carrying mobile integrons were the most frequently identified in the colonized MLN. Four animals were found infected by *Salmonella* spp. of a single serotype (Rissen or Derby) but showing 2 or 3 different antimicrobial resistance profiles, without evidence of mobile genetic element exchange *in vivo*.

Conclusion: This is the first report clearly demonstrating that pigs naturally infected by *Salmonella* may harbour different strains simultaneously. This may have implications in the interpretation of results from baseline studies, and also help to better understand human salmonellosis outbreaks and the horizontal transmission of antimicrobial resistance genes.

Keywords: *Salmonella*, multiple infections, pigs, serotypes, antimicrobial resistance.

BACKGROUND

Acute gastroenteritis caused by *Salmonella* spp. represents a Public Health concern because of its high welfare and socio-economical impact in developed countries (1, 2). In the USA, salmonellosis is the main cause of foodborne illness with 1,027,561 human cases of non-typhoidal salmonellosis in 2011, of which a total of 19,336 (1.9%) required hospitalization and 378 (1.95%) had a fatal outcome (1). In the European Union (EU), salmonellosis is, after campylobacteriosis, the most common zoonosis, registering a total of 95,548 human cases in 2011 (3).

Besides laying hens and poultry, asymptotically *Salmonella*-infected pigs are a major source of human salmonellosis (4-6), by intermittently shedding the pathogen in their faeces and thus contaminating pork and products thereof. However, faecal excretion is not necessarily indicative of a true infection of the animal. In fact, after being ingested, *Salmonella* may be present in faecal samples and pass through the pig gut lumen without invading the enterocytes. To cause active infection, *Salmonellae* should invade the enterocyte barrier and reach the local lymphoid system (7). Accordingly, the proper diagnosis of this infection in pigs requires the identification of this pathogen in the mesenteric lymph nodes (MLN). Thus, EU reference studies in finishing pigs have been based on the detection of *Salmonella* spp. in MLN at slaughter.

Pigs are considered susceptible to most of *Salmonella* serotypes and, although Typhimurium is the most common, a large variety of other serotypes are also reported in surveillance studies at farm level (5-8). However, the presence of multiple infections in MLN of a single animal, although suggested, has never been confirmed.

An additional challenge for human health is the emergence of multi-antimicrobial resistant (AR) *Salmonella* strains and the subsequent spread of the AR clones (9). Pigs and other domestic species are recognized as a primary reservoir of multi-AR bacteria, usually associated with the selective pressure exerted by antimicrobial treatments (10). The emergence and spread of multi-AR *Salmonella* are often related to both the acquisition and the fixation of bacterial mobile genetic elements such as plasmids, transposons or integrons (11). Five classes of integrons carrying antibiotic resistance gene cassettes have been reported so far (12). Class 1 Integrons (IC1) are the most prevalent in the *Enterobacteriaceae* family, containing different AR gene cassettes (e.g. *pse1* and *aadA2*, characteristic of Typhimurium phage-type DT104) that can be located either extrachromosomally or integrated in the *Salmonella* Genomic Island

1 (SGI1) (13). Coexistence in the same animal of *Salmonella* strains showing different AR genes has been postulated to support the horizontal AR genetic exchange.

The aim of the present study was to ascertain whether different *Salmonella* serotypes and/or strains can be simultaneously isolated from the same animal.

METHODS

Experimental design, *Salmonella* spp. isolation and serotyping

A total of 14 fattening pig farms identified previously (8) with high herd *Salmonella*-prevalence and showing multiple circulating strain types (serotypes and/or AR profiles) were selected for this study. One pig from each farm was randomly selected at the slaughter line in the abattoir. Animal handling and slaughtering procedures were performed according to the current national legislation (Law 32/2007, for animal care on holdings, transportation, testing and slaughtering). The whole intestinal package was removed from the selected carcasses at the evisceration point of the slaughter line, and MLN samples (25 grams from at least 5 MLN) were collected in a sterile plastic bag (Stomacher[®] 80, Seward Medical), transported at 4°C to the laboratory and immediately processed for *Salmonella* isolation. Isolation procedures were performed according to ISO 6579:2002/Amd 1:2007 rules (14), as described previously (8). After selective growth (37°C, 24 h) on Xylose Lysine Deoxycholate Agar (XLD) and Brilliant Green Agar (BGA) plates, 10 presumptive *Salmonella* spp. colonies from each MLN sample were transferred from selective plates to agar, then tested biochemically (triple sugar iron, urease agar, indole reaction and L-lysine decarboxylation tests) and further confirmed by serotyping at the National Reference Laboratory Centre for Animal Salmonellosis (Madrid, Spain), following the Kauffmann-White Scheme (15).

Antimicrobial resistance

A total of 140 *Salmonella* colonies were tested by the Kirby-Bauer disk diffusion method (16) using the antimicrobials and concentrations recommended by the current EU legislation for harmonized monitoring of antimicrobial resistance of *Salmonella* in poultry and pigs (17), namely, Ampicillin and Amoxicillin plus Clavulanic acid (A), Chloramphenicol (C), Streptomycin (S), Gentamicin, Sulfisoxazole and Trimethoprim plus Sulfamethoxazole (Su), Tetracycline (T), Nalidixic acid (Nx), Enrofloxacin, and Cefotaxime (BD Diagnostics). *E. coli* strain ATCC 25922, and serovar Typhimurium strains ATCC 14028 and DT104 were used as controls. Antimicrobial

susceptibility was determined by measuring the inhibition halo generated after incubation (37°C, 24 h). Strains were classified as resistant or susceptible, according to the Clinical and Laboratory Standard Institute (CLSI) recommendations (18).

