



UNIVERSIDAD DE LEÓN
Departamento de Sanidad Animal

TESIS DOCTORAL

**SALMONELOSIS PORCINA EN ESPAÑA:
PREVALENCIA, FACTORES DE RIESGO Y RESISTENCIA
ANTIMICROBIANA**

Carina García Feliz

León, 2011



UNIVERSIDAD DE LEÓN

AUTORIZACIÓN DEL DIRECTOR DE LA TESIS PARA SU PRESENTACIÓN
(Art. 11.3 del R.D. 56/2005)

El Dr. D. Pedro Miguel Rubio Nistal y la Dra. Dña. Ana María Carvajal Urueña como Directores¹ de la Tesis Doctoral titulada “Salmonelosis porcina en España: prevalencia, factores de riesgo y resistencia antimicrobiana” realizada por Dña. Carina García Feliz en el Departamento de Sanidad Animal, informan favorablemente el depósito de la misma, dado que reúne las condiciones necesarias para su defensa.

Lo que firman, para dar cumplimiento al art. 11.3 del R.D. 56/2005, en León a 13 de Diciembre de 2010.

Fdo.: Pedro Miguel Rubio Nistal

Fdo.: Ana María Carvajal Urueña

¹ Si la Tesis está dirigida por más de un Director tienen que constar los datos de cada uno y han de firmar todos ellos.



UNIVERSIDAD DE LEÓN

**ADMISIÓN A TRÁMITE DEL DEPARTAMENTO
(Art. 11.3 del R.D. 56/2005 y
Norma 7ª de las Complementarias de la ULE)**

El Departamento de Sanidad Animal en su reunión celebrada el día 14 de Diciembre de 2010 ha acordado dar su conformidad a la admisión a trámite de lectura de la Tesis Doctoral titulada “Salmonelosis porcina en España: prevalencia, factores de riesgo y resistencia antimicrobiana”, dirigida por el Dr. D. Pedro Miguel Rubio Nistal y la Dra. Dña. Ana María Carvajal Urueña y elaborada por Dña. Carina García Feliz, y cuyo título en inglés es el siguiente “Swine salmonellosis in Spain: prevalence, risk factors and antimicrobial resistance”.

Lo que firmo, para dar cumplimiento al art. 11.3 del R.D. 56/2005, en León a 14 de Diciembre de 2010.

El Secretario,

Fdo.: Juan Fregeneda Grandes

Vº Bº

El Director del Departamento,

Fdo.: D. Elías F. Rodríguez Ferri

AGRADECIMIENTOS

Durante todo este tiempo son muchas las personas que me han ayudado para que este trabajo de tesis doctoral saliera adelante.

En primer lugar, quiero nombrar a mis directores de tesis, Pedro Rubio Nistal y Ana Carvajal Urueña, sin los cuales no hubiera sido posible la realización de este proyecto. A Pedro por darme la oportunidad de incluirme en su equipo de trabajo y por la confianza depositada durante todos estos años. A Ana, por lo mucho que me ha enseñado, especialmente por su empuje y ánimo y por no dejar que me diera por vencida en ningún momento.

A mis compañeros de departamento, con los que he compartido muy buenos momentos y que han sufrido estoicamente tantas horas de “Siglo XXI” en la radio. Muy especialmente a Jesús, mi compañero de andanzas “salmonelósicas”, por su ayuda incondicional y con el que he compartido tantos días de trabajo, excursiones a mataderos e incluso aventuras con extintores. A Gloria, por su excelente trabajo y por esas charlas en las que hemos intentado solucionar un poco el mundo. Al resto de profesores del departamento de infecciosas, Juan, Marcelino y Miguel, por ofrecerme su ayuda siempre y cuando la he necesitado.

A Ana Belén, por enseñarme a dar mis primeros pasos en el laboratorio y por hacer fácil y agradable mi primera etapa en el departamento.

A Aurora y todo su equipo del Laboratorio Nacional de Referencia de *Salmonella* y *Shigella* del Instituto de Salud Carlos III, por el serotipado de las cepas de este trabajo y por su hospitalidad durante mi estancia en su laboratorio.

A todos mis amigos, que han aguantado a mi lado todo este tiempo y no han dejado de animarme siempre que me ha costado ver el lado positivo de las cosas.

A Amparo, cuyo inestimable apoyo ha sido clave en mi último año en Madrid.

A Julio, por ayudarme a superar todos los obstáculos que se han presentado a lo largo de esta aventura, que no son pocos, por sacrificar más de un fin de semana para que yo pudiera terminar este trabajo y por no dejar de creer nunca que yo podría con este desafío.

A mi madre y a mi hermana, por su constante apoyo y porque siempre han estado ahí cuando las circunstancias lo han requerido.

A todos los veterinarios que participaron desinteresadamente en la recogida de muestras. A mis compañeros del Laboratorio Regional de Sanidad Animal de León, en especial a Paquita, por su confianza y apoyo, y a todas aquellas personas que, de una u otra forma, han colaborado o se han visto involucrados en este proyecto.

Por último, quiero mostrar mi más sincero agradecimiento al MARM por el soporte económico otorgado a este trabajo

Gracias, porque sin todos vosotros hoy no podría estar escribiendo estas líneas.

A mis padres

A mi hermana

A Julio

I. REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA	1
1. GÉNERO <i>Salmonella</i>	3
1.1. Características del género <i>Salmonella</i>	3
1.2. Taxonomía y nomenclatura	3
2. CARACTERIZACIÓN DE <i>Salmonella spp.</i>	5
2.1 Métodos fenotípicos.....	5
2.1.1. Serotipificación	5
2.1.2. Perfil bioquímico.....	7
2.1.3. Fagotipificación.....	9
2.1.4. Resistencia a antimicrobianos	10
2.2. Métodos genotípicos.....	11
2.2.1. Perfil plasmídico.....	11
2.2.2. Patrones de restricción cromosómica, técnicas de hibridación y métodos basados en la PCR.....	12
2.2.3. Electroforesis en campo pulsado (PFGE).....	13
2.2.4. Detección de polimorfismos en las secuencias repetidas en tandem (MLVA)	13
3. <i>Salmonella spp.</i> COMO AGENTE CAUSANTE DE ZOONOSIS	14
3.1. Importancia y distribución de los casos y brotes de salmonelosis en el hombre	15
3.2. Salmonelosis en el hombre: fuentes de infección. Papel de la carne de cerdo y sus derivados.....	17
3.3. Brotes de salmonelosis en el hombre asociados al consumo de productos del cerdo.....	18
4. INFECCIONES POR <i>Salmonella</i> EN EL CERDO	19
4.1. Eliminación y transmisión	19
4.2. Patogenia de la infección	21
4.3. Estados de portador.....	23
4.4. Principales serotipos de <i>Salmonella</i> que infectan al cerdo	24
5. EPIDEMIOLOGÍA DE LAS INFECCIONES POR <i>Salmonella</i> EN LAS EXPLOTACIONES PORCINAS	25
5.1. Dinámica de la infección por <i>Salmonella</i> en las explotaciones porcinas	25
5.2. Prevalencia de <i>Salmonella</i> en cerdos de cebo.....	28
5.3. Principales medidas de control y factores de riesgo asociados a la infección por <i>Salmonella</i> en las explotaciones porcinas.....	32
5.3.1. Animales infectados	32
5.3.2. Alimentación	33
5.3.2.1. La alimentación como fuente de infección de <i>Salmonella</i> en las granjas porcinas.....	34

5.3.2.2. La alimentación como medida de control de la salmonelosis porcina.....	37
5.3.3. Medidas de bioseguridad	43
5.3.3.1. Control de vectores de transmisión de <i>Salmonella</i>	43
5.3.3.2. El hombre como vector de transmisión de <i>Salmonella</i>	44
5.3.3.3. Agua de bebida	45
5.3.3.4. Estatus sanitario de las explotaciones.....	45
5.3.3.5. Temperatura ambiente	45
5.3.3.6. Contaminación ambiental	46
5.3.3.7. Tamaño de la explotación.....	47
5.3.3.8. Suelos y separación entre corrales.....	48
5.4. Otras medidas de control: la vacunación.....	49
6. PROGRAMAS DE CONTROL DE <i>Salmonella</i> APLICADOS EN PRODUCCIÓN PORCINA.....	50
6.1. Programas de Control aplicados en países con baja prevalencia de <i>Salmonella</i> (Suecia, Finlandia y Noruega).....	50
6.2. Programas de Control en países con media y alta prevalencia de <i>Salmonella</i>	51
6.2.1. El programa danés.....	51
6.2.2. El programa británico	52
6.2.3. El programa irlandés.....	53
6.2.4. El programa alemán	54
6.2.5. El programa holandés	54
6.2.6. Programas de Control en otros países europeos.....	55
7. MÉTODOS DE DETECCIÓN DE <i>Salmonella</i> spp.	55
7.1. Métodos bacteriológicos	55
7.1.1. Preenriquecimiento no selectivo	56
7.1.2. Enriquecimiento selectivo.....	57
7.1.3. Aislamiento en medios sólidos selectivos y diferenciales	58
7.1.4. Confirmación de los aislados.....	59
7.1.5. Factores que afectan a la sensibilidad de las pruebas bacteriológica.....	59
7.2. Métodos inmunológicos	61
7.2.1. Métodos inmunológicos de detección de antígenos.....	61
7.2.2. Métodos inmunológicos de detección de anticuerpos.....	62
8. RESISTENCIA ANTIMICROBIANA EN <i>Salmonella</i>	66
8.1. Aspectos generales de la resistencia antimicrobiana.....	66
8.1.1. Mecanismos de resistencia.....	66
8.1.2. Resistencia natural y resistencia adquirida	67
8.1.3. Transmisión de genes de resistencia.....	69

8.2. Uso de antimicrobianos en producción animal.....	72
8.3. Sistemas de vigilancia de resistencia antimicrobiana.....	74
8.4. Resistencia antimicrobiana en <i>Salmonella</i> Typhimurium y otros serotipos. Diseminación de clones multirresistentes.....	75
8.5. Determinación de la sensibilidad antimicrobiana.....	79
8.5.1. Método de difusión en agar (Técnica de Kirby-Bauer).....	81
8.5.2. Método de dilución.....	81
8.5.2.1. Método de dilución en agar.....	82
8.5.2.2. Métodos de dilución en caldo (macrodilución y microdilución)	82
8.5.3. E-test.....	83
8.5.4. Métodos automatizados.....	84
II. OBJETIVOS.....	85
III. TRABAJOS PUBLICADOS.....	89
ESTUDIO I: <i>Salmonella enterica</i> Infections in Spanish Swine Fattening Units.....	91
ESTUDIO II: Antimicrobial Resistance of <i>Salmonella enterica</i> Isolates from Apparently Healthy and Clinically Ill Finishing Pigs in Spain.....	101
ESTUDIO III: Herd-Level Risk Factors for Faecal Shedding of <i>Salmonella enterica</i> in Spanish Fattening Pigs.....	115
IV. DISCUSIÓN GENERAL.....	125
V. CONCLUSIONES.....	139
VI. RESUMEN GENERAL.....	143
1. RESUMEN GENERAL.....	145
2. ABSTRACT.....	149
VII. BIBLIOGRAFÍA.....	153

I. REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA

1. GÉNERO *Salmonella*

1.1. Características del género *Salmonella*

La primera descripción de bacterias del género *Salmonella* se remonta a finales del siglo XIX, cuando Daniel Elmer Salmon y Theobald Smith aislaron *Salmonella Choleraesuis* en muestras tomadas en un cerdo con peste porcina clásica, creyendo que era el agente de esta enfermedad. El bacteriólogo francés Joseph Léon Marcel Lignières sugirió en 1900 que estas bacterias se denominaran *Salmonella*, en honor a Salmon.

Salmonella spp. se engloba dentro de la familia *Enterobacteriaceae* y su hábitat principal es el tracto intestinal del hombre y los animales. Los miembros de este género destacan por su gran capacidad de adaptación, lo que les permite infectar a un amplio rango de hospedadores.

Al igual que otros miembros de la familia *Enterobacteriaceae* se caracterizan por ser bacilos gram-negativos, anaerobios facultativos, catalasa positivos, oxidasa negativos, no formadores esporas y por poseer flagelos peritricos que les confieren movilidad, con excepción del serotipo Gallinarum y las variantes inmóviles de otros serotipos.

Las bacterias de este género pueden sobrevivir durante largos periodos de tiempo en el ambiente asociadas a substratos orgánicos, multiplicándose entre los 7 y los 45°C y sobreviviendo a la refrigeración y congelación. Se inactivan a pH inferior a 5 y a temperaturas superiores a 60°C.

El valor óptimo de actividad de agua (a_w) para su multiplicación es de 0,995 aunque crecen en medios con valores de a_w de entre 0,945 y 0,999 y se multiplican en alimentos con valores inferiores a 0,93 (Cox, 1999). Además, toleran elevadas concentraciones de ácidos biliares y su crecimiento no resulta inhibido por la presencia de colorantes como el azul de metileno, el cristal violeta o el verde brillante, propiedades que se utilizan para la preparación de medios de cultivo selectivos y diferenciales.

Los desinfectantes comunes como fenoles, iodados y clorados son eficaces frente a *Salmonella*.

1.2. Taxonomía y nomenclatura

En la actualidad la nomenclatura y clasificación de las bacterias de este género sigue siendo muy controvertida. Actualmente, aunque no está oficialmente reconocido por el Comité Internacional de Taxonomía Bacteriana (ICBT), la clasificación más aceptada es la que propone que el género *Salmonella* comprende dos especies: *Salmonella bongori* y *Salmonella enterica*.

Según la clasificación propuesta por Kauffmann en 1966 cada cepa de *Salmonella* distinguible antigénicamente debía ser considerada como una especie. Este concepto desapareció tras el análisis a través de pruebas de hibridación ADN-ADN, que concluyeron que las cepas de *Salmonella* pertenecían a un único grupo de hibridación, con 7 subgrupos distinguibles entre sí fenotípicamente (Crosa *et al.*, 1973). Así pues, estos subgrupos se incluían en única especie, que posteriormente se denominaría *Salmonella choleraesuis* (Le Minor *et al.*, 1982; 1986). Poco después, Le Minor & Popoff (1987) propusieron que estos 7 subgrupos (I, II, IIIa, IIIb, IV, V, VI) fueran considerados subespecies y recomendaron además el cambio de nombre de *Salmonella choleraesuis* por el de *Salmonella enterica*, ya que se prestaba a confusión debido a la existencia de un serotipo denominado Choleraesuis. Recientemente se ha rechazado el nombre de *Salmonella choleraesuis* como especie (Tindall *et al.*, 2005). Por último, en 1989 fue elevada al rango de especie la hasta entonces denominada subespecie *bongori* o subgrupo V (Reeves *et al.*, 1989).

Así pues, en la actualidad, *Salmonella enterica* agrupa a la mayoría de las bacterias del género que se aíslan de animales de sangre caliente, incluido el hombre, y se divide en seis subespecies (o subgrupos fenotípicamente distintos) designadas con números romanos o con un nombre: *enterica* (I), *salamae* (II), *arizonae* (IIIa), *diarizonae* (IIIb), *houtenae* (IV) e *indica* (VI) (Le Minor & Popoff, 1987; Brenner *et al.*, 2000; Grimont & Weill, 2007).

Recientemente, Shelobolina *et al.* (2004) propusieron una nueva especie perteneciente al género *Salmonella*, aislada de la superficie de un sedimento contaminado y denominada como *Salmonella subterranea* (Validation List N° 102). El análisis de la secuencia del ADN ribosómico de la subunidad 16S del aislado mostró una gran similitud con *Salmonella bongori* y *Enterobacter cloacae*. Sin embargo, trabajos posteriores sobre la taxonomía de esta especie bacteriana como el de Grimont & Weill (2007) ni siquiera la incluyeron dentro del género *Salmonella*.

Los serotipos o serovares de *Salmonella* pueden ser clasificados en grupos desde un punto de vista epidemiológico según estén más o menos adaptados a una especie hospedadora (Kingsley & Bäumlér, 2000). Así existen serovariedades adaptadas estrictamente a un hospedador específico (por ejemplo, *S. Typhi* únicamente asociada a infecciones en el hombre o *S. Gallinarum* en aves), serovariedades adaptadas a un hospedador específico pero que en algunos casos pueden aislarse en otros hospedadores (por ejemplo, *S. Choleraesuis* que se ha asociado a procesos sistémicos graves en cerdos y en el hombre) y serovariedades no adaptadas a hospedadores específicos (por ejemplo, *S. Typhimurium* que se aísla de una gran variedad de animales y del ambiente) (Uzzau *et al.*, 2000). Estos últimos, son los que con más frecuencia originan brotes de salmonelosis en el hombre, asociados al consumo de productos contaminados, principalmente huevos y carne.

2. CARACTERIZACIÓN DE *Salmonella* spp.

2.1 Métodos fenotípicos

2.1.1. Serotipificación

La clasificación de serotipos o serovares se realiza en función de la combinación de antígenos superficiales somáticos o antígenos O, de antígenos flagelares o antígenos H y, eventualmente, del antígeno capsular (Vi) (Popoff & Le Minor, 1997). Estos antígenos se identifican mediante técnicas de microaglutinación empleando sueros específicos, generalmente comerciales, frente a cada uno de ellos. De esta forma se caracteriza a la cepa en función de su estructura antigénica (Popoff, 2001).

La primera clasificación de serovariedades basada en estos antígenos superficiales (somáticos y flagelares, principalmente) fue propuesta por White en 1926. Este esquema fue modificado por Kauffmann en 1941 y actualmente la Organización Mundial de la Salud (OMS) así como los laboratorios de referencia se basan en el denominado esquema de Kauffmann-White para la clasificación de las serovariedades de *Salmonella*.

Recientemente, Grimont & Weill (2007) han propuesto que este esquema cambie su nombre por el de Le Minor-Kauffmann-White ya que la mayoría de las serovariedades actualmente conocidas, un total de 1.309 serovariedades, fueron descritas por Le Minor.

Los antígenos somáticos o antígenos O se localizan en el lipopolisacárido (LPS) de la pared celular y son termoestables. Estos antígenos a su vez se clasifican en antígenos mayores y menores. Los antígenos somáticos mayores son aquellos que definen el serogrupo o grupo antigénico y son compartidos por todas las salmonelas incluidas en un mismo serogrupo. Así, el antígeno somático O:4 caracteriza al serogrupo que se denominaba B y que actualmente se denomina serogrupo O:4. Por su parte, los antígenos somáticos menores tienen un menor valor discriminativo puesto que son compartidos por salmonelas de diferentes serogrupos. Por ejemplo, el antígeno somático O:12 se detecta en salmonelas de los serogrupos A, B y D. Además, algunos antígenos menores son generados por modificaciones químicas de un antígeno mayor o por conversiones fágicas.

Según el esquema de Kauffmann- White, el género *Salmonella* se divide en 67 serogrupos, que en un principio se designaron con letras (de la A a la Z) y posteriormente con números (del O:1 al O:67). Hoy en día se considera más correcto designar cada serogrupo en función de las características del antígeno somático mayor, manteniéndose las letras de manera

provisional y entre paréntesis, por ejemplo, O:4 (B) (Grimont & Weill, 2007). Además, algunas cepas carecen del polisacárido O por un defecto de su síntesis. Estas cepas se denominan “rugosas” y no son serotipables.

Los antígenos flagelares o antígenos H son termolábiles y los componen las flagelinas, subunidades proteicas que forman los flagelos. La mayor parte de las cepas de *Salmonella* son capaces de expresar alternativamente dos flagelinas antigénicamente diferentes, denominadas de fase 1 o específica, característica del serotipo, y de fase 2 o no específica, que pueden ser comunes a otros serotipos. Las flagelinas de fase 1 se denominan con letras minúsculas que van de la *a* a la *z*, mientras que las flagelinas de fase 2 se denominan en muchas ocasiones con la letra *z* con subíndices y en otras con números o con letras minúsculas. No obstante, existen aislados denominados monofásicos que expresan solo una de las dos flagelinas. Estos aislados son naturales en algunas serovariedades o pueden aparecer debido a la inactivación o la falta de expresión del gen que codifica una u otra fase.

Respecto a los antígenos capsulares, el único que se conoce en *Salmonella* es el antígeno Vi (de virulencia) que está presente únicamente en serovariedades muy invasivas como *S. Dublin* y *S. Typhi*.

Aplicando lo anterior, según el esquema de Kauffmann-White, la fórmula antigénica de una *Salmonella* se expresa como: Antígeno somático O: Antígeno flagelar de fase 1: Antígeno flagelar de fase 2. Así, la fórmula antigénica de *S. Typhimurium* es 1,4,5,12:i:1,2.

El esquema de Kauffmann-White propone que las serovariedades de la subespecie I (*Salmonella enterica* subsp. *enterica*) conserven su denominación antigua, que por lo general hace referencia a la localización geográfica donde fueron aisladas por primera vez, como por ejemplo, *S. Dublin* o *S. Ohio*. Las serovariedades de las demás subespecies así como de *S. bongori* aisladas después de 1966 se deben designar con la fórmula antigénica correspondiente.

Con el fin de agilizar y simplificar la escritura de los serotipos o serovariedades, Le Minor & Popoff (1987) propusieron que se escriban con la inicial en mayúsculas y sin cursiva (por ejemplo, *Salmonella Typhimurium* o *S. Typhimurium*) y si se menciona por primera vez en un texto deben ir precedidos de la palabra “serotipo” o “ser.”, por ejemplo, *Salmonella* serotipo Typhimurium o *Salmonella* ser. Typhimurium.

Hasta el momento actual, se han descrito un total de 2.579 serovariedades de *Salmonella*, perteneciendo la mayoría de ellas a *Salmonella enterica* subsp. *enterica* (59 %) (Grimont & Weill, 2007). En la **Tabla 1** se muestra el número de serovariedades identificadas hasta el momento dentro de cada especie y subespecie, así como sus principales hábitats.

Tabla 1. Serovariedades y principales hábitats para las diferentes subespecies de *Salmonella spp.* (Brenner et al., 2000; Grimont & Weill, 2007).

Especies y subespecies de <i>Salmonella spp.</i>	Nº de serovariedades	Principales hábitats
<i>S. enterica</i> subsp. <i>enterica</i> (I)	1.531	Animales de sangre caliente
<i>S. enterica</i> subsp. <i>salamae</i> (II)	505	Animales de sangre caliente/fría y ambiente
<i>S. enterica</i> subsp. <i>arizonae</i> (IIIa)	99	Animales de sangre fría y ambiente
<i>S. enterica</i> subsp. <i>diarizonae</i> (IIIb)	336	Animales de sangre fría y ambiente
<i>S. enterica</i> subsp. <i>houtenae</i> (IV)	73	Animales de sangre fría y ambiente
<i>S. enterica</i> subsp. <i>indica</i> (IV)	13	Animales de sangre fría y ambiente
<i>S. bongori</i> (V)	22	Animales de sangre fría y ambiente
Total	2.579	

La serotipificación es una técnica sencilla y estable que permite la identificación del serotipo, uno de los principales marcadores epidemiológicos de este género y referencia obligada en los estudios de salmonelosis.

2.1.2. Perfil bioquímico

La determinación del perfil bioquímico se utiliza como paso siguiente al aislamiento, ya que permite confirmar la identidad de *Salmonella* frente a otras enterobacterias que hayan podido ser aisladas, conjuntamente, en los medios selectivos.

El perfil bioquímico se basa en diferencias de reacciones bioquímicas previamente seleccionadas por su capacidad discriminativa. Las pruebas bioquímicas se han llevado a cabo tradicionalmente en una serie de medios específicos como el TSI (triple azúcar hierro), citrato de

Simons, SIM (sulfito indol motilidad), ureasa, catalasa, Voges-Proskauer, fenilalanina etc., para detectar y visualizar en ellos una serie de resultados clave en la identificación de *Salmonella*. Aunque el perfil bioquímico de *Salmonella* es estable para la mayoría de las serovariedades pertenecientes a los siete subgrupos identificados, existen una serie de características diferenciales que se muestran en la **Tabla 2** (Le Minor *et al.*, 1982; 1986).

Tabla 2. Propiedades bioquímicas diferenciales de las especies y subespecies de *Salmonella spp* (Le Minor *et al.*, 1982; 1986).

Pruebas bioquímicas	<i>S. enterica</i>						
	subesp. enterica (I)	subesp. salamae (II)	subesp. arizonae (IIIa)	subesp. diarizonae (IIIb)	subesp. houtenae (IV)	subesp. indica (VI)	subesp. bongori (V)
Dulcitol	+	+	-	-	-	d	+
ONPG	-	-	+	+	-	d	+
Malonato	-	+	+	+	-	-	-
Gelatinasa	-	+	+	+	+	+	-
Sorbitol	+	+	+	+	+	-	+
KCN	-	-	-	-	+	-	+
L(+)-tartrato	+	-	-	-	-	-	-
Mucato	+	+	+	- (70 %)	-	+	+
Salicina	-	-	-	-	+	-	-
Lactosa	-	-	- (75 %)	+ (75 %)	-	D	-

+: 90 % o más de resultados positivos, -: 90 % o más de resultados negativos, d: diferentes reacciones

En la **Tabla 3** se muestran las propiedades bioquímicas más destacadas de *Salmonella enterica* subsp. *enterica*, puesto que la práctica totalidad de los serotipos de *Salmonella* aislados en el hombre y los animales domésticos pertenecen a esta subespecie (Brenner *et al.*, 2000).

Tabla 3. Pruebas bioquímicas para *Salmonella enterica* subsp. *enterica* (I).

Prueba bioquímica	Reacción	Prueba bioquímica	Reacción
Motilidad	+	Glucosa (fermentación)	+
Reducción del nitrato	+	Manitol (fermentación)	+
Oxidasa	-	Maltosa (fermentación)	+
O/F	F	Lactosa (fermentación)	-
Hidrólisis de la urea	-	Adonitol (fermentación)	-
Indol	-	Dulcitol (fermentación)	+
Producción de H ₂ S	+	Sacarosa (fermentación)	-
Utilización de Citrato	+	Lisina decarboxilasa	+
Malonato sódico	-	Ornitina decarboxilasa	+
Crecimiento en KCN	-	Arginina dihidrolasa	+
Rojo de Metilo	+	Voges Proskauer	-
ONPG	-		

Como excepción a este perfil típico están las serovariedades Typhi, Cholerasuis, Paratyphi A y Gallinarum. Estas serovariedades no utilizan el citrato a excepción de *S. Cholerasuis* que muestra resultados variables siendo positivas un 25 % de las cepas. Igualmente ocurre con la arginina dihidrolasa que proporciona resultados negativos para todos ellos con la excepción de *Cholerasuis* que muestra resultados positivos en el 55 % de los casos. *S. Paratyphi A* es negativo para la lisina decarboxilasa mientras que los serotipos *Gallinarum* y *Typhi* son negativos para la ornitina decarboxilasa (Farmer *et al.*, 1985).

Existen técnicas sistematizadas de identificación de microorganismos que se basan en la realización simultánea de determinadas pruebas bioquímicas en formato miniaturizado. Estos pueden ser procedimientos manuales como es el caso del sistema API 20E (BioMérieux) con un tiempo de identificación estimado de 24 horas o sistemas automatizados como puede ser el Vitek (BioMérieux) con tiempos de identificación estimados entre 4 y 18 horas

2.1.3. Fagotipificación

Los fagos son virus que infectan a las bacterias produciendo, en la mayor parte de los casos, su destrucción y, consecuentemente, zonas de lisis visibles a simple vista sobre placas de agar en las que se ha sembrado previamente la bacteria.

Debido a su alta especificidad, cada fago es capaz de infectar solamente a una cepa determinada de una bacteria o a cepas muy similares, que se incluyen en un mismo grupo denominado fagotipo. Esta especificidad, en el caso *Salmonella*, se ha aprovechado para tipificar las cepas en función de que sean receptivas a la lisis por uno u otro fago. El fagotipo o lisotipo es de gran valor en el estudio epidemiológico o de *Salmonella*, ya que existe un alto grado de correlación entre fagotipo y origen epidémico (Rabsch *et al.*, 2002).

Entre los inconvenientes de este método figura por un lado que es una técnica muy laboriosa, que requiere una amplia batería de fagos que no suelen comercializarse y cuyo acceso suele limitarse a los laboratorios de referencia. Por otro lado, no todos los aislados pueden ser caracterizados y existen diferentes mecanismos que pueden provocar un cambio en el fagotipo.

Existen esquemas de fagotipificación para algunas serovariedades del género *Salmonella*. Entre los serotipos en los que más se ha empleado el fagotipado se encuentran Typhi, Paratyhi A y B, Typhimurium y Enteritidis. Hasta el momento, se han identificado más de 300 fagotipos para el serotipo Typhimurium (Callow, 1959; Anderson *et al.*, 1977) de los cuales más de 200 son fagotipos definitivos (DTs). Se han desarrollado, además, esquemas de fagotipado para otros

serotipos de importancia clínica y epidemiológica como son Newport (Petrow *et al.*, 1974), Hadar o Virchow (Chambers *et al.*, 1987), entre otros.

Actualmente el fagotipado se utiliza en los laboratorios de referencia como marcador epidemiológico secundario. Además, a partir de la caracterización de la cepa pentarresistente de *S. Typhimurium* DT 104 (Threlfall *et al.*, 1994; Angulo, 1997) el fagotipo ha pasado a formar parte de la taxonomía de este serotipo y se emplea en la mayoría de estudios de caracterización de cepas (Wray *et al.*, 1998; Briggs & Fratamico, 1999; Lan *et al.*, 2003). A nivel práctico, su importancia radica en que determinados fagotipos están asociados a ciertas características como son la multirresistencia a antimicrobianos o la capacidad invasiva.

2.1.4. Resistencia a antimicrobianos

La resistencia a antimicrobianos es un problema cada día más importante, tanto desde la perspectiva de la salud humana como para la salud animal. El uso y más aún la mala utilización o el abuso de los antimicrobianos, no solo en medicina humana y veterinaria sino también como promotores de crecimiento en producción animal, ha creado una enorme presión de selección para el desarrollo de resistencias bacterianas (WHO, 2000). El perfil de resistencia se basa en la determinación del patrón de sensibilidad o resistencia de un microorganismo a un conjunto de antimicrobianos. Conocer los niveles de resistencia en *Salmonella* es de gran interés tanto clínico como epidemiológico.

En la adquisición de resistencias intervienen diferentes mecanismos, ligados principalmente a elementos genéticos móviles como son plásmidos, transposones e integrones, que juegan un importante papel en su diseminación (Davies, 1994). El que los principales determinantes de resistencia estén ligados a estos elementos genéticos móviles y no esenciales para el crecimiento de la bacteria hace que el perfil de resistencia a antimicrobianos sea relativamente inestable. Por otro lado, puede producirse una pérdida o ganancia de resistencias debido a mutaciones.

Es importante tener en cuenta que cepas con idénticos patrones de resistencia a antimicrobianos pueden ser totalmente diferentes por otros métodos de tipificación, por lo que el perfil de resistencia a los antimicrobianos tiene valor únicamente como marcador epidemiológico secundario. No obstante, el establecimiento del perfil de resistencia es una técnica rutinaria, sencilla, rápida y accesible para la caracterización de cepas de *Salmonella* en estudios epidemiológicos. Además, un patrón de resistencia similar puede indicar cierta clonalidad, siempre y cuando las cepas en estudio sean geográficamente cercanas. Por otro lado, aunque las resistencias hayan sido transmitidas de forma horizontal a través de elementos genéticos móviles,

se ha demostrado en *S. Typhimurium* DT 104 la integración de ciertas resistencias a nivel cromosómico (Therfall *et al.*, 1994; Briggs & Fratamico, 1999).

2.2. Métodos genotípicos

Si bien los métodos fenotípicos, como la serotipificación y la fagotipificación, proporcionan información epidemiológica relevante, en ocasiones son necesarios métodos que permitan diferenciar cepas idénticas o muy parecidas fenotípicamente. Los métodos de tipificación genotípica permiten distinguir diferencias genómicas mínimas, que no tienen una manifestación fenotípica y que no son observables por otros métodos. En general, los métodos de tipificación genotípica tienen un mayor poder de discriminación que los métodos de caracterización fenotípica y son relativamente reproducibles.

Entre los métodos de tipificación molecular más usados están el perfil plasmídico, el análisis del polimorfismo de los fragmentos de restricción del ADN mediante electroforesis de campo constante (“restriction fragment length polymorphisms” o RFLP) o en campo pulsado (“pulsed-field gel electrophoresis” o PFGE), el revelado de fragmentos específicos mediante hibridación con sondas genéricas (como por ejemplo la ribotipificación y perfiles de secuencias de inserción) y los métodos basados en la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) como la amplificación aleatoria del ADN polimórfico (“random amplification of polymorphic DNA” o RAPD) o la detección de polimorfismos en las secuencias repetidas en tandem (“multi locus variable-number tandem repeat analyses” o MLVA) (Liébana, 2002a; 2002b; 2002c; EFSA, 2009a). Un reciente estudio realizado por la EFSA señala que la técnica de PFGE es la más utilizada para la tipificación molecular en los laboratorios de referencia de *Salmonella* de los diferentes países miembros de la UE seguida de la técnica de MLVA (EFSA, 2009a).

2.2.1. Perfil plasmídico

La determinación del perfil plasmídico es un método rápido, sencillo y barato, que se utiliza junto a otros métodos de caracterización genotípicos en muchos laboratorios para la caracterización y la vigilancia epidemiológica de *Salmonella* (Therfall *et al.*, 1994; Ridley *et al.*, 1998; Echeita *et al.*, 2001; Liébana, 2002a; 2002b; 2002c; Olson *et al.*, 2007; Kaldhone *et al.*, 2008). El análisis del perfil plasmídico es también un método importante en el estudio de los mecanismos de adquisición de resistencias antimicrobianas en *Salmonella* (Lawson *et al.*, 2004; Batchelor *et al.*, 2005; Reddy *et al.*, 2005; Herrero *et al.*, 2006).

La principal desventaja de este método es la inestabilidad del perfil obtenido debido a la posible pérdida de plásmidos o a la delección de alguno de sus genes. Este proceso puede ocurrir en el hospedador, en el ambiente o durante el subcultivo y conservación de cepas en el laboratorio. Por esta razón, es útil como marcador epidemiológico mientras exista una cantidad mínima de presión selectiva en el ambiente (Liébana, 2002a; 2002b; 2002c).