The presence of IC1 was analysed by PCR using the primers 5'CS-3'CS described previously (19), and the resulting amplicons were purified with a commercial kit (ATP), cloned in pGEM®-T (Promega), and then sequenced (Secugen). DNA sequences were analysed by ExPASy protein translation (SIB Bioinformatics Resource Portal) followed by Protein Basic Local Alignment Search Tool (BLASTP, NCBI) analysis. The presence of SGI1 was also determined by PCR using U7-L12 and Lj-R1 primers specific for SGI1 left junction amplification (13).

Pulsed-Field Gel Electrophoresis

To identify simultaneous infections by different *Salmonella* strains in a pig, the strains isolated from each animal showing identical phenotypic (i.e. serotype and AR) and AR genotypic (i.e. IC1 and SGI1) characteristics, were analysed by Pulsed-Field Gel Electrophoresis (PFGE), following the Pulse-Net protocol described by the Centre for Disease Control and Prevention (20). Briefly, the agarose plugs containing DNA were digested with 30 U XbaI (New England Biolabs). DNA fragments were separated (14°C, 18 h, 200 V) in 1% agarose gels with 0.5X Tris borate EDTA buffer, using a Cheff-DR II System (BioRad), and DNA was stained with 5% aqueous ethidium bromide solution. Lambda Ladder (BioRad) was used as molecular weight marker, and the DNA obtained from serotype Braenderup was used as control. *Salmonella* strains showing less than 95% PFGE profile similarity were considered as different.

RESULTS

Eight different serotypes were identified among the 140 *Salmonella* strains obtained. As shown in Table 14, serotypes Typhimurium, Rissen, Derby, and Kapemba were the most frequently isolated (46, 31, 20, and 16 strains, respectively) and widely distributed (in 8, 4, 2, and 3 animals, respectively). Fifty per cent of the pigs analysed (codes 1-7, Table 14) were found infected simultaneously by different *Salmonella* strains, since 2 or 3 different serotypes were identified in each pig. Typhimurium was the serotype most frequently isolated (6 out of 7) in these pigs. Interestingly, serovar Kapemba was always found simultaneously with Typhimurium. The remaining 7 pigs were found infected with a single serotype.

Regarding phenotypic AR characteristics, pigs were infected with at least one multi-AR strain, and a total of 12 different AR profiles were identified (Table 14). The AR profile most frequently identified (46 strains) was ACSSuT, with or without additional resistance to Nx (Table 14). Genotypically, strains showing 3 types of IC1 were identified in 12 pigs (85.7%), showing amplicons of either 1000 bp (21 strains from 4 pigs), 2000 bp (64 strains from 9 pigs), or a double band of 1000 bp and 1200 bp each (18 strains from 2 pigs) (Table 14). These IC1 were absent in the 4 strains found susceptible to all antimicrobials as well as in the other 33 strains showing AR to one (aminopenicillins or tetracyclines) or several (SSu, SSuT or ACST) agents.

Amplicon sequencing allowed the identification of IC1 carrying 4 different AR gene cassettes: (i) *bla_{oxa30}-aadA1* contained in 2000 bp amplicons of Typhimurium strains; (ii) *drfA12-aadA2* contained in 2000 bp amplicons of Goldcoast, Rissen and Bredeney; (iii) *aadA1* contained in 1000 bp amplicons of Kapemba and Derby; and (iv) *aadA2-pse1* contained in 1000 plus 1200 bp amplicons (Table 14). This latter IC1 was found only in Typhimurium strains, and associated with both the ACSSuT penta-AR profile and the presence of SGI1. Accordingly, these strains showed the characteristics of the DT104 phage-type. The remaining 28 Typhimurium strains (from 6 pigs) also showed the ACSSuT penta-AR profile but only the 2000 bp *bla_{oxa30}-aadA1* IC1 amplicon not associated with SGI1 was amplified (Table 14). Similarly, the 16 Kapemba strains (found in 3 pigs) were resistant to CSSuT and carried a single 1000 bp IC1 containing the *aadA1* AR gene (animal codes 1-3, Table 14). Interestingly, in 4 out of the 7 pigs infected with an unique *Salmonella* serotype (animal codes 8-11, Table 1), 2 or 3 different AR profiles were identified, regardless of the presence/absence and size/sequence of IC1 amplicons. This clearly indicates also the presence of different *Salmonella* strains infecting the same animal.

The remaining 3 pigs (animal codes 12-14, Table 14) were infected by a unique and homogeneous *Salmonella* strain, as confirmed by PFGE. Overall, 11 out of the 14 pigs studied were infected simultaneously by at least 2 different *Salmonella* strains.

Table 14. Serotypes and antimicrobial resistance (AR) patterns of *Salmonella* strains isolated from fattening pig MLN^a.

Animal	Serotypes	AR profile ^b	Class 1 Integron size/genes ^c	Total No. of strains
1	Typhimurium (4); Kapemba (6)	ACSSuTNx (4); CSSuT (6)	2000 bp/ <i>bla_{oxa}30-aadA1</i> (4); 1000 bp/ <i>aadA1</i> (6)	2
2	Typhimurium (8); Kapemba (2)	ACSSuT (8); CSSuT (2)	2000 bp/ <i>bla_{oxa}30-aadA1</i> (8); 1000 bp/ <i>aadA1</i> (2)	2
3	Typhimurium (1); Kapemba (8); subsp. <i>arizonae</i> 48: z4,z23 :- (1)	ACSSuT (1); CSSuT (8); Susceptible (1)	2000 bp/ <i>bla_{oxa}30-aadA1</i> (1); 1000 bp/ <i>aadA1</i> (8); None (1)	3
4	Typhimurium (2); subsp. <i>enterica</i> 6,7:-:1,5 ^d (8)	ACSSuT (2); SSu (8)	2000 bp/ <i>bla_{oxa}30-aadA1</i> (2); None (8)	2
5	Typhimurium (3); Goldcoast (7)	ACSSuT (3); ACST (7)	2000 bp/ <i>bla_{oxa}30-aadA1</i> (3); 2000 bp/ <i>drfA12-aadA2</i> (7)	2
6	Typhimurium (8); Rissen (2)	ACSSuT (8); T (2)	1000+1200 bp/ <i>aadA2-pse1</i> (8) ^e ; None (2)	2
7	Rissen (9); subsp. <i>arizonae</i> 48:z4,z23:- (1)	ASSu (9); Susceptible (1)	2000 bp/ <i>drfA12-aadA2</i> (9); None (1)	2
8	Rissen (10)	ACST (3); A (5); Susceptible (2)	None (10)	3
9	Rissen (10)	ASSu (5); SSu (5)	2000 bp/ <i>drfA12-aadA2</i> (10)	2
10	Derby (10)	SSuT (8); T (2)	None (10)	2
11	Derby (10)	SuT (5); T (5)	1000 bp/ <i>aadA1</i> (5); none (5)	2
12	Typhimurium (10)	ACSSuTNx (10)	1000+1200 bp/ <i>aadA2-pse1</i> (10) ^e	1
13	Typhimurium (10)	ACSSuT (10)	2000 bp/ <i>bla_{oxa}30-aadA1</i> (10)	1
14	Bredeney (10)	SuTNx (10)	2000 bp/ <i>drfA12-aadA2</i> (10)	1
Total	8 (140)	12	3 amplicon size/ 4 IC1 types	NA

^a A total of 140 CFU (10 CFU/pig) isolated in selective BGA or XLD media were purified in agar and characterized; ^b Antimicrobial agents showing AR strains: (A) ampicillin and/or amoxicillin-clavulanic acid; (C) chloramphenicol; (S) streptomycin and/or gentamicin; (Su) sulfonamides and/or trimethoprim-sulphometoxazole; (T) tetracycline and/or doxycycline; (Nx) nalidixic acid; ^c Genes identified by IC1 amplicons sequencing; ^d Flagellar antigen phase 2 was not detected; ^e SGI1 was detected; NA: not applicable.

DISCUSSION

To the best of our knowledge, this is the first report in pigs demonstrating that the same animal may be naturally infected by multiple *Salmonella* strains. For this, a thorough microbiological analysis of MLN was carried out in a limited number of animals belonging to farms with high salmonellosis prevalence and where multiple circulating *Salmonella* strain types were previously identified. Although it was not the objective of this study, our results suggest that *Salmonella* co-infections may be quite common in pig herds with multiple *Salmonella* circulating strains.

The existence of multiple infections in the same animal suggests that pigs can be either infected simultaneously during a brief period either through one or multiple sources (i.e. food, water, environment, etc.) or re-infected along the different stages of their productive life (i.e. post-weaning, growing and finishing periods). The possibility of reinfection has been previously proposed in sows from which different *Salmonella* serotypes were isolated from faecal samples collected at different time points (21). Nevertheless, the presence of the pathogen in faeces does not necessarily mean an active infection, as *Salmonella* can circulate passively through the animal's gut lumen. Faecal culture results should be interpreted with caution since these samples can also be easily cross-contaminated during collection. In our study, however, the presence of *Salmonella* in MLN would reflect a true infection. In the present study, the possibility of MLN cross-contamination was very limited because (i) sampling was performed at different dates; (ii) we used single-use gloves and clothes, liquid disinfectant (DD445, A&B Laboratorios de Biotecnología) and sterilized instruments each time; (iii) MLN samples were individually collected in sterile plastic bags; and (iv) once in the laboratory, MLN samples were defatted and externally decontaminated through alcohol immersion and flaming, as recommended by the ISO method (8). Thus, our results demonstrate the presence of active multiple infections as different *Salmonella* strains were isolated from MLN tissue, which could be colonised only after active enterocyte invasion (5).

Typhimurium and Rissen were the most prevalent *Salmonella* serotypes identified, which is in agreement with the findings of a large study performed previously in the same pig population (8). It is worth to note that Kapemba was also found in a relative high frequency (11.4%) but always accompanied by Typhimurium. In contrast, Kapemba was rarely isolated at both individual (1.8%) and herd (3.7%) levels in the previous large study (8), and also in the baseline study carried out in the EU (5). Such differences could be due to the different identification

strategy used in these studies, since serotyping was performed exclusively on one colony from each animal in these large-scale studies.

For epidemiological purposes, the international standards recommend confirming the presence of *Salmonella* by typing one (up to 5) colony per sample (14). Although this microbiological approach may be useful to confirm infection, it could easily overlook the presence of the less predominant strains, since the more prevalent ones appear to be always present in MLN co-infections (Table 14). Therefore, epidemiological studies based on the serotyping of a single bacterial colony, such as those focused on the eradication of specific serotypes (i.e. national control programmes against major zoonotic *Salmonella* serotypes) may be over-representing the prevalent strains and underestimating other potentially pathogenic but less predominant serotypes. Likewise, outbreak investigations would require the analysis of several colonies from the same animal to identify the main source of infection. Systematic screening of multiple colonies from individual pig samples could contribute to the trace back of many *Salmonella* outbreaks origin in humans (22).

The coexistence of *Salmonella* strains with different multi-AR profiles within the same pig as primary reservoir may have important epidemiological consequences. This can promote exchange and propagation of mobile genetic elements between bacterial strains that share the same biological niche *in vivo*. In this study, co-infections by *Salmonella* strains showing different AR profiles were relatively frequent, regardless of the serotype. In fact, most of animals studied (11 out of 14) were simultaneously infected by strains showing 2 or 3 different AR profiles. The finding that pigs with co-infections showed different AR profiles against common antimicrobial agents suggested that genetic exchange could be taking place within the same animal, generating a genetic variability in *Salmonella*. Horizontal transfer of AR genes or IC1 was not observed in three animals (animal codes 3, 7 and 8, Table 14) harbouring both susceptible and multi-AR strains, but genetic exchanges could not be excluded in these animals (23).