2.2.2. Patrones de restricción cromosómica, técnicas de hibridación y métodos basados en la PCR

Los patrones de restricción cromosómica (RFLP) se basan en la detección de fragmentos de distinto peso molecular tras la digestión del ADN con enzimas de restricción. Es un método sensible y relativamente sencillo, particularmente útil para la comparación de un número pequeño de cepas. El empleo de endonucleasas de corte frecuente da lugar a perfiles muy complejos, difíciles de interpretar y de comparar a gran escala. Por otro lado, los fragmentos de elevado peso molecular no se resuelven en la electroforesis convencional, dando lugar a patrones cromosómicos incompletos.

Las técnicas de hibridación más utilizadas son el ribotipado y la detección de la secuencia de inserción IS200. El ribotipado se basa en el estudio del polimorfismo de patrones de restricción de genes muy conservados del ARN ribosómico y secuencias asociadas, mientras que las secuencias de inserción IS200 son elementos repetitivos y conservados de ADN, que se encuentran en más del 90 % de los aislados de *Salmonella*. Entre las principales ventajas del ribotipado está su rapidez gracias a la utilización de métodos automatizados y aunque su poder de discriminación es menor al de otros métodos como el PFGE, diversos estudios han señalado su utilidad como marcador epidemiológico complementario al perfil plasmídico y a otros métodos de caracterización fenotípica (Martinetti & Altwegg, 1990; Olsen *et al.*, 1992). Por lo que respecta a la detección de la secuencia de inserción IS200, aunque es un método reproducible, es cuestionable su utilidad como marcador epidemiológico, ya que la presencia de esta secuencia es variable y limitada a algunos tipos de *Salmonella* (Torre *et al.*, 1993).

La técnica de amplificación aleatoria del ADN polimórfico (RAPD) es una PCR de secuencias al azar que utiliza oligonucleótidos cortos, de unos 10 pb, de secuencias arbitrarias y de baja especificidad, que permiten amplificar fragmentos pequeños de ADN (Welsh & McClland, 1990; Williams *et al.*, 1990). La baja reproducibilidad de esta técnica hace que habitualmente se emplee asociada a otras (Eriksson *et al.*, 2005).

2.2.3. Electroforesis en campo pulsado (PFGE)

La electroforesis en campo pulsado (PFGE) ha sido una de las técnicas de tipificación genotípica de elección para *Salmonella* (Olsen *et al.*, 1992; Guerra *et al.*, 2000). El estudio llevado a cabo por la EFSA con el fin de determinar los principales métodos de caracterización empleados señala que esta técnica es utilizada por 19 de los 20 laboratorios nacionales de referencia (EFSA, 2009). Se basa en el estudio de la variación de la secuencia de nucleótidos del ADN, revelada por el polimorfismo en los fragmentos de restricción generados por tratamientos con endonucleasas específicas de baja frecuencia de corte. De este modo, en lugar de obtenerse varios cientos de fragmentos de ADN, como sucedería con el empleo de una endonucleasa normal, con muchos puntos de corte, se obtienen solo decenas de fragmentos que pueden separarse en geles de agarosa en los que la orientación del campo eléctrico se alterna periódicamente, mediante pulsos, permitiendo la separación de fragmentos de gran tamaño. De esta forma se pueden obtener patrones de restricción claros y fácilmente distinguibles entre unas cepas y otras. El análisis de estos patrones mediante un software apropiado permite obtener un árbol filogenético de las cepas en el que puede verse claramente su mayor o menor proximidad genética.

Esta técnica fue estandarizada por el CDC (Centers for Disease Control and Prevention, Atlanta, EEUU) en el año 1996, para el programa de vigilancia conocido como PulseNet, destacando por su elevada especificidad y reproducibilidad, permitiendo caracterizar la práctica totalidad de las cepas de *Salmonella* con gran poder de discriminación (Swaminathan *et al.*, 2001). En la actualidad, es señalada como la técnica de elección en la gran mayoría de los estudios epidemiológicos de *Salmonella* (Ridley *et al.*, 1998; Baggesen *et al.*, 2000; Lawson *et al.*, 2004; Eriksson *et al.*, 2005; Valdezate *et al.*, 2005; Valdezate *et al.*, 2007; Kérouanton *et al.*, 2007; Aarestrup *et al.*, 2007). Sin embargo, es una técnica costosa en tiempo y en trabajo y debido al elevado precio del equipo no está al alcance de todos los laboratorios.

2.2.4. Detección de polimorfismos en las secuencias repetidas en tandem (MLVA)

Recientemente, se ha introducido la técnica del número variable de repeticiones en tándem (MLVA) para la caracterización molecular de bacterias del género *Salmonella* (Kotetishvili *et al.*, 2002). Entre sus ventajas destacan su bajo coste, el que sea accesible para cualquier laboratorio con una mínima equipación de biología molecular y el que es fácilmente estandarizable a gran escala. Además, puede ser automatizada mediante el empleo de electroforesis capilar para la determinación del tamaño de los fragmentos generados y la determinación del número de repeticiones.

La técnica de MLVA es empleada por 11 de los 20 laboratorios nacionales de referencia que llevan a cabo estudios moleculares en los aislados de *Salmonella* en la UE (EFSA, 2009a).

3. *Salmonella* spp. COMO AGENTE CAUSANTE DE ZOONOSIS

Las serovariedades no tifoideas de *Salmonella* spp. son las responsables de esta zoonosis y representan un grave problema de salud pública. Generalmente provocan en el hombre una enterocolitis localizada, que suele resolverse a los 2-7 días sin ayuda de terapia antimicrobiana. Sin embargo, el uso de agentes antimicrobianos es indispensable en niños, ancianos e individuos inmunocomprometidos al ser en estos grupos más posible el establecimiento de infecciones sistémicas, (Ruiz *et al.*, 2004). El problema se ve agravado porque existe el riesgo de fallos terapéuticos debidos a la emergencia y diseminación de cepas de *Salmonella* resistentes a antimicrobianos (McEwen & Fedorka-Cray, 2002; Teale *et al.*, 2002; Carlson *et al.*, 2003), y, en especial, de cepas con resistencia a los antimicrobianos de elección en el hombre, como son el trimetoprim-sulfametoxazol, las cefalosporinas de tercera generación y las fluoroquinolonas (Lee *et al.*, 1994). Se estima que un 5 % de los casos de salmonelosis tiene complicaciones graves como artritis reactiva, o daños neurológicos y neuromusculares, mientras que en el 1 % de los casos la infección provoca la muerte.

Entre los factores responsables del incremento de la salmonelosis y de otras intoxicaciones alimentarias en el hombre en los países más industrializados se encuentran los cambios en los hábitos de alimentación, consecuencia, en muchos casos, del menor tiempo disponible para las comidas y del aumento del consumo de comidas rápidas o precocinadas, la tendencia a la producción y distribución de alimentos en masa, la apertura económica y la globalización así como el desarrollo de resistencias antimicrobianas. Por otro lado, debido al envejecimiento de la población así como al aumento de individuos inmunocomprometidos en la misma existe un número creciente de personas particularmente sensibles a las infecciones por *Salmonella* (Altekruse *et al.*, 1998; Oldfield, 2001).

3.1. Importancia y distribución de los casos y brotes de salmonelosis en el hombre

Las infecciones por *Salmonella* son, en la actualidad, una de las principales causas de gastroenteritis en el hombre en la mayoría de los países de mundo y particularmente en los países industrializados. En el año 2008, en la Unión Europea se confirmaron 131.468 casos de salmonelosis en el hombre, lo que representa una incidencia de 26,4 casos por cada 100.000 habitantes, un 13,5 % inferior al año anterior (EFSA, 2010) (**Figura 1**). Si bien la salmonelosis en la UE es, tras la campilobacteriosis, la segunda causa de casos confirmados de toxoinfección alimentaria, ocupa el primer lugar como causa de brotes, siendo la responsable del 55,1% de los brotes de toxoinfecciones alimentarias (EFSA, 2010).

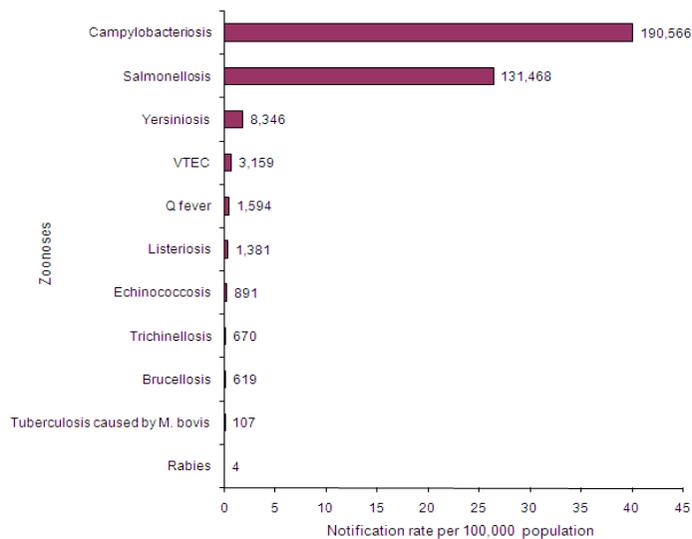


Figura 1. Distribución de los casos confirmados de toxoinfección alimentaria en la UE en el año 2008 en función de su etiología. Fuente: EFSA, 2010.

Desde el año 2004 en la UE se ha observado una disminución progresiva del número de casos de salmonelosis en el hombre, probablemente como consecuencia de las medidas de vigilancia y control de *Salmonella* que comenzaron a aplicarse en avicultura a nivel comunitario en el año 2004 (**Figura 2**).

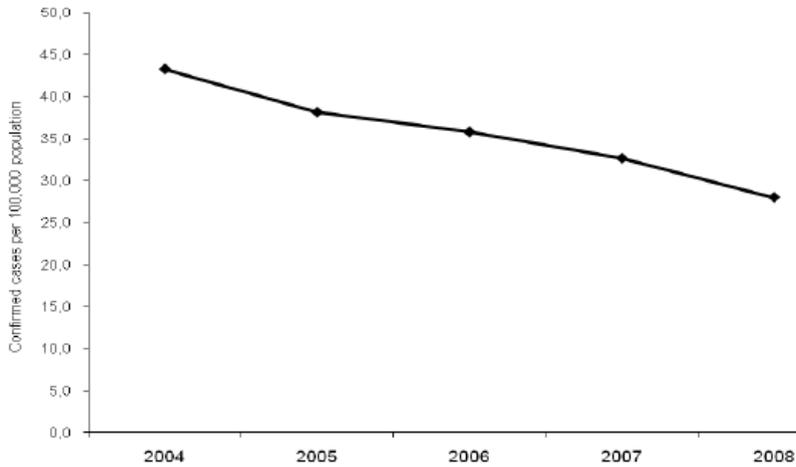


Figura 2. Evolución de las notificaciones de salmonelosis en el hombre entre el año 2004 y 2008 en la UE. Fuente: EFSA, 2010.

Al igual que en años anteriores, los serotipos más frecuentemente aislados en los casos de salmonelosis en el hombre en la UE fueron *S. Enteritidis* (70.091 casos) y *S. Typhimurium* (26.423 casos). Entre ambos serotipos incluyen el 80 % del total de casos (EFSA, 2010).

En España, entre los años 2004 y 2005, el Laboratorio Nacional de Referencia de *Salmonella* y *Shigella* (LNRSSSE) recibió para su estudio 13.089 cepas de *Salmonella spp.* (no tifoideas) procedentes de muestras clínicas de origen humano. De éstas, 10.136 fueron cepas procedentes de casos aislados de salmonelosis o no reconocidas como pertenecientes a un brote, mientras que 2.301 fueron cepas aisladas de casos asociados a brotes de origen alimentario. En ambos casos los serotipos más frecuentes fueron también *S. Enteritidis* y *S. Typhimurium* (Echeita *et al.*, 2007).

Tanto en España como en el resto de Europa, el mayor número de casos se producen en niños de entre 0 y 4 años. Además, la distribución temporal de los casos es marcadamente estacional, con picos en los meses de verano, seguramente debido a la influencia de la temperatura y de los hábitos alimenticios.

3.2. Salmonelosis en el hombre: fuentes de infección. Papel de la carne de cerdo y sus derivados

Los huevos y la carne de pollo constituyen el origen principal de los casos de salmonelosis en el hombre. Sin embargo, durante los últimos años ha sido reconocida la importancia de la carne de cerdo como fuente de infección para el hombre (Maguire *et al.*, 1993; Wegener *et al.*, 1994; Schwartz, 1999; Fedorka-Cray & Wray, 2000; EFSA, 2010). Resulta difícil realizar una estimación exacta del número de casos de salmonelosis humana que se pueden atribuir al cerdo, aunque el progreso de las técnicas epidemiológicas permite determinar cada vez con mayor exactitud el origen de los casos humanos.

Diferentes trabajos han estimado que entre el 7 % y el 20 % de los casos de salmonelosis en la UE pueden estar asociados al consumo de productos de cerdo en el entorno de la Unión (Berends *et al.*, 1998; Frenzen *et al.*, 1999; Steinbach & Kroell, 1999). Hald & Wegener (1999) estimaron que en Dinamarca entre el 10 y el 15 % de los casos de salmonelosis en el hombre eran debidos al consumo de carne de cerdo o productos derivados, siendo esta estimación del 14 al 19 % en el caso de Holanda y del 18 al 23 % en Alemania. Igualmente en Holanda, comparando el número de casos producidos por un serotipo de *Salmonella* con su respectiva prevalencia en reservorios animales, se ha estimado que entre el 21% y el 26% de los casos pueden ser atribuidos al cerdo (Van Pelt *et al.*, 1999; Valkenburgh *et al.*, 2007). En Dinamarca, un modelo estadístico más complejo y que incluye datos relativos al consumo de cada tipo de alimento así como las características de éste y la virulencia de los diferentes serotipos implicados, estimó que, en el año 2004, el 9 % (del 7,1 % al 11,4%) de los casos de salmonelosis humana eran debidos al consumo de productos del cerdo (Hald *et al.*, 2004). En Estados Unidos, sin embargo, la estimación de estas cifras es algo más baja, entre el 6 y el 9 % (Frenzen *et al.*, 1999).

En España, no se dispone de datos que permitan estimar los casos de salmonelosis en el hombre atribuidos al cerdo; sin embargo, es importante destacar que también en nuestro país, los huevos, la carne de pollo y la carne de cerdo y sus derivados son los principales responsables de los brotes de salmonelosis.

3.3. Brotes de salmonelosis en el hombre asociados al consumo de productos del cerdo

Según el último informe de la EFSA correspondiente al año 2008, la carne de cerdo y sus derivados fueron los responsables del 7,1 % de los brotes de salmonelosis en la UE (Figura 3). Al igual que en años anteriores, *S. Typhimurium* fue el segundo serotipo más frecuentemente identificado (EFSA, 2010).

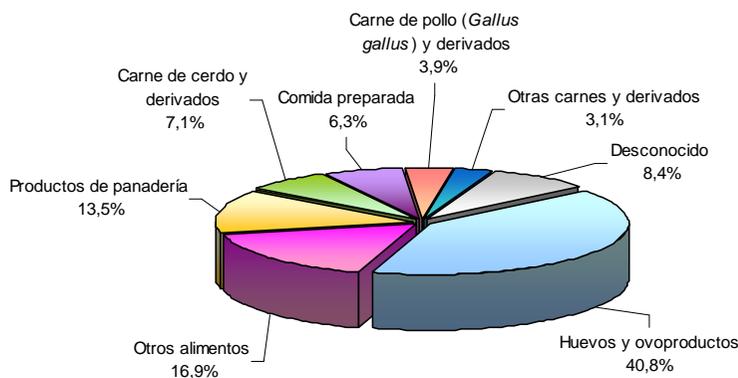


Figura 3. Distribución de los alimentos implicados en los brotes confirmados de salmonelosis en el hombre en la UE durante el año 2008. Fuente: EFSA, 2010.

En Francia, entre 1993 y 1995, se declararon dos brotes de salmonelosis en los que se aislaron *S. Brandenburg* y *S. Goldcoast* y que fueron ocasionados por el consumo de productos del cerdo (Desenclos *et al.*, 1996). En Dinamarca, en el año 1993, hubo un brote de salmonelosis que afectó a más de 500 personas causado por *S. Infantis* y que fue atribuido al consumo de productos derivados del cerdo que procedían de un mismo matadero (Wegener & Baggesen, 1996). La alarma social que causó este brote y el hecho de que cerca del 80 % de la carne de cerdo producida en Dinamarca sea destinada a exportación hicieron que este país se decidiera a implantar un programa de control obligatorio de salmonelosis porcina en las granjas de producción a partir de 1995.

En Alemania, en el verano de 2001 y entre Diciembre de 2004 y Marzo de 2005, se declararon dos brotes de salmonelosis en el hombre que fueron relacionados con el consumo de

cerdo. Los serotipos implicados fueron *S. München* (Buchholz *et al.*, 2005) y *S. Bovismorbificans* (Gilsdorf *et al.*, 2005), respectivamente.

Sin embargo, como ya hemos señalado el serotipo más frecuentemente identificado en los casos de salmonelosis en el hombre asociados al consumo de cerdo y productos derivados es *S. Typhimurium*. Berends *et al.* (1998) estimaron que el 50 % de los casos causados por este serotipo en el hombre estaba vinculado al consumo de productos del cerdo. Así, existe un número importante de brotes declarados de salmonelosis en el hombre causados por *S. Typhimurium* en los que se han visto implicados los productos cárnicos del cerdo como vehículos de la infección (Maguire *et al.*, 1993; Mølbak & Hald, 1997; Mølbak *et al.*, 1999; Tribe & Walker, 2000; Torpdahl *et al.*, 2006).

En noviembre-diciembre de 2008 un brote en el que estuvo implicado *S. Typhimurium* afectó a 3 países nórdicos (Dinamarca, Suecia y Noruega). Gracias a la utilización de la técnica MLVA se consiguió establecer la conexión entre los brotes de los diferentes países y atribuir el origen del mismo al consumo de productos derivados del cerdo provenientes de Dinamarca (Bruun *et al.*, 2009).

En España se ha relacionado el aislamiento de cepas de *S. Rissen*, *S. 4,5,12:i:-* y *S. Derby* de muestras clínicas de origen humano con el consumo de productos derivados del ganado porcino (Echeita *et al.*, 1999; Echeita *et al.*, 2005a; Valdezate *et al.*, 2005).

4. INFECCIONES POR *Salmonella* EN EL CERDO

Las infecciones por bacterias del género *Salmonella* en el ganado porcino pueden ser abordadas desde dos perspectivas, como problema clínico en estos animales y como problema de salud pública. Aunque como entidad clínica puede causar importantes pérdidas económicas en la producción porcina, hoy en día la salmonelosis porcina ha ganado importancia como un problema de salud pública.

4.1. Eliminación y transmisión

Tradicionalmente, la ruta fecal-oral ha sido señalada como la principal vía de entrada de *Salmonella* en el cerdo. No obstante, se ha demostrado la transmisión de la infección por vía respiratoria en varias especies, entre ellas el cerdo, a través de la inhalación de aerosoles o de

partículas de polvo contaminadas (Fedorka-Cray *et al.*, 1995; Proux *et al.*, 2001, Oliveira *et al.*, 2007). Varios estudios experimentales han comprobado el papel de esta vía respiratoria en la transmisión de la salmonelosis porcina y ha demostrado que tanto las tonsilas como los pulmones son órganos importantes para la invasión y la diseminación de la bacteria en estos animales (Gray *et al.*, 1996b; Proux *et al.*, 2001; Oliveira *et al.*, 2006; 2007). Particularmente, Fedorka-Cray *et al.* (1995) demostraron que pocas horas tras la infección por vía respiratoria, mediante aerosoles que contenían dosis elevadas de *S. Typhimurium* de cerdos esofagoectomizados, era posible aislar *Salmonella* del tracto digestivo y de los ganglios linfáticos adyacentes. Desde un punto de vista epidemiológico, la importancia de la vía aerógena es particularmente relevante si se tiene en cuenta que *Salmonella* puede sobrevivir largos periodos de tiempo en aerosoles (McDemid & Lever, 1996). En la actualidad, la mayoría de los autores coinciden en destacar la importancia de la vía respiratoria y el papel que juegan pulmones y tonsilas en la infección, al ser capaces, en muy poco tiempo, de diseminar la bacteria a los órganos internos. No obstante, se desconoce la relevancia de esta forma de transmisión en las granjas.

Por lo que respecta a la vía de infección fecal-oral se ha comprobado que las cepas de *Salmonella* que penetran por vía oral son capaces de alcanzar el colon y el recto en un período de entre 30 y 60 minutos (Hurd *et al.*, 2001b). La importancia de esta vía de infección radica en la gran cantidad de bacterias que se excretan a través de las heces, especialmente en la fase aguda de la infección. Se ha descrito que los cerdos pueden eliminar hasta 10^7 bacterias por gramo de heces en la fase aguda de la infección por *S. Typhimurium* (Gutzmann *et al.*, 1976). En infecciones experimentales realizadas con *S. Typhimurium* y *S. Choleraesuis* se ha encontrado que la cantidad de bacterias eliminadas en las heces es del orden de 10^5 UFC por gramo de heces en el tercer día postinoculación (Fedorka-Cray *et al.*, 1994; Gray *et al.*, 1996b). Según diferentes autores, esta eliminación fecal disminuye con el tiempo en intensidad hasta convertirse en una eliminación intermitente (Wood *et al.*, 1989; Nielsen *et al.*, 1995; Beloeil *et al.*, 2003). En los animales portadores, la eliminación puede ser tan baja como 50 UFC por gramo de heces (Wood & Rose, 1992; Sibley *et al.*, 2003).

Se desconoce la dosis mínima necesaria para reproducir la infección en condiciones naturales. Sin embargo, existen numerosos estudios que mediante infecciones experimentales han conseguido reproducir la infección empleando diferentes vías de inoculación (oral, intranasal o por inyección intraperitoneal). Dawe & Troutt (1976) consiguieron reproducir una enfermedad leve tras la inoculación de 10^6 UFC, aunque por lo general las dosis utilizadas en este tipo de estudios han sido superiores, en torno a 10^8 UFC (Gray *et al.*, 1995; 1996a; 1996b; Collazos, 2008). Loynachan & Harris (2005) concluyeron que dosis superiores a 10^3 UFC eran suficientes

para reproducir la infección en los cerdos, permitiendo aislar *Salmonella* tanto en tejidos relacionados con el tracto digestivo como en otros no relacionados.

En general, la gran facilidad de transmisión de la infección en condiciones naturales parece apuntar a que la dosis infectante es menor que en los modelos experimentales. Esta diferencia se debería a la existencia de posibles factores implicados en la transmisión natural que son difíciles de reproducir en modelos experimentales, entre los cuales se incluirían la exposición de manera repetida a pequeñas dosis y el incremento de la virulencia de *Salmonella* tras la infección del hospedador, lo cual permitiría el éxito de dosis bajas infectantes.

4.2. Patogenia de la infección

La naturaleza de la infección por *Salmonella spp.* está determinada por una serie de factores entre los que se encuentran la vía de transmisión, la dosis infectante, el serotipo implicado, la presencia y grado de inmunidad y el grado de resistencia del hospedador.

Cronológicamente, la patogenia de la salmonelosis puede dividirse en dos fases: una primera fase de localización intestinal y, en algunos casos, una segunda fase sistémica (**Figura 4**). Si la entrada se ha producido por vía oral, *Salmonella* debe hacer frente a una serie de condiciones adversas como son el pH ácido del estómago, las sales biliares, la microflora intestinal o el peristaltismo. Una vez superadas estas barreras, las salmonelas colonizan el tracto gastrointestinal adhiriéndose a las células epiteliales de la mucosa a través de las fimbrias (Dibb-Fuller *et al.*, 1999; Vimal *et al.*, 2000). Seguidamente, se produce la invasión celular regulada por los genes de la isla de patogenicidad SPI-1.

A través de un sistema de secreción tipo III, *Salmonella* es capaz de introducir en la célula hospedadora una serie de proteínas que van a reorganizar el citoesqueleto dando lugar a una endocitosis (Zhou & Galán, 2001). Como consecuencia de esta interacción, se concentra en la zona un elevado número de polimorfonucleares y se induce la producción de citoquinas proinflamatorias que van a provocar cambios que pueden afectar a la modulación de la secreción del cloro, contribuyendo directamente a la aparición de la diarrea (EcKmann *et al.*, 1997). La reacción inflamatoria trae como consecuencia un aumento de la permeabilidad vascular que provoca un edema de la mucosa así como una transmigración de células inflamatorias a la luz intestinal. Además, la respuesta inflamatoria, junto con la producción de toxinas, provoca daños en la superficie del epitelio intestinal, que pueden ir desde ulceración hasta destrucción de la

mucosa (Ekperigin & Nagaraja, 1998), facilitando la salida de fluidos extravasculares y, consecuentemente el cuadro clínico de diarrea (Zhang *et al.*, 2003)

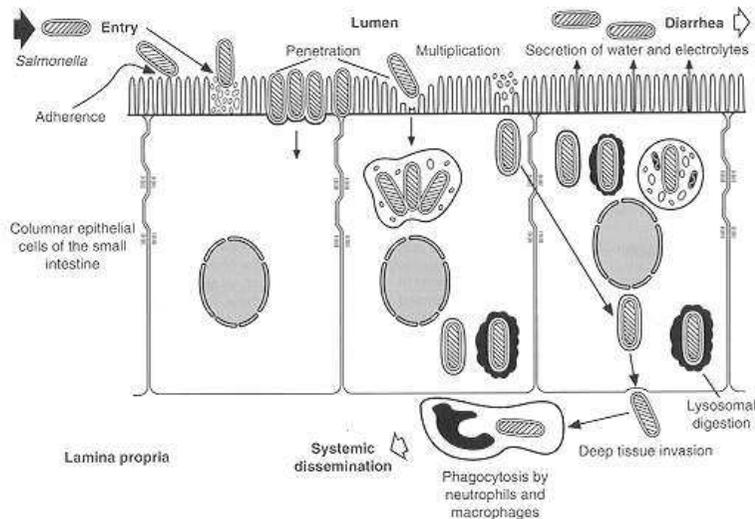


Figura 4. Esquema de la invasión de la mucosa intestinal por *Salmonella*. Fuente: Ralph A. Giannella, 1996.

La fase sistémica se inicia cuando *Salmonella* alcanza la lámina propia y es fagocitada por los macrófagos. La clave para el mantenimiento de esta infección se basa en la capacidad de *Salmonella* para sobrevivir y multiplicarse en el interior de los macrófagos. Este mecanismo está regulado por la isla de patogenicidad SPI-2, que permite la translocación de proteínas bacterianas a través de la membrana vacuolar al citoplasma de los macrófagos (Hensel, 2000). En el interior de los macrófagos, *Salmonella* logra alcanzar los ganglios linfáticos mesentéricos. En algunas ocasiones, cuando la infección la producen los serotipos más invasivos o cuando afecta a animales debilitados, *Salmonella* puede llegar a la circulación sanguínea y alcanzar así diferentes órganos internos, principalmente el hígado y el bazo, donde se localizan en elevadas concentraciones en las primeras fases de la infección (Barrow, 1999).

En concordancia con estos mecanismos, numerosos estudios basados en infecciones experimentales, principalmente con los serotipos Cholerasuis y Typhimurium, han descrito la presencia de *Salmonella*, además de en el tracto gastrointestinal (intestino y ganglios linfáticos mesentéricos) en diversos órganos como el bazo, el riñón, el pulmón, el corazón, el hígado, las

tonsilas y diferentes ganglios linfáticos (mesentéricos, pulmonares, inguinales, cervicales, etc.) (Wood *et al.*, 1989; Wood & Rose, 1992; Fedorka-Cray *et al.*, 1994; Nielsen *et al.*, 1995; Cote *et al.*, 2004; Loynachan *et al.*, 2004; Collazos, 2008). Sin embargo, no todos estos órganos tienen una misma importancia en la patogenia de la salmonelosis, siendo los tejidos más relevantes las tonsilas, el ciego, la porción caudal del íleon, el colon y los ganglios linfáticos mesentéricos, retrofaríngeos y mandibulares (Wood *et al.*, 1989; Wood & Rose, 1992).

4.3. Estados de portador

El estado de portador es el resultado de la capacidad de *Salmonella* para sobrevivir y multiplicarse en los macrófagos y de evadir la respuesta inmunitaria del hospedador (Haesebrouck *et al.*, 2004; Donné *et al.*, 2005).

Diversos estudios experimentales llevados a cabo en una gran variedad de hospedadores y con una amplia gama de serotipos de *Salmonella* han demostrado que esta bacteria puede persistir dando lugar a la aparición de animales portadores (Morgan *et al.*, 1987; Wood *et al.*, 1989; Sanchez *et al.*, 2002). El estado de portador se caracteriza por la ausencia de signos clínicos unido a la capacidad para transmitir la infección a animales receptivos. Los factores que intervienen en el desarrollo del estado de portador son entre otros el serotipo implicado, la dosis infectante, la vía de entrada y la edad del animal.

Wray & Sojka, (1977) distinguen tres tipos de portadores denominados activo, pasivo y latente. Los portadores activos son aquellos individuos que tras la resolución de la enfermedad siguen eliminando *Salmonella* en las heces durante períodos de tiempo más o menos largos en función del serotipo implicado. Por el contrario, los portadores pasivos eliminan la bacteria durante períodos de tiempo más limitados, ya que tras la infección existe una limitada o nula invasión de los ganglios linfáticos mesentéricos. Los portadores latentes son aquellos individuos en los que tras la resolución de la infección, no eliminan *Salmonella* en las heces, pero la bacteria se mantiene acantonada en diversos tejidos, especialmente en el tracto digestivo (intestino delgado e íleon), ganglios linfáticos mesentéricos y tonsilas (Wood *et al.*, 1989; Fedorka-Cray & Wray, 2000). Estos individuos pueden convertirse en eliminadores en cualquier momento en función de diferentes factores. En especial se ha descrito que el estrés puede promover la excreción de la bacteria e incluso la reactivación de la enfermedad.

Desde un punto de vista epidemiológico los portadores latentes son particularmente importantes y constituyen una de las principales fuentes de contaminación para las explotaciones.

Por otra parte, la eliminación que puede reactivarse como consecuencia del estrés durante el transporte y durante la espera antes del sacrificio favorece la contaminación de las canales así como la diseminación de la salmonelosis a otros cerdos (Berends *et al.*, 1996; Beloeil *et al.*, 2004).

4.4. Principales serotipos de *Salmonella* que infectan al cerdo

El cerdo es receptivo a la infección por un gran número de serotipos de *Salmonella*. En el estudio basal llevado a cabo en los países miembros de la UE con el fin de conocer la prevalencia de esta infección en cerdos de abasto se detectaron más de 80 serotipos diferentes en los ganglios linfáticos mesentéricos recogidos en los cerdos inmediatamente tras el sacrificio, siendo los más frecuentes Typhimurium (40 %), Derby (14,62 %) y Rissen (5,8 %) (EFSA, 2008a). Igualmente, en el estudio llevado a cabo en la UE con el fin de estimar la prevalencia de la infección en cerdas reproductoras se identificaron más de 50 serotipos diferentes en las heces, siendo los más frecuentes Derby (23,9 %), Typhimurium (17,9 %), London (6,4 %), Livingstone (5,4 %), Infantis (5 %) y Rissen (4,5 %) (EFSA, 2009b).

Desde un punto de vista clínico, los serotipos más relevantes para el ganado porcino son Cholerasuis y Typhimurium.

S. Cholerasuis es un serotipo particularmente adaptado al cerdo y se asocia a una presentación clínica septicémica. La infección cursa con fiebre, temperaturas superiores a los 41,7°C, inapetencia, letargia, cianosis en la parte distal de las extremidades, respiración superficial y tos húmeda. Estos signos clínicos aparecen a las 24-36 horas de la infección mientras que la diarrea, por lo general, no se presenta hasta 4-5 días después (Reed *et al.*, 1986). Suele afectar a cerdos de entre los 2 y 4 meses de edad, con una morbilidad variable, en torno al 10 %, y una mortalidad muy alta (Reed *et al.*, 1986; Wilcock & Schawrtz, 1992). También se ha descrito que puede provocar abortos en cerdas (Uzzau *et al.*, 2000).

Es importante señalar que, con excepción del Reino Unido (Davies *et al.*, 2004), apenas se han descrito aislamientos de *S. Cholerasuis* en Europa. En el estudio basal de prevalencia de salmonelosis en cerdos de cebo en la UE se identificaron un total de 10 aislados de *S. Cholerasuis* sobre un total de 2.600 (0,38 %) (EFSA, 2008a), mientras que en el estudio basal de prevalencia en cerdos reproductores no se identificó ningún aislado de este serotipo entre los 1.303 identificados (EFSA, 2009b). Por el contrario es bastante frecuente en EE.UU. donde tiene una importancia clínica destacable (Schawrtz *et al.*, 1999; Chiu *et al.*, 2004).

Por su parte, *S. Typhimurium* es el serotipo que más frecuentemente se asocia con las denominadas formas entéricas de la salmonelosis. El principal signo clínico es una diarrea acuosa verde-amarillenta, que se manifiesta a las 48 de la infección y que suele acompañarse de letargia, inapetencia y fiebre. Generalmente afecta a animales de entre 6 y 8 semanas y se resuelve al cabo de 7-10 días (Fedorka-Cray *et al.*, 1994). La mortalidad suele ser baja pero la morbilidad puede ser muy elevada (Wilcock & Schawrtz, 1992) y en ocasiones puede causar infecciones septicémicas (Fedorka-Cray *et al.*, 1994).

Como hemos indicado, *S. Typhimurium* es uno de los serotipos más frecuentemente identificados en muestras de origen porcino en Europa y también es el que habitualmente se asocia a brotes de enterocolitis en el cerdo. Sin embargo, es difícil determinar su papel real como agente etiológico de diarrea porque con frecuencia se aísla junto con otros enteropatógenos así como en animales sanos.