SGI1 was detected only in Typhimurium strains from two animals (animal codes 6 and 12, Table 1) containing also the characteristic IC1 1000-1200 bp double band with the double *aadA2-pse1* gene cassette, and the typical penta-AR (ACCSuT or ACSSuTNx) of DT104 phagetype (13). The widespread dissemination of Typhimurium DT104 clone was particularly relevant since it was first isolated in the early 80's in UK cattle and subsequently reported worldwide in a wide variety of animal species including pigs, animal foodstuff, and humans

(24, 25). Similarly, other emergent variants, such as the monophasic variant of Typhimurium DT193 phagetype carrying the multi-AR ASSuT (26) have been detected, and epidemiological surveillance is therefore recommended (27).

IC1 genotypes are the most frequent carriers of AR genes in *Salmonellae*, but these genes could also be present in other integrons (28, 29). In fact, IC1 was not detected in some strains resistant to one (aminopenicillins or tetracycline) or more (SSu, SSuT or ACST) antimicrobial agents. However, a quick detection of AR strains is critical for a successful treatment in human beings. Thus, the IC1 PCR analysis of several *Salmonella* colonies from a *Salmonella* positive sample should be considered as a suitable (quick, easy, low cost, and effective) screening approach for detecting multi-AR genetic mobile elements.

The presence of simultaneous infections by *Salmonella* strains of different serotype, serogroup and AR profiles could also have immunological implications on the host-pathogen interaction. Thus, if infections occur over time, our results may suggest a limited genus-, serogroup- and species- specific protection of pigs after a primary *Salmonella* infection, but further studies are needed for a better understanding of the host-pathogen interactions. The existence of co-infections in a single animal and within the same herd may assist in the development of effective vaccines, therapeutics and control programmes against pig salmonellosis.

CONCLUSIONS

This study demonstrates the presence of simultaneous infections by different *Salmonella* strains in asymptomatic pigs. Systematic screening for multiple strains from individual MLN samples is a time-consuming strategy not routinely applied in laboratory protocols but essential to understanding both the pathogenesis and epidemiology of *Salmonella* infections in pigs. It may also be useful to trace back the origin of salmonellosis outbreaks in humans. Further studies in larger pig populations should be carried out to confirm that *Salmonella* co-infections are a common event in swine.

REFERENCES

1. Davies P.R., Scott Hurd H., Funk J.A., Fedorka-Cray P.J., Jones F.T. 2004. The role of contaminated feed in the epidemiology and control of *Salmonella* enterica in pork production. Foodborne Pathog Dis 1:202-215.
2. EFSA. 2010. The Community summary report on trends and sources of zoonoses. Zoonotic agents and food-borne outbreaks in European Union in 2008. EFSA J 1496:19-102.
3. EFSA-ECDC. 2013. The European Union summary report on trends and sources of zoonoses, zoonotic agents and foodborne outbreaks in 2011. EFSA J 11:3196.
4. Pires S.M., de Knecht L., Hald T. 2011. Estimation of the relative contribution of different food and animal sources to human *Salmonella* infections in the European Union. Scientific/Technical Report submitted to EFSA, EFSA J.
5. 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. Part A. EFSA J 135:1-111.
6. Mandilara G., Lambiri M., Polemis M., Passiotou M., Vatopoulos A. 2013. Phenotypic and molecular characterisation of multiresistant monophasic *Salmonella* Typhimurium (1,4, [5], 12:i:-) in Greece, 2006 to 2011. Euro Surveill 18:20496.
7. Berends B.R., Urlings H.A., Snijders J.M., Van Knapen F. 1996. Identification and quantification of risk factors in animal management and transport regarding *Salmonella* spp. in pigs. Int J Food Microbiol 30:37-53.
8. 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 Prot 74:1070-1078.
9. Van Duinkerken E., Wannet W.J., Houwers D.J., van Pelt W. 2003. Antimicrobial susceptibilities of *Salmonella* strains isolated from humans, cattle, pigs, and chickens in the Netherlands from 1984 to 2001. J Clin Microbiol 41:3574-3578.

10. Wedel S.D., Bender J.B., Leano F.T., Boxrud D.J., Hedberg C., Smith K.E. 2005. Antimicrobial-drug susceptibility of human and animal *Salmonella* Typhimurium, Minnesota, 1997-2003. *Emerg Infect Dis* 11:1899-1906.
11. Carattoli A. 2001. Importance of integrons in the diffusion of resistance. *Vet Res* 32:243-259.
12. Collis C.M., Kim M.J., Partridge S.R., Stokes H.W., Hall R.M. 2002. Characterization of the Class 3 integron and the site-specific recombination system it determines. *J Bacteriol* 184:3017-3026.
13. Boyd D.A., Peters G.A., Ng L., Mulvey M.R. 2000. Partial characterization of a genomic island associated with the multidrug resistance region of *Salmonella enterica* Typhimurium DT104. *FEMS Microbiol Lett* 189:285-291.
14. ISO. 2007. International Organisation for Standardisation 6579:2002/DAM 1:2007. Microbiology of Food and Animal Feeding Stuffs. Horizontal Method for the Detection of *Salmonella* spp. Annex D: Detection of *Salmonella* spp. in Animal Faeces and in Samples from the Primary Production Stage. Geneva, Switzerland.
15. Grimont P.A., Weill F.X. 2007. Antigenic formulae of the *Salmonella* serovars. Institute Pasteur and World Health Organization.
16. Murray P.R., Baron E.J., Jorgensen J.H., Tenover F.C., Tenover P.C. 2003. Manual of Clinical Microbiology. ASM, Press, Washington, D.C.
17. DOUE. 2007. Commission Decision of 12 June 2007 on a Harmonised monitoring of antimicrobial resistance in *Salmonella* in poultry and pigs. 2007/407/EC. Official J Eur Union, Brussels, Belgium.
18. CLSI. 2005. Approved standard M2-A7 in performance standards for antimicrobial disk susceptibility tests. Wayne, Pa, USA.
19. Levesque C., Piche L., Larose C., Roy P.H. 1995. PCR mapping of integrons reveals several novel combinations of resistance genes. *Antimicrob Agents Chemother* 39:185-191.
20. Ribot E.M., Fair M.A., Gautom R., Cameron D.N., Hunter S.B., Swaminathan B., Barrett T.J. 2006. Standardization of pulsed-field gel electrophoresis protocols for

the subtyping of *Escherichia coli* O157:H7, *Salmonella*, and *Shigella* for PulseNet. Foodborne Pathog Dis 3:59-67.