5. EPIDEMIOLOGÍA DE LAS INFECCIONES POR *Salmonella* EN LAS EXPLOTACIONES PORCINAS

La epidemiología de la salmonelosis porcina es muy compleja debido a los numerosos factores que se pueden encontrar asociados a la entrada y al mantenimiento de esta bacteria en las explotaciones porcinas. Entre ellos se cabe destacar la existencia de fuentes de infección muy diversas y de un amplio rango de hospedadores y vectores, a los que se suma la capacidad de *Salmonella* para persistir durante largos períodos de tiempo en las explotaciones y en los cerdos infectados.

5.1. Dinámica de la infección por *Salmonella* en las explotaciones porcinas

El conocimiento de las fuentes de infección y los mecanismos de transmisión de *Salmonella* dentro y entre los diferentes estratos de edad, así como la determinación de la prevalencia de la infección y de los principales serotipos presentes en cada uno de ellos es fundamental para entender la epidemiología de la enfermedad en las explotaciones porcinas.

Son muchos los estudios que describen diferencias en la prevalencia de *Salmonella* en función del grupo de edad en las granjas de cerdos. Estos estudios coinciden en destacar que la prevalencia bacteriológica de *Salmonella* es mayor en los lechones de transición y en los cerdos

de cebo que en los reproductores o en los lechones lactantes (Funk *et al.*, 2001b; Kranker *et al.*, 2003). Berends *et al.* (1996) describieron valores de prevalencia del 5 al 30 % en cerdas reproductoras, del 0 al 17 % en lechones destetados y valores más elevados, de entre el 30 % y el 100 % en los cerdos de cebo.

En cerdas reproductoras, los valores de seroprevalencia de esta infección suelen ser siempre muy elevados, con un 80 -100 % de animales seropositivos (Nollet *et al.*, 2005a). Sin embargo, el porcentaje de reproductores eliminadores de *Salmonella* es mucho más variable describiéndose, en algunos casos, valores de prevalencia considerables. Así, en EEUU, Davies *et al.* (1998) describieron en este grupo de animales un porcentaje de eliminadores relativamente moderado (18 %-22 %) mientras que Letellier *et al.* (1999) detectan una mayor proporción de animales positivos por bacteriología en las explotaciones de reproductores en comparación con las granjas de engorde.

Asimismo, en cerdas reproductoras se han descrito diferencias en los porcentajes de eliminación de *Salmonella* en función del momento del ciclo productivo en el que se encuentren. Algunos autores han descrito una mayor proporción de cerdas positivas durante la gestación en comparación con la lactación (Funk *et al.*, 2001b; Korsak *et al.*, 2003), probablemente debido a una mayor higiene en esta fase o a cambios en el tipo de dieta y la forma de administración de agua que están asociados al traslado de las cerdas a las salas de parto. Por el contrario, Nollet *et al.* (2005b) señalaron que el período en el que se observa un mayor porcentaje de cerdas eliminadoras es tras el destete, mientras que en la gestación y en la lactación las prevalencias detectadas son más bajas, inferiores al 10 %. Además, este mismo trabajo concluye que las cerdas con cinco partos o más eliminan salmonelas con menor frecuencia que las cerdas con menos partos.

La importancia de la infección por *Salmonella* en los módulos de reproducción radica en su posible transmisión a la descendencia y, consecuentemente, a los cerdos de cebo y a las canales. Por lo general, la prevalencia de la salmonelosis en lechones al destete suele ser relativamente baja, aunque podría estar subestimada debido a la técnica de muestreo utilizada en estos animales que está basada en hisopos rectales y , por ello, el diagnóstico tiene menor sensibilidad que cuando se recoge una mayor cantidad de heces (Funk *et al.*, 2000). Algunos autores sostienen la hipótesis de que a pesar que *Salmonella* se aísla en mayor o menor medida de cerdas y lechones, su importancia en la contaminación final del cebo es escasa. En este sentido, Berends *et al.* (1996) estimaron que sólo entre el 1 % y el 10 % de los casos en los que se aísla *Salmonella* en el cebo son debidos a las infecciones anteriores de los lechones y diversos estudios no han podido demostrar que lechones procedentes de cerdas positivas tengan un mayor riesgo de

eliminar salmonelas durante la fase de transición y engorde y, por el contrario, han sugerido que los anticuerpos maternos juegan un papel importante en la protección frente a la infección en estos animales (Funk *et al.*, 2001b; Kranker *et al.*, 2003; Nollet *et al.*, 2005a).

El uso del destete precoz, entre los 10 y los 21 días, junto al traslado de los lechones a un nuevo ambiente limpio ha sido propuesto por algunos autores como una medida eficaz para el control de esta infección en las granjas porcinas (Dahl *et al.*, 1997; Fedorka-Cray *et al.*, 1997a; Nietfeld *et al.*, 1998a).

Por otro lado, algunos autores señalan que los serotipos aislados en reproductores no suelen ser los mismos que se identifican en las fases de transición y engorde (Beloil *et al.*, 2003; Berends *et al.*, 1996; Davies *et al.*, 1998; Funk *et al.* 2001b). Algunos estudios han asociado la infección por estos serotipos, considerados como exóticos, en cerdas a la contaminación de la alimentación que estos animales reciben durante la fase de gestación (Kranker *et al.*, 2003). Por el contrario, otros autores proponen que las diferencias encontradas entre ambas poblaciones pueden deberse a errores de muestreo, a variaciones en la capacidad infectante de los diferentes serotipos o a las diferencias en la protección conferida por los anticuerpos maternos frente a la infección por diferentes serotipos de *Salmonella*. También se ha indicado que las limitaciones de los protocolos de aislamiento que habitualmente seleccionan una única colonia por muestra, podrían explicar, al menos parcialmente, las diferencias observadas puesto que se ha demostrado que es posible la infección y la eliminación simultánea de varios serotipos de *Salmonella* (Lee *et al.*, 1972; Williams *et al.*, 1981; Davies *et al.*, 1997a; O'Carroll *et al.*, 1999; Funk *et al.*, 2000;).

En contraposición, Nollet *et al.* (2005a) describieron similitudes entre el perfil genético de los serotipos aislados en las unidades de reproductores y el de los encontrados en las fases de transición y engorde. Sin embargo, no pudieron demostrar una transmisión directa de las cerdas a su descendencia, sugiriendo que había una transmisión indirecta, a través de los trabajadores y del ambiente de las instalaciones.

En lo que respecta a la fase de transición, en primer lugar se produce la desaparición de los anticuerpos maternos, entre la séptima y la octava semana (Berends *et al.*, 1996; Beloil *et al.*, 2003) y un claro incremento de la prevalencia de animales eliminadores. Kranker *et al.* (2003) describieron que transcurridas 3 ó 4 semanas tras el destete entre el 5 % y el 50 % de los cerdos son infectados por *Salmonella*, probablemente como consecuencia de la desaparición de los anticuerpos maternos, del contacto con nuevas fuentes de infección al mezclar lechones de diferentes camadas y del estrés asociado al destete causado por los cambios de alimentación y de alojamiento. Todos estos factores provocan un incremento de la eliminación de *Salmonella* favoreciendo, a su vez, la transmisión horizontal.

La transmisión durante la etapa de cebo es principalmente horizontal y entre las fuentes de infección más relevantes se encuentran vectores, fómites, alimentación y agua de bebida (Berends *et al.*, 1996). Para algunos autores la eliminación de *Salmonella* es particularmente importante durante la primera mitad de la fase de engorde (Berends *et al.*, 1996) mientras que para otros, tanto el momento de infección como la duración de la eliminación son variables y pueden producirse en cualquier momento durante el cebo (Kranker *et al.*, 2003; Beloeil *et al.*, 2004; Funk *et al.*, 2005). Generalmente en el cebo se produce la seroconversión de la gran mayoría de los cerdos, particularmente en el último tercio de esta fase (Berends *et al.*, 1996; Beloeil *et al.*, 2003).

Los lechones infectados procedentes de granjas de selección y multiplicación se han descrito como una importante vía de entrada de la infección por *Salmonella* en los cebaderos, especialmente para la introducción de serotipos como Typhimurium, Derby o Anatum (Bager, *et al.*, 1994; Letellier *et al.*, 1999). En consonancia con esta afirmación, Lo Fo Wong *et al.* (2004a) describieron que la prevalencia de la infección es superior en aquellos cebaderos que reciben animales de diferentes orígenes. Por el contrario, otros autores apuntan que la principal fuente de infección, durante las fases de transición y engorde, es la propia flora endémica de la explotación (Berends *et al.*, 1996).

5.2. Prevalencia de *Salmonella* en cerdos de cebo

Durante los últimos años son muchos los países que han realizado estudios para tratar de estimar la prevalencia de esta infección al final de la fase de cebo.

Estos estudios de prevalencia pueden realizarse a partir del examen microbiológico de las heces, del contenido de ciego o de los ganglios linfáticos mesentéricos, o bien por serología mediante el mix-LPS ELISA para la detección de anticuerpos específicos frente a los principales serogrupos de *Salmonella* (Nielsen *et al.*, 1995; van der Heijden *et al.*, 1998; van der Wolf *et al.*, 1999).

La prevalencia bacteriológica aporta información sobre la proporción de cerdos que están excretando activamente la bacteria (análisis de heces o de contenido del ciego) o son portadores (análisis de ganglios linfáticos mesentéricos), mientras que la serología indica la proporción de cerdos que han estado en contacto con la bacteria y no necesariamente sobre los que están infectados en el momento del análisis serológico.

Por otro lado, la bacteriología proporciona información adicional, necesaria para poder conocer los serogrupos y serotipos de *Salmonella* predominantes en cada área y determinar, consecuentemente, la sensibilidad de las pruebas serológicas.

La prevalencia bacteriológica de la salmonelosis puede determinarse a nivel de granja, empleando muestras de heces, o en el matadero, empleando muestras de contenido de ciego o de ganglios linfáticos mesentéricos, obteniéndose en cada caso resultados que tienen significados diferentes.

La recogida de muestras en el matadero tiene como ventajas la comodidad y la posibilidad de tomar diferentes muestras de un mismo animal (heces, ganglios linfáticos, contenido de ciego, etc.). Sin embargo, se ha demostrado que el porcentaje de individuos positivos a *Salmonella* obtenido en los cerdos tras su sacrificio en el matadero es muy superior al obtenido previamente en la granja (Williams & Newell, 1967; Hurd *et al.*, 2001c; 2002). Este hecho se ha atribuido principalmente al estrés asociado a factores como el transporte al matadero, que inducen la eliminación de *Salmonella* por parte de los portadores e incrementa la receptividad de los cerdos no infectados. Una vez que los cerdos llegan a matadero permanecen en los corrales de espera un período de tiempo variable, generalmente no superior a 6 u 8 horas, pero que puede superar las 12 horas. El ambiente contaminado de estos corrales de espera es una fuente importante de infección para los cerdos en los momentos previos al sacrificio (Swanenburg *et al.*, 2001). Diversos estudios experimentales han demostrado que en los cerdos expuestos a ambientes contaminados como los corrales de espera del matadero, pueden aislarse salmonelas de los ganglios linfáticos mesentéricos y del contenido del ciego y del colon entre dos y seis horas tras la infección oral (Fedorka-Cray *et al.*, 1995; Hurd *et al.*, 2001b; Morrow *et al.*, 2002). Por ello, un muestreo en matadero puede dar lugar a una sobreestimación del valor de prevalencia real de la infección por *Salmonella* en las granjas. Por el contrario, los estudios realizados a partir de heces en granjas pueden subestimar el porcentaje de cerdos que, siendo portadores, en el momento del muestreo no excretan la bacteria.

Existen una gran variedad de resultados sobre la prevalencia bacteriológica en las granjas en función de los autores, los países y las zonas. Así, en países como EEUU y Canadá se describen valores del 57,3 % y del 66,7 % de granjas positivas respectivamente (Rodríguez *et al.*, 2006; Rajic *et al.*, 2005) mientras que en países europeos como Holanda, Dinamarca, Irlanda e Italia la proporción de granjas con algún animal eliminador se han situado en valores del 23 %, 11,4 %, 51 % y 36,8 %, respectivamente (van der Wolf *et al.*, 1999; Christensen *et al.*, 2002; Rowe *et al.*, 2003; Ricci *et al.*, 2005). En Cataluña Mejía *et al.* (2006) describieron valores de un

28 % de explotaciones positivas mientras que Vidal (2005) detectaron el 46,2 % en Castilla y León.

La prevalencia de animales eliminadores en granjas de Cataluña fue del 2-3 % (Mejía *et al.*, 2006), muy próximo a los valores descritos en otros países europeos como Grecia o Dinamarca, donde la prevalencia individual fue del 1,4 % y 2,1%, respectivamente (Grafanakis *et al.*, 2001; Stege *et al.*, 2000). En otros países como EEUU o Canadá se han descrito valores más elevados, con un 4,9 % y 14,3 % de animales positivos por bacteriología, respectivamente (Bahnson *et al.*, 2006; Rajic *et al.*, 2005).

Es muy complicado establecer comparaciones entre estas estimaciones. Aparte de las diferencias geográficas propiamente dichas, existe una gran variabilidad entre las formas de producción de cada país. Es también muy importante recalcar que las estimaciones de prevalencia están afectadas en gran medida por las estrategias de muestreo, desde el diseño del estudio hasta el tamaño de la muestra, y los protocolos de aislamiento utilizados (Funk *et al.*, 2000; Hurd *et al.*, 2001a; Rajic *et al.*, 2005).

Funk *et al.* (2000) demostraron que existía un aumento de la sensibilidad del cultivo bacteriológico asociado al incremento en el volumen de muestra de heces. Así, con muestras de 1 gramo se obtenía una sensibilidad del 9 %, mientras que con muestras de 25 gramos esta sensibilidad se elevaba hasta el 78 %.

Igualmente, Davies *et al.* (2000b) describieron diferencias en la sensibilidad del cultivo bacteriológico en función de los diferentes protocolos de aislamiento utilizados. Por otro lado, Arnold *et al.* (2005) describieron que la sensibilidad del método microbiológico aumentaba cuando se utilizan mezclas de muestras de heces individuales.

También es importante tener en cuenta que los valores obtenidos en cada estudio en particular son indicativos de un período concreto. Se ha demostrado que el estatus de la infección por *Salmonella* en un grupo de granjas, en una explotación o un lote de animales puede variar ampliamente a lo largo del tiempo, por lo que un único muestreo mostraría solamente una instantánea de la situación (Funk *et al.*, 2001b; Lo Fo Wong *et al.*, 2004b; Rajic *et al.*, 2005).

Durante los últimos años, algunos países europeos como Dinamarca, el Reino Unido, Irlanda, Alemania u Holanda han puesto en marcha algún tipo programa de control de la salmonelosis porcina y por tanto, los resultados de estudios realizados en algunos de estos países europeos podrían no reflejar con total exactitud la situación actual en la que se encuentra la infección en sus sistemas de producción.

La seroprevalencia de la infección en los cerdos de cebo también varía mucho entre los diferentes estudios realizados. Se han descrito proporciones de granjas seropositivas a *Salmonella* del 47 %, 35,6 %, 19 %, 24 % o 77,3% en Dinamarca, Grecia, EEUU, Holanda o España (Mousing *et al.*, 1997; Grafanakis *et al.*, 2001; O'Connor *et al.*, 2006; van der Wolf *et al.*, 2001b; Mejía *et al.*, 2006). Los valores de seroprevalencia dentro de granja también varían ampliamente, desde valores bajos como el 3 % descrito en Grecia (Grafanakis *et al.*, 2001), medios como el 23 % en Dinamarca (Lo Fo Wong *et al.*, 2003) o elevados como los descritos por Mejía *et al.* (2006) en Cataluña, con más del 50 % de animales seropositivos en una elevada proporción de las explotaciones porcinas (26 %) o por Collazos (2008) en Castilla y León con un 26,4 % de explotaciones seropositivas en nivel 3, es decir, con más del 50 % de los animales seropositivos.

Al igual que hemos señalado para los estudios de prevalencia bacteriológica, también existen numerosos factores que pueden explicar las diferencias en los valores de seroprevalencia, como son el tipo de muestra analizada, el punto de corte, el tipo de ELISA o la edad de los animales.

En general, la determinación de anticuerpos a partir de muestras de jugo de carne tiene una menor sensibilidad en comparación con el suero. Sin embargo, a nivel práctico, la obtención e identificación de muestras de jugo de carne resulta mucho más sencilla y, por tanto, de más utilidad para estudios a gran escala (Mousing *et al.*, 1997; Nielsen *et al.*, 1998).

El tipo de prueba empleada también es un factor que puede hacer variar los resultados. Actualmente los ELISAs más utilizados detectan anticuerpos específicos contra los serogrupos B, CI y DI, responsables de la gran mayoría de las infecciones en el cerdo en los países europeos. En Holanda, van der Heijden *et al.* (1998) desarrollaron un Mix-ELISA que permitía detectar anticuerpos frente a un 89 % de los serotipos encontrados en las explotaciones porcinas (van der Wolf *et al.*, 1999). Sin embargo en nuestro país, en concreto en Cataluña, se ha descrito que un ELISA basado en la identificación de estos tres serogrupos sólo detectaría el 63,4 % de los aislamientos realizados en campo (Mejía *et al.*, 2006).

El punto de corte utilizado es uno de los factores que influye de forma más importante en los valores de seroprevalencia obtenidos. Cambiando este punto de corte se modifica la sensibilidad y la especificidad de la prueba. Así, se puede usar un punto de corte más estricto cuando lo importante sea la sensibilidad o por el contrario un punto de corte mayor cuando se pretenda dar una mayor importancia a la especificidad. Aunque Nielsen *et al.* (1995) determinaron un punto de corte para el Mix-ELISA del 10 % de DO, este valor se incrementa de forma notable cuando la técnica se emplea en programas de control de esta infección a gran escala (Mousing *et al.*, 1997).

Por último, otros factores que pueden influir en los resultados del ELISA son la edad de los animales y el momento de la infección. Durante las fases finales del engorde es cuando más frecuentes son las infecciones por *Salmonella*, existiendo por tanto un incremento en el número de animales seropositivos en estas edades (van der Wolf *et al.*, 2001a).

5.3. Principales medidas de control y factores de riesgo asociados a la infección por *Salmonella* en las explotaciones porcinas

Aunque *Salmonella* se detecta en toda la cadena de producción de alimentos de origen porcino, los países europeos le han dado un papel relevante al control de esta infección en la producción primaria, en las granjas, siguiendo el enfoque global de la seguridad alimentaria basado en la premisa "de la granja a la mesa". El objetivo de estos programas es la reducción de la prevalencia de la infección en los cerdos de matadero.

Un punto fundamental para el establecimiento de estos planes de control en granja es la identificación de posibles factores de riesgo asociados a la introducción y la diseminación de la *Salmonella* en las explotaciones. A este respecto, existen diversos estudios dirigidos a la identificación de estos factores de riesgo y en base a los cuales se han propuesto diversas estrategias y medidas incluidas en los programas de control.

No existe una única estrategia de control aplicable a todas las situaciones, sino que las estrategias deben basarse en una combinación de medidas eficaces y que sean prácticamente realizables y económicamente factibles en función de cada granja y de los diferentes sistemas de producción utilizados en diferentes empresas, regiones o países (Lo Fo Wong *et al.*, 2004a).

En general, las medidas de control pueden estar encaminadas a prevenir la entrada de *Salmonella* en la granja (monitorización de la entrada de animales nuevos en la explotación, control del pienso, vectores y fómites, etc.), a limitar la diseminación de *Salmonella* dentro de la granja (sistemas de manejo todo dentro-todo fuera, duración del vaciado sanitario, limpieza y desinfección, control de vectores y, en algún caso, identificación y eliminación de cerdos positivos) o a incrementar la resistencia de los cerdos a la infección (probióticos, prebióticos, vacunas, acidificantes, etc.).

5.3.1. Animales infectados

Las explotaciones porcinas no son sistemas cerrados sino que están en continuo contacto con el exterior y hay muchos factores externos que pueden influir en la introducción de

Salmonella en la granja. Hay mucha bibliografía que señala a la entrada de cerdos como una de las principales vías de introducción de *Salmonella* en las explotaciones porcinas (Berends *et al.*, 1996)

La importancia de estos cerdos infectados, incluyendo los animales portadores, en la introducción de la salmonelosis en una explotación es particularmente relevante cuando se trata de cerdas de reposición, especialmente en las explotaciones de ciclo cerrado donde las fases de producción de lechones y la fase de engorde están en la misma localización.

Diversos autores han descrito elevados valores de prevalencia de *Salmonella* en las cerdas de reposición y su importancia en el mantenimiento de la infección en la granja (Davies *et al.*, 1998; Davies *et al.*, 2000a; Letellier *et al.*, 1999).

Entre las medidas de control que pueden adoptarse a este nivel estarían el empleo de reposición procedente solo de granjas con estatus sanitario igual o superior al de la explotación de destino o la utilización de reposición de la propia explotación, la monitorización de los animales reproductores que entran en la explotación y el establecimiento de sistemas de adaptación o cuarentena adecuados. Algunos países, como Suecia o Dinamarca, han incluido la monitorización de los reproductores de reposición en sus programas nacionales de control (Wierup, 1997; Mousing *et al.*, 1997).

También se ha descrito que la introducción de lechones de múltiples orígenes a las unidades de cebo constituye un importante factor de riesgo en la salmonelosis porcina. En un estudio realizado en 359 granjas de diferentes países europeos Lo Fo Wong *et al.* (2004a) describieron que la introducción de cerdos provenientes de más de tres orígenes diferentes estaba asociada a una mayor seroprevalencia de la infección en la explotación. Por tanto, una posible medida de control para este tipo de explotaciones sería minimizar el número de orígenes de los lechones.

5.3.2. Alimentación

La alimentación juega un doble papel en la epidemiología de esta infección en las explotaciones porcinas. Por un lado, el pienso es una posible vía de entrada de la bacteria en la explotación y, por otro, la alimentación puede ser utilizada como una herramienta para controlar su transmisión, ya que determinadas prácticas de alimentación afectan de manera beneficiosa al ecosistema microbiológico del sistema gastro-intestinal de los cerdos.

5.3.2.1. La alimentación como fuente de infección de *Salmonella* en las granjas porcinas

La alimentación ha sido descrita como una importante fuente de infección de *Salmonella* en la granjas porcinas (Schwartz, 1999) y algunos autores sostienen que existe un riesgo, variable pero siempre presente, de exposición a *Salmonella* a través del pienso (Edel *et al.*, 1974; Fedorka-Cray *et al.*, 1997b).

En países con elevadas prevalencias de *Salmonella* es complicado establecer el papel que desempeña la alimentación como fuente de infección, siendo necesarios exhaustivos estudios epidemiológicos ya que es difícil excluir otras fuentes. Sin embargo, en países con bajas prevalencias, la alimentación es considerada una de las fuentes de infección de mayor relevancia en ganado porcino principalmente debido a su capacidad potencial para llegar a un gran número de explotaciones. Recientemente en Suecia, un país con una prevalencia de *Salmonella* casi nula, se declaró un brote causado por *S. Cubana* que afectó a 49 explotaciones porcinas que recibieron pienso contaminado proveniente de una misma planta de producción (Österberg *et al.*, 2006)

En un informe realizado por la EFSA se estimó que en el año 2005, en la UE, la proporción de materias primas destinadas a la alimentación animal de origen vegetal contaminadas con *Salmonella* oscilaba entre 0 % y el 6,7 %. De este porcentaje, entre un 0 % y 3,3 % correspondió a grano de cereal y entre un 0,4 % y 6,7 % a oleaginosas. Estos resultados indican que las oleaginosas como la soja se asocian a mayores niveles de contaminación por *Salmonella* que el grano de cereal. Además, en este mismo informe se estimó la proporción de materias primas de origen animal contaminadas con *Salmonella*. Mientras que para la harina de pescado los porcentajes fueron muy bajos (0-0,8 %) para las harinas de carne los porcentajes de aislamiento de *Salmonella* oscilaron entre el 0 y el 3 % para el conjunto de la UE, excepto para España, donde la proporción de muestras positivas fue del 33,3 % (EFSA, 2006).

En cuanto a la estimación de la proporción de piensos de cerdos (producto final) contaminados por *Salmonella* en la UE, el porcentaje de positivos fue bastante bajo, entre el 0 % y el 1,7 %. No obstante, estos resultados deben interpretarse con precaución debido a la limitada representatividad de los muestreos (EFSA, 2006).

En general, durante los últimos años se ha observado una disminución en los niveles de contaminación por *Salmonella* en los piensos comerciales. Este hecho podría estar asociado a la aplicación de nuevos sistemas de descontaminación del pienso, tanto físicos como químicos, así como a la prohibición del uso de proteína animal en la alimentación animal.

Sin embargo, la ausencia de *Salmonella* en el pienso a la salida de fábrica de pienso no permite asegurar que éste llegue a los animales libre de *Salmonella*. Diversos autores han descrito niveles de contaminación relativamente altos en el pienso cuando éste se muestrea en la propia granja. Así, Lo Fo Wong *et al.* (2004a), en un estudio realizado en varios países europeos, detectaron la presencia de *Salmonella* en el alimento en el 17,6 % de las explotaciones muestreadas mientras que Harris *et al.* (1997) identificaron la bacteria en el 46,7 % de un total de 30 explotaciones muestreadas.

Entre los principales puntos críticos para la recontaminación del pienso se encuentran el almacenamiento en la propia fábrica, debido a posibles condensaciones y contaminaciones por pájaros o roedores (Davies & Wray, 1997) y el transporte (Fedorka-Cray *et al.*, 1997b) por lo que la aplicación de medidas como una adecuada limpieza y desinfección de los camiones entre cada transporte, especialmente si previamente se han transportado materias primas, debería garantizar la higiene microbiológica del pienso suministrado a la granja. Por último, el pienso puede contaminarse por *Salmonella* durante su posterior almacenamiento y distribución en la granja (Berends *et al.*, 1996), principalmente debido a deficiencias en el almacenamiento, como silos en los que las tapas se dejan abiertas o en los que no se realiza de forma adecuada la limpieza y desinfección entre ciclos de producción. Por todo ello, es necesario mantener unas buenas prácticas de higiene, de control de vectores, un transporte y almacenamiento lo más hermético posible y, si es necesario, utilizar aditivos que dificulten el crecimiento de patógenos.

A pesar de todo lo anteriormente expuesto, es importante destacar que el papel que juega el alimento contaminado en la epidemiología de la salmonelosis porcina no está claramente determinado. Aunque el pienso pueda ser una fuente de infección, la mayoría de los trabajos coinciden en señalar que los serotipos aislados en materias primas o en el pienso comercial generalmente no se corresponden con los serotipos más frecuentemente aislados en el ganado porcino (Berends *et al.*, 1996; Harris *et al.*, 1997; Mousing *et al.*, 1997; Funk *et al.*, 2001b; Lo Fo Wong *et al.*, 2004b).

En un informe realizado por la EFSA en el año 2005 se detallan los serotipos aislados tanto de materias primas como de piensos compuestos y ambos varían ampliamente de un país a otro, probablemente debido a diferencias en las estrategias de muestreo y en el tipo de materias primas o piensos comerciales analizados. En la **Tabla 4** se recogen los diez serotipos más frecuentemente aislados.

S. Typhimurium y *S. Enteritidis*, los serotipos más frecuentemente aislados en el hombre y en los animales domésticos ocupan el quinto y el noveno lugar, respectivamente, mientras que *S. Infantis* y *S. Agona*, que también están entre los diez serotipos más frecuentemente aislados en

el hombre y los animales, se encuentran igualmente entre los diez más frecuentemente aislados en los piensos y materias primas. Sin embargo, el resto de serotipos encontrados no se encuentran entre los más frecuentemente aislados en el hombre o en la carne de cerdo o pollo (EFSA, 2006).

Tabla 4. Distribución de los 10 serotipos de *Salmonella* más frecuentemente aislados en alimentación animal (materias primas y piensos compuestos) en algunos de Estados Miembros de la UE (con más de 20 aislados). (EFSA, 2006)

País	Serotipos aislados	<i>S. Livingstone</i>	<i>S. Senftenberg</i>	<i>S. Montevideo</i>	<i>S. Infantis</i>	<i>S. Typhimurium</i>	<i>S. Mbandaka</i>	<i>S. Tennessee</i>	<i>S. Agona</i>	<i>S. Bredeney</i>	<i>S. Enteritidis</i>	Otros serotipos
Austria	24	-	4	79	4	-	-	4	8	-	-	-
Dinamarca	72	40	-	32	10	0	-	-	-	-	0	18
Alemania	20	-	-	-	-	95	-	-	-	-	5	-
Grecia	30	-	-	-	-	7	10	-	3	47	-	33
Italia	23	39	-	4	-	4	13	-	-	-	4	35
Letonia	25	-	4	12	4	0	-	24	-	-	4	52
Holanda	29	17	31	-	-	-	24	-	3	-	3	21
Noruega	40	-	43	-	3	10	20	3	5	-	0	18
Eslovaquia	51	-	-	-	47	4	-	2	4	-	20	24
Suecia	83	10	7	-	10	5	10	19	6	-	-	34

En este sentido, la frecuencia de detección de *S. Enteritidis* en pienso de avicultura es muy baja y de igual manera prácticamente nunca se aísla *S. Typhimurium* en la monitorización de materias primas y pienso en producción porcina. Por tanto, la prevalencia de *Salmonella* en granjas no muestra una relación directa con la presencia de *Salmonella* en el pienso. Sin embargo, esto no significa que la presencia de *Salmonella* en la alimentación animal no pueda ser relevante en algún caso, porque puede ser el origen de la entrada en la cadena de producción de alimentos de nuevos serotipos potencialmente patógenos para los animales y/o las personas.

Por todo ello, durante años se han realizado considerables esfuerzos para limitar la presencia de *Salmonella* en la alimentación animal. Häggblom (1994a; 1994b) describe una serie de principios básicos para el control de *Salmonella* en los piensos:

1. La industria solamente debería de trabajar con materias primas libres de *Salmonella* (materias primas sometidas a control microbiológico para detección de la presencia de *Salmonella*).
2. Instauración de tratamientos térmicos. Tal y como describió Edel *et al.* (1970) el tratamiento por calor en el proceso de granulación del pienso reduce la contaminación por *Salmonella* de manera eficaz. Sin embargo, este tratamiento implica ciertos riesgos como es una posible condensación del agua libre, debido a un enfriamiento inadecuado, lo que crea condiciones favorables para el crecimiento de *Salmonella*. La recontaminación del pienso higienizado puede producirse también por el contacto con materias primas contaminadas o durante el proceso de enfriamiento, por entrada de aire contaminado ya que *Salmonella* puede estar presente en las partículas de polvo del ambiente exterior. Por tanto, es importante que el aire del enfriador no provenga del lugar de descarga de materias primas y que tanto el transporte como las rutas que sigue el pienso higienizado no sean las mismas que siguen las materias primas o el pienso sin higienizar.
3. Instauración de sistemas basados en la aplicación de análisis de peligros y puntos de control críticos (APPCC) desde la recepción de las materias primas hasta el consumo del pienso por los animales para garantizar la ausencia de *Salmonella* en toda la línea de producción. Debe adoptarse un sistema de tolerancia cero para la contaminación por *Salmonella*.
4. Desarrollo de protocolos de limpieza y desinfección eficaces en el caso de detección de contaminación por *Salmonella* en el alimento (Sternberg Lewerin *et al.*, 2005).

5.3.2.2. La alimentación como medida de control de la salmonelosis porcina

Independientemente de la calidad microbiológica del pienso, determinadas prácticas de alimentación juegan un papel importante en el control de *Salmonella* en las explotaciones porcinas por los efectos beneficiosos que producen sobre el equilibrio del ecosistema intestinal del cerdo. A continuación se detallan diferentes prácticas de alimentación cuya eficacia está descrita y que pueden ser una parte importante en los programas de control de salmonelosis porcina a nivel de explotación.

a) Tamaño de las partículas del pienso

El granulado del pienso, que conlleva un tratamiento térmico, ha sido recomendado durante muchos años como una medida eficaz para el control de *Salmonella* estos piensos (Edel *et al.*, 1970). No obstante, hay muchos estudios recientes en los que se asocia claramente la utilización de pienso granulado con un aumento de la prevalencia de *Salmonella* en explotaciones

porcinas (Jørgensen *et al.*, 1999; Kjeldsen & Dahl, 1999; Kranker *et al.*, 2001; Leontides *et al.*, 2003; Lo Fo Wong *et al.*, 2004a; Rajic *et al.*, 2007; Hautekiet *et al.*, 2008).

Además, se ha demostrado que la administración de pienso en harina o con un tamaño de partícula grosera (>3 mm) es eficaz para disminuir la prevalencia de *Salmonella* en el ganado porcino debido a que este tipo de alimentación origina modificaciones en el ecosistema intestinal que dificultan la multiplicación de *Salmonella* en el tracto intestinal (Jørgensen *et al.*, 1999; Kjeldsen & Dahl, 1999; Jørgensen *et al.*, 2001; Mikkelsen *et al.*, 2004; Hansen, 2004).

Kjeldsen & Dahl, (1999) describieron que en la alimentación con partículas groseras o en harina, parte de los carbohidratos no son digeridos en el estómago y pasan a ser fermentados en el intestino, dando lugar a la formación de ácidos grasos volátiles que crean un ambiente desfavorable para la multiplicación de *Salmonella*. Otros estudios señalan que este tipo de alimentación favorece el crecimiento de bacterias ácido lácticas y, por tanto, produce un aumento en la concentración de ácidos orgánicos que van a contribuir a la reducción del número de enterobacterias en el intestino (Jørgensen *et al.*, 1999; Mikkelsen *et al.*, 2004). Además, la administración de alimentación grosera tiene otras ventajas como son la disminución de procesos diarreicos y un efecto protector contra las úlceras gástricas. Su principal inconveniente es que origina una disminución de los parámetros productivos, principalmente del índice de conversión, debido a la menor digestibilidad del pienso (Mikkelsen *et al.*, 2004).

b) Alimentación líquida fermentada

Diferentes estudios han demostrado que la utilización de una dieta líquida y en particular de alimentación líquida fermentada, disminuye el riesgo de infección por *Salmonella* en las explotaciones porcinas (Davies *et al.*, 1997a; van der Wolf *et al.*, 1999; van der Wolf *et al.*, 2001a; Beloeil *et al.*, 2004; Lo fo Wong *et al.*, 2004a; Farzan *et al.*, 2006).

La alimentación líquida consiste en una mezcla de pienso compuesto con agua o bien pienso compuesto con subproductos líquidos procedentes de la industria alimentaria, como puede ser el suero de quesería. Esta mezcla puede administrarse recién preparada o bien almacenarse en tanques donde, en las condiciones adecuadas, se produce una fermentación natural debido a la presencia de bacterias lácticas, especialmente abundantes en algunos subproductos, que producen ácido láctico y acético (Mikkelsen & Jensen, 1997).

Estos ácidos, en combinación con la disminución del pH en el tracto intestinal dan como resultado un ambiente desfavorable para el crecimiento de bacterias enteropatógenas (van der Wolf *et al.*, 2001a; Lo Fo Wong *et al.*, 2002; van Winsen *et al.*, 2002). En este sentido, existen

trabajos que demuestran que el uso de alimentación líquida fermentada a base de lactosueros fomenta el desarrollo de bacterias lácticas a la vez que disminuye la presencia de enteropatógenos, entre ellos *Salmonella*, tanto en el sistema de distribución del alimento (Geary *et al.*, 1996; Russell *et al.*, 1998) como en el tracto digestivo de los cerdos (van Winsen *et al.*, 2001b; 2002).

Entre los efectos beneficiosos de este tipo de dieta están el mantenimiento en buen estado de la estructura de las vellosidades intestinales (Deprez *et al.*, 1987) y el aumento de la acidez y de la flora láctica que ayudan a controlar la flora patógena (Jensen & Mikkelsen, 1998; Ewing & Cole, 1994). Estos efectos se traducen además en una mejora del crecimiento y del índice de conversión de los cerdos.

Dependiendo de su concentración en el alimento, el ácido láctico puede tener efecto bacteriostático o bactericida sobre *Salmonella*. A concentraciones de 70 nM actúa como bacteriostático, mientras que a concentraciones superiores a 100 nM puede actuar como bactericida (Brooks, 2003). En este sentido, Van Winsen *et al.* (1997) demostraron que determinadas bacterias ácido lácticas presentes en el alimento líquido fermentado, en particular *Lactobacillus plantarum*, tienen un efecto bacteriostático sobre *S. Typhimurium* al comienzo del proceso de fermentación, que se transforma en bactericida transcurridas dos horas del inicio del mismo.

El principal inconveniente de la alimentación líquida fermentada es que exige una importante inversión inicial para la instalación del sistema que debe ser manejado por mano de obra especializada y que necesita controles periódicos que aseguren una óptima fermentación del alimento. A este hecho, hay que sumarle que habitualmente la alimentación líquida va ligada a la disponibilidad de subproductos de la industria alimentaria, aunque puede realizarse solo con agua. No obstante, a largo plazo la instalación de estos sistemas de alimentación es rentable por la mejora que se consigue en el índice de conversión, y especialmente en explotaciones con un tamaño considerable y situadas en zonas geográficas con disponibilidad de subproductos.

Los sistemas de alimentación líquida en explotaciones porcinas están aún poco implantados en España aunque los importantes cambios estructurales sufridos durante las últimas dos décadas en este sector, hacen viable un incremento de su uso y muy especialmente en el cerdo ibérico, donde se consiguen unas mejoras muy notables en los índices de conversión.

c) Suplementación con ácidos orgánicos

La administración de ácidos orgánicos a través de la dieta puede ser una alternativa a la utilización de la alimentación líquida fermentada. Se ha demostrado que la adición de estos ácidos

orgánicos, tanto a través del pienso (Wingstrand *et al.*, 1997; Van Winsen *et al.*, 2001b) como del agua de bebida (Van der Wolf *et al.*, 2001a), tiene un claro efecto beneficioso de reducción de la infección por *Salmonella* en las explotaciones porcinas. Sin embargo, es importante señalar que el efecto de estos ácidos en granjas porcinas es difícil de establecer, particularmente en estudio transversales, ya que suelen utilizarse como medida preventiva y terapéutica frente a posibles infecciones por *E. coli* y *Salmonella* (Lo Fo Wong *et al.*, 2004a).

Su efecto beneficioso depende del tipo de ácido utilizado, de la dosis y de las pautas de administración. Para su uso como agentes conservantes, es decir, para inhibir el crecimiento de hongos y bacterias en las materias primas y en los piensos, son suficientes niveles de acidificación próximos al 0,3 %, mientras que para asegurar que estos ácidos lleguen al intestino y que ejerzan su efecto en él se necesitan concentraciones superiores en el alimento. Jorgensen *et al.* (2001) describieron que se producía una disminución de la excreción fecal de *Salmonella* y se mejoraban los parámetros productivos con concentraciones del 2,8 % de ácido láctico en la alimentación. Por otro lado, Creus *et al.* (2007) demostraron que dietas suplementadas con concentraciones de ácido fórmico al 0,8 % o bien, dietas suplementadas con una mezcla de ácido láctico y fórmico a niveles del 0,4 % cada uno, reducían la seroprevalencia de *Salmonella* en las explotaciones porcinas en comparación con dietas sin acidificantes.

La capacidad antimicrobiana de los ácidos reside en dos mecanismos diferentes. Por un lado, producen un descenso del pH en el intestino y, por otro, la forma no disociada del ácido atraviesa la membrana del patógeno y al disociarse intracelularmente, altera el gradiente de protones e inhibe los sistemas enzimáticos necesarios para la síntesis de proteína microbiana y para el transporte de nutrientes (Roth, 2000; Wilson *et al.*, 2003)

Los principales ácidos orgánicos utilizados en este sentido son el fórmico, el propiónico, el butírico, el láctico y el acético. Estos ácidos se caracterizan por tener un pKa que se sitúa entre 3 y 5, es decir valores próximos al pH del estómago y de la parte proximal del intestino delgado, por lo que la mayor parte de la molécula del ácido cuando llega al intestino se encuentra en forma no disociada (Östling & Lindgren, 1993).

Algunos ácidos se administran en forma de sales de sodio, potasio o calcio. En relación con los ácidos libres tienen la ventaja de ser más manejables, generalmente inodoros, menos volátiles y menos corrosivos. Otro efecto positivo de este tipo de administración es que la molécula se mantiene prácticamente intacta a su paso por el estómago liberándose posteriormente buena parte del ácido a nivel de duodeno.

El principal inconveniente que presenta la utilización de ácidos orgánicos es que cuando se administran a través del agua de bebida se puede producir obturación y corrosión de la línea de bebederos. Otra desventaja que se ha señalado para esta práctica es que puede favorecer la presentación de úlceras en los animales.

d) Probióticos

Según la FAO, por probióticos se entiende aquellos microorganismos vivos que cuando son administrados en un número adecuado confieren al hospedador beneficios para su salud (FAO/WHO, 2001).

Se ha descrito que los probióticos juegan un papel muy importante en la fisiología del aparato digestivo y del sistema inmunitario y que pueden ser empleados para el control y la prevención de enfermedades infecciosas tanto en el hombre como en los animales. La utilización de los probióticos ha cobrado especial importancia en producción animal tras la prohibición de antibióticos como promotores del crecimiento impuesta en la UE (Reglamento (CE) 2821/98).

Entre los microorganismos más frecuentemente utilizados por sus propiedades probióticas están las denominadas bacterias ácido lácticas. Numerosos trabajos han demostrado la capacidad de estas bacterias para inhibir distintos patógenos, entre ellos *Salmonella*. Esta capacidad de inhibición se basa fundamentalmente en el desplazamiento de los microorganismos patógenos mediante exclusión competitiva, gracias a la creación de un ambiente fisiológicamente restrictivo para estos patógenos mediante distintos mecanismos, como son el incremento de la concentración de ácidos grasos volátiles de cadena corta (Prohaszka & Baron, 1983), la competición por los receptores de la mucosa intestinal (Collins & Gibson, 1999), la producción de sustancias antimicrobianas como las bacteriocinas (Jack *et al.*, 1995), la competición por los nutrientes disponibles y la mejora de la salud intestinal asociada a la producción, por parte de la flora láctica, de vitaminas que favorecen el desarrollo y funcionalidad del epitelio (Collins & Gibson, 1999).

La utilidad de los probióticos ha sido ampliamente demostrada en avicultura. Diversos autores han demostrado que la administración de una mezcla de bacterias procedentes del intestino de aves adultas sanas confería protección frente *Salmonella* en pollitos (Nurmi & Rantala, 1973; Goren *et al.*, 1984; Blankenship *et al.*, 1993). Los beneficios aportados por esta práctica en avicultura han propiciado que se incluya dentro de los programas de control de la salmonelosis.

En el ganado porcino, aunque en menor medida, también se han desarrollado y probado probióticos. En algunos estudios, se ha demostrado que la incorporación de mezclas bacterianas

en la dieta se asocia a una reducción de la colonización por *Salmonella* y *E. coli* (Anderson *et al.*, 1999; Fedorka-Cray *et al.*, 1999; Harvey *et al.*, 2002; Genovese *et al.*, 2000; 2003). Más recientemente, se ha descrito que la utilización de una mezcla de cuatro bacterias ácido lácticas (*Lactobacillus murinus*, *Lactobacillus salivarius* subsp. *salivarius*, *Lactobacillus pentosus* y *Pediococcus pentosaceus*) reduce la colonización y eliminación en las heces de *S. Typhimurium* (Casey *et al.*, 2007). Asimismo, Collazos (2008) demostró que la administración de una mezcla probiótica fermentada constituida por *Lactobacillus reuteri*, *Lactobacillus delbrueckii*, *Lactobacillus animalis*, *Lactobacillus murinis* y *Lactobacillus ruminis* a lechones destetados producía una reducción de los signos clínicos tras las infección por *S. Typhimurium* y limitaba la eliminación de *Salmonella* en las heces así como la invasión de distintos órganos internos.

La UE ha regulado este tipo de aditivos en el pienso (Reglamento (CE) 1831/2003) con el objeto de asegurar su inocuidad para los animales de destino y los consumidores, ya que uno de sus principales inconvenientes es la posible transmisión de resistencias antimicrobianas. En concreto, se ha señalado a algunos enterococos como responsables de la transmisión de resistencias a la vancomicina.

e) Prebióticos

El efecto positivo de los prebióticos puede potenciarse mediante la utilización en la dieta de prebióticos que, básicamente, consisten en carbohidratos que no son digeridos por los animales, pero que son metabolizados por la microbiota intestinal (W

alker & Duffy, 1998; Steer *et al.*, 2000). Entre los prebióticos más utilizados se encuentran los fructooligosacáridos (FOS), oligosacáridos de la serie de la rafinosa que son utilizados metabólicamente de forma selectiva por un amplio rango de bacterias intestinales beneficiosas y no por la flora patógena.

Por otra parte, los prebióticos pueden administrarse con probióticos de manera que ambos tengan un efecto sinérgico, ya que el prebiótico puede ser un sustrato específico para la multiplicación del probiótico (Collins & Gibson, 1999; Schrezenmeir & De Vrese, 2001).

En avicultura se ha probado la eficacia de la combinación de FOS con probióticos en la reducción de la colonización por *Salmonella* (Bailey *et al.*, 1991) mientras que, en ganado porcino, Letellier *et al.* (1999) no observaron ningún efecto sobre la presencia de *Salmonella* cuando utilizaron una mezcla de FOS con un probiótico comercial en cerdos aunque si pudieron demostrar la existencia de cambios evidentes en la flora intestinal. Probablemente, el largo ciclo productivo del cerdo, los importantes cambios fisiológicos que ocurren durante el destete y la

importancia de la infección en las fases finales del cebo puedan tener como consecuencia una menor utilidad de estos métodos en el ganado porcino en comparación con la avicultura.

5.3.3. Medidas de bioseguridad

5.3.3.1. Control de vectores de transmisión de *Salmonella*

Además de la introducción de *Salmonella* en las explotaciones porcinas a través de nuevos animales de reposición y del alimento contaminado, existen otras vías que pueden participar en la introducción y/o diseminación de salmonelosis en las granjas, como son la presencia roedores, aves, insectos y de animales domésticos como gatos o perros, que pueden actuar como reservorios y vectores de *Salmonella* (Davies *et al.*, 1997; Murray, 2000).

Algunos estudios han relacionado la presencia de gatos en las granjas con una menor prevalencia de *Salmonella* lo que se atribuye al papel del gato como predador de roedores y pájaros que actúan como importantes reservorios de la bacteria (Veling *et al.*, 2002; Nollet *et al.*, 2004). Por el contrario, otros autores han relacionado la presencia de gatos en las explotaciones con la infección por *Salmonella* (Evans & Davies, 1996; Funk *et al.*, 2001a; Barber *et al.*, 2002).

Las moscas también pueden actuar como vectores mecánicos en la diseminación de *Salmonella* en las granjas. En explotaciones con elevadas prevalencias de salmonelosis se ha aislado la bacteria en muestras de moscas (Morse & Duncan, 1974; Khalil *et al.*, 1994). Letellier *et al.*, (1999).

Los ratones y las ratas pueden estar infectados con *Salmonella*. Se han detectado concentraciones importantes de esta bacteria, 10^5 UFC, por pellet de heces de roedores (Henzler & Opitz, 1992) y muchas veces, se ha identificado el mismo serotipo que en los animales domésticos (Barber *et al.*, 2002; Davies & Wray, 1995; Davies & Breslin, 2001; Liébana *et al.*, 2003).

Asimismo, se ha aislado *Salmonella* de aves, con prevalencias que van del 0 % al 50 % (Coulson *et al.*, 1983; Craven *et al.*, 2000; Barber *et al.*, 2002). La falta de medidas para controlar su entrada en las instalaciones se ha asociado con la seropositividad a *Salmonella* (Bahnson *et al.*, 2001; Mejía *et al.*, 2006).

Todos estos animales pueden transmitir la infección a los cerdos bien actuando como fuente de contaminación del pienso y del agua de bebida a través de sus heces (Harris *et al.*, 1997) o bien porque sus cadáveres pueden ser consumidos por los propios cerdos. Por lo tanto, la contratación de una empresa de control de plagas junto con la implementación de medidas de

protección que impidan su entrada en la granja es un aspecto relevante en el control de la salmonelosis.

En contraposición, otros estudios que no han podido identificar como un factor de riesgo o relacionar la presencia de vectores como roedores y pájaros con la infección por *Salmonella* (Renwick *et al.*, 1992; Henken *et al.*, 1992; Beloeil *et al.*, 2004).

5.3.3.2. El hombre como vector de transmisión de *Salmonella*

El hombre ha sido descrito también como un vector para la diseminación de *Salmonella* (Berends *et al.*, 1996) y, consecuentemente, la introducción de la bacteria por los visitantes o el personal de la granja debe de ser prevenido.

Se ha descrito que en las explotaciones donde trabajan un número elevado de personas diariamente existe un mayor riesgo para la infección por *Salmonella* (Funk *et al.*, 2001b). Además, diversas prácticas de bioseguridad aplicadas al personal y a los visitantes de las granjas de porcino han sido relacionadas con una disminución del riesgo de infección por *Salmonella* en cerdos. La existencia de dispositivos de lavado de manos para los operarios o el acceso a los aseos está asociado a una disminución de la salmonelosis (Funk *et al.*, 2001b; Lo Fo Wong *et al.*, 2004a). Además, otros estudios señalan la importancia de que los aseos no estén situados en contacto directo con los alojamientos de los cerdos (Hautekiet *et al.*, 2008).

La existencia de vestuarios que permitan el cambio de ropa y calzado antes de la entrada a los alojamientos de los cerdos también se ha asociado con un descenso de la seroprevalencia en explotaciones porcinas en Dinamarca (Lo Fo Wong *et al.*, 2004a) aunque no en Holanda (van der Wolf *et al.*, 2001a). Se han detectado salmonelas en muestras tomadas de las botas de los operarios de explotaciones porcinas en porcentajes que van del 11 % al 20 % (Barber *et al.*, 2002; Rajic *et al.*, 2005). Por tanto, la limpieza y desinfección de las botas es otro aspecto importante a tener en cuenta ya que puede actuar como fómites en la diseminación de patógenos como *Salmonella* en las granjas (Amass *et al.*, 2000). En un estudio realizado en Bélgica se relacionó también la presencia de alfombras de desinfección a la entrada de los alojamientos de los cerdos con una disminución de la seroprevalencia de *Salmonella* (Hautekiet *et al.*, 2008).

Por otro lado, Letellier *et al.*, (1999) han sugerido que el personal de los sistemas de recogida de cadáveres podría participar como vector mecánico de la enfermedad.

Por todo ello, la mejora en los aspectos relacionados con las medidas de higiene del personal de las explotaciones porcinas puede ser un punto importante de intervención en los programas de control de *Salmonella*.

5.3.3.3. Agua de bebida

Algunos autores han descrito la importancia del agua de bebida en la diseminación de la bacteria en las explotaciones porcinas (Letellier *et al.*, 1999). Este modo de transmisión de la enfermedad es particularmente relevante en las explotaciones que utilizan agua de pozos propios sin potabilizar y especialmente de aguas superficiales que pueden contaminarse con *Salmonella* procedente de la misma o de otras granjas (Mejía *et al.*, 2006).

En cuanto al diseño de los bebederos, Bahnson *et al.* (2006) describieron que el uso de bebederos de chupete estaba asociado a un menor riesgo de infección por *Salmonella* en explotaciones porcinas comparado con el uso de bebederos de tipo cazoleta probablemente como consecuencia de que el contacto de la materia fecal con el agua es mayor en este tipo de bebederos. Además, es importante destacar que las bacterias del género *Salmonella* son capaces de crear biofilms (Jones & Bradshaw, 1996) que les confieren la capacidad de colonizar las conducciones de agua de la línea de bebederos.

5.3.3.4. Estatus sanitario de las explotaciones

Diversos investigadores han descrito que el riesgo de infección por *Salmonella* es inferior en explotaciones porcinas con un elevado *estatus sanitario* (van der Wolf *et al.*, 1999; Kranker *et al.*, 2001). Asimismo, se ha descrito que en explotaciones con procesos diarreicos durante la fase de cebo, el riesgo de excreción de *Salmonella* es mayor (Møller *et al.*, 1998; van der Wolf *et al.*, 2001a; Oliveira *et al.*, 2005, Quessy *et al.*, 2005; Mejía *et al.*, 2006). Por otro lado, Beloeil *et al.* (2004) observaron que la probabilidad de que los cerdos de cebo eliminarán *Salmonella* en las heces era superior en animales seropositivos a *Lawsonia intracellularis* y al síndrome respiratorio reproductivo porcino (SRRP).

5.3.3.5. Temperatura ambiente

La temperatura ambiente, al igual que la estación del año, han sido relacionadas con la prevalencia de *Salmonella* en las explotaciones porcinas. Algunos autores han encontrado prevalencias superiores en los meses de invierno y primavera (Funk *et al.*, 2001a), otros en invierno y otoño (Christensen & Rudemo, 1998) y, más recientemente, Hautekiet *et al.* (2008) describieron prevalencias de *Salmonella* superiores en los meses de verano.

La variabilidad de estos resultados hace pensar que la prevalencia de *Salmonella* pueda estar más relacionada con la regulación de la temperatura en los alojamientos de los animales que con la propia estación del año. Hautekiet *et al.* (2008) encontraron que en explotaciones en las que la programación de la temperatura estaba situada en un rango neutral ($\leq 26^{\circ}\text{C}$) la prevalencia de *Salmonella* era menor que en aquellas en las que la programación del sistema estaba por encima de la temperatura crítica, como por ejemplo 26°C para cerdos de 90 Kg (Christianson *et al.*, 1982). Por otro lado, también se ha comprobado que las explotaciones que no poseen ningún sistema de regulación de la temperatura del aire en las unidades de engorde tienen un mayor riesgo para la infección por *Salmonella* (Hautekiet *et al.*, 2008). Posiblemente, este hecho se deba a que en condiciones climáticas adversas como pueden ser una ventilación insuficiente o temperaturas inapropiadas dan lugar a un incremento de los niveles de glucocorticoides en los cerdos (Bianca, 1968). El estrés producido en estas situaciones puede reactivar la infección en portadores latentes y/o incrementar la receptividad a la infección por *Salmonella* en animales sanos (Berends *et al.*, 1996; Mulder *et al.*, 1995). Además, Funk *et al.* (2001a) comprobaron que las variaciones elevadas de temperatura entre el día y la noche están asociadas con una mayor seroprevalencia de *Salmonella* en las explotaciones porcinas. Por tanto, la instalación de sistemas de ventilación y una regulación adecuada de la temperatura del aire de los alojamientos de los animales puede considerarse un aspecto a tener en cuenta en el control de la salmonelosis porcina.

5.3.3.6. Contaminación ambiental

La contaminación residual en los alojamientos de los cerdos ha sido identificada como un importante factor de riesgo para la infección por *Salmonella* (Williams & Newell, 1968; Baggesen *et al.*, 1996; Beloeil *et al.*, 2004).

Salmonella puede sobrevivir durante meses en restos de polvo y materia orgánica presentes en los corrales, equipamientos y sistemas de ventilación (Berends *et al.*, 1996; Rajic *et al.*, 2005), estando esta supervivencia marcada por algunos factores como el serotipo o las condiciones climáticas (Wray, 1994). Por ello, es de suma importancia emplear protocolos de limpieza y desinfección eficaces en las granjas. Diversos estudios han probado que la aplicación de un protocolo adecuado de limpieza y desinfección es una medida importante para prevenir la infección por *Salmonella* dentro de la granja (Berends *et al.*, 1996; Schmidt *et al.*, 2004; Hautekiet *et al.*, 2008).

De forma frecuente, se detecta la presencia de contaminación ambiental tras los procesos de limpieza y desinfección de los corrales (Gebreyes *et al.*, 1999; Funk *et al.*, 2001a) fundamentalmente debido a que estas tareas se han realizado de forma inadecuada o a que las superficies son de materiales de difícil desinfección. Gebreyes *et al.* (1999) encontraron más de

un 80 % de corrales contaminados por *Salmonella* tras la limpieza y desinfección y antes de la entrada de nuevos animales. Además, en algunos casos, el serotipo aislado fue semejante al responsable de infecciones posteriores en el colectivo de animales. Por otro lado, van der Wolf *et al.* (2001a) describieron que el riesgo para la infección por *Salmonella* era superior en explotaciones de porcino que utilizaban protocolos de limpieza y desinfección entre lotes comparado con las explotaciones que realizaban exclusivamente tareas de limpieza pero no de desinfección, sugiriendo que en las explotaciones en las que se usaban desinfectantes se limpiaba de manera menos adecuada.

Aunque el periodo de vaciado sanitario tiene por objetivo principal la disminución de la contaminación ambiental, evitando el establecimiento de ciclos de infección entre lotes de animales, dos trabajos han señalado que en las granjas en las que no se realiza un período de vaciado sanitario o de inactividad en los corrales entre lotes de cerdos, el riesgo de la infección por *Salmonella* es menor (Corrégé & Dubroca, 2005; Hautekiet *et al.*, 2008). Se ha propuesto como posible explicación para este hecho contradictorio el hecho de que durante los días de vaciado, al no existir ningún sistema de calefacción ni ventilación forzada, se mantiene en los corrales un ambiente muy húmedo que puede favorecer la multiplicación bacteriana (Beloil *et al.*, 2004).

Numerosos estudios han demostrado las ventajas de la aplicación de sistemas de manejo “*todo dentro-todo fuera*”, combinados con la aplicación de protocolos de limpieza y desinfección eficaces y vaciado sanitario. Este sistema no puede prevenir la entrada de la bacteria en la granja, pero si puede prevenir la contaminación cruzada entre lotes y disminuir el nivel de portadores en la granja (Lo Fo Wong *et al.*, 2004a; Beloil *et al.*, 2004; Farzan *et al.*, 2006; Hautekiet *et al.*, 2008). Por el contrario, otros estudios no han sido capaces de encontrar diferencias significativas en la prevalencia de *Salmonella* entre las granjas que utilizan estos sistemas o equivalentes y las que no los utilizan (Davies *et al.*, 1997a; Nollet *et al.*, 2004; Rajic *et al.*, 2007).

5.3.3.7. Tamaño de la explotación

El tamaño de explotación es un factor muy complejo ya que además del número de cerdos existen otras variables como pueden ser el número de naves, el número de salas por nave, el número de corrales por sala, la densidad de animales o el número de trabajadores en la granja que están asociados al tamaño de la explotación y pueden ser, igualmente, factores de riesgo para la infección por *Salmonella*. Probablemente, este hecho puede ser la causa de los resultados contradictorios que se han observado con respecto a este factor. Van der Wolf *et al.* (2001a) describieron que las granjas de pequeño tamaño (con menos de 800 cerdos de cebo) tenían mayores valores de seroprevalencia a *Salmonella* que las granjas de mayor tamaño. Al contrario,

otros autores han descrito un riesgo de infección por *Salmonella* superior en las explotaciones de mayor tamaño en comparación con las más pequeñas (Dahl, 1997; Carstensen & Christensen, 1998; Mousing *et al.*, 1997; Farzan *et al.*, 2006) mientras que algunos estudios no han podido demostrar la existencia de asociación entre estos dos parámetros (Lo Fo Wong *et al.*, 2004a; Rajic *et al.*, 2007). A pesar de que las explotaciones de mayor tamaño tienen, habitualmente, medidas de bioseguridad más estrictas y mejores prácticas de manejo que las explotaciones de menor tamaño, el número de fuentes de infección suele ser superior en las granjas de mayor tamaño.

Por otro lado, algunos estudios han asociado una mayor prevalencia de *Salmonella* con explotaciones o corrales de elevada densidad de animales (Funk *et al.*, 2001a). Una posible explicación es que en densidades menores de animales se limita la transmisión de *Salmonella* debido a la reducción de los contactos y del estrés, que a su vez disminuye la tasa de eliminación de la bacteria.

5.3.3.8. Suelos y separación entre corrales

Entre las características estructurales de las instalaciones, algunos estudios han descrito como un factor de protección para la infección por *Salmonella* los corrales con suelos de rejilla total (Davies *et al.*, 1997a; 1997b; Nollet *et al.*, 2004). Este tipo de suelo contribuye a una disminución del contacto de los animales con las heces y por tanto de la transmisión fecal-oral de la bacteria entre los cerdos (Funk & Gebreyes, 2004). Sin embargo, otros autores no han encontrado una asociación clara entre los diferentes tipos de suelo (cemento, rejilla total o parcial) y el riesgo de la infección por *Salmonella* (Lo Fo Wong *et al.*, 2004a; Van der Wolf *et al.*, 2001a; Rajic *et al.*, 2007).

En cuanto al tipo de separación entre corrales, Dahl *et al.* (1996) sugirieron que cuando existen barreras sólidas y suficientemente elevadas se previene la transmisión de *Salmonella* entre los grupos de cerdos. Este tipo de separaciones reducen el contacto de los animales con las heces de cerdos de otros grupos al igual que el contacto nasal. Así, en diversos estudios se ha encontrado una relación significativa entre la infección por *Salmonella* y el tipo de separación entre corrales (Rajic *et al.*, 2007).

5.4. Otras medidas de control: la vacunación

No cabe duda que las vacunas, particularmente las vacunas vivas que inducen tanto inmunidad humoral como celular (Van Immerseel, 2003), pueden ser herramientas de gran interés para el control de la salmonelosis porcina

Actualmente se pueden distinguir tres tipos de vacunas vivas frente a *Salmonella*: vacunas con atenuaciones no localizadas o caracterizadas, vacunas con mutaciones que afectan a genes relacionados con rutas metabólicas entre las que destacan las cepas con mutaciones en los genes que regulan la biosíntesis de aminoácidos aromáticos (*aroA*, *aroC* y *aroD*) (Lumsden *et al.*, 1991) y vacunas con mutaciones que afectan a genes relacionados con la virulencia como las que poseen una mutación en el gen *phoP/phoQ* que regula la isla de patogenicidad SPI-2 o en los genes *spv* (*Salmonella* virulence plasmid), situados en un plásmido y que codifican genes relacionados con la virulencia (Kramer *et al.*, 1992).

La experiencia ha demostrado que la utilización de vacunas, especialmente las vivas, en conjunto con otras medidas relacionadas con la bioseguridad y las características de manejo son eficaces en el control de *Salmonella*. Algunos autores señalan que la vacunación podría jugar un papel importante en el control de *Salmonella* en explotaciones con una elevada seroprevalencia (Lumsden & Wilkie, 1992; Ortmann, 1999; Springer *et al.*, 2001; Haesebrouck *et al.*, 2004).

En Alemania, se ha desarrollado una vacuna viva atenuada, basada en *S. Typhimurium*, de administración oral y que se ha mostrado eficaz en la reducción de la colonización por *Salmonella* de los órganos internos tanto en estudios experimentales (Springer *et al.*, 2001) como en pruebas de campo (Linder *et al.*, 2001). Por otro lado, se ha sugerido que la vacunación en edades tempranas, inmediatamente tras el destete, podría no interferir con la detección de anticuerpos anti-*Salmonella* al final del período de engorde, momento señalado para la monitorización serológica. Además, se han ensayado técnicas de diagnóstico serológico capaces de distinguir animales vacunados de los naturalmente infectados (EFSA, 2005).

La gran desventaja de las vacunas es que incluyen un único serotipo y que, consecuentemente, van a inducir una limitada protección cruzada con otros serotipos del mismo serogrupo y aún más limitada con serotipos de otros serogrupos.

La inclusión de la vacunación en los programas de control de *Salmonella* dependerá del objetivo del programa, control o erradicación, del nivel de prevalencia de la infección en las explotaciones, de los serotipos implicados, de los métodos de detección utilizados y de los resultados del análisis coste-beneficio.

6. PROGRAMAS DE CONTROL DE *Salmonella* APLICADOS EN PRODUCCIÓN PORCINA.

Según la legislación Europea (Reglamento (CE) 2160/2003), todos los países miembros deben establecer medidas apropiadas y eficaces para detectar y controlar agentes zoonóticos como *Salmonella* en todas las fases de la producción, transformación y distribución, en particular a nivel de la producción primaria, con objeto de disminuir su prevalencia y el riesgo que suponen para la salud pública. Este Reglamento establece que la UE será la encargada de fijar los objetivos de reducción de la prevalencia de zoonosis específicas a nivel de la producción primaria mientras que cada estado miembro se encargará de diseñar los programas específicos de control, que serán aprobados por la Comisión, y que tendrán como objetivo el tratar de alcanzar los objetivos de reducción de prevalencia fijados.

En el ganado porcino de cebo, entre octubre de 2006 y septiembre de 2007 se llevó a cabo un estudio dirigido a estimar la prevalencia de *Salmonella* a nivel comunitario. Asimismo, durante el año 2008 se realizó otro estudio, con el mismo objetivo, en explotaciones con cerdos reproductores. Los resultados obtenidos por cada país en estos estudios fueron analizados por la Autoridad Europea de Seguridad Alimentaria (EFSA) y los resultados del análisis fueron publicados. Esta información será utilizada para, a continuación, fijar los objetivos de reducción de prevalencia. A los seis meses de la fijación de estos objetivos, los Estados miembros deben presentar sus programas de control a la Comisión, para su aprobación, de manera que, éstos comiencen a aplicarse en los 18 meses siguientes a la fecha en la que se haya fijado el objetivo.

No obstante, algunos países de la UE ya tienen instaurados Programas de Control de *Salmonella* en producción porcina que pasamos a presentar de forma resumida a continuación.

6.1. Programas de Control aplicados en países con baja prevalencia de *Salmonella* (Suecia, Finlandia y Noruega)

A principios de los años 50, como consecuencia de un brote de *Salmonella* que afectó a más de 9.000 personas y que fue vinculado a un matadero, comenzaron a aplicarse programas de control de *Salmonella* en Suecia, Finlandia y Noruega (Lundbeck *et al.*, 1955). El objetivo de los programas en estos países es asegurar que todos los productos destinados al consumo estén libres de *Salmonella*.

Se monitorizan todos los puntos críticos de la cadena de producción de alimentos, incluyendo muestreos en explotaciones ganaderas y en el matadero, con el fin de determinar la presencia o ausencia de *Salmonella*. Cuando se detecta la presencia de la bacteria, independientemente del serotipo aislado, se ponen en marcha una serie de medidas. Las granjas afectadas son sometidas a restricciones que incluyen la prohibición del movimiento de animales, con excepción del transporte a un matadero sanitario. El ambiente y los animales son muestreados para la detección bacteriológica de *Salmonella*. Los portadores de *Salmonella* son sacrificados y destruidos y se aplican cuidadosos protocolos de limpieza y desinfección. Las restricciones son levantadas tras dos muestreos consecutivos negativos de todos los animales de la granja. A su vez, se realiza una investigación epidemiológica para determinar el posible origen de la infección.

Además, todo aislamiento de *Salmonella* en animales, el hombre, pienso o productos alimentarios es notificado, independientemente del motivo del muestreo. Todos los aislados son serotipados y fagotipados y a los que provienen de animales se les realizan pruebas para determinar la resistencia a antimicrobianos.

6.2. Programas de Control en países con media y alta prevalencia de *Salmonella*

6.2.1. El programa danés

En 1995, Dinamarca puso en marcha un programa nacional de control de *Salmonella* en el ganado porcino tras un dramático incremento del número de casos de salmonelosis en humanos en 1993 vinculado al consumo de productos del cerdo (Mousing *et al.*, 1997). El programa está basado en el control serológico de muestras de jugo de carne de los cerdos que son sacrificados en los mataderos.

La base del programa fue descrita por Baggesen *et al.* (1996) y ha ido sufriendo revisiones a lo largo de los años. Se recogen muestras de todas las explotaciones porcinas con la excepción de aquellas que sacrifican menos de 200 cerdos al año, ya que su participación es de limitada importancia (Alban *et al.*, 2002). Las muestras de jugo de carne son tomadas de forma aleatoria entre el total de animales sacrificados estando su número en dependencia del tamaño de las explotaciones. Todas las muestras son examinadas mediante un mix-LPS-ELISA que permite la detección de anticuerpos anti-*Salmonella* específicos frente a los principales serogrupos que infectan al cerdo. Aunque inicialmente, el punto de corte utilizado en estas técnicas ELISA fue del 40 %, se redujo a un 20 % de DO en el año 2001 (Alban *et al.*, 2002).