21. Nollet N., Houf K., Dewulf J., De Kruijff A., De Zutter L., Maes D. 2005. *Salmonella* in sows: a longitudinal study in farrow-to-finish pig herds. Vet Res 36:645-656.
22. CDC. 2010. Multiple-serotype *Salmonella* gastroenteritis outbreak after a reception Connecticut, 2009, MMWR Morb Mortal Wkly Rep 59:1093-1097.
23. Brewer M.T., Xiong N., Anderson K.L., Carlson S.A. 2013. Effects of subtherapeutic concentrations of antimicrobials on gene acquisition events in *Yersinia*, *Proteus*, *Shigella*, and *Salmonella* recipient organisms in isolated ligated intestinal loops of swine. Am J Vet Res 74:1078-1083.
24. Besser T.E., Goldoft M., Pritchett L.C., Khakhria R., Hancock D.D., Rice D.H., Gay J.M., Johnson W., Gay C.C. 2000. Multiresistant *Salmonella* Typhimurium DT104 infections of humans and domestic animals in the Pacific Northwest of the United States. Epidemiol Infect 124:193-200.
25. Helms M., Ethelberg S., Molbak K. 2005. International *Salmonella* Typhimurium DT104 infections, 1992-2001. Emerg Infect Dis 11:859-867.
26. Antunes P., Mourao J., Pestana N., Peixe L. 2011. Leakage of emerging clinically relevant multidrug-resistant *Salmonella* clones from pig farms. J Antimicrob Chemother 66:2028-2032.
27. EFSA. 2009. Analysis of the baseline survey on the prevalence of *Salmonella* in holdings with breeding pigs in the EU, 2008. Part A: *Salmonella* prevalence estimates. EFSA J 7:93 pp.
28. Carattoli A., Bertini A., Villa L., Falbo V., Hopkins K.L., Threlfall E.J. 2005. Identification of plasmids by PCR-based replicon typing. J Microbiol Methods 63:219-228.
29. Guerra B., Junker E., Miko A., Helmuth R., Mendoza M.C. 2004. Characterization and localization of drug resistance determinants in multidrug-resistant, integron-carrying *Salmonella enterica* serotype Typhimurium strains. Microb Drug Resist 10:83-91.

DISCUSIÓN GENERAL

DISCUSIÓN GENERAL

Tras el control de la salmonelosis en aves y sus productos derivados, la salmonelosis porcina está siendo objeto de control exhaustivo en la UE. Para ello, se ha partido de un estudio de referencia con idéntica metodología en todos los Estados Miembros que tiene como finalidad comparar la situación epidemiológica y sanitaria en los diferentes países del entorno europeo. Como resultado, España ha resultado ser el país con mayor prevalencia de salmonelosis porcina de toda la UE. Sin embargo, los resultados obtenidos deben considerarse un reflejo de la situación existente en las principales regiones productoras de porcino de nuestro país (i.e. Cataluña y Aragón) pero no de la existente en otras CC.AA. con relativamente menor producción porcina, como Navarra, puesto que el número de muestras analizadas fue proporcional a la producción porcina de cada país y región (1, 2). En efecto, así lo indicó el estudio realizado durante los años 2008 y 2009 en GLM de porcino de engorde de Aragón, mostrando en esa CC.AA. una prevalencia (3) similar a la media reportada por España a la UE (4) (Tabla 9). Por el contrario, en Navarra no existía información específica a este respecto y, puesto que las características productivas propias no justificaban asumir los elevados niveles de prevalencia de las CC.AA. vecinas, uno de los objetivos de esta Tesis Doctoral fue determinar la prevalencia y epidemiología de la salmonelosis porcina en Navarra. Así, utilizando idéntica metodología que los estudios de referencia, en esta Tesis se ha comprobado que tanto el porcino de engorde (Capítulo 1) como las cerdas reproductoras (Capítulo 2) de producción intensiva de la C.F. presentaban una baja presencia de *Salmonella*, tanto en MLN como en heces. En comparación con el entorno europeo, como se resume en la Tabla 15, el porcino intensivo de Navarra presentó niveles de salmonelosis muy inferiores a la media española y a la europea (4, 5), situándose al nivel de países como Dinamarca y Austria (ver Figura 6, en apartado Introducción). Esta situación tiene gran trascendencia para la economía regional, debido a la importancia del sector porcino en la producción agraria local y al carácter exportador de Navarra (ver apartado Introducción), así como para el sector porcino español en el contexto europeo, puesto que España es el segundo mayor productor de porcino de la UE.