Los resultados de este análisis serológico son empleados para clasificar a las explotaciones en tres niveles, basándose en el cálculo de un coeficiente conocido como “*índice serológico de Salmonella*”, resultado del promedio de los resultados obtenidos en tres meses consecutivos. Los resultados del último se valoran con una mayor importancia suponiendo el 60 % del coeficiente, mientras que los otros dos meses suponen un 20 % cada uno. En el nivel 1 se engloban las explotaciones con un *índice serológico* menor de 40, es decir, las granjas negativas o de baja prevalencia. En el nivel 2 estarían las explotaciones con un *índice serológico* superior a 40 e inferior a 70, explotaciones con un número elevado de positivos, y por último en el nivel 3 se engloban las granjas con un *índice serológico* por encima de 70 y por tanto con un número inaceptable de muestras positivas (Alban *et al.*, 2002). Es importante conocer que estos valores de clasificación también se han ido modificando a lo largo del desarrollo del programa de control.

En las explotaciones de los niveles 2 y 3, los servicios veterinarios deben tomar medidas específicas como son la recogida de muestras de heces en los corrales para establecer el serotipo de *Salmonella* implicado y su distribución y se deben diseñar planes específicos de mejora. Además, estas granjas sufren una penalización económica en el matadero sobre el precio de la canal, de un 4 % para las explotaciones de nivel 3 y de un 2 % para las de nivel 2. En el caso de las explotaciones pertenecientes al nivel 3 es obligatorio el sacrificio de los animales bajo estrictas medidas de higiene. Asimismo, deben recogerse muestras para análisis bacteriológico en las granjas de selección y multiplicación que suministran animales a las granjas que están en los niveles 2 y 3, con el objeto de determinar si ha existido una posible transmisión de *Salmonella* desde estas explotaciones.

Por otro lado, aparte del control serológico de *Salmonella* en los cerdos de cebo, el programa incluye un control de la presencia de *Salmonella* en el pienso, en las granjas de multiplicación y selección así como muestreos aleatorios en los mataderos.

Como resultado del programa, el número de casos de salmonelosis en el hombre atribuidos al cerdo ha sufrido un notable descenso, de 1.100 en 1993 a 166 en el año 2000 (Alban *et al.*, 2002).

6.2.2. El programa británico

En el año 2002, en Gran Bretaña por iniciativa de la industria se implantó el programa denominado “Zoonosis Action Plan *Salmonella* Programme”, conocido por la abreviatura ZAP. El objetivo del programa es identificar granjas porcinas de cebo con una elevada prevalencia de la infección.

Este programa, al igual que el danés, está basado en la toma de muestras de jugo de carne de los animales sacrificados en los mataderos. El ELISA utilizado también es semejante al del programa danés, un Mix-LPS-ELISA, que detecta anticuerpos contra los serogrupos B y C1 de *Salmonella*.

Una vez que se han recogido al menos 15 muestras en tres meses consecutivos, las granjas se categorizan en tres niveles diferentes: ZAP 1, en el que se engloban las granjas con baja seroprevalencia (< 65%) en las que no se requiere ningún plan de acción; ZAP 2, granjas con una seroprevalencia moderada (entre un 65 % y un 85 %) en las que deben tomarse medidas que permitan que puedan incorporarse de nuevo al ZAP 1 en 17 meses; por último el ZAP 3, que engloba a las granjas con elevada seroprevalencia (\geq 85 %) en las que debe desarrollarse un plan de acción para la reducción de *Salmonella* y deben incorporarse al ZAP 1 en 11 meses.

El estatus de ZAP 1 solo puede volver a reasignarse si la seroprevalencia es inferior al 65 % tras el análisis de un mínimo de 15 muestras durante tres meses consecutivos. Las granjas que no puedan volver a este nivel ZAP 1 serán excluidas de los programas de calidad (Quality Assurance) y no podrán sacrificar sus animales en los mataderos adscritos a esta red.

6.2.3. El programa irlandés

En 1997, se implantó en Irlanda un programa voluntario de control de *Salmonella* en cerdos (Quirke *et al.*, 2001).

Al igual que el programa danés, la estrategia se basa en el análisis serológico de los animales en matadero y la clasificación de las granjas en tres niveles en función de su seroprevalencia. El muestreo se basa en la recogida de grupos de 24 muestras aleatorias tres veces al año en cada explotación de cerdos de cebo, separándose los muestreos por un tiempo no inferior a tres meses y no superior a cinco.

Para el cálculo de la categoría en la que debe clasificarse la granja se tiene en cuenta la proporción de muestras positivas en cada uno de los muestreos. La categorización inicial de una granja estará basada en el promedio de los resultados obtenidos en sus dos primeros muestreos. Posteriormente, la categorización de la granja se realizará mediante el cálculo de un índice estimado a partir de los resultados obtenidos en los tres últimos muestreos, valorándose cada muestreo en una proporción diferente: el más reciente en una proporción del 50 %, el inmediatamente anterior en un 30 % y el menos reciente en un 20 %. En la categoría 1 se engloban las explotaciones cuyo índice es inferior al 10 %, en la categoría 2 las granjas con un

índice entre el 10 % y el 50 % y, por último, en la categoría 3 las explotaciones con un índice superior al 50 %.

En las granjas pertenecientes a las categorías 2 y 3 se deben tomar medidas para reducir los niveles de contaminación por *Salmonella*. Además, los animales de las granjas pertenecientes a la categoría 3 deberán ser sacrificados en el matadero de forma aislada al resto de los animales de otras granjas y sus productos deberán ser tratados térmicamente antes de destinarse al consumo humano.

6.2.4. El programa alemán

En el año 2002, se puso en marcha en Alemania un programa voluntario de control de *Salmonella* en producción porcina (Osterkorn *et al.*, 2001; Blaha, 2004) impulsado por la industria alimentaria alemana, el “QS *Salmonella* Monitoring Programme”.

Al igual que los anteriores, este programa de control está basado en la monitorización serológica de los animales en el matadero, en este caso a través de la recogida de 60 muestras de jugo de carne de cada explotación. El punto de corte utilizado en el Mix ELISA es de un 40 % de DO y la clasificación de las explotaciones en función de su categoría de riesgo es la siguiente: Categoría I o de bajo riesgo con menos de un 20 % de animales positivos; Categoría II o de riesgo medio, entre un 20 % y un 40 % de animales positivos; Categoría III o de alto riesgo con más del 40 % de muestras positivas.

Entre las medidas asociadas al programa de control está el sacrificio separado de los animales procedentes de explotaciones clasificadas en la categoría III, así como facilitar a los productores herramientas para la reducción de la contaminación por *Salmonella* en las explotaciones de las categorías II y III.

Respecto a esta última medida, es importante señalar que cada vez son más los ganaderos que solicitan la ayuda de los servicios veterinarios para que les asesoren sobre como mejorar la higiene y la bioseguridad de la explotación con el objeto de volver a englobarse en la categoría I o, al menos, de evitar la categoría III.

6.2.5. El programa holandés

En Febrero de 2005 comenzó el programa de control de *Salmonella* holandés que se basa en la categorización de las explotaciones de cerdos de cebo en función de su seroprevalencia. Para clasificar las explotaciones se recogen de forma aleatoria muestras de suero, bien en la granja (tres semanas antes del sacrificio) o en el matadero, el día del sacrificio. Se toman un total 36 muestras

por año de cada explotación, 12 por trimestre, y se emplea un sistema de clasificación semejante al del programa alemán.

Además, el programa holandés incluye muestreos aleatorios de la superficie de las canales, un total de 10 muestras cada dos semanas y en cada matadero.

6.2.6. Programas de Control en otros países europeos

En Austria se han implementado programas regionales de control que proporcionan una buena base para la instauración de un programa nacional de control de *Salmonella*. En otros países europeos como Bélgica o Francia los programas de control se han limitado a estudios piloto.

7. MÉTODOS DE DETECCIÓN DE *Salmonella* spp.

7.1. Métodos bacteriológicos

A pesar del desarrollo de nuevas herramientas de diagnóstico de *Salmonella*, los métodos tradicionales de cultivo bacteriológico continúan siendo los más utilizados y de referencia para la detección de *Salmonella* en animales, alimentos y muestras ambientales (Funk, 2003). A diferencia de otros métodos, permiten el aislamiento para, en su caso, poder caracterizar las cepas. De ahí que este método continúe siendo el pilar fundamental de los estudios epidemiológicos de la infección por *Salmonella*.

En casos clínicos de salmonelosis, la bacteria puede ser aislada a partir de las heces empleando medios de cultivo específicos, ya que se elimina en concentraciones elevadas (10^6 – 10^7 UFC/g de heces). No obstante, en las infecciones subclínicas, que son las más frecuentes, la bacteria se elimina de forma intermitente y en concentraciones mucho menores, lo que hace necesarios protocolos de aislamiento más complejos que incluyan medios de enriquecimiento selectivo que incrementen la sensibilidad (D'Aoust & Sewell, 1986; Aho, 1992; Davies *et al.*, 2000b; Funk, 2003). Por todo ello, los métodos bacteriológicos tienen el inconveniente de ser más caros y consumir más tiempo.

Se han descrito más métodos y más medios de cultivo para el aislamiento de *Salmonella* que para cualquier otra bacteria (Waltman, 2000). El haberse empleado gran variedad de protocolos lo que dificultaba mucho la comparación de los resultados obtenidos en diferentes laboratorios. Por este motivo, comenzaron a aparecer protocolos estándar para el aislamiento de

Salmonella, entre los que destaca la norma ISO (6579:2002). En un principio, este protocolo se diseñó para el análisis de muestras procedentes de alimentos y piensos, pero posteriormente se le añadió un anexo específico para el análisis de muestras de heces de animales.

La mayoría de los métodos de aislamiento bacteriológico tienen las siguientes etapas: un preenriquecimiento no selectivo, un enriquecimiento selectivo y posteriormente, la siembra en un medio sólido selectivo e indicador.

7.1.1. Preenriquecimiento no selectivo

El preenriquecimiento se ha utilizado clásicamente en muestras en las que puede haber un número bajo de bacterias, como en los animales con infecciones subclínicas, en muestras con elevada contaminación como las heces o en muestras en las que a consecuencia de diversos procesos, como la congelación o descongelación, las bacterias hayan podido resultar dañadas. El objeto de este paso es aumentar la viabilidad de las bacterias antes de transferirlas a un medio selectivo donde, de otra manera, no sobrevivirían (Corry *et al.*, 1969; Aho, 1992).

En un principio se utilizaron para esta etapa medios como el caldo de lactosa (LB), pero éste dejó de utilizarse porque la fermentación de la lactosa causaba una acidificación perjudicial para *Salmonella* (Hilker, 1975). Por este motivo, los medios que se utilizan actualmente como pueden ser el caldo de pre-enriquecimiento universal (UPB), el medio M9 o el agua de peptona tamponada (BPW), entre otros, no incluyen en su composición azúcares fermentables y tienen una gran capacidad tampón (Bailey & Cox, 1992). Respecto a su eficacia, Juven *et al.* (1984) concluyeron que los medios BPW y M9 son mejores que el LB mientras que Hoorfar & Mortensen (2000) no pudieron demostrar diferencias significativas entre el caldo UPB y el BPW.

Algunos autores han sugerido que el preenriquecimiento en muestras de heces puede ser contraproducente ya que puede favorecer el crecimiento de flora competitiva que podría dar lugar a falsos negativos (Aho, 1992). Jensen *et al.* (2003) demostraron que la adición de novobiocina (22 µg/ml) al caldo de preenriquecimiento incrementaba la detección de *Salmonella* en muestras de heces probablemente debido a la supresión del crecimiento de la flora competidora. En cualquier caso, el preenriquecimiento es, en la actualidad, una práctica habitual en los protocolos de aislamiento de *Salmonella* a partir de heces de cerdo (Hoorfar & Bagesen, 1998).

El período de incubación oscila entre 18 y 24 horas y, especialmente en muestras de heces donde existe una gran cantidad de bacterias competidoras, no conviene prolongarlo porque podría disminuir la viabilidad de *Salmonella*. Asimismo, otros trabajos han demostrado que un período

de incubación por debajo de 18 horas reduce la sensibilidad del diagnóstico (D'Aoust *et al.*, 1990). La temperatura recomendada para la incubación es de entre 35 ° y 37 °C.

7.1.2. Enriquecimiento selectivo

El objetivo de la etapa de enriquecimiento selectivo es inhibir el crecimiento de la flora competidora, presente en grandes cantidades en las heces, y favorecer el crecimiento de *Salmonella* hasta niveles en los que posteriormente pueda ser detectada en medios diferenciales.

Los medios más utilizados para esta etapa son: el caldo tetrionato, el Rappaport-Vassiliadis (RV) y el caldo selenito, aunque este último presenta una serie de desventajas como pueden ser su menor sensibilidad, su corto período de vida útil o su elevada toxicidad (Waltman, 2000) que hacen que su uso sea inferior al de los otros dos caldos.

El caldo tetrionato en un principio estaba compuesto por yodina y tiosulfato sódico. Posteriormente, se reformuló mediante la adición de sales biliares, verde brillante y novobiocina dando lugar al caldo Muller-Kauffman-Tetrionato (MKT) con novobiocina, uno de los medios recomendados por la norma ISO 6579:2002 para el aislamiento de *Salmonella* en muestras de pienso y alimentos.

Al igual que el tetrionato, el caldo Rappaport-Vassiliadis (RV) es uno de los medios recomendados en la norma ISO 6579:2002 para el aislamiento de *Salmonella*. La acción de este caldo se basa en la capacidad de *Salmonella* de sobrevivir y multiplicarse en presencia de verde malaquita, con una osmolaridad elevada, un bajo aporte de nutrientes y un pH relativamente bajo. En cuanto a su eficacia en comparación con el tetrionato o el selenito existen opiniones enfrentadas. Por un lado, diversos autores describen que se obtienen peores resultados con el caldo RV que con el tetrionato o el caldo selenito (Skovgaard *et al.*, 1985; Cherrington & Huis in 't Veld, 1993) mientras que, por el contrario, Bager & Petersen (1991) señalan que se obtienen mejores resultados con el caldo RV.

Como alternativa a estos caldos, se han desarrollado medios selectivos semisólidos como el Rappaport-Vassiliadis semisólido (MSRV) y el DIASSALM[®]. Diversos estudios destacan la mayor eficacia de estos medios en comparación con los caldos de enriquecimiento tradicionales (Dusch & Altwegg, 1995; Davies *et al.*, 2001; Voogt *et al.*, 2001; Champagne *et al.*, 2005). El más utilizado es el MSRV que combina las propiedades selectivas de caldo RV con las características de motilidad de la mayoría de los serotipos de *Salmonella*. El inconveniente de este medio es que no permite detectar serotipos que carecen de movilidad como las biovariedades Gallinarum y Pullorum de *S. Gallinarum*.

La temperatura de incubación de los medios de enriquecimiento debe oscilar entre los 41°C y los 42°C, especialmente para muestras con una elevada cantidad de flora competidora como son las heces. La incubación a estas temperaturas elevadas es beneficiosa porque inhibe el crecimiento de la flora competidora y permite la multiplicación de *Salmonella* debido a la elevada termoresistencia que poseen las bacterias de este género. En ningún caso, la temperatura debe superar los 43 ° C, ya que podría ser letal para algunos serotipos de *Salmonella* (Peterz *et al.*, 1989).

Habitualmente, el tiempo de incubación de esta etapa de enriquecimiento selectivo es de 24 horas. No obstante, algunos autores señalan que la sensibilidad del método se incrementa con tiempos de incubación más prolongados y recomiendan un segundo subcultivo a partir del caldo de enriquecimiento a las 48 horas (D'Aoust *et al.*, 1992). La eficacia de esta segunda incubación varía en función del tipo de caldo de enriquecimiento utilizado. Mientras que para el MKT y el caldo selenito se ha demostrado que existe un incremento se incrementa la sensibilidad con una incubación de 48 horas, con el RV no se han observado cambios en la sensibilidad en comparación con la incubación de 24 horas (Bager & Petersen, 1991).

Algunos autores señalan que incluir en el protocolo de aislamiento de *Salmonella* un paso de enriquecimiento secundario retardado es beneficioso (Nietfeld *et al.*, 1998b; O'Carrol *et al.*, 1999; Davies *et al.*, 2000b). Este paso consiste en mantener a temperatura ambiente, durante 5-7 días, el caldo de enriquecimiento en el caso de que el subcultivo en medio sólido diferencial resulte negativo tras la incubación inicial del caldo de enriquecimiento de 24 horas. Transcurridos estos 5-7 días, se transfiere una alícuota a un caldo de enriquecimiento fresco que se incuba a 37 ° C durante 24- 48 horas y se subcultiva, nuevamente, en un medio sólido selectivo. O'Carrol *et al.* (1999) sugieren que este paso compensa los daños que haya podido sufrir la bacteria durante el tiempo de almacenamiento de la muestra.

7.1.3. Aislamiento en medios sólidos selectivos y diferenciales

La propiedad selectiva de estos medios está basada en la presencia de sustancias inhibidoras del crecimiento de otras bacterias competidoras, mientras que su propiedad diferencial radica en la incorporación de sustancias que proporcionan a las colonias de *Salmonella* un aspecto característico y por tanto, permiten una fácil diferenciación visual. Los caracteres más utilizados para esta diferenciación visual son la producción de SH₂ y su incapacidad de fermentar la lactosa.

Entre los medios sólidos selectivos y diferenciales más utilizados se encuentran el agar verde brillante (BGS), el agar Rambach (Ra), el agar Hektoen enteric (HE), el agar xilosa-lisina-desoxichocolate (XLD) y el agar xilosa-lisina-tergitol 4 (XLT4). En concreto, el agar XLT4 ha

sido descrito como uno de los medios más eficaces y selectivos para la recuperación de *Salmonella* a partir de muestras de alimentos y heces (Dusch & Altwegg, 1995). No obstante, la eficacia de estos medios sólidos va a depender en gran medida de la eficacia de los medios de enriquecimiento selectivos empleados en la etapa inmediatamente anterior del aislamiento.

Algunos autores sugieren que es conveniente utilizar diferentes combinaciones de medios de enriquecimiento y de medios sólidos selectivos y diferenciales con el fin de elevar la sensibilidad y facilitar el aislamiento de distintos serotipos (Rostagno *et al.*, 2005). En este sentido, se ha descrito que algunos medios de enriquecimiento inhiben el crecimiento de determinados serotipos de *Salmonella* (Hoorfar & Mortensen, 2000).

La incubación de estos medios de cultivo se realiza entre 35 y 37°C durante 18-24 horas. Después de la incubación se seleccionan las colonias bacterianas sospechosas, en base a sus características morfológicas, las cuales varían en función del medio de cultivo usado. La selección de más de una colonia por placa podría permitir la identificación de diferentes aislados en una misma muestra.

7.1.4. Confirmación de los aislados

El último paso del aislamiento es confirmar que las colonias seleccionadas pertenecen al género *Salmonella*. Esta confirmación se realiza generalmente, en primer lugar, mediante pruebas bioquímicas y, posteriormente, mediante identificación serológica.

Para la confirmación bioquímica se suelen recoger de 3 a 5 colonias sospechosas del medio sólido diferencial que se inoculan en medios compuestos como el TSI (Triple Iron Sugar) o el LI (lysine Iron) donde dan lugar a reacciones características. Además, pueden utilizarse galerías de pruebas bioquímicas comerciales como los sistemas Api[®] o Micro ID así como sistemas automáticos o semiautomáticos como el VITEK[®].

La confirmación serológica se realiza mediante la técnica de aglutinación en porta utilizando sueros específicos monovalentes o polivalentes frente a los antígenos somáticos, capsulares y flagelares de *Salmonella*.

7.1.5. Factores que afectan a la sensibilidad de las pruebas bacteriológica.

La sensibilidad de las pruebas bacteriológicas está condicionada por numerosos factores que hacen difícil el establecimiento de comparaciones entre los resultados proporcionados por diferentes estudios. A continuación se detallan los factores más relevantes que pueden afectar a la sensibilidad de la prueba.

- *Cantidad de muestra:* se ha demostrado que la sensibilidad de la prueba aumenta significativamente al aumentar la cantidad de muestra analizada (Funk *et al.*, 2000). Así, con muestras de un 1 gramo la sensibilidad era del 9 %, mientras que con muestras de 25 gramos la sensibilidad ascendía a un 78 %. De igual forma, Cannon & Nicholls (2002) describieron que a mayor peso de la muestra mayor sensibilidad de la prueba, especialmente en muestras con bajas concentraciones de *Salmonella*.
- *Muestras individuales o mezclas:* el análisis de muestras individuales de heces de cerdos tiene una baja sensibilidad, especialmente en muestras procedentes de animales con infecciones subclínicas, donde la excreción de la bacteria es intermitente y en bajas concentraciones (Wilcock & Scharwrtz, 1992). Por el contrario, el análisis de muestras formadas por mezclas de heces de animales individuales aumenta la probabilidad de detección de *Salmonella* y además, reduce el coste del diagnóstico (Arnold *et al.*, 2005). Sin embargo, este sistema no permite una buena estimación de la prevalencia individual ni de la distribución de serotipos dentro de la explotación (Damman *et al.*, 1999).
- *Tipo de muestras:* el tipo de muestras más utilizadas para el aislamiento de *Salmonella* en granja son las heces y en matadero se utilizan el contenido de ciego y del colon y los ganglios linfáticos mesentéricos. A partir de las muestras recogidas en matadero se obtiene una sobreestimación del valor de prevalencia de en las granjas, debido a las infecciones que tienen lugar durante el transporte y en los corrales de espera en matadero (Hurd *et al.*, 2003; Beloeil *et al.*, 2004; Gebreyes *et al.*, 2004a). Por el contrario, con frecuencia se subestima la prevalencia en la granja, cuando se determina a partir de muestras de heces, debido a la excreción intermitente de *Salmonella* en los cerdos con infecciones subclínicas o a la existencia de portadores no eliminadores (Hurd *et al.*, 2003). Por otro lado, Swanenburg *et al.* (2001) demostraron, que el origen de la infección estaba en las granjas basándose en la caracterización de los aislados obtenidos a partir de heces en la granja y a partir de ganglios linfáticos mesentéricos en el matadero. Por tanto, el aislamiento de *Salmonella* en ganglios linfáticos mesentéricos en el matadero reflejaría las infecciones de los animales en la granja, siempre y cuando éstos no hayan sufrido contaminaciones cruzadas durante el transporte al matadero y/o en los corrales de espera.
- *Protocolos de diagnóstico y medios de cultivo utilizados:* en los apartados anteriores ya se ha puesto en evidencia la importancia de la utilización de

diferentes protocolos de aislamiento y de medios de cultivo sobre la sensibilidad de la prueba.

- *Temperatura y tiempo de almacenamiento de las muestras antes del análisis:* las condiciones de conservación de las muestras de heces también pueden influir sobre la sensibilidad de las pruebas. O'Carroll *et al.* (1999) describieron que los mejores resultados se obtienen cuando se realiza un procesamiento inmediato de las muestras, alcanzándose un 90 % de sensibilidad; sin embargo, ésta disminuye al 85 % cuando las muestras son conservadas a 4 °C durante 6 días y a un 70 % cuando se mantienen a -15°C durante 14 días.

7.2. Métodos inmunológicos

Durante los últimos años se han desarrollado un gran número de métodos de detección directa e indirecta de *Salmonella* alternativos a los métodos de cultivo tradicionales. Estas técnicas consumen menos tiempo que los métodos bacteriológicos tradicionales, son menos laboriosos y más baratos. De entre las diferentes técnicas disponibles, la más utilizada es el ELISA que puede usarse tanto para la detección de antígenos como de anticuerpos específicos frente a *Salmonella*.

7.2.1. Métodos inmunológicos de detección de antígenos

Entre las técnicas inmunológicas utilizadas para la detección directa de *Salmonella* destacan los ensayos inmunoenzimáticos (ELISA). Las técnicas ELISA utilizadas para la detección directa de *Salmonella* se basan en el tapizado de las placas con anticuerpos frente a diferentes antígenos flagelares y somáticos de *Salmonella*. La lectura de los resultados se realiza mediante un espectrofotómetro siendo esta lectura proporcional a la cantidad de antígeno presente en la muestra. Dentro de estas técnicas destacan sistemas totalmente automatizados como el VIDAS® (BioMérieux).

Entre sus ventajas cuentan con que son métodos por lo general automatizados, rápidos, menos laboriosos que los medios de cultivo tradicionales y con capacidad de analizar un gran número de muestras. Algunos estudios describen que para muestras de pienso y alimentos estos sistemas tienen la misma eficacia para la detección de *Salmonella* que los métodos de cultivo tradicionales (Curiale *et al.*, 1997; Uyttendaele *et al.*, 2003). No obstante, en el caso de muestras de heces, su sensibilidad es inferior (Fedorka-Cray, 2000). En general, cuanto más limpia sea la muestra mayor es la eficacia de la técnica.

Por el contrario, entre sus inconvenientes destaca el hecho de que continua siendo necesaria una etapa de preenriquecimiento y/o enriquecimiento selectivo ya que su límite de detección se sitúa entre 10^3 y 10^5 UFC por ml (Blackburn, 1993) por lo que para la realización de la prueba necesitaríamos entre 24 y 48 horas. Además de este límite de detección, la presencia de reacciones cruzadas y el hecho de que un resultado positivo deba confirmarse por cultivo bacteriológico normal son algunas de sus otras desventajas (Maciorowski *et al.*, 2006).

7.2.2. Métodos inmunológicos de detección de anticuerpos

Por lo general los ELISAs utilizados para la detección de anticuerpos anti*Salmonella* están basados en el uso de antígenos somáticos o antígenos O y son los conocidos como LPS-ELISA. La respuesta inmunitaria es específica para cada antígeno O, lo que permite identificar animales infectados por los diferentes serotipos de *Salmonella* incluidos en un mismo serogrupo que comparte antígenos somáticos mayores. En concreto, en el caso del ganado porcino se han identificado anticuerpos específicos frente a los serogrupos B, C1, C2, D1 y E1, existiendo reacciones cruzadas entre los serogrupos B y D1 debido a que contienen antígenos somáticos comunes. Este hecho es utilizado en el diseño de los ELISAs con el fin de poder detectar a la vez la infección por los serotipos de varios serogrupos de *Salmonella*. De esta forma, mediante el empleo de mezclas de antígenos somáticos de diferentes serogrupos para el tapizado de las placas se pueden identificar los serotipos más comunes en una especie animal o en una región determinada. Los ELISAs que utilizan mezclas de antígenos somáticos de diferentes serogrupos para el tapizado de las placas se denominan Mix-LPS-ELISAs.

En el caso del ganado porcino, el primer Mix-LPS-ELISA para la detección de anticuerpos específicos frente a *Salmonella* fue puesto a punto por Nielsen *et al.* (1995). Este ELISA incluye los antígenos somáticos O: 1, 4, 5 y 12 de *S. Typhimurium* y los antígenos somáticos O: 6 y 7 de *S. Choleraesuis*. Teóricamente permite la detección de anticuerpos contra los serogrupos B, C1 y D1, éste último por reacción cruzada con el antígeno somático 12, y se estimó que permitía la identificación de las infecciones causadas por el 90-95 % de las cepas de campo aisladas de cerdos en Dinamarca (Baggesen *et al.*, 1996).

Basándose en el ELISA danés, otros laboratorios desarrollaron ELISAs semejantes (Van der Heijden *et al.*, 1998; Proux *et al.*, 2000; Czerny *et al.*, 2001; Chow *et al.*, 2004) que también incluyen los antígenos somáticos 1, 4, 5, 6, 7 y 12 y tienen capacidad teórica para identificar las infecciones por salmonelas de los serogrupos B, C1 y D1. No obstante, Van der Heijden (2001) realizaron un estudio en el que se compararon 12 test existentes en el mercado y encontraron notables diferencias en la sensibilidad en función del test utilizado. Un resultado similar fue

mostrado por Collazos (2008) al comparar diferentes Mix-LPS-ELISAs comerciales y dos Mix-LPS-ELISA desarrollados en el propio laboratorio.

Un ELISA desarrollado en Holanda emplea los antígenos somáticos 6 y 7 de una cepa de *S. Livingstone* y no de *S. Cholerasuis* (Van der Heijden *et al.*, 1998). Van der Wolf *et al.* (1999) determinaron que este test era capaz de identificar las infecciones causadas por el 89 % de las cepas de campo de *Salmonella* aisladas en Holanda.

Otra variante del ELISA danés fue la desarrollada en Francia por Proux *et al.* (2000). Emplea para el tapizado de las placas una mezcla de antígenos somáticos de los serotipos Typhimurium, Anatum, Hadar, Infantis y Enteritidis, con el objeto de identificar las infecciones causadas por el 100 % de las cepas aisladas en campo. En teoría, permite la identificación de los serogrupos B, C1, C2, D1 y E1. Sin embargo, otros autores han señalado que la inclusión de un elevado número de antígenos somáticos lleva consigo una disminución de la sensibilidad y particularmente de la especificidad de la prueba y la aparición de resultados erráticos (Lo Fo Wong & Hald, 2000; Collazos, 2008).

Por lo general, en la mayoría de los ensayos serológicos se emplean muestras de suero. Sin embargo, en estudios a gran escala como los de un programa de control nacional, la recogida e identificación de muestras de suero en todos los animales sacrificados es complicada. Para solventar esto, se recurre al análisis de muestras de jugo de carne que son más fáciles de recoger. Este método ha sido aplicado para la monitorización de *Salmonella* en el ganado porcino (Mousing *et al.*, 1997). El jugo de carne se obtiene tras un proceso de congelación y posterior descongelación de una porción de diafragma y/o músculo esternomastoideo. Aunque los títulos de anticuerpos del jugo son ligeramente inferiores a los del suero, si se utiliza una menor dilución existe una elevada concordancia con los resultados proporcionados por el suero con el Mix-ELISA (Nielsen *et al.*, 1998).

Los anticuerpos se detectan durante 3-4 meses tras la infección por *Salmonella* (Van der Gaag *et al.*, 2001). Esto permite que los ELISAs sean de utilidad para la detección de animales que han estado en contacto con la bacteria y que pueden ser eliminadores intermitentes o portadores latentes que en el momento del muestreo no estén excretando la bacteria y, por tanto, animales que no se detectarían por análisis bacteriológico. Por otro lado, se ha descrito que el tiempo que transcurre entre la infección por *Salmonella* y la aparición de anticuerpos puede variar de una a unas pocas semanas en infecciones experimentales (van Winsen *et al.*, 2001a; Lo Fo Wong *et al.*, 2004b; Collazos, 2008) y hasta dos meses en infecciones naturales (Kranker *et al.*, 2003). Este hecho implica que en etapas iniciales de la infección animales positivos por análisis bacteriológico no sean detectados por serología.

Otros factores que pueden afectar a los resultados del ELISA son el serotipo implicado, ya que no todos tienen la misma capacidad de inducir respuesta inmunitaria (van Winsen *et al.*, 2001a; Collazos, 2008) o fallos en la seroconversión, cuando no se produce respuesta inmunitaria independientemente del serotipo implicado. Este hecho podría explicarse en parte por la resistencia de algunos cerdos a la infección (van Diemen *et al.*, 2002) y se estima que ocurre en el 1-2 % de los cerdos, aunque es difícil de cuantificar (Nielsen *et al.*, 1995).

La inmunidad pasiva es otro factor a tener en cuenta, ya que los anticuerpos maternos pueden permanecer hasta 8 o 10 semanas, lo que da lugar a que los cerdos de corta edad puedan ser seropositivos sin estar infectados.

La determinación de la sensibilidad y especificidad de los Mix-ELISA es bastante compleja ya que depende del serotipo implicado, de los antígenos utilizados para tapizar las placas y del punto de corte empleado en la técnica. Tomando como prueba de referencia el cultivo bacteriológico, varios estudios experimentales han tratado de estimar estos parámetros. En general, existe discrepancia en cuanto a la concordancia de los resultados obtenidos por bacteriología y serología. Existen estudios que describen una elevada correlación entre la serología y la excreción fecal del patógenos (Nielsen *et al.*, 1995; Christensen *et al.*, 1999; Sorensen *et al.*, 2004), mientras que otros señalan la falta de asociación entre ambas técnicas (Botteldoorn *et al.*, 2003; Casey *et al.*, 2004; Collazos, 2008).

Por lo general, los valores de sensibilidad y especificidad estimados en las granjas son muy superiores a los determinados a nivel individual, ya que existe una gran variabilidad en la respuesta serológica de cada animal (Nielsen *et al.*, 1995; Mousing *et al.*, 1997). La mayoría de los autores coinciden en señalar que las técnicas de detección de anticuerpos están particularmente indicadas para la detección de estos anticuerpos en colectivos animales.

En estudios experimentales, se describe que la sensibilidad y especificidad de la técnica se aproxima al 100 % (Nielsen *et al.*, 1995). Sin embargo, estos valores pueden variar considerablemente cuando se evalúan a nivel de campo (Harris, 2003). Entre las posibles causas de esta discrepancia cabe destacar la poca concordancia entre los antígenos utilizados para el tapizado de las placas y los serotipos que puedan estar involucrados en la infección en el momento del muestreo, así como las menores dosis infectantes que habitualmente se dan en condiciones de campo comparadas con las utilizadas experimentalmente.

Otro factor que afecta de forma fundamental a la sensibilidad y especificidad de la técnica es el punto de corte utilizado. Se puede usar un punto de corte más estricto cuando lo importante

sea la sensibilidad de la prueba o, por el contrario, utilizar un punto de corte más elevado cuando se pretenda dar una mayor importancia a la especificidad.

Lo Fo Wong & Hald (2000) estimaron que la sensibilidad a nivel de rebaño era de un 90 % y la especificidad del 30 % para un punto de corte del 10 % de DO, mientras que para un punto de corte del 40 % de DO la sensibilidad se veía reducida a un 50 % y la especificidad aumentaba a un 80 %. Como hemos señalado anteriormente estos parámetros varían en función del serotipo implicado en la infección. Así, para un punto de corte del 40 % de DO, cuando los cerdos de una granja están infectados con *S. Typhimurium* estos parámetros mejoran considerablemente, de modo que la sensibilidad es mayor del 90 % y la especificidad del 80 %, mientras que si los cerdos están infectado con otros serotipos, para un mismo punto de corte del 40 % de DO, la sensibilidad está en torno al 20 % y la especificidad en torno al 95 %. Este hallazgo probablemente refleja diferencias en la capacidad de colonización e invasión o en la inmunogenicidad de los diferentes serotipos.

Existen estudios que indican que la infección por algunos de los serotipos del serogrupo C1 no necesariamente inducen anticuerpos detectables mediante Mix-LPS- ELISA. Así, Collazos (2008) empleando el punto de corte recomendado para los programas control fueron incapaces de detectar seroconversión en los cerdos experimentalmente infectados con *S. Rissen*. Este hecho cuestiona la utilidad de estas técnicas para la detección de infecciones por serotipos de *Salmonella* con poca capacidad de invasión en el ganado porcino.

En cuanto a factores que pueden afectar a la sensibilidad y a la especificad de la técnica también cabe destacar el fenómeno de reacciones cruzadas, que se relaciona con la presencia de anticuerpos no específicos frente a *Salmonella*, producidos como respuesta a otras enterobacterias o a bacterias no viables presentes en el pienso (Wiuff *et al.*, 2002).

Como conclusión podemos indicar que los estudios serológicos son especialmente útiles para la detección de granjas de cerdos con una elevada prevalencia de *Salmonella*, así como para la detección de cambios y tendencias en estudios longitudinales (Nielsen *et al.*, 1995; Christensen *et al.*, 1999; van der Wolf *et al.*, 2001b).

8. RESISTENCIA ANTIMICROBIANA EN *Salmonella*

El descubrimiento de la penicilina en 1929 por Alexander Fleming abrió la era de la terapia antibiótica, siendo uno de los acontecimientos más importantes del pasado siglo. La historia médica y particularmente la historia de las enfermedades infecciosas ha estado marcada, a partir de ese momento, por el continuo desarrollo e introducción de nuevos y potentes antimicrobianos. El mal uso y/o abuso que se ha realizado de estas drogas, no solo en medicina humana y veterinaria sino también como promotores de crecimiento en producción animal, ha creado una enorme presión de selección para el desarrollo de resistencias bacterianas (WHO, 2000). La emergencia y diseminación de resistencias antimicrobianas en bacterias de carácter zoonótico como *Salmonella* es particularmente alarmante debido a su impacto en salud pública.

Aunque las primeras cepas de *Salmonella* resistentes a antimicrobianos se detectaron en torno a 1950, hasta los años 80 las cepas de *Salmonella* no tifoideas eran consideradas microorganismos relativamente sensibles. Sin embargo, en la década de 1990 la resistencia a antimicrobianos en *Salmonella* se extendió de forma notable (Cormican *et al.*, 1998; Angulo *et al.*, 2000). La aparición de bacterias resistentes a antimicrobianos constituye, igualmente, un grave problema para la medicina veterinaria al limitar las opciones terapéuticas y/o profilácticas frente a determinadas infecciones.

8.1. Aspectos generales de la resistencia antimicrobiana

8.1.1. Mecanismos de resistencia

Se dice que una bacteria es sensible a un antimicrobiano cuando éste es capaz de inhibir su multiplicación y, consecuentemente, es capaz de controlar la infección en un hospedador. Por el contrario, una bacteria se considera resistente a un antimicrobiano cuando la concentración que éste alcanza en el sitio de infección no es lo suficientemente elevada como para inhibir la multiplicación o matar a la bacteria (Witte & Klare, 1999).

Desde el punto de vista molecular y bioquímico existen tres mecanismos principales por medio de los cuales las bacterias sensibles pueden llegar a ser resistentes a los antimicrobianos. Uno de ellos es la inactivación enzimática o modificación del antimicrobiano. Este mecanismo de resistencia es de gran importancia en la resistencia a antimicrobianos β -lactámicos. Hasta ahora, se han descrito más de 80 β -lactamasas de las cuales las denominadas TEM y PSE son las más frecuentemente encontradas en *Salmonella* (Medeiros, 1997; Massova & Mobashery, 1998).

Otros mecanismos de resistencia se basan en la disminución de la concentración intracelular del antimicrobiano debido a una menor permeabilidad de la membrana externa (Quintiliani *et al.*, 1999) o a la existencia de mecanismos de eflujo activo, bien documentados en el caso de la resistencia a tetraciclinas (Roberts, 1996).

Finalmente, la resistencia antimicrobiana puede deberse a cambios en el sitio diana de actuación del antimicrobiano en la célula bacteriana de forma que el antibiótico no la reconozca o no pueda actuar adecuadamente sobre ella. Un buen ejemplo de este mecanismo es la resistencia a fluoroquinolonas (Wiedemann & Heisig, 1994; Hooper, 1999).

Estos mecanismos de resistencia, a excepción de la disminución de la concentración intracelular del antimicrobiano a consecuencia de cambios en la permeabilidad de la membrana, están codificados en genes de resistencia, que pueden ser transmitidos de unas bacterias a otras, tanto vertical como horizontalmente a través de elementos genéticos móviles (Hall & Collis, 1998).

8.1.2. Resistencia natural y resistencia adquirida

La resistencia antimicrobiana no es exclusivamente un fenómeno derivado de la era de la antibioterapia. Existe, en las poblaciones bacterianas, una resistencia antimicrobiana natural o también denominada intrínseca, tratándose de una propiedad innata de ciertos organismos que se basa en la ausencia del sitio diana de actuación o en la presencia de mecanismos de resistencia de baja expresión (Smith & Lewin, 1993; Paulsen *et al.*, 1996). Un ejemplo de este tipo de resistencia es la resistencia a vancomicina en *Escherichia coli*, un fenómeno que se explica por el hecho de que la vancomicina es demasiado grande para pasar a través de los canales de porinas de la membrana externa de este género bacteriano.

Sin embargo, la gran mayoría de las resistencias bacterianas son resistencias adquiridas, consecuencia de la presión selectiva, combinación de la cantidad y del tiempo de uso de los antimicrobianos en un área específica (Levy, 1997), y con una repercusión mucho más significativa en la salud pública. Estas resistencias adquiridas pueden originarse como consecuencia de mutaciones en el cromosoma bacteriano o por la adquisición de nuevo material genético transferido desde otras poblaciones bacterianas. En la **Figura 5** se muestran los principales mecanismos de resistencia asociados tanto a la resistencia intrínseca como adquirida.

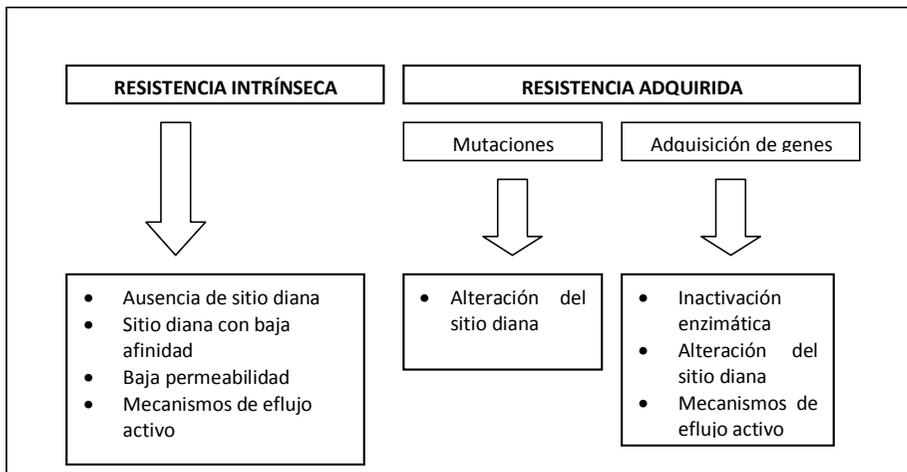


Figura 5. Principales mecanismos de resistencia asociados a la resistencia intrínseca y adquirida.
Fuente: EFSA, 2008b

Mientras que los mecanismos de resistencia adquiridos están distribuidos en una gran variedad de bacterias, los mecanismos de resistencia intrínsecos parecen ser específicos de género y especie.

Como hemos indicado, la resistencia adquirida es una propiedad específica de una cepa bacteriana, que puede deberse a mutaciones en el cromosoma bacteriano, en genes son fundamentales para la acción del antibiótico. La mutación es un mecanismo espontáneo que ocurre durante la replicación, con baja frecuencia y que da lugar, en general, a cambios estructurales en el cromosoma bacteriano. Estas mutaciones pueden ser rápidas y profundas, pero en la mayoría de los casos son escalonadas y lentas, como es el caso de la resistencia a quinolonas. Por lo general, están basadas en el cambio de una o varias pares de bases que se traduce en una pequeña modificación en la secuencia de aminoácidos codificados por el correspondiente gen. Esta alteración de la secuencia frecuentemente no tiene influencia en la actividad biológica pero modifica la sensibilidad al agente antimicrobiano (Alekhun & Levy, 2000; Quintiliani *et al.*, 1999). Es importante señalar que normalmente el antimicrobiano no influye en la aparición de estas mutaciones, salvo en algunos grupos como las quinolonas. El principal papel de antimicrobiano es el de seleccionar los mutantes resistentes, al ser las bacterias sensibles rápidamente eliminadas en su presencia.

Aunque este tipo de resistencia es importante, el riesgo de diseminación horizontal es mucho menor que en el caso de la resistencia adquirida a consecuencia de la presencia de genes

específicos de resistencia procedentes de otros organismos, particularmente cuando estos genes de resistencia están asociados a elementos genéticos móviles (Alekhshun & Levy, 2000; Bennett, 1995).

8.1.3. Transmisión de genes de resistencia

Se ha descrito que los genes de resistencia pueden intercambiarse entre poblaciones bacterianas e incluso pasar a células de mamíferos (Courvalin, 1995; Courvalin, 1996; Davies, 1998). La rápida diseminación de genes de resistencia entre poblaciones bacterianas se debe, principalmente, a la transferencia horizontal de estos genes (Trieu-Cout & Courvalin, 1986; Stellwagen & Craig, 1998).

Los elementos que participan en esta transferencia de genes de resistencia son los plásmidos, transposones e integrones. Estos elementos se transmiten verticalmente, durante la división de la bacteria, pero también pueden transmitirse de manera horizontal, de una bacteria a otras de la misma especie o de diferentes especies y géneros, a través de tres mecanismos principales, la transducción, la transformación y la conjugación (Bennett, 1995; Schwarz & Noble, 1999; Sefton, 2002).

Los plásmidos son moléculas de ADN extracromosómico que se replican y transcriben independientemente del ADN cromosómico. Están presentes, prácticamente, en todas las bacterias de importancia en medicina humana y veterinaria. Su tamaño varía entre 2 y más de 100 kilobases (kb) e incluyen un material genético, que en condiciones fisiológicas, es completamente prescindible para la supervivencia de la bacteria. Sin embargo, suele tratarse de material genético importante que codifica, entre otras cosas, para la resistencia a antimicrobianos (Stanisich, 1988) pudiendo incluir uno o más genes de resistencia. Se denominan plásmidos conjugativos a aquellos que incluyen un conjunto de genes, denominados *tra*, que son los responsables de que se produzca la conjugación de la bacteria que los hospeda con la receptora. Además, pequeños plásmidos no conjugativos que incluyen genes de resistencia pueden transferirse a otra bacteria a través de su integración en plásmidos conjugativos. Estos plásmidos conjugativos también pueden actuar de vectores de transposones e integrones (Bennett, 1995).

A diferencia de los plásmidos, los transposones no poseen sistemas de replicación independientes, necesitando estar integrados en vectores como el ADN cromosómico o los plásmidos. Los transposones varían en tamaño, entre 1 y 60 kb, y estructura. Los más pequeños son conocidos como secuencias de inserción y solamente llevan un gen para la transposasa, que es la responsable de los movimientos, permitiéndoles escindirse de una localización concreta e integrarse en otra. Los más grandes, generalmente, llevan uno o más genes, muchos de los cuales

codifican para la resistencia a antimicrobianos. Pueden insertarse en diferentes posiciones del ADN cromosómico o plasmídico y se pueden transferir de un plásmido a otro o de un plásmido al cromosoma, proporcionando una notable movilidad a los genes de resistencia que incluyen.

Otro importante vehículo en la adquisición de genes de resistencia son los integrones, elementos genéticos móviles que se pueden encontrar en plásmidos, en transposones o integrados en el cromosoma bacteriano y que acumulan una combinación de genes, particularmente genes de resistencia (Bennett, 1999). Entre los genes incluidos en los integrones se encuentra un gen, *IntI*, que codifica una recombinasa sitio-específica conocida como integrasa que permite que el integron se inserte y se escinda del sitio diana (plásmido, transposon o cromosoma), y promotores para la expresión de genes de resistencia, con un sitio de inserción (*attI*) para los casetes de genes de resistencia constituidos por un gen carente de promotor y un sitio específico de recombinación denominado elemento 59 pb o sitio *attC* (Recchia & Hall, 1997). Los integrones también poseen genes que codifican para la resistencia a sulfamidas (*SulI*) y a detergentes (QacE Δ 1) y un marco abierto de lectura con función desconocida (Orf5) (Fluit & Schmitz, 1999). En resumen, los integrones son elementos genéticos específicos de sitio, responsables del reconocimiento, captura y expresión de casetes (Rowe-Magnus & Mazel, 2002; Fluit & Schmitz, 2004).

La transferencia de estos integrones ocurre a través de recombinación específica de sitio y se ha visto que cruza barreras de especie (Bennett, 1999). Esta diseminación de la resistencia antimicrobiana entre diferentes especies a través de integrones es preocupante, ya que permite que las resistencias provenientes de gran número de fuentes pueda ser transferida a bacterias patógenas como *Salmonella*.

En aislados clínicos multirresistentes de *Salmonella* se han detectado integrones que incluyen casetes con resistencia a 8 antimicrobianos diferentes (Naas *et al.*, 2001).

Hasta este momento, se han descrito cinco clases de integrones (Rowe-Magnus & Mazel, 2002). Los más frecuentes son los integrones de clase 1 seguidos de los integrones de clase 2 que están, respectivamente, asociados a transposones de la familia Tn3 y Tn7 (Rowe-Magnus & Mazel, 2002; Fluit & Schmitz, 2004). Este tipo de integrones se han detectado principalmente en enterobacterias gram negativas, aunque también se han encontrado integrones de clase 1 en algunas bacterias gram positivas (Fluit & Schmitz, 2004; Rowe-Magnus & Mazel, 2002; Correia *et al.*, 2003). En la actualidad, los integrones se consideran los principales responsables de la acumulación y diseminación recientes de genes de resistencia en el genoma bacteriano, habiendo despertado gran interés por su implicación en la resistencia a nuevos antibióticos como las cefalosporinas de amplio espectro, carbapenémicos y quinolonas. También se han relacionado con la selección y dispersión epidémica de clones de determinadas especies bacterianas como

Salmonella enterica. Es particularmente importante la capacidad de los integrones para generar estructuras formadas por la asociación de diversos elementos genéticos de resistencia y/o virulencia.

Como hemos señalado anteriormente, la transferencia de genes de resistencia se realiza esencialmente por tres vías: transformación, transducción y conjugación (Bennett, 1995; Schwarz & Noble, 1999; Sefton, 2002).

La adquisición de genes de resistencia por transformación consiste en la captación de ADN desnudo por la célula bacteriana. Aunque este material genético puede ser incorporado de forma natural, generalmente el proceso es más eficiente cuando la bacteria se vuelve “*competente*”, bajo condiciones químicas y físicas particulares (Baur *et al.*, 1996; Davison, 1999). La transformación es el mecanismo más frecuente de introducción de plásmidos en la célula hospedadora en condiciones de laboratorio. Sin embargo, *in vivo*, la transformación es un mecanismo de limitada importancia en la transferencia de genes (Bennett, 1995).

La transducción consiste en la transferencia de ADN exógeno a una célula receptora u hospedadora a través de bacteriófagos. La transmisión de genes de resistencia mediante fagos no es un mecanismo muy común. Por un lado, la transducción está fuertemente ligada a la cantidad limitada de ADN que puede ser empaquetada en el fago y además, se requieren receptores específicos para el ensamblaje de los fagos en la nueva célula hospedadora.

La conjugación es uno de los mecanismos de transferencia horizontal de material genético más reconocidos. Consiste en la transmisión directa de un plásmido conjugativo o un transposón de una bacteria donante a una receptora (Bennett, 1995). Para que la conjugación se lleve a cabo de forma efectiva es necesario el contacto entre ambas células. En los microorganismos gram negativos participa en el proceso un “*pilus conjugativo*” a través del cual se produce el intercambio de material genético. En los microorganismos gram positivos parece jugar un papel fundamental la producción de pequeños péptidos, denominados feromonas, por parte de la célula receptora. Estas moléculas inducen la formación de adhesinas en las células donadoras que favorecen el contacto entre ambas células. La conjugación es considerada como el mecanismo más importante en la propagación de genes de resistencia entre bacterias de diferentes especies y géneros que comparten un mismo hábitat como son la piel y las mucosas del aparato digestivo, del respiratorio y del genital.

8.2. Uso de antimicrobianos en producción animal

Mientras que en medicina humana el uso de antimicrobianos es fundamentalmente terapéutico, en medicina veterinaria han sido usados con tres objetivos claramente diferenciados, terapéuticos, profilácticos y como promotores del crecimiento (Schwarz *et al.*, 2001).

El uso terapéutico y profiláctico incluyen la utilización de antimicrobianos para el tratamiento, control y prevención de infecciones bacterianas en los animales siendo las drogas empleadas con estos fines las mismas o muy similares a las empleadas en medicina humana.

El uso terapéutico de los antimicrobianos se efectúa con el objeto de controlar una infección bacteriana existente. Según el número de animales a tratar o del tipo de producción, este tratamiento puede ser individual, como el que se realiza en animales de compañía donde los antimicrobianos son administrados de forma oral o parenteral. Sin embargo, en muchos casos, cuando es necesario tratar a un grupo numeroso de animales como es el caso de la producción porcina y avícola, el tratamiento individual de los animales es impracticable. En estos casos, se suele realizar un tratamiento de todo el grupo y los antimicrobianos son administrados en el pienso o en el agua de bebida. La aplicación simultánea de antimicrobianos a un grupo de animales cuando algunos presentan síntomas de enfermedad se conoce como metafilaxis. El objetivo de este tipo de tratamientos es evitar la diseminación de la enfermedad a la totalidad del grupo (Schwarz *et al.*, 2001). Sin embargo, a este respecto, es importante señalar que algunos trabajos apuntan que el uso de antimicrobianos suministrados en el pienso, es decir, el tratamiento masivo de los individuos, es un factor de riesgo para la aparición de cepas resistentes. En contraposición, el tratamiento individualizado no supone un riesgo tan elevado (Dunlop *et al.*, 1998).

Por el contrario, la profilaxis es una medida exclusivamente preventiva que puede realizarse tanto en grupos de animales como de forma individualizada. La administración profiláctica de los antimicrobianos se hace imprescindible en determinados momentos de la vida del animal, como pueden ser el destete en producción porcina o el final de lactación en vacuno de leche y en determinadas circunstancias como la mezcla de animales de diferentes procedencias o el transporte. Coincidiendo con esas circunstancias, los animales son, generalmente, más receptivos a las infecciones y la profilaxis está dirigida a evitar estas infecciones (Schwarz *et al.*, 2001).

La administración profiláctica de antimicrobianos ha sido muy criticada por su posible contribución en la selección de bacterias resistentes y el fomento de la diseminación de genes de resistencia (Schwarz *et al.*, 2001).

A este respecto, aún más controvertido ha sido el uso de los antimicrobianos como promotores de crecimiento en animales de producción. En este caso, los antimicrobianos son administrados en bajas concentraciones, concentraciones subterapéuticas, con el objeto de acelerar la ganancia de peso y mejorar los índices de transformación de los alimentos. Recientemente, en un esfuerzo por frenar el desarrollo de resistencias bacterianas, se han tomado una serie de medidas a nivel de la UE que culminaron con la retirada del mercado de todos los antimicrobianos usados como promotores del crecimiento en producción animal en enero de 2006 (Reglamento (CE) 1831/2003). No obstante, continúan utilizándose en los EE.UU. y en otras partes del mundo.

El uso de β -lactámicos y tetraciclinas como promotores de crecimiento está prohibido en Europa desde 1975, por el contrario, en EEUU siguen utilizándose en la actualidad. En 1996, también a nivel europeo, se prohibió la avoparcina como promotor de crecimiento y en 1999 otros seis compuestos: tilosina, espiramicina, virginiamicina, bacitracina, carbadox y olaquinox.

La prohibición de todas estas moléculas como promotores de crecimiento fue consecuencia de la existencia de reacciones de resistencia cruzadas con antimicrobianos empleados en medicina humana (glicopéptidos como la vancomicina o macrólidos como la eritromicina etc...). Entre esta prohibición y la abolición total del uso de antimicrobianos como promotores, en Europa solo estuvo permitido el uso de cuatro moléculas con estos fines: flavofosfolipol, avilamicina, salinomina y monensina (Comisión Europea, 2003).

Existen evidencias claras de la relación de los promotores de crecimiento con la selección de resistencias antimicrobianas. Así, el uso de la clortetraciclina, sulfonamidas y otros compuestos en el pienso se ha relacionado con el incremento de aislados de *E. Coli* resistentes en cerdos de cebo (Dunlop *et al.*, 1998). Hay numerosos estudios que revelan un incremento en los niveles de resistencia antimicrobiana tras la introducción de ciertos compuestos como promotores del crecimiento. Entre estos se encuentran el olaquinox y el carbadox, cuyos niveles de resistencia en aislados de *E. coli* procedentes de cerdos se incrementaron significativamente tras su empleo como promotores (Linton *et al.*, 1988; Ohmae *et al.*, 1981; 1983). Otro ejemplo a este respecto es la aparición de aislados de enterococos resistentes a vancomicina relacionados con el uso de la avoparcina en cerdos (Bager *et al.*, 1997).

Si bien, existe información sobre el tipo de antimicrobianos utilizados en medicina y producción veterinaria, así como la finalidad para la que son destinados, los datos acerca de la cantidad de antimicrobianos empleados en animales destinados al consumo humano son muy escasos e imprecisos. A nivel Europeo, sólo unos pocos países, particularmente países nórdicos,

Dinamarca, Noruega, Suecia, y Holanda disponen de datos exactos (DANMAP, 2003; NORM/NORMVET 2002; SWEDRES/SVARM, 2003; MARAN, 2002).

Sin embargo, sí que existen estimaciones acerca las cantidades usadas de estas sustancias para el conjunto de la UE incluida Suiza (Boatman M., 1998). Estos datos fueron recopilados en un informe de la Federación Europea para la Sanidad Animal (FEDESA, 1997). En dicho informe se estima que en el año 1997 se vendieron en la UE y Suiza 10.493 toneladas de antimicrobianos, de las cuales el 52 % fue destinado a medicina humana y el 33 % a medicina animal, mientras que el 15 % restante se utilizó como promotores del crecimiento. Asimismo, se ha estimado que el 90 % de los antimicrobianos para uso animal, incluidos los utilizados como promotores de crecimiento, producidos en el mundo son administrados a través del pienso. En lo que respecta a las especies animales, fueron utilizados principalmente en ganado porcino (60 %), en aves y conejos (20 %), en rumiantes (18 %) y sólo un 1 % se empleó en acuicultura y en pequeños animales.

8.3. Sistemas de vigilancia de resistencia antimicrobiana

Existe gran preocupación acerca de la posibilidad de transferencia de resistencias antimicrobianas, a través de bacterias entéricas zoonóticas como es el caso de *Salmonella*, desde los animales de renta hacia la población humana. Recientemente, en la UE en un esfuerzo por frenar el desarrollo de resistencias bacterianas, además de prohibir el empleo de antimicrobianos como promotores del crecimiento en producción animal, se han instaurado una serie de programas de vigilancia y monitorización de resistencias antimicrobianas no sólo en el hombre sino también en animales de renta.

Algunos países, entre los que se encuentra España, disponen en la actualidad de programas nacionales de vigilancia para determinar la sensibilidad a antimicrobianos en bacterias aisladas de animales (DANMAP, 2009; Moreno *et al.*, 2000; SVARM, 2008; NARMS, 2007). Además, el Comité for Medicinal Products for Veterinary use o CVMP de la Agencia Europea del Medicamento (EMA) ha puesto en marcha un plan estratégico 2006-2010 para controlar el riesgo de la difusión de resistencias antimicrobianas por productos veterinarios. El objetivo de este plan es el desarrollo e instauración de medidas que garanticen el uso correcto de antimicrobianos en veterinaria de manera que se eviten el desarrollo de resistencias.

8.4. Resistencia antimicrobiana en *Salmonella* Typhimurium y otros serotipos. Diseminación de clones multirresistentes

Como ya hemos indicado, la salmonelosis es una de las enfermedades transmitidas por los alimentos ampliamente distribuida en todo el mundo y la emergencia y la diseminación de resistencias antimicrobianas en *Salmonella* constituye un problema creciente en salud pública (McEwen & Fedorka-Cray, 2002; Teale, 2002; Carlson *et al.*, 2003). El tratamiento de la salmonelosis no requiere, habitualmente, terapia antimicrobiana debido a la naturaleza autolimitante de la infección. Sin embargo, en personas inmunodeprimidas, ancianos y niños, así como en los casos de salmonelosis sistémica grave, la terapia antimicrobiana resulta esencial (Ruiz *et al.*, 2004). Además, algunos estudios indican que las salmonelosis causadas por cepas resistentes pueden ser significativamente más graves que las causadas por cepas sensibles e incluso la duración de la enfermedad puede ser mayor (Lee *et al.*, 1994; Travers & Barza, 2002; Varma *et al.*, 2005).

Hoy en día, se aíslan con frecuencia cepas de *Salmonella* resistentes a varios antimicrobianos o cepas multirresistentes siendo algunas de ellas particularmente patógenas. Este es el caso del clon de *S. Typhimurium* fagotipo DT 104 (Wall *et al.*, 1994). Este clon se caracteriza por poseer un perfil específico de resistencia que incluye ampicilina (A), cloranfenicol (C) o florfenicol (F), estreptomina (S), sulfametoxazol (Su) y tetraciclina (T). Diversos estudios moleculares han evidenciado que este perfil de resistencia está genéticamente codificado en el cromosoma de la bacteria, en conexión con varios integrones recientemente identificados (Briggs & Fratamico, 1999).

La primera cepa con estas características fue aislada en 1984 en el Reino Unido y posteriormente se convirtió en endémica en el ganado vacuno, reservorio desde el que se extendió a otros animales como cerdos, ovejas y pollos (Threlfall *et al.*, 1993; Threlfall, 2000). Desde entonces, este clon se ha diseminado al hombre y a otros animales (Esaki *et al.*, 2004), caracterizándose por causar enfermedad, generalmente grave. El hombre se infecta frecuentemente a través del consumo de productos de origen animal (Helms *et al.*, 2005). Merece la pena señalar que según los datos aportados recientemente por los sistemas de vigilancia instaurados en algunos países, este fagotipo DT 104 de *S. Typhimurium* comienza a mostrar una disminución en su incidencia.

Sin embargo, este perfil de MR característico de cepas de *S. Typhimurium* DT 104 y de fagotipos relacionados como DT U302 y DT 104b, no es exclusivo de este serotipo, habiéndose detectado también en aislados de *S. Agona* (Clockaert *et al.*, 2000; Boyd *et al.*, 2002) así como

en los serotipos Derby, Infantis, Anatum, Mbandaka y 4,5,12:i- (Vidal, 2005), lo que apunta hacia una transmisión horizontal de la resistencia.

En general, la aparición de fenotipos de resistencia característicos en aislados de diferentes serotipos de *Salmonella* (Rissen, Derby, Wein, Kapemba o Panama) ha sido evidenciado por diferentes autores (Gebreyes *et al.*, 2000; Porrero *et al.*, 2002; Gebreyes & Thakur, 2005). En contraposición, se han descrito patrones de resistencia específicos para determinados serotipos (Carraminana *et al.*, 2004; Schroeter *et al.*, 2004).

Desde 1994, también ha aumentado la incidencia de aislamientos de *S. Typhimurium* DT 104 con resistencia adicional a fluoroquinolonas y cefalosporinas de tercera generación, que son los fármacos de elección para el tratamiento de salmonelosis sistémicas en adultos y en niños, respectivamente (Threlfall *et al.*, 1996; Winokur *et al.*, 2000; Fey *et al.*, 2000). Threlfall *et al.* (1997b) propusieron que el uso de este tipo de compuestos en producción animal era el principal responsable de la emergencia de estas resistencias. En Dinamarca, el primer caso de transmisión al hombre de *S. Typhimurium* DT 104 a partir de productos del cerdo y a través de la cadena alimentaria fue descrito en 1999. La cepa identificada en ese brote mostraba el perfil de resistencia ACSSuT con resistencia adicional a fluoroquinolonas.

Numerosos trabajos han demostrado la emergencia de aislados de *Salmonella* resistentes a quinolonas y con sensibilidad reducida a fluoroquinolonas provenientes tanto de animales como de infecciones en el hombre (Threlfall *et al.*, 1997b; Mølbak *et al.*, 2002). Se ha descrito, igualmente, una menor respuesta clínica a estas drogas en los pacientes infectados con aislados de *S. Typhimurium* DT 104 resistentes al ácido nalidíxico en un brote asociado al consumo de productos del cerdo (Mølbak *et al.*, 1999). El hecho de que esta resistencia aparezca en relación a los fagotipos DT 104, DT 104b y DT U302 es particularmente relevante debido a la enorme capacidad de diseminación que han demostrado tener (Hakanen *et al.*, 1999). En este sentido, el empleo de la enrofloxacin en medicina animal se ha asociado a la emergencia de cepas resistentes al ácido nalidíxico y con sensibilidad reducida a ciprofloxacina (Threlfall *et al.*, 1997a; Malorny *et al.*, 1999).

En España se autorizó el uso de la enrofloxacin en pollos, ganado porcino y vacuno en 1986, año a partir del cual se han detectado frecuentemente aislados de *Salmonella* con estas características, especialmente entre los serotipos Hadar y Virchow identificados principalmente en aves (Cruchaga *et al.*, 2001; Usera *et al.*, 2002). Se ha propuesto que este hecho podría ser consecuencia de las diferencias en el modo de aplicación de la enrofloxacin en las distintas especies animales ya que, mientras que en producción porcina la enrofloxacin se utiliza como inyectable, en avicultura se emplea incorporada al pienso, como premezcla, o al agua en forma

soluble. La posible aparición en el mercado de este tipo de preparados en producción porcina podría contribuir a disparar el porcentaje de aislados resistentes.

Las cefalosporinas, en especial las de tercera generación o de amplio espectro, son antimicrobianos de elección en el tratamiento de las salmonelosis invasivas en el hombre, especialmente en niños, donde el uso de fluoroquinolonas está contraindicado debido a sus efectos adversos (Bryan & Scheld, 1992; Cherubin *et al.*, 1986). En este sentido, un aspecto preocupante es la creciente aparición de cepas resistentes a cefalosporina de tercera generación como la ceftriaxona y el ceftiofur, tanto en aislados de origen animal como humano (Winokur *et al.*, 2000; Rankin *et al.*, 2002).

Respecto al fagotipo DT 193 de *S. Typhimurium*, investigaciones realizadas en el Reino Unido han demostrado que es un fagotipo heterogéneo con muchos clones y líneas de hibridación distintas (Baquar *et al.*, 1994). Su fenotipo de resistencia más común es ATSSu y se ha relacionado con aislados de origen porcino (Hampton *et al.*, 1995). Se han identificado brotes de enfermedad en el Reino Unido causados por este fagotipo DT 193 (Thornton *et al.*, 1993) y, particularmente, brotes asociados al consumo de productos derivados del cerdo (Maguire *et al.*, 1993).

La variante monofásica de *S. Typhimurium*, *S.* 4,5,12:i:-, apareció y diseminó rápidamente, adquiriendo relevancia entre los aislados identificados en los casos de salmonelosis en el hombre en 1997. Esta variante monofásica ha sido asociada a reservorios porcinos (Echeita *et al.*, 1999; Cruchaga *et al.*, 2001) y se ha relacionado con un fenotipo de resistencia concreto que incluye el casete típico de *S. Typhimurium* (ACSSuT) con resistencia adicional a gentamicina y apramicina. Se ha propuesto que estas resistencias podrían ser una característica intrínseca de esta variante monofásica (Guerra *et al.*, 2000; De la Torre *et al.*, 2003).

En general, debemos señalar que no se conoce con certeza si la amplia difusión de cepas de *Salmonella* multirresistentes es el resultado del uso inadecuado de antimicrobianos en medicina y producción animal, de la diseminación clonal de ciertas cepas multirresistentes o de una combinación de ambas opciones.

Es cierto que la resistencia a los antimicrobianos más usados en medicina y producción animal es muy común y que el uso veterinario de antimicrobianos puede seleccionar organismos resistentes y facilitar su propagación. Sin embargo, también es conocido que muchos de los genes de resistencia de bacterias gram negativas están localizados en integrones y que los integrones de clase I están ampliamente difundidos entre diferentes serotipos de *Salmonella*, especialmente en el serotipo Typhimurium (Guerra *et al.*, 2000; Randall *et al.*, 2004; White *et al.*, 2003).

Leverstein-van Hall *et al.* (2003) demostraron la existencia de una relación significativa entre la multirresistencia y la presencia de integrones en aislados de la familia *Enterobacteriaceae*. Además, las cepas multirresistentes en las que se detectaron integrones tenían una mayor facilidad para adquirir genes de resistencia adicionales en comparación con otras con el mismo patrón de resistencia pero que no presentaban integrones. Este hecho sugiere que la presencia de integrones facilita la adquisición de otros genes de resistencia.