Merece la pena destacar el escaso número de factores de riesgo asociados a la presencia de *Salmonella*, tanto en el porcino de engorde como en el reproductor (8/78 y 6/69 factores analizados, respectivamente). Este hecho es achacable a la baja prevalencia observada y también al sistema de integración que permite unificar el sistema de manejo de los animales entre explotaciones, permitiendo una producción porcina más homogénea y controlada. Así,

los animales analizados pertenecían a las siete principales integradoras de Navarra, por lo que factores como la calidad del pienso o la atención veterinaria eran poco variables entre las explotaciones analizadas. El tipo de factores de riesgo identificados fue diferente según se tratara de (i) infección en GLM o presencia del patógeno en heces; y de (ii) cerdos de engorde o sus madres. Entre ellos, los factores más relacionados con la infección de los cerdos de engorde fueron la época del año en que se habían sacrificado (con mayor prevalencia en invierno) y la inexistencia de duchas y vestuarios para los trabajadores; mientras que la presencia del patógeno en la heces de estos animales estaba relacionada con el control sanitario del agua de bebida y distintos aspectos del pienso administrado. En el caso de las cerdas reproductoras, la ausencia de reformas en las instalaciones con las consiguientes dificultades para la correcta limpieza y desinfección y la reposición con hembras externas a la granja fueron los principales factores asociados a la salmonelosis. Estos y otros factores de riesgo identificados en cada caso, como por ejemplo, la administración de comida en gránulos en lugar de harina fina, el control permanente de roedores o un frecuente análisis del agua de bebida de los animales, son aspectos fácilmente modificables que permitirían al ganadero mejorar el nivel de prevalencia de *Salmonella* hasta alcanzar valores de ausencia o muy baja (menor del 3%) prevalencia del patógeno, como los indicados por países como Finlandia o Suecia (4, 5).

Tabla 15. Análisis comparativo de los resultados obtenidos en los estudios de referencia de la UE (4, 5), en un trabajo con idéntica metodología realizado en Aragón (3) y en esta Tesis, utilizando muestras de MLN y/o heces de porcino de engorde y reproductor.

Tipo de ganado porcino	Tipo de muestra	Prevalencia (%) de <i>Salmonella</i> spp.			
		Europa	España	Aragón	Navarra
Engorde	MLN	10,3%	29%	31,3%	7,3%
	Heces	33,3%	53,1%	ND	8,4% ^a
Reproductor	MLN	ND	ND	ND	6,1%
	Heces	28,7%	64%	ND	5,5% ^a /10,8%**

^a valor calculado a partir de muestras de heces procesadas individualmente (las demás muestras de heces se analizaron a partir de mezclas de heces); ND: valor no determinado; Comparación estadística de la prevalencia en Navarra: * $p < 0,0001$ vs. España-Aragón y $p = 0,008$ vs. UE; ** $p < 0,0001$ vs. UE-España-Aragón.

En definitiva, los resultados de prevalencia obtenidos en el contexto de esta Tesis Doctoral indican que la situación epidemiológica del ganado porcino en la CF de Navarra es altamente satisfactoria, permitiendo: (i) ofrecer una producción porcina de calidad; (ii) valorar positivamente la labor de la gestión ganadera realizada, tanto por parte del ganadero como por parte de la administración pública de la región; y (iii) afrontar con garantías las posibles restricciones que finalmente impongan las autoridades sanitarias de la UE. Asimismo, el conocimiento y la modificación de los posibles factores de riesgo (fundamentalmente, los relacionados con la alimentación animal y las condiciones higiénico-sanitarias de las explotaciones) permitirán reducir aún más los niveles de prevalencia de la salmonelosis porcina y, con ello, contribuir al control de esta importante zoonosis en nuestro país y en la UE, ofreciendo una mayor seguridad alimentaria en materia de salmonelosis porcina e incrementando la competitividad de un sector económico tan relevante para nuestro país como es el porcino y sus derivados.

Cabe destacar el carácter novedoso del estudio de prevalencia de *Salmonella* en GLM de cerdas reproductoras. Puesto que la presencia de *Salmonella* en heces puede tener un origen ambiental, su presencia en los GLM es la única demostración inequívoca de la existencia de infección en los animales asintomáticos y su posible papel como reservorios y fuente intermitente del patógeno (6). Sin embargo, debido a la dificultad para muestrear este tipo de animales, tan sólo hemos encontrado un trabajo sobre infección ganglionar en cerdas reproductoras (7), mostrando mucha mayor prevalencia (58,2%) que en nuestro estudio. Sin embargo, esa alta prevalencia puede ser debida al contexto epidemiológico de esos animales (como lo indica la elevada prevalencia -31,3%- de los cerdos de engorde muestreados en paralelo) y también puede estar influenciada por ciertas condiciones experimentales, como el mantenimiento de los animales durante 10 días en los corrales antes del sacrificio. En nuestro estudio, la prevalencia de salmonelosis en cerdas reproductoras fue baja (6,1% de los animales analizados) y similar a la observada en los cerdos de engorde del mismo contexto epidemiológico (7,3%). Además, el análisis del patógeno en GLM y en heces de cerdas de las mismas granjas mostró niveles similares de prevalencia en heces (5,5%), discrepando drásticamente con la elevada seropositividad (41,8%, al *cut-off* del 40% de D.O.) de las muestras de suero obtenidas de los mismos animales que los GLM. Por otra lado, el estudio en GLM permitió observar por primera vez la ausencia de relación entre el tipo de cepas de *Salmonella* que infectan a estos animales (mayoritariamente Typhimurium y Derby) y las existentes en las heces (mayoritariamente London y Derby) en las granjas donde se alojan,

sugiriendo la ingestión pasiva del patógeno y su supervivencia a través del tracto digestivo, con un origen distinto de la infección ganglionar.

En cuanto al tipo de cepas de *Salmonella* existentes en Navarra, la mayoría (81,8%) de las aisladas en GLM de cerdos de engorde eran *S. Typhimurium* o su variante monofásica, en contraste con 49% de cepas de este serotipo aisladas en Aragón (3). Asimismo, *Typhimurium* fue el serotipo predominante en los GLM de las cerdas (43,75%) y en el contenido intestinal de los cerdos de engorde (45,8%) muestreados en matadero. Sin embargo, curiosamente, este serotipo no se aisló en ninguna de las 720 muestras de heces de las reproductoras analizadas en granja, lo que sugiere que la presencia de *Typhimurium* en los cerdos de engorde podría estar relacionado con (i) el estrés del transporte que favorece la excreción del patógeno al contenido intestinal; y (ii) la ingestión del patógeno durante el transporte y espera en matadero. *S. Enteritidis*, frecuentemente asociada a los casos de salmonelosis humana, tan sólo se aisló en los GLM de una pequeña proporción animales (dos de engorde y dos reproductoras), siendo sensibles a todos los antibióticos analizados. Destacó la elevada proporción de cepas aisladas que eran sensibles a todos los antibióticos analizados (el 32,5% del total de las cepas de engorde aisladas y el 42,6% de las de reproductoras). En particular, el 48% de las cepas aisladas en GLM de los cerdos de engorde fueron sensibles a todos los antibióticos, frente al 26,6% de las aisladas en condiciones equivalentes en Aragón (3). El perfil de multi-resistencia antimicrobiana más frecuente fue ACSSuT, con resistencia adicional o no a Quinolonas, asociado al fagotipo DT104 de *S. Typhimurium*.

En el Capítulo 3, demostramos la existencia de infecciones naturales por distintas cepas de *Salmonella* existentes simultáneamente en GLM de cerdos de engorde que llegan a matadero para consumo humano. Este hecho sugiere la necesidad de analizar varias colonias para (i) estudiar en profundidad la patogenia de la infección porcina; (ii) realizar una adecuada vigilancia epidemiológica y control de la expansión de clones emergentes asociados a patrones de multi-AR (como *S. Typhimurium* DT104B portador de la penta-resistencia a ACSSuT y la variante monofásica de *S. Typhimurium* con resistencia a ASSuT); y (iii) conocer nuevos aspectos de la epidemiología de *Salmonella* en ganado porcino y su transmisión al ser humano. Todo ello puede tener implicaciones tanto en la identificación del origen de los brotes de infecciones humanas, como en la transmisión horizontal de elementos genéticos móviles portadores de genes de resistencia y/o virulencia y también para sospechar de la escasa utilidad de las vacunas para proteger frente a infecciones por serotipos no patogénicos para el ganado porcino.

El uso de muestras de heces obtenidas en granja tiene la ventaja de evitar un incremento de la excreción debido al estrés del transporte (8). De acuerdo con esto, los serotipos detectados en GLM y en heces fueron muy diferentes, coincidiendo únicamente en uno de ellos (Derby). El procesado microbiológico individual (25 gramos/animal) y en mezcla (5 gramos/muestra × 5 muestras) de las mismas muestras de heces ha permitido determinar la sensibilidad del cultivo ISO 6579 en ambos tipos de muestras y comparar los resultados obtenidos (Capítulo 2) con los del estudio de referencia de la UE (5). Asimismo, el análisis comparativo entre el procesado de las heces en mezcla (siguiendo las recomendaciones de la UE) y de manera individual (en línea con la metodología aplicada en MLN) aporta un mayor conocimiento acerca de las limitaciones de las técnicas microbiológicas aplicadas. En nuestro caso, el nivel de prevalencia obtenido al procesar las heces individualmente (5,5 %) fue inferior ($p=0,029$) al obtenido al procesarlas en mezcla (10,8%), probablemente debido al diferente número de muestras consideradas en cada caso (600 individuales vs. 120 en mezcla).

Por otra parte, combinando los resultados obtenidos en los Capítulos 1 y 2, no se pudo observar el posible papel de las cerdas reproductoras como vehículo vertical de transmisión de *Salmonella* al ganado de engorde, según se ha sugerido (9), debido a la baja prevalencia general y a las diferentes cepas de *Salmonella* encontradas en ambos tipos de animales de la C.F. de Navarra, si bien la prevalencia de la infección en ambos fue similar (Tabla 9).

La presencia de *Salmonella* en MLN y/o en heces y la detección de anticuerpos anti-*Salmonella* en suero sanguíneo tienen distinto significado biológico y conlleva distintas implicaciones epidemiológicas para el control de la salmonelosis porcina, de acuerdo con lo sugerido en la bibliografía (10). En algunos países, la detección de anticuerpos anti-*Salmonella* ha sido ampliamente recomendada y utilizada como método de control de la salmonelosis porcina, con resultados satisfactorios (2, 11). De hecho, en países con baja o nula prevalencia de salmonelosis porcina los movimientos pecuarios de ganado porcino requieren un análisis serológico previo con resultado seronegativo que garantice la ausencia del patógeno (12). En nuestro estudio se observó una discrepancia evidente entre la serología y la infección o la excreción de *Salmonella* en todos los animales, que fue aún más evidente en los adultos. De hecho, independientemente del *cut-off* considerado, el 100% de las granjas de reproductoras poseían cerdas positivas, mientras que en el 60% de ellas no se detectó ningún animal infectado. En caso de utilizarse este tipo de diagnóstico como base del control de la salmonelosis porcina, la inmensa mayoría de las explotaciones de la C.F. de Navarra serían catalogadas como explotaciones seropositivas, describiendo un panorama epidemiológico

totalmente opuesto al que muestra el diagnóstico microbiológico. Por lo tanto, en el contexto epidemiológico descrito en esta Tesis Doctoral, el uso del diagnóstico serológico como herramienta para el control de la salmonelosis porcina debe ser desaconsejada.