Además, el uso de antimicrobianos no explica el porqué se encuentran marcadas diferencias entre los patrones de resistencia de distintos serotipos que han estado expuestos a la misma presión selectiva. Van Duijkeren *et al.* (2003) propusieron que quizás este hecho podría explicarse por características particulares de las cepas multirresistentes y por presiones selectivas diferentes del uso de antimicrobianos. Mirold *et al.* (1999) demostraron que el gen *sopE* que codifica para una proteína que participa en la invasión bacteriana de las células del epitelio intestinal, está presente en cepas multirresistentes de diferentes fagotipos de *S. Typhimurium* asociados a ganado vacuno, sugiriendo una transferencia horizontal de este gen entre diferentes aislados de este serotipo.

Otro argumento en contra de que el uso indiscriminado de antimicrobianos es el único responsable de los incrementos en los niveles de resistencia bacteriana es el hecho de que la resistencia a ciertos antimicrobianos se haya desarrollado en ausencia de presión selectiva. Así, se ha descrito resistencia a furazolidona en aislados de los serotipos Enteritidis y Paratyphi B variedad Java procedentes de humanos y pollos con anterioridad a la introducción de esta droga en medicina veterinaria. Van Pelt *et al.* (2003) han sugerido que el alto nivel de resistencia a furazolidona es consecuencia de la diseminación clonal de *S. Paratyphi B* variedad Java. Por otro lado, Gebreyes *et al.* (2006) en un estudio comparativo realizado con aislados de *Salmonella* procedentes de explotaciones porcinas convencionales y de explotaciones porcinas en las que no se emplean antimicrobianos, demostraron que la resistencia antimicrobiana era más común en las granjas donde se usan rutinariamente antibióticos aunque se detectaron aislados multirresistentes de *Salmonella* en las explotaciones libres de antimicrobianos, sugiriendo que factores de riesgo distintos a la presión selectiva marcada por el antimicrobianos permiten la permanencia de cepas resistentes.

8.5. Determinación de la sensibilidad antimicrobiana

Existen diferentes pruebas o métodos para la determinación de la sensibilidad de un determinado microorganismo a los antimicrobianos. Estas pruebas clasifican a los microorganismos en tres categorías: sensibles, intermedios y resistentes. Un resultado sensible significa que la infección causada por ese organismo puede ser apropiadamente tratada con las dosis habituales del antimicrobiano estudiado, mientras que cuando el resultado es resistente, el organismo no sería inhibido por el antimicrobiano a las dosis habituales o lo que es lo mismo, el microorganismo dispone de mecanismos de resistencia contra ese determinado antimicrobiano. La categoría de sensibilidad intermedia incluye microorganismos que son inhibidos por concentraciones del antimicrobiano que están muy cercanas a las alcanzadas en el plasma, por lo que pueden responder pobremente a la terapia. Esta categoría, además, implica que ese antimicrobiano puede ser usado si la infección está localizada en un lugar del organismo en el cuál se encuentra más concentrado de forma fisiológica (por ejemplo, las quinolonas en el tracto urinario), o bien en aplicaciones locales. También puede ser utilizado en concentraciones más elevadas que las recomendadas de forma habitual, siempre que la toxicidad del fármaco lo permita.

La **Tabla 5** muestra las técnicas más frecuentemente utilizadas en la realización de estudios de sensibilidad antimicrobiana y sus ventajas e inconvenientes más destacables.

Tabla 5. Métodos más frecuentes para el estudio de la sensibilidad antimicrobiana y sus principales ventajas e inconvenientes

Métodos	Categorías	CMI ^a (µg/ml)	Ventajas	Inconvenientes
Difusión en agar (Técnica de Kirby-Bauer)	S, I, R ^b	No	Sencilla, de bajo coste, fácilmente interpretable.	Limitada a organismos de crecimiento rápido y no exigente.
Dilución en agar	S, I, R	Sí	Permite analizar numerosos aislamientos a la vez, detecta crecimientos heterogéneos, permiten el estudio de organismos fastidiosos.	Requerimiento de mucho trabajo técnico y lenta.
Dilución en caldo (macrodilución y microdilución)	S, I, R	Sí	Flexibles, permiten el estudio de organismos fastidiosos.	Dificultad para detectar contaminaciones.
E-test	S, I, R	Sí	Rápida, sencilla, lectura directa de la CMI en µg/ml, permite estudiar microorganismos con requerimientos especiales (fastidiosos).	Coste
Métodos automatizados	S, I, R	Sí	Manipulación fácil y rápida (ideales para grandes volúmenes de trabajo), facilita la obtención de estadísticas.	Alto Coste, no adecuados para el estudio de microorganismos con requerimientos especiales.

^a CMI: concentración mínima inhibitoria, ^b S: sensible, I: intermedio, R: resistente.

8.5.1. Método de difusión en agar (Técnica de Kirby-Bauer)

También denominado método de difusión de disco es el procedimiento más generalizado para la determinación de la sensibilidad antimicrobiana. Para la realización de esta técnica, una suspensión bacteriana estandarizada del microorganismo en estudio es inoculada en la superficie de una placa de agar (Mueller-Hinton o Mueller Hinton suplementado con sangre para microorganismos con requerimientos especiales) sobre la cual se colocan discos impregnados con una concentración conocida de antimicrobiano. Durante la incubación el antimicrobiano difunde radialmente a través del agar creando un gradiente de concentración alrededor del disco. A partir de un punto determinado, la concentración del antimicrobiano ya es incapaz de inhibir al microorganismo en estudio. El diámetro del área de inhibición alrededor del disco permite clasificar a los aislados como sensibles, intermedios o resistentes, de acuerdo a las tablas publicadas por el *Nacional Committee for Clinical Laboratory Standards* (NCCLS). Si la técnica se realiza de forma correcta las categorías se correlacionan muy bien con las obtenidas por otros métodos.

La sencillez de esta técnica junto al relativo bajo coste de los reactivos y la no necesidad de equipos especiales para su aplicación hacen que sea una de las más frecuentemente empleadas. Sus principales limitaciones son que únicamente es interpretable para microorganismos de crecimiento rápido y no exigente y que no permite obtener datos exactos de concentración mínima inhibitoria (CMI).

8.5.2. Método de dilución

Los métodos de dilución se utilizan para la determinación de la CMI o mínima concentración de un antimicrobiano que es capaz de inhibir la multiplicación bacteriana, siendo ésta la mejor medida para evaluar *in vitro* la sensibilidad antimicrobiana. Además de la CMI, se determinan los valores de inhibición que engloban al 50 % y al 90 % de las cepas de una especie, CMI₅₀ y CMI₉₀, respectivamente. En los métodos de dilución, los agentes antimicrobianos se analizan en un rango de diluciones de factor dos, que deben incluir concentraciones que permitan discriminar las diferentes categorías de sensible, intermedio y resistente. Este rango de concentraciones probado debe incluir también el rango esperado para la CMI de las cepas control.

Estos métodos de dilución pueden realizarse tanto en medios en caldo como en agar, aunque la microdilución en caldo es el método más utilizado en los laboratorios clínicos. Varias compañías fabrican paneles comerciales que contienen diluciones de uno o generalmente múltiples agentes antimicrobianos en un formato de microdilución en caldo.

Entre las ventajas que presentan los métodos de dilución están la posibilidad de suplementar o reemplazar los medios por otros que permitan el crecimiento de microorganismos exigentes y la posibilidad de proporcionar los resultados tanto en términos cualitativos (sensible, intermedio, resistente) como cuantitativos ($\mu\text{g/ml}$).

8.5.2.1. Método de dilución en agar

En el método de dilución en agar se emplean placas de agar que contienen diferentes concentraciones del antimicrobiano. Las placas son inoculadas con una suspensión bacteriana estandarizada y, tras el periodo de incubación, se examina si existe o no crecimiento bacteriano y se determina la CMI para el antimicrobiano. Los inóculos pueden ser aplicados rápida y simultáneamente a las superficies de agar utilizando un aparato de replicación del inóculo. La mayoría de replicadores disponibles en el mercado transfieren de 32 a 36 inóculos a cada placa. El pH del agar Mueller-Hinton debe estar entre 7,2 y 7,4 a temperatura ambiente y no deben añadirse cationes suplementarios. El medio puede ser complementado con un 5% de sangre de cordero desfibrinada o sangre de caballo lisada en el caso de microorganismos más exigentes como *Streptococcus pneumoniae*.

Las ventajas de las pruebas de dilución en agar incluyen la reproducibilidad de los resultados y el crecimiento satisfactorio de la mayoría de organismos poco o moderadamente exigentes, además de facilitar la detección de contaminaciones y permitir el estudio de asociaciones de antimicrobianos. Sin embargo, sus desventajas incluyen el laborioso trabajo técnico que requiere preparar las placas de dilución en agar, en especial cuando se valoran diferentes antimicrobianos, y su relativamente corto tiempo de almacenamiento. Por lo general, las pruebas de dilución en agar no se realizan en laboratorios clínicos de rutina pero pueden ser ideales para laboratorios regionales de referencia o laboratorios de investigación que deben analizar un gran número de cepas.

8.5.2.2. Métodos de dilución en caldo (macrodilución y microdilución)

a) Macrodilución en caldo

Consiste en determinar la sensibilidad de una bacteria frente a un antimicrobiano por la interacción de ambos en un medio líquido. Para la prueba se emplea un volumen mínimo de 1 ml de cada dilución de antimicrobiano a la que se añade 1 ml de la suspensión bacteriana ajustada. Tras la agitación, cada tubo es incubado a 37°C durante un tiempo mínimo de 16-20 horas, en función del microorganismo a valorar. Es aconsejable realizar un control de pureza del inóculo subcultivando una alícuota de la suspensión bacteriana en un medio sólido no selectivo. La lectura realiza de forma directa considerándose crecimiento positivo si existe turbidez, precipitado o un

punto de sedimento ≥ 2 mm de grosor. La CMI es la concentración más baja del agente antimicrobiano que inhibe completamente el crecimiento del microorganismo en los tubos.

b) *Microdilución en caldo*

A diferencia de la macrodilución en esta prueba se utilizan volúmenes muy pequeños, de 0,2 ml a 0,05 ml. La mayoría de los sistemas emplean un volumen de 0,1 ml por pocillo.

Para la realización de esta prueba se emplean placas de microdilución de poliestireno, siendo las más habituales las de 96 pocillos, en las que se preparan las diferentes diluciones del antimicrobiano en caldo, generalmente diluciones 1:2, a las que se agrega el inóculo de la cepa problema. Existen placas comerciales con diferentes concentraciones de antimicrobianos.

Una placa puede contener de 7 a 8 diluciones de 12 antimicrobianos diferentes. Un pocillo se emplea como control positivo incluyendo el caldo de cultivo junto con el inóculo bacteriano y otro sirve como control negativo incluyendo únicamente el caldo de cultivo. Asimismo, debe realizarse un control de pureza del inóculo subcultivando una alícuota en un medio sólido no selectivo.

El caldo Mueller-Hinton, suplementado con los cationes magnesio y calcio, se recomienda para las pruebas de sensibilidad de microorganismos aeróbios o facultativos y de rápido crecimiento. Su pH, a temperatura ambiente, debe estar entre 7,2 y 7,4. Para microorganismos más exigentes, como *Streptococcus pneumoniae*, el caldo Mueller-Hinton puede ser suplementado con sangre de caballo lisada al 2-5%.

Tras incubar la placa a 37° C durante 16-20 horas, se realiza la lectura por observación directa. La multiplicación del microorganismo se verifica por la presencia de turbidez o de un botón de sedimento en el fondo del pocillo.

8.5.3. E-test

Es uno de los métodos más recientes que se han presentado en el mercado y consiste en una combinación de los métodos anteriores. Se trata de una técnica cuantitativa en placa que permite obtener una lectura directa de CMI, para lo que se emplean tiras plásticas impregnadas en concentraciones crecientes de antimicrobiano indicadas en una escala graduada sobre la propia tira.

Una de sus grandes ventajas es que resulta un método ideal para estudiar cualquier tipo de microorganismo, aerobio o anaerobio, incluyendo aquellos más exigentes o "fastidiosos" o microorganismos con requerimientos especiales para su multiplicación.

La cepa problema se inocula en una placa y sobre ella se deposita la tira del antibiótico o antibióticos a ensayar. Tras una incubación de 16-24 horas a 35°C, se observan las placas y se valora la zona de inhibición, de forma elíptica, alrededor de cada tira. La lectura se realiza de forma directa, anotando el punto de mayor concentración de antibiótico en el que existe crecimiento.

8.5.4. Métodos automatizados

Por lo general, estos métodos emplean sistemas de microdilución en caldo sobre microplacas e interpretan el crecimiento bacteriano en los diferentes pocillos por medio de un autoanalizador (mediciones por turbidez o fluorescencia) o, en el caso de los sistemas más sencillos, por simple lectura óptica del técnico a través de un visor invertido de espejo.

Al estar automatizado o semiautomatizado el sistema, resultan métodos ideales para grandes volúmenes de trabajo. Una de sus grandes limitaciones es que sólo ofrecen garantía para investigar microorganismos de crecimiento rápido y que no tengan requerimientos especiales.

II. OBJETIVOS

Los objetivos propuestos en el presente trabajo de tesis doctoral fueron los siguientes:

1. Determinar la prevalencia bacteriológica de la infección por *Salmonella enterica* en las explotaciones porcinas con cerdos de cebo en España.
2. Conocer los serotipos y serogrupos de *Salmonella enterica* más frecuentes en el ganado porcino de España.
3. Identificar factores de riesgo para la infección por *Salmonella enterica* en las explotaciones porcinas con cerdos de cebo en España.
4. Determinar la frecuencia y distribución de la resistencia y multiresistencia antimicrobiana así como los patrones de resistencia más frecuentes en los aislados de *Salmonella enterica* procedentes de cerdos de cebo en nuestro país.

III. TRABAJOS PUBLICADOS

ESTUDIO I: *Salmonella enterica* Infections in Spanish Swine Fattening Units

Zoonoses Public Health 54 (2007): 294-300

ORIGINAL ARTICLE

Salmonella enterica Infections in Spanish Swine Fattening UnitsC. García-Feliz¹, J. A. Collazos¹, A. Carvajal¹, A. B. Vidal¹, A. Aladueña², R. Ramiro², M. de la Fuente², M. A. Echeita² and P. Rubio¹¹ Departamento de Sanidad Animal (Enfermedades Infecciosas y Epidemiología), Facultad de Veterinaria, Universidad de León, E-24071 León, Spain² Laboratorio Nacional de Referencia de *Salmonella* y *Shigella*, Centro Nacional de Microbiología, Instituto de Salud Carlos III, 28220 Majadahonda, Madrid, Spain**Keywords:***Salmonella enterica*; swine; serovars; phage types; prevalence; faecal culture**Correspondence:**Ana Carvajal Uruña. Departamento de Sanidad Animal (Enfermedades Infecciosas y Epidemiología), Facultad de Veterinaria, Universidad de León, E-24071 León, Spain.
Tel.: 0034 987 291302;
Fax: 0034 987 291304;
E-mail: ana.carvajal@unileon.es

Received for publication July 26, 2007

Summary

The present study is the first conducted in Spain to estimate the bacteriological herd prevalence of *Salmonella enterica* in fattening units and to describe the *Salmonella* serovar diversity on these farms using a sample representative of the entire swine population. For this purpose, 10 faecal samples were collected from 10 different pens containing pigs close to market weight in a total of 232 fattening units. Total sample size was proportionally distributed according to the fattener census in each of the regions of the country and all the samples were examined by culture of 25 g of faecal material. One hundred (43.1%) farms had at least one *Salmonella*-positive sample (95% CI: 37–49.1%). *Salmonella enterica* was detected in 290 (12.5%) pooled faecal floor samples (95% CI: 11.2–13.8%). The apparent herd prevalence of salmonellosis was similar among multi-site, finishing and farrow to finish farms. Overall, 24 different serovars were identified, with *S. Typhimurium*, *S. Rissen* and *S. Derby* being the most common both at herd and sample level. Results of phage typing were available for the 91 isolates of *S. Typhimurium*. A total number of 10 different phage types were identified, with DT 193 being the most frequent. Phage types DT 104, DT 104b and DT U302, which have been associated with several multi-resistant patterns, accounted for 23% and 29% of the *Typhimurium* total isolates or *Typhimurium* infected farms respectively.

- The present study confirms that swine farms in Spain are a reservoir of *Salmonella* and pig and pork products could be a significant source of *Salmonella* infections as has been proposed in other countries.
- A high diversity of serovars was found among Spanish swine fattening units being *Typhimurium* the most prevalent one followed by *Rissen*, *Derby* and 4,5,12:i:-. All these *Salmonella* serovars have been related with disease in humans in Spain.
- A high diversity of phage types among *Salmonella Typhimurium* isolates from Spanish swine farms was detected. It's important to remark that the most prevalent ones were also the most commonly detected among human isolates of *Salmonella Typhimurium* in our country.

Introduction

Infection with *Salmonella enterica* is one of the main causes of human gastroenteritis worldwide and over the last decade pork and pork products have been identified as an important source of human outbreaks of salmonellosis (Schwartz, 1999; Fedorka-Cray and Wray, 2000). In 1999 salmonellosis in humans was attributable to pork or pork products in 10–15%, 14–19% and 18–23% of the cases in Denmark, the Netherlands and Germany, respectively (Hald and Wegener, 1999) while in England and Wales, in the period 1992–1999, 32% of meat related food-borne outbreaks were associated with pig meat and 48% of them were caused by *Samonella* (Smerdon et al., 2001).

Clinical porcine salmonellosis is a major cause of economic loss in pig production and can be separated into two syndromes, one associated with enterocolitis and involving mainly *S. Typhimurium* and the other usually associated with septicaemia and caused by *S. Choleraesuis* (Fedorka-Cray and Wray, 2000). However, swine salmonellosis has gained recognition as a public-health problem. Pigs are susceptible to a wide variety of serovars of *Salmonella* and although infected pigs usually remain as healthy carriers, sub-clinically infected pigs may excrete *Salmonella* spp. in faeces or keep the bacteria in the digestive tract, the closely associated lymph nodes or the tonsils (Fedorka-Cray and Wray, 2000). *Salmonella* carrier pigs entering the slaughterhouse have been demonstrated to be the most important sources of carcasses and products contamination (Bahnsen et al., 2006).

In response to the ongoing need to protect the health of consumers, the European Union (EU) is now requiring all member states to develop monitoring programmes for *Salmonella* in swine. Directive 2003/99/EC on the monitoring of zoonosis and zoonotic agents and Regulation (EC) No. 2160/2003 on the control of *Salmonella* and other zoonotic agents provide detailed regulations for monitoring, and targets for reducing the *Salmonella* prevalence in pig herds. Several countries with medium or high *Salmonella* prevalence among swine farms: the UK, Ireland, Germany, Holland and particularly Denmark have implemented *Salmonella* control programmes. The Danish *Salmonella* Control Program was the first and started in January 1995 with the main objective of reducing the occurrence of *Salmonella* spp. in pig herds and pork products (Mousing et al., 1997). The key element of the programme is a classification scheme of the herds based on a serological survey using a mix LPS-ELISA containing the O-antigen factors 1, 4, 5, 6, 7 and 12 (Nielsen et al., 1995), which are in serogroups B and C1, and which were previously determined as being the most prevalent ones among swine farms in Denmark (Baggesen et al., 1996). On the other hand, *Salmonella* Control Programs from Sweden, Norway and Finland, countries with a low prevalence of infection, are based in the rejection of *Salmonella* contaminated animals, feed and food products.

The development of pig production in Spain has been spectacular. It has increased by 38% since 1997 to reach 3.3 million Tm in 2006. This is the second highest output in the EU and pig meat exports have doubled in the last 5 years to reach almost 670.000 Tm in 2005 (data from the Ministry of Agriculture and Livestock). In spite of the importance of the Spanish swine industry, there is a lack of information concerning *Salmonella* status in Spanish swine farms. The aim of the present study was to determine the bacteriological prevalence of sub-clinical *Salmonella* infections in Spanish swine farms and to

determine the most frequently isolated serovars of the bacteria.

Material and Methods

Study design, sample size and selection of herds

The study ran from March 2003 to February 2004 and focused on fattening units, farms that delivered slaughter pigs and included only finishing, farrow to finish (own production of growers in one site) and multi-site (own production of growers in more than one site) farms. Fattening units were chosen because swine salmonellosis is particularly relevant as a public health problem and it was decided to sample those pens containing pigs about to be sent for slaughter.

The number of herds to be sampled was calculated using the WIN EPISCOPE computer package (Frankena et al., 1990), taking data from the latest available census (December 2002) of swine fattening units in Spain (data from the Ministry of Agriculture and Livestock <http://www.mapa.es/es/estadistica/pags/anuario/introduction.htm>). Although there was very little documentation on the true prevalence of *Salmonella* infection in Spanish swine herds at the time of the sampling, the limited available data on our country was used (Vidal et al., 2002; Mejía et al., 2003) and 35% was taken as the expected bacteriological prevalence of *Salmonella*-positive farms. It was calculated that, with a 95% CI and an absolute error of $\leq 7\%$, a total number of 179 farms would have to be sampled.

Total sample size was proportionally divided according to the fattener census in each of the regions of the country (17) and within each of these regions, sample size was again proportionally distributed according to the number of fattening units in each of the provinces included in a region. The Canary Islands, Balearic Islands, Madrid, Cantabria and Asturias regions were not sampled as their production of market pigs was $<1\%$ of the total of the country.

Farms were selected from those affiliated to veterinary practices or farmer organizations as well as to feed companies that indicated in a previous interview that were willing to cooperate. The number of farms sampled within each organization was proportional to their client base in each province, allowing those with a larger number of fattening places to participate with more farms. The annual production of selected companies and organizations represented approximately 70% of swine market production in Spain.

Within each farm, pens were defined as sub-units of sampling. Animals within a pen share common characteristics such as nutrition, housing or exposure to infectious agents (McDermott et al., 1994) that would probably

result in a common *Salmonella* infectious status. It was decided to collect 10 samples from 10 different pens within each herd, with a 95% probability of at least one positive sample in a target herd with a prevalence of 25% of positive pens. Pens were selected by practitioners from those containing finishing swine within 4 weeks of shipment using a systematic random sampling procedure. Within each pen, a pool of approximately 25 g of fresh faecal material (5 × 5 g) was collected from five different locations distributed all over the pen into 100 ml sterile flasks.

All collaborating companies and organizations were provided with coolers containing pre-labelled flasks for the collection of faecal samples as well as sampling forms and instructions for sampling and sample submission. Faecal samples were collected by practitioners on one visit to each selected farm. Information on herd size and type was collected as part of a questionnaire.

Microbiological examination

Each sample was investigated separately using conventional bacteriological analysis with three incubation steps. Samples were thoroughly mixed using a sterile spatula and 25 g of faecal material were added to 225 ml of buffered peptone water (Merck, Darmstadt, Germany), gently mixed and incubated at 37°C for 18–22 h for non-selective enrichment. Selective enrichment was performed by inoculating 0.1 ml of the buffered peptone water solution with 10 ml of Rappaport Vassiliadis broth (Merck, Darmstadt, Germany), followed by incubation at 41.5°C for 18–22 h. A delayed 2-day secondary enrichment was performed in all the samples to increase sensitivity. Finally, 1 µl of the selective broth was plated onto the indicative media, xylose-lysine-tergitol-4 agar (Merck, Darmstadt, Germany) and further incubated overnight at 37°C. Plates were evaluated for typical colonies of *Salmonella* species after 24 ± 3 h incubation. Suspected *Salmonella* colonies were screened using indol test and 4-methylumbelliferyl caprilate fluorescence test (Mucap test; Biolife, Milano, Italia) and confirmed as *Salmonella* seeding them in Kligler Iron Agar (Oxoid, Madrid, Spain), Lysine Iron Agar (Difco, Barcelona, Spain) and Motility Indole Ornithine Medium (Difco, Barcelona, Spain). One single *Salmonella*-confirm isolate from each positive sample was frozen and forwarded to the National Reference Laboratory for *Salmonella* and *Shigella* (NRLSS) (Instituto de Salud Carlos III, Madrid, Spain) for typing.

Salmonella serogrouping, serotyping and phage-typing

All isolates were serotyped according to the Kauffmann-White scheme (Popoff and Le Minor, 1992) using slide

agglutination with antisera purchased from the Statens Serum Institut (Copenhagen, Denmark) or from Bio-Rad Laboratories (Madrid, Spain). Phage typing of *S. Typhimurium*, *S. 4,5,12:i-* and *S. 4,12:i-* was performed in accordance with the methods of the Laboratory of Enteric Pathogens, Health Protection Agency, Colindale, London, UK (Anderson et al., 1977).

Data handling and statistical procedure

All data were stored and analysed in EpiInfo® for Windows (CDC, Atlanta, Georgia, USA). All herds with at least one isolate of *Salmonella* spp. were defined as positive and estimates of apparent prevalence of positive samples and positive herds were calculated. An univariate analysis using the chi-square test at $\alpha = 0.05$ was used to detect any association between the prevalence of positive herds among the different regions (regions with <8 sampled farms were not included in the analysis) and the type of farm (multi-site, individual finishing or farrow to finish). The correlation between the prevalence of positive samples or herds and the total number of fattening units or the density of fatteners (fatteners >50 kg/km²) in each of the regions was calculated using the Pearson's product-moment correlation for uncategorized variables.

Results

A total of 2320 faecal pen floor specimens and 232 farms producing market pigs and located in 12 different regions of Spain were sampled through the study. The estimated number of slaughtered pigs per year in each farm ranged from 100 to 187 000 with a median of 3500 (mean 7316.6).

Salmonella spp. were recovered from 290 of 2320 faecal floor specimens (12.5%; 95% CI: 11.2–13.8%) and 100 out of 232 farms housing fattening pigs had at least one positive sample (43.1%; 95% CI: 37–49.1%). The number of positive samples per positive farm ranged from 1 to 10 with a median of 2 (mean 2.9).

The apparent herd prevalence in different regions of Spain is shown in Table 1. In particular, Castilla y León, a region located in the north-west part of Spain, showed a lower prevalence of *Salmonella*-positive herds. The risk of a herd being positive for *Salmonella enterica* in Castilla y León was four times (OR = 4.04, 95% CI: 1.54–11.22%) lower as compared with the rest of the country ($\chi^2 = 9.1$; $P = 0.002$). There was no statistical significant correlation across the different regions between the prevalence of positive herds or positive samples and the total number of fattening units or the number of fatteners (>50 kg/km²) in the area.

Table 1. Apparent prevalence of *Salmonella enterica* at herd and sample level obtained in bacteriological examination of faecal samples collected in 232 Spanish farms housing fattening pigs, total number of fattening units and density of fatteners (fatteners >50 kg/km²) in the main pig producing regions of Spain

	Positive herds (%)	Positive samples (%)	Fattening units (%)	Fatteners (>50 kg/km ²)
Galicia	2 (25)	7 (8.7)	2.4	7.8
Aragón	21 (46.6)	68 (15.1)	20.7	41.9
Cataluña	26 (53)	81 (16.5)	24.7	73.6
Castilla y León	6 (15.8)	18 (4.7)	11.7	12
Castilla La Mancha	12 (60)	37 (18.5)	7.5	9.6
Valencia	3 (33.3)	9 (10)	5	20.7
Murcia	7 (46.7)	22 (14.6)	7.5	64.2
Extremadura	4 (36.4)	8 (7.3)	7.2	16.7
Andalucía	12 (50)	24 (10)	10	11.1
Total	100 (43.1)	290 (12.5)		

Most of the participating farms were multi-site operations (41.9%) while the rest were individual finishing farms (33.3%) or part of farrow-to-finish operations (24.8%). The apparent herd prevalence of salmonellosis was 42%, 42.8% and 36.5%, respectively, among multi-site, finishing and farrow to finish farms. These differences did not reach statistical significance ($\chi^2 = 4.8$; $P = 0.088$).

The most frequently isolated serogroups were B and C1, detected in 62% and 31% of the positive samples respectively. Other serogroups identified were E1 (3.4%), G (1.7%), C2 (1.4%), D1 (0.3%) and K (0.3%). The predominant serovar was *S. Typhimurium*, comprising 91 of the isolates (31.4%), followed by 69 *S. Rissen* (23.8%) and 47 *S. Derby* (16.2%). Altogether, a total of 24 different serovars were detected (Table 2).

At herd level, 90% of the positive herds were infected by *Salmonella* serogroups B or C1. *S. Typhimurium* was found in 38 farms (38%). Other frequent serovars were *S. Rissen*, *S. Derby*, *S. 4,12:i:-*, *S. 4,5,12:i:-* and *S. Bredeney* with 25%, 14%, 8%, 7% and 7% of the positive herds respectively. In 66% of the farms only one *Salmonella* serovar was recovered while in 27% and 7% of the farms two and three different serovars respectively were detected.

Results of phage typing were available for isolates of *S. Typhimurium*, including *Typhimurium* var. *Copenhagen* (Table 3), the O:5-negative variant of *Salmonella* serovar *Typhimurium*, and also for the 22 isolates of *S. 4,5,12:i:-* and *S. 4,12:i:-*. A total number of nine different phage types of *S. Typhimurium* were identified with DT 193 being the most frequently identified (31.9%), followed by DT 104b (9.9%). Twenty-two isolates (24.2%) were non-typable and 6 (6.6%) were atypical or reaction

Table 2. Distribution of *Salmonella* serovars isolated from 100 *Salmonella*-positive Spanish farms housing fattening pigs

<i>Salmonella</i> serovar	<i>Salmonella</i> serogroup	Positive samples (%)	Positive herds (%)
Typhimurium	B	44 (15.2)	19 (19)
Typhimurium var.Copenhagen	B	47 (16.2)	21 (21)
Rissen	C1	69 (23.8)	25 (25)
Derby	B	47 (16.2)	14 (14)
4,5,12:i:-	B	12 (4.1)	7 (7)
4,12:i:-	B	10 (3.4)	8 (8)
Bredeney	B	13 (4.5)	7 (7)
Montevideo	C1	12 (4.1)	5 (5)
Anatum	E1	7 (2.4)	4 (4)
Wien	B	5 (1.7)	3 (3)
Kedougou	G	3 (1.1)	2 (2)
Tennessee	C1	3 (1.1)	1 (1)
Ohio	C1	2 (0.7)	2 (2)
Muenchen	C2	2 (0.7)	2 (2)
Meleagridis	E1	2 (0.7)	1 (1)
Worthington	G	2 (0.7)	1 (1)
Agona	B	1 (0.3)	1 (1)
Infantis	C1	1 (0.3)	1 (1)
Livingstone	C1	1 (0.3)	1 (1)
London	E1	1 (0.3)	1 (1)
Newport	C2	1 (0.3)	1 (1)
Hadar	C2	1 (0.3)	1 (1)
Goldcoast	C2	1 (0.3)	1 (1)
Enteritidis	D	1 (0.3)	1 (1)
Cerro	K	1 (0.3)	1 (1)

Table 3. Distribution of phage types among 91 *Salmonella* Typhimurium isolates from Spanish farms housing fattening pigs

Phage types of <i>S. Typhimurium</i>	No. isolates (%)	No. herds (%)
DT 193	29 (31.9)	10 (25)
DT 104	6 (6.6)	5 (12.5)
DT 104b	9 (9.9)	3 (7.5)
DT U ₃₀₂	6 (6.6)	3 (7.5)
DT 23	6 (6.6)	1 (2.5)
DT 208	4 (4.4)	1 (2.5)
DT 179	1 (1.1)	1 (2.5)
DT 194	1 (1.1)	1 (2.5)
DT 41	1 (1.1)	1 (2.5)
RDNC	6 (6.6)	5 (12.5)
Non-typable	22 (24.2)	15 (33.3)
Total	91	40

RDNC, reaction does not conform.

does not conform which indicated that the tested bacterial strain reacted with some of the typing phages but did not conform to a standard phage type. Two phage types occurred in seven farms (15.2% of the *S. Typhimurium* infected farms) while three phage types occurred in one herd (2.4%). Phage typing of the 12 *S. 4,5,12:i:-* isolates classified seven of them as DT U302 (58.3%) while

among the 9 S. 4,12:i- isolates, phage type DT 193 was the most common (33.3%).

Discussion

Serological detection using mix LPS-ELISAs, which combine different O-antigens, have been proposed as the best option to establish the *Salmonella* prevalence in pig herds (Nielsen et al., 1995; Van der Heijden et al., 1998; Van der wolf et al., 1999). However, bacteriological surveys are necessary to establish the prevalence of different *Salmonella* serogroups, determined by O-antigens, in each particular area and consequently to determine the sensitivity of these serological tests for all the *Salmonella* infections occurring in the population (EFSA, 2006). On the other hand, estimates of bacteriological prevalence of *Salmonella* infections in pigs can be established at either the farm or the slaughterhouse with very different results. Williams and Newell (1967) have already demonstrated that different results were obtained at the farm and the slaughterhouse with samples collected from the same pigs. More recently, Fedorka-Cray et al. (1995) demonstrated that *S. Typhimurium* can be isolated from the caecal content within 4–6 h after oral exposure of pigs to the bacterium and Hurd et al. (2002) showed a 7-fold-higher *S. enterica* isolation rate from pigs necropsied at the slaughterhouse as compared with those slaughtered on the farm.

The present study is the first large-scale screening for *Salmonella* spp. conducted in Spain. Apparent bacteriological prevalence of *Salmonella* infection was estimated using faecal samples collected on swine farms housing fattening pigs distributed through the whole country and was found to be moderately high, both at the sample (12.5%) and the herd level (43.1%). These data are higher than the 6% sample and 38% farm prevalence reported by Fedorka-Cray et al. (1996) on swine farms in the USA, the 23.7% farm prevalence in the Netherlands described by Van der wolf et al. (1999) or the 11.4% farm prevalence described by Christensen et al. (2002) 4 years after the implementation of the Salmonella Control Program in Denmark. In contrast, the results of this study are similar or lower to the 14.3% and 66.7% reported by Rajic et al. (2005) on 90 Alberta finishing farms at the sample and farm level respectively, 51% of positive farms found in Ireland (Rowe et al., 2003) or 57.3% of positive swine farms detected across five states of the USA (Rodríguez et al., 2006).