BIBLIOGRAFÍA

1. DOUE. 2003. Regulation (EC) No 2160/2003 of the European Parliament and of the council on the control of *Salmonella* and other species food-borne zoonotic agents. Official J Eur Union.
2. DOUE. 2006. Commission Decision of 29 September 2006 concerning a financial contribution from the Community towards a baseline survey on the prevalence of *Salmonella* in slaughter pigs to be carried out in the Member States. 2006/668/EC. Official J Eur Union.
3. 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 Prot 74:1070-1078.
4. 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. Part A. EFSA J 135:1-111.
5. EFSA. 2009. Analysis of the baseline survey on the prevalence of *Salmonella* in holdings with breeding pigs in the EU, 2008. Part A: *Salmonella* prevalence estimates. EFSA J 7:93 pp.
6. EFSA. 2011. Analysis of the baseline survey of *Salmonella* in holdings with breeding pigs, in the EU, 2008; Part B: Analysis of factors potentially associated with *Salmonella* pen positivity. EFSA J 9:2329.
7. Keteran K., Brown J., Shotts E.B., Jr. 1982. *Salmonella* in the mesenteric lymph nodes of healthy sows and hogs. Am J Vet Res 43:706-707.
8. Williams L.P., Jr., Newell K.W. 1967. Patterns of *Salmonella* excretion in market swine. Am J Public Health Nations Health 57:466-471.
9. Funk J.A., Gebreyes W.A. 2004. Risk factors associated with *Salmonella* prevalence on swine farms. J Swine Health Prod 12:246-251.
10. Nollet N., Maes D., Duchateau L., Hautekiet V., Houf K., Van Hoof J., De Zuttera L., De Kruif A., Geers R. 2005. Discrepancies between the isolation of *Salmonella* from mesenteric lymph nodes and the results of serological screening in slaughter pigs. Vet Res 36:545-555.

11. OIE. 2014. Office International des Épizooties: Manual of Diagnostic Tests & Vaccines for Terrestrial Animals. Available at: <http://www.oie.int/en/manual-of-diagnostic-tests-and-vaccines-for-terrestrial-animals/>.
12. Alban L., Stege H., Dahl J. 2002. The new classification system for slaughter-pig herds in the Danish *Salmonella* surveillance-and-control program. *Prev Vet Med* 53:133-146.

CONCLUSIONES

CONCLUSIONES

1. La prevalencia general de *Salmonella* en ganado porcino de producción intensiva de Navarra fue baja, situándose por debajo de la media europea y muy por debajo de la media aportada por España al estudio de referencia europeo. No obstante, la aplicación de ciertas medidas higiénicas y de manejo identificadas en este trabajo para el control de la salmonelosis porcina, permitiría reducir aún más la prevalencia, haciendo del porcino de Navarra un sector altamente competitivo al nivel nacional e internacional, para la comercialización tanto de canales como de animales de reposición.

2. La prevalencia de *Salmonella* fue similar en muestras de GLM y heces, indicando que ambos tipos de muestras pueden ser de utilidad para definir la prevalencia al nivel colectivo. Sin embargo, otros estudios requerirán la detección individual del patógeno en uno y/u otro tipo de muestra, según el significado biológico y epidemiológico que se persiga, puesto que sólo un pequeño porcentaje de los animales presenta simultáneamente infección en GLM y excreción en heces.

3. El diagnóstico serológico por ELISA mostró una utilidad muy limitada para el diagnóstico y como herramienta de control de la salmonelosis porcina, tanto al nivel individual como de granja, al menos en las condiciones epidemiológicas analizadas. Así, en cerdos de engorde se identificaron granjas con animales infectados y serología negativa y otras, libres de infección detectable que presentaron serología positiva. En el caso de cerdas reproductoras, la seroprevalencia fue mucho mayor que la prevalencia bacteriológica real, sin poder establecerse una correlación entre ambas.

4. *Salmonella* Typhimurium fue el serotipo más frecuente en todos los estudios realizados, a excepción de las heces de cerdas reproductoras, donde no se aisló ninguna cepa con este serotipo, lo que sugiere un origen del patógeno distinto de la infección ganglionar. Además, *S.* Derby se aisló frecuentemente en las heces de todos los animales y también *S.* London en las de cerdas reproductoras. La presencia de *S.* Enteritidis en GLM tanto de cerdos de engorde como de reproductoras, aunque

no se encontró en heces, debe ser controlada como posible causa de brotes de salmonelosis humana de origen porcino.

5. A diferencia de otros trabajos, más de la mitad (53,3%) de las cepas de *Salmonella* aisladas del porcino de Navarra mostraron susceptibilidad a todos los agentes antimicrobianos analizados, marcando una clara diferencia con las principales regiones productoras de España. La otra mitad de las cepas circulantes en los animales de la C.F. presentaron resistencia a algún antibiótico, siendo estreptomycinina y tetraciclina los más frecuentes. El perfil de penta-resistencia ACSSuT típico de *S. Typhimurium* fagotipo DT104, con o sin resistencia adicional a quinolonas naturales, fue el perfil de multi-resistencia más frecuente en todos los casos, estando asociado fundamentalmente, pero no sólo, a dicho fagotipo. Asimismo, cabe destacar el aislamiento de una cepa de *S. Typhimurium* con resistencia a ASSuT-Nx-Cfx, que podría indicar la aparición de cepas de *Salmonella* de origen porcino con elementos genéticos móviles portadores de resistencia a cefalosporinas de tercera generación, siendo el tratamiento de elección en humana, especialmente en niños.

6. La baja prevalencia de salmonelosis en el porcino de Navarra y la escasa coincidencia entre los serotipos excretados por las cerdas y los encontrados en los cerdos de cebo, no permitió identificar al ganado porcino reproductor como fuente de infección activa de *Salmonella* para el ganado de engorde.

7. Se ha demostrado, por primera vez, la existencia de infecciones simultáneas en GLM por cepas de *Salmonella* de distintos serotipos y/o perfiles AR, en cerdos destinados a consumo humano. Esto podría conllevar la aparición de brotes de toxiinfecciones en humanos causados por diversos serotipos y/o cepas con distinta RA.

8. La presencia de cepas de *Salmonella* fenotípicamente iguales en GLM y heces, en animales con serología negativa, sugiere que la ingestión reciente del patógeno (durante el transporte y/o espera en matadero) es tanto o más importante que la excreción intermitente del patógeno desde los GLM hacia las heces, a partir de infecciones subclínicas. En consecuencia, el control de factores higiénico-sanitarios

en el porcino de engorde debe considerarse tanto o más importante que las infecciones subclínicas de estos animales, para el control de esta importante zoonosis.

upna
Universidad
Pública de Navarra
Nafarroako
Unibertsitate Publikoa