Comparisons among different studies should be considered very carefully as prevalence estimates are affected by the sampling strategy (sample size and type of sampling) and isolation procedure (Davies et al., 2000; Funk et al., 2000; Rajic et al., 2005). Funk et al. (2000) demonstrated an increase in sensitivity associated with increased faecal sample size whereas Davies et al. (2000) reported differ-

ences in the sensitivity of bacteriological culture depending on testing protocols. So, besides other factors, the use of 10 pen floor samples per farm with a minimum of 25 g each, which were processed individually, and the microbiological procedure which included pre-enrichment, enrichment and selective steps may account for the higher prevalence found in this study in comparison with previous ones. Moreover, each faecal sample was a pooled sample as it was collected from five different locations within each pen. According to Arnold et al. (2005), the sensitivity of microbiological methods increases with the number of samples in the pool.

This study found that the apparent prevalence of *Salmonella* infected herds was lower in Castilla y León, one of the largest regions in the EU, which represented more than 10% of the Spanish fattener and nearly 20% of the Spanish breeding sow census (data from the Ministry of Agriculture and Livestock <http://www.mapa.es>). No correlation could be demonstrated between the prevalence of *Salmonella*-positive herds or samples and the total number of fattening units or the density of fatteners in each of the sampled areas. Nevertheless, it is important to emphasize that Aragón, Catalonia and Murcia regions, where more than 50% of the Spanish fattening units are concentrated, and are the most highly concentrated areas of pig production in Spain, reached very high values of *Salmonella*-positive herds and samples.

A total of 24 different serovars were identified, indicating a great diversity among swine *Salmonella* isolates, probably as a result of multiple infective sources (Baggesen et al., 1996). A variety of *Salmonella* serovars in swine farm samples, higher than those of beef, dairy or poultry farms, has been reported by Rodríguez et al. (2006). As previously described in swine farms of other countries (Baggesen et al., 1996; Van der wolf et al., 1999; Rowe et al., 2003; Rajic et al., 2005), *S. Typhimurium* was the predominant serovar at the herd (40%) and individual level (31.4%). Among them, its O:5-negative variant, designated variant Copenhagen, which was primarily reported to be found in pigeons but it is now also isolated from cattle, swine and other animals (Frech et al., 2003), was the most frequent at the herd (16.2%) and individual level (21%). Although the variant Copenhagen has rarely been related with diseases in humans, during 2003 and 2004 it was identified in the NRLSS in 8.2% and 9.7% of the Spanish human isolates respectively (data do not shown).

According to the results reported by Mejía et al. (2003) on swine farms in Catalonia and Astorga et al. (2007) on Andalusian swine production units, *S. Rissen*, detected in 25% of the farms, was the second serovar isolated from Spanish swine fattening units. This serovar has also emerged since the year 2000 among Spanish human isolates of *Salmonella* and ranked 6th in importance in

2002–2003 (Echeita et al., 2005), being mostly associated with pork products (De Frutos et al., 2005). Conversely, S. Derby, a serovar which it has been suggested is able to establish a persistent infection in pig herds (Baggesen et al., 1996), was isolated in 16% of the samples and 14% of the positive farms. Regarding this, a clone of S. Derby in swine samples, pork-derived products and subsequently in humans has recently been described in Spain (Valdezate et al., 2005).

The S. 4,5,12:i:-, a serovar that emerged and spread among human isolates of *Salmonella* in 1997 and has been associated with a swine reservoir (Echeita et al., 1999), ranks 4th in our study. It has been suggested that this serovar originates from S. Typhimurium DT U302 strains (Echeita et al., 1999, 2001; De la Torre et al., 2003), and is frequently associated with the multi-resistance profile R-ACSSuT (ampicillin, chloramphenicol, streptomycin, sulfonamide and tetracycline) as well as resistance to gentamicin and trimethoprim-sulfamethoxazole (De la Torre et al., 2003).

Knowledge of prevailing serogroups of *Salmonella* is important because it is an important factor influencing the sensitivity of mix LPS-ELISAs used for serological detection of *Salmonella* infected farms. Most of these techniques are designed to detect antibodies only against serogroups B, C1 and D1 (Nielsen et al., 1995; Van der Heijden et al., 1998) and therefore 91% of the infected farms in this study should be identified using the serological approach (Table 2). A similar result has been described for Denmark (Baggesen et al., 1996), the Netherlands (Van der wolf et al., 1999) or Canada (Letellier et al., 1999; Rajic et al., 2005).

The present investigation has also demonstrated a high diversity of phage types among S. Typhimurium isolates with nine different types regardless of the high number of non-typable strains. Phage type DT 193 was the most frequently identified, followed by DT 104, DT 104b and DT U302. Moreover, these phage types were also the most frequent among human isolates of S. Typhimurium in Spain (Echeita et al., 2005). It is very important to emphasize that DT 104 that is now acknowledged as an internationally distributed zoonotic pathogen (Helms et al., 2005), DT U302, closely related to DT 104 and DT 104b phage types have been associated with several multi-resistant patterns and account for 23% and 29% of the Typhimurium total isolates or Typhimurium infected farms respectively.

Acknowledgements

We gratefully acknowledge the pig farmers and veterinarians, their organizations and the feed companies for their active co-operation in the development of the project. G.F. Bayón provided excellent technical assistance. This

work was funded by the Ministerio de Agricultura, Pesca y Alimentación and the Ministerio de Ciencia y Tecnología project No.GL2002-04161-C02-01.

References

- Anderson, E. S., L. R. Ward, M. J. Saxe, and J. D. de Sa, 1977: Bacteriophage typing designations of *Salmonella* Typhimurium. *J. Hyg. (London)* 78, 297–300.
- Arnold, M. E., A. J. C. Cook, and R. H. Davies, 2005: A modelling approach to estimate the sensitivity of pooled faecal samples for isolation of *Salmonella* in pigs. *J. R. Soc. Interface* 2, 365–372.
- Astorga, R. J., M. A. Echeita, A. Maldonado, S. Valdezate, A. Carbonero, A. Aladueña, and A. Arenas, 2007: Surveillance and antimicrobial resistance of *Salmonella* strains isolated from slaughtered pigs in Spain. *J. Food Protect.* 70, 1502–1506.
- Baggesen, D. L., H. C. Wegener, F. Bager, H. Stege, and J. Christensen, 1996: Herd prevalence of *Salmonella enterica* infections in Danish slaughter pigs determined by microbiological testing. *Prev. Vet. Med.* 26, 201–213.
- Bahnsen, P. B., P. J. Fedorka-Cray, S. R. Ladely, and N. E. Mateus-Pinilla, 2006: Herd-level risk factors for *Salmonella enterica* subsp. *enterica* in U.S. market pigs. *Prev. Vet. Med.* 76, 249–262.
- Christensen, J., D. L. Baggesen, B. Nielsen, and H. Stryhn, 2002: Herd prevalence of *Salmonella* spp. in Danish Salmonella Control Program with reference to a pre-implementation study. *Vet. Microbiol.* 88, 175–188.
- Davies, P. R., P. K. Turkson, J. A. Funk, M. A. Nichols, S. R. Ladely, and P. J. Fedorka-Cray, 2000: Comparison of methods for isolating *Salmonella* bacteria from faeces of naturally infected pigs. *J. App. Microbiol.* 89, 169–177.
- De Frutos, C., E. Ortíz, A. Herrero, J. L. Ayala, and B. Fernández, 2005: Análisis de los serotipos de *Salmonella* spp. Aislados durante los años 2002, 2003 y 2004 por los laboratorios de Sanidad Animal en España. *Bol. Epidemiol. Sem. CNE IS-CIII* 13, 133–144.
- De la Torre, E., D. Zapata, M. Tello, W. Mejía, N. Frías, F. J. García Peña, E. M. Mateu, and E. Torre, 2003: Several *Salmonella enterica* subsp. serotype 4,5,12:i:- phage types isolated from swine samples originate from serotype Typhimurium DT U302. *J. Clin. Microbiol.* 41, 2395–2400.
- Echeita, M. A., A. Aladueña, S. Cruchaga, and M. A. Usera, 1999: Emergence and spread of an atypical *Salmonella enterica* subsp. *enterica* serotype 4,5,12:i:- strain in Spain. *J. Clin. Microbiol.* 37, 3425.
- Echeita, M. A., S. Herrera, and M. A. Usera, 2001: Atypical, *flj*-negative *Salmonella enterica* subsp. *enterica* strain of serovar 4,5,12:i:- appears to be a monophasic variant of serovar Typhimurium. *J. Clin. Microbiol.* 39, 2981–2983.
- Echeita, M. A., A. Aladueña, R. Gonzalez-Sanz, M. de la Fuente, F. Cerdán, M. Arroyo, and R. Gutierrez, 2005: Análisis de las cepas de *Salmonella* spp. aisladas de muestras

- clínicas de origen humano en España. Años 2002 y 2003. *Bol. Epidemiol. Sem. CNE ISCIII* 13, 85–96.
- EFSA, 2006: Opinion of the scientific panel on biological hazards on “risk assessment and mitigation options of *Salmonella* in pig production”. *The EFSA J.* 341, 1–131.
- Fedoraka-Cray, P. J., and C. Wray, 2000: *Salmonella* infections in pigs. In: Wray, C., and A. Wray (eds), *Salmonella in Domestic Animals*, pp. 191–207. CAB International, London.
- Fedoraka-Cray, P. J., L. Collins Kelley, T. J. Stabel, J. T. Gray, and J. A. Laufer, 1995: Alternate routes of invasion may affect pathogenesis of *Salmonella* Typhimurium in swine. *Infect. Immun.* 63, 2658–2664.
- Fedoraka-Cray, P. J., E. J. Bush, and L. A. Thomas, 1996: Results of the NAHMS Swine '95 Grower/Finisher Survey. Annual Meeting of the United States Animal Health Association, October 14–17. Available at: <http://www.nadc.ars.usda.gov/virtconf/submabs/abstracts/F00002.html> (accessed 4 September 2007).
- Frankena, K., J. P. T. M. Noordhuizen, P. Willeberg, P. F. Van Voorthuysen, and J. O. Goelema, 1990: EPISCOPE: computer programs in veterinary epidemiology. *Vet. Rec.* 122, 86–87.
- Frech, G., C. Kehrenberg, and S. Schwarz, 2003: Resistance phenotypes and genotypes of multiresistant *Salmonella enterica* subsp. *enterica* serovar Typhimurium var. Copenhagen isolates from animal sources. *J. Antimicrob. Chemother.* 51, 180–182.
- Funk, J. A., P. R. Davies, and M. A. Nichols, 2000: The effect of faecal sample weight on detection of *Salmonella enterica* in swine feces. *J. Vet. Diagn. Invest.* 12, 412–418.
- Hald, T., and H. C. Wegener, 1999: Quantitative assessment of the sources of human salmonellosis attributable to pork. In: Proceedings of the Third International Symposium on the Epidemiology and Control of Salmonella in Pork, pp. 200–205. Washington, D.C.
- Helms, M., S. Ethelberg, K. Molbak, and the DT104 Study group, 2005: International *Salmonella* Typhimurium DT104 infections, 1992–2001. *Emerg. Infect. Dis.* 11, 859–867.
- Hurd, H. S., J. D. McKean, R. W. Griffith, I. V. Wesley, and M. H. Rostagno, 2002: *Salmonella enterica* infections in market swine with and without transport and holding. *Appl. Environ. Microbiol.* 68, 2376–2381.
- Letellier, A., S. Messier, J. Paré, J. Ménard, and S. Quessy, 1999: Distribution of *Salmonella* in swine herds in Québec. *Vet. Microbiol.* 67, 299–306.
- McDermott, J. J., Y. H. Schukken, and M. M. Shoukri, 1994: Study design and analytical methods for data collected from clusters of animals. *Prev. Vet. Med.* 18, 175–191.
- Mejía, W., D. Zapata, M. Martín, J. Casal, and E. Mateu, 2003: Epidemiology of salmonellosis in fattening units of Catalonia (Spain): a bacteriological survey. In: Proceedings of the Fifth International Symposium on the Epidemiology and Control of *Salmonella* in Pork, pp. 4–7. Crete, Greece.
- Mousing, J., P. T. Jensen, C. Halgaard, F. Bager, N. Feld, B. Nielsen, J. P. Nielsen, and S. Bech-Nielsen, 1997: Nationwide *Salmonella enterica* surveillance and control in Danish slaughter swine herds. *Prev. Vet. Med.* 29, 247–261.
- Nielsen, B., D. Baggesen, F. Bager, J. Haugegaard, and P. Lind, 1995: The serological response to *Salmonella* Typhimurium and *S. Infantis* in experimentally infected pigs. The time course followed with an indirect anti-LPS ELISA and bacteriological examinations. *Vet. Microbiol.* 47, 205–218.
- Popoff, M. Y., and L. Le Minor, 1992: Antigenic Formulas of the *Salmonella* Serovars. WHO Collaborating Center for Reference and Research on Salmonella. Institut Pasteur, Paris.
- Rajic, A., J. Keenlside, M. E. McFall, A. E. Deckert, A. C. Muckle, B. P. O'Connor, K. Manninen, C. E. Dewey, and S. A. McEwen, 2005: Longitudinal study of *Salmonella* species in 90 Alberta swine finishing farms. *Vet. Microbiol.* 105, 47–56.
- Rodriguez, A., P. Pangloli, H. A. Richards, J. R. Mount, and F. A. Draughon, 2006: Prevalence of *Salmonella* in diverse environmental farm samples. *J. Food Prot.* 69, 2576–2580.
- Rowe, T. A., F. C. Leonard, G. Kelly, P. B. Lynch, J. Egan, A. M. Quirke, and P. J. Quinn, 2003: *Salmonella* serotypes present on a sample of Irish pigs farms. *Vet. Rec.* 153, 453–456.
- Schwartz, K. J., 1999: Salmonellosis. In: Straw, B. E., S. D'Ala-laire, W. L. Mengeling, and D. J. Taylor (eds), *Diseases of Swine*, pp. 535–551. Blackwell, Oxford.
- Smerdon, W. J., G. K. Adak, S. J. O'Brien, and I. A. Gillespie, 2001: General outbreaks of infectious intestinal disease linked with red meat, England and Wales, 1992–1999. *Commun. Dis. Publ. Health* 4, 259–267.
- Valdezate, S., A. Vidal, S. Herrera-León, J. Pozo, P. Rubio, M. A. Usera, A. Carvajal, and M. A. Echeita, 2005: *Salmonella* Derby clonal spread from pork. *Emerg. Infect. Dis.* 11, 694–698.
- Van der Heijden, H. M. J. F., P. H. M. Boleij, W. L. A. Loeffen, J. H. Bongers, P. J. van der Wolf, and M. J. M. Tielen, 1998: Development and validation of an indirect ELISA for the detection of antibodies against *Salmonella* in Swine. In: Proceedings of the 15th IPVS Congress, 5–9 July, Vol. 2, p. 69. Birmingham.
- Van der wolf, P. J., J. H. Bongers, A. R. W. Elbers, F. M. M. C. Franssen, W. A. Hunneman, A. C. A. van Exsel, and M. J. M. Tielen, 1999: *Salmonella* infections in finishing pigs in Netherlands: bacteriological herd prevalence, serogroup and resistance of isolates and risk factors for infection. *Vet. Microbiol.* 67, 263–275.
- Vidal, A. B., J. Pozo, M. L. Arriba, A. Carvajal, and P. Rubio, 2002: Detection of *Salmonella* in Spanish Swine herds with diarrhoea. In: Proceedings of the 13th International Symposium *Salmonella* and Salmonellosis, pp. 345–346. Saint-Brieuc, France.
- Williams, L. P., and K. W. Newell, 1967: Patterns of *Salmonella* excretion in market swine. *Am. J. Publ. Health* 57, 466–471.

ESTUDIO II: Antimicrobial Resistance of *Salmonella enterica* Isolates from Apparently Healthy and Clinically Ill Finishing Pigs in Spain.

Zoonoses Public Health. 55 (2008): 195-205

ORIGINAL ARTICLE

Antimicrobial Resistance of *Salmonella enterica* Isolates from Apparently Healthy and Clinically Ill Finishing Pigs in Spain

C. García-Feliz¹, J. A. Collazos¹, A. Carvajal¹, S. Herrera², M. A. Echeita² and P. Rubio¹

¹ Departamento de Sanidad Animal (Enfermedades Infecciosas y Epidemiología), Facultad de Veterinaria, Universidad de León, E-24071 León, Spain

² Laboratorio Nacional de Referencia de *Salmonella* y *Shigella*, Centro Nacional de Microbiología, Instituto de Salud Carlos III, 28220 Majadahonda, Madrid, Spain

Impacts

- This study confirms that antimicrobial resistance and multi-resistance is a common finding among *Salmonella* isolates from both apparently healthy and clinically diseased finishing pigs in Spain and suggests that swine should be taken into consideration as a reservoir of *Salmonella*-resistant and multi-resistant strains.
- Resistance to some of the antimicrobials currently used in swine as tetracycline, sulphamethoxazole, ampicillin and streptomycin was commonly found but it was also frequently detected to chloramphenicol, an antimicrobial that have not been use in food-producing animals in the UE for years. On the other hand, although there was a low incidence of resistance to quinolones and cephalosporins, antimicrobials of choice in the treatment of human systemic salmonellosis, the detection of resistant or intermediate isolates to ceftiofur and ciprofloxacin emphasizes the importance of monitoring antimicrobial resistance among *Salmonella* isolates of porcine origin.
- Antimicrobial resistance and multi-resistance was particularly high among isolates of serovar Typhimurium and its monophasic variant, S. 4,5,12:i:-. The pentaresistance core pattern R-ACSSuT frequently associated to S. Typhimurium definitive type (DT) 104, was mostly seen among S. Typhimurium isolates, by itself or associated with additional resistance to other antimicrobials, although it was also detected among other serovars.

Keywords:

Salmonella enterica; antimicrobial resistance; swine salmonellosis

Correspondence:

A. Carvajal, Facultad de Veterinaria, Enfermedades Infecciosas, Campus de Vegazana, 24071 León, Spain.
Tel.: +34 987 291306;
Fax: +34 987 291304;
E-mail: ana.carvajal@unileon.es

Received for publication November 16, 2007

doi: 10.1111/j.1863-2378.2008.01110.x

Summary

This study was the first conducted in Spain to evaluate the occurrence of antimicrobial resistance and multi-resistance in *Salmonella* isolates recovered from finishing pigs from Spanish swine farms distributed over the whole country. For this purpose, 290 *Salmonella* isolates recovered from apparently healthy finishing pigs in a farm-based cross-sectional study and 192 *Salmonella* isolates recovered from faecal samples of finishing pigs suffering from diarrhoea were investigated. Resistance to a panel of 17 antimicrobials was determined using a broth microdilution technique. Resistance was a common finding and was detected in 90.3% of the *Salmonella* isolates from apparently healthy finishing pigs and 95.3% of the *Salmonella* isolates from clinically diseased finishing pigs. Resistance was particularly high among isolates of serogroup B and serovars Typhimurium and its monophasic variant S. 4,5,12:i:-. Higher frequencies of resistance were found to tetracycline, sulphamethoxazole, streptomycin, spectinomycin, ampicillin, chloramphenicol and trimethoprim-sulphamethoxazole. Less than 10% of the isolates were resistant to amoxicillin/clavulanic acid,

neomycin, cephalotin, apramycin and gentamicin. Resistance to ciprofloxacin, colistin and ceftiofur was rare (under 1%). Multi-resistance, defined as resistance to four or more drugs, was detected in more than 50% of the isolates. Although multi-resistance was particularly frequent among isolates of *S. Typhimurium*, it was also high among other serovars as Bredeney and the *S. Typhimurium* monophasic variant. 4,5,12:i:-

Introduction

The extensive use or misuse of antimicrobial agents, not only in humans and veterinary medicine, but also as growth promoters in livestock production, has created enormous pressure for the selection of antimicrobial-resistant bacteria (WHO, 2000) and the emergence of these resistant bacteria has become a major public health issue. Recently, the European Union (EU) has initiated several actions including the removal of all antimicrobials used as growth promoters in animal husbandry (Regulation EC 1831/2003) in an effort to decrease the development of antimicrobial resistance. Moreover, a new legislation prescribing antimicrobial resistance surveillance programmes in selected zoonotic and animal pathogens in all the states of the EU has been adopted (Directive 2003/99/EC and Commission Decision 2007/407/EC).

Salmonella enterica is one of the most important food-borne zoonotic pathogens worldwide and the emergence and spread of antimicrobial resistance in *Salmonella* is of increasing threat to human health (McEwen and Fedorka-Cray, 2002; Teale, 2002; Carlson et al., 2003). Although antimicrobial therapy is not usually required due to the self-limiting nature of the infection, it is essential in immunocompromised, elderly or very young patients, as well as in cases of severe or systemic salmonellosis (Ruiz et al., 2004). Several studies have indicated that patients with antimicrobial-resistant *Salmonella* infections are more likely to be hospitalized and tend to be ill longer than those with susceptible *Salmonella* infections (Lee et al., 1994; Travers and Barza, 2002; Varma et al., 2005). Particularly relevant is the widespread dissemination of *S. Typhimurium* definitive type (DT) 104, a phage-type characterized by penta-resistance to ampicillin, chloramphenicol, streptomycin, sulfonamides and tetracycline (R-ACSSuT). The five genes for this penta-resistance type, *aadA2*, *floR*, *pse-1*, *sul1* and *tet(G)* are clustered within the genome on the so-called *Salmonella* genomic island 1 (SGI-1), which also contains horizontally transferable genetic elements such as phage- and plasmid-related genes (Boyd et al., 2001). It was first isolated in the early 1980s in cattle in the UK and nowadays has been reported in

humans, a wide variety of animals including pigs and food of animal origin from many countries (Threlfall et al., 1993; Esaki et al., 2004; Helms et al., 2005). Moreover, since 1994, *S. Typhimurium* DT104 isolates with additional resistance to fluoroquinolones and third generation cephalosporins, drugs of choice for the treatment of invasive salmonellosis in adults and children, respectively, have been reported (Threlfall et al., 1996; Fey et al., 2000; Winokur et al., 2000).

Antimicrobial use is frequent in pig production, accounting for 60% (or 4050 tons) of the total use of antimicrobial agents in animals in the EU (Schwarz and Chaslus-Dancla, 2001). A higher antimicrobial resistance of *Salmonella* isolates from pigs as compared with those originated from other animal species has been reported (Usera et al., 2002). Furthermore, pork is the most frequently consumed meat in Spain and Europe. Consequently, *Salmonella* contaminated pork and pork products may be an important reservoir of *Salmonella*-resistant strains for humans.

The aims of the present study were to describe and evaluate the occurrence of antimicrobial resistance in *Salmonella enterica* isolates recovered from apparently healthy and clinically ill finishing pigs from Spanish swine farms and to determine the most frequent resistance patterns and the relationship of these patterns with serovars and phage-types.

Materials and Methods

Salmonella isolates

In all, 290 *Salmonella* isolates from apparently healthy pigs were available from a farm-based cross-sectional study representative of the entire fattening swine population conducted in Spain from March, 2003 to February, 2004. The aim of this study was to determine the *Salmonella* prevalence and serovar diversity in Spanish swine fattening units. Briefly, 10 faecal samples were collected from 10 different pens containing apparently healthy pigs close to market weight in a total of 232 fattening units distributed all over the country. In all, 290 *Salmonella* isolates were recovered and 24 serovars were identified, *Typhimurium* being the most frequently occurring

(31.4%) followed by Rissen (24%) and Derby (16%). The methods used for the selection of farms and samples and sample collection have been described in detail elsewhere (García-Feliz et al., 2007).

In addition, 192 *Salmonella* isolates obtained from faecal samples of finishing pigs suffering from diarrhoea submitted to the Laboratory of Infectious Diseases in the Veterinary Faculty at the University of León from January, 2003 to February, 2004 for diagnostic examination were used. From each farm, six to 12 faecal samples were collected, directly from the rectum of pigs with clinical signs of diarrhoea. In all, 186 farms distributed all over the country were investigated. The most common aetiological agents identified were *Brachyspira hyodysenteriae* and *Lawsonia intracellularis*. Moreover, 75 farms (40.3%) had at least one *Salmonella* positive sample. In all, 192 *Salmonella* isolates comprising 20 different serovars were recovered. As in the study from apparently healthy pigs, *S. Typhimurium* was the most frequently identified serovar (35.4%) among diarrhoeic pigs, followed by *S. Rissen* (23.4%) and *S. Derby* (12%).

Each sample was investigated separately using the ISO method (ISO 6579: 1993 General guidance on methods for the detection of *Salmonella*). One single *Salmonella*-confirm isolate from each positive sample was frozen and forwarded to the National Reference Laboratory for *Salmonella* and *Shigella* (Health Institute Carlos III, Madrid) for typing. All isolates were serotyped in accordance with the Kauffmann–White scheme (Popoff and Le Minor, 1992) and phage-typing of *S. Typhimurium* and its monophasic variants, *S. 4,5,12:i:-* and *S. 4,12:i:-*, was performed with phages provided by the International Phage-typing Reference Laboratory (Colindale, London, England) following international phage-typing methods (Anderson et al., 1977).

Antimicrobial susceptibility testing

Antimicrobial susceptibility testing was performed using a broth microdilution technique in a semi-automated system (Sensititre®; TREK Diagnostic Systems Inc., East Grinstead, West Sussex, UK) in accordance with the manufacturer's instructions. Each of the isolates was tested with a panel of 17 antimicrobials including amoxicillin/clavulanic acid (AMC), ampicillin (AMP), apramycin (APR), cephalothin (CEP), ceftiofur (XNL), ciprofloxacin (CIP), chloramphenicol (CHL), colistin (COL), florphenicol (FFN), gentamicin (GEN), nalidixic acid (NAL), neomycin (NEO), spectinomycin (SPE), streptomycin (STR), sulphamethoxazole (SMX), trimethoprim/sulfamethoxazole (TMP) and tetracycline (TET). Panels were read 24 h after inoculation and minimal inhibitory concentration (MIC), defined as the lowest concentration that inhibited

visible bacterial growth, was determined. Isolates were classified as susceptible, intermediate or resistant according to classification guides suggested by the National Committee for Clinical Laboratory Standards (NCCLS, 2002, 2005) or according to the manufacturer's indications (TREK Diagnostic Systems Inc.) when such a standard was not available. *Escherichia coli* CECT 434 (ATCC 25922), *Staphylococcus aureus* CECT 794 (ATCC 29213) and *Enterococcus faecalis* CECT 795 (ATCC 29212) were used for quality control purposes.

Data handling and analysis

Isolates classified as intermediate were considered as susceptible (decreased susceptibility) to not overestimate the rate of resistance.

The lowest concentration that completely inhibited the growth of 50% and 90% of the isolates, MIC₅₀ and MIC₉₀ respectively, were calculated for each of the antimicrobials. All data were stored and analysed in Epi Info® for Windows (CDC, Atlanta, GA, USA).

An univariate analysis using the chi-squared test at $\alpha = 0.05$ was utilized to detect any association between the prevalence of antimicrobial resistance among apparently healthy or diseased pigs and the different serovars or serogroups. Fisher's two-tailed exact test was used when the number of isolates in any of the categories was under 10.

Results

The distribution of antimicrobial resistance in *Salmonella* isolates from apparently healthy and clinically ill finishing pigs from Spain at various concentrations ($\mu\text{g/ml}$) and breakpoints that were used is summarized in Tables 1 and 2.

Overall, antimicrobial resistance (defined as resistance to one or more drugs) was detected in 445 of the 482 *Salmonella* isolates from Spanish pigs (92.3%). The prevalence of antimicrobial resistance was 90.7% among *Salmonella* isolates from apparently healthy swine and 94.8% among those from pigs suffering from diarrhoea although significant differences could not be demonstrated ($\chi^2 = 2.19$; $P = 0.13$).

Antimicrobial resistance to ciprofloxacin was uncommon (only one *S. Ohio* isolate from a pig suffering from diarrhoea), as also to colistin (only one *S. Derby* isolate from an apparently healthy pig) and ceftiofur (four *S. Montevideo* isolates from healthy pigs at the same farm). Less than 10% of the isolates were resistant to amoxicillin/clavulanic acid, neomycin, cephalotin, apramycin and gentamicin with similar values among isolates from clinically ill and apparently healthy pigs. Resistance

Table 1. Distribution of MICs ($\mu\text{g/ml}$) among 290 *Salmonella* isolates from apparently healthy finishing pigs in Spain

Antimicrobial	No. isolates at each MIC ($\mu\text{g/ml}$)															MIC ₅₀ ($\mu\text{g/ml}$)	MIC ₉₀ ($\mu\text{g/ml}$)	%	
	0.03	0.06	0.12	0.25	0.5	1	2	4	8	16	32	64	128	256	512				≥ 1024
AMP						<48	101	7			>	134 ^a					2	>32	46.2
APR									<242	19	2		>	27 ^a			4	8	9.3
AMC									<151	9	69	49 ^b	10 ^a >	2 ^a			$\leq 2/1$	16/8	4.1
CEP									<12	171	74	23 ^b	4 ^a	>	6 ^a		4	16	3.5
CHL									<	23	170	10 ^b	2 ^a	16 ^a >	69 ^a		8	>64	30
CIP	<266	9		12	3						>						≤ 0.03	≤ 0.03	-
COL									<288	1 ^b			>	1 ^a			≤ 4	≤ 4	0.34
FFN									<5	128	106	12	28 ^a	3 ^b >	8 ^a		8	32	13.4
GEN									<259	2		3 ^b	10 ^a	14 ^a >	2 ^a		1	2	9
NAL											<269	6			2 ^a >	13 ^a	≤ 8	≤ 8	5.2
NEO									<259	20	1 ^b		2>	8 ^a			2	4	2.75
SMX													<105	8	4	172 ^b >	>1024	>1024	59.3
SPE									<		9	123	22 ^b	11 ^b >	124 ^a		64	>128	46.5
STR									<3	45	69	29	42 ^a >	102 ^a			32	>64	50
TET									<35		1 ^b		35 ^a >	219 ^a			>32	>32	88.2
TMP											<210		>	80 ^a			4	>32	27.7
XNL									<63	215	8		>	4 ^a			1	1	1.4

AMP, ampicillin; APR, apramycin; AMC, amoxicillin/clavulanic acid; CEP, cephalothin; CHL, chloramphenicol; CIP, ciprofloxacin; COL, colistin; FFN, florphenicol; GEN, gentamicin; NAL, nalidixic acid; NEO, neomycin; SMX, sulphamethoxazole; SPE, spectinomycin; STR, streptomycin; TET, tetracycline; TMP, trimethoprim; XNL, ceftiofur.

(<) minimum value of concentration used; (>) maximum value of concentration used.

Values above the range denote MIC values greater than the highest concentration in the range. MICs equal to or lower than the lowest concentration used are given as the lowest concentration.

^aThe number of resistant isolates.

^bThe number of isolates with intermediate susceptibility.

to nalidixic acid was significantly higher ($\chi^2 = 10.39$, $P < 0.001$) among *Salmonella* isolates from clinically ill pigs (14.6%) as compared with those from apparently healthy pigs (5.2%). Moreover, all nalidixic acid-resistant isolates showed decreased susceptibility to ciprofloxacin ($\text{MIC} \leq 0.5 \mu\text{g/ml}$).

Salmonella isolates from both apparently healthy and clinically diseased pigs showed higher frequencies of resistance to tetracycline (88.2% and 92.2% respectively), sulphamethoxazole (59.3% and 67.2% respectively) and streptomycin (50% and 45.8% respectively), antimicrobials extensively used in swine production medicine for many years. Resistance was also high to spectinomycin (46.5% and 54.2% respectively) as well as to chloramphenicol (30% and 26.6% respectively), ampicillin (46.2% and 53.6% respectively) and trimethoprim-sulphamethoxazole (27.6% and 29.7% respectively). Resistance to florphenicol was also similar among isolates from healthy (13.4%) and diarrhoeic pigs (14%). All the florphenicol-resistant isolates showed resistance to chloramphenicol.

A limited number of isolates with intermediate or decreased susceptibility was observed among isolates from apparently healthy and clinically diseased pigs to cephalothin (7.9% and 9.9% respectively), chloramphenicol (3.4% and 3.6% respectively), colistin (one and two isolates

respectively), spectinomycin (7.6% and 4.7% respectively), gentamicin (1.03% and 0.5% respectively), amoxicillin/clavulanic acid (16.9% and 4.2% respectively) and tetracycline (one isolate from a healthy pig). The number of isolates with intermediate susceptibility to amoxicillin/clavulanic acid was significantly higher among isolates from apparently healthy as compared with those from diseased animals ($\chi^2 = 17.04$, $P < 0.001$).

Distribution of resistance by serovar is shown in Table 3. Overall, isolates belonging to serogroup B exhibited significantly higher frequencies of resistance to ampicillin ($\chi^2 = 67.6$, $P < 0.001$), apramycin ($\chi^2 = 19.4$, $P < 0.001$), gentamicin ($\chi^2 = 20.2$, $P < 0.001$), chloramphenicol ($\chi^2 = 48.3$, $P < 0.001$), spectinomycin ($\chi^2 = 18.3$, $P < 0.001$), streptomycin ($\chi^2 = 71$, $P < 0.001$), tetracycline ($\chi^2 = 27.9$, $P < 0.001$) and florphenicol ($\chi^2 = 48$, $P < 0.001$) than for the rest of the serogroups. Resistance was particularly high among isolates of *S. Typhimurium* and its monofasic variants, *S. 4,5,12:i:-* and *S. 4,12:i:-*, while it was particularly low among isolates of *S. Rissen* for the majority of antimicrobials tested. Thus, resistance was significantly higher among isolates of *S. Typhimurium* as compared with those of *S. Rissen*, *S. Derby* and *S. Anatum* to ampicillin ($\chi^2 = 69.7$, $P < 0.001$; $\chi^2 = 106.6$, $P < 0.001$; $\chi^2 = 5.1$, $P = 0.01$ respectively),

Table 2. Distribution of MICs ($\mu\text{g/ml}$) among 192 *Salmonella* isolates from clinically ill finishing pigs in Spain

Antimicrobial	No. isolates for each minimum inhibitory concentration ($\mu\text{g/ml}$)															MIC ₅₀ ($\mu\text{g/ml}$)	MIC ₉₀ ($\mu\text{g/ml}$)	%			
	0.03	0.06	0.12	0.25	0.5	1	2	4	8	16	32	64	128	256	512				≥ 1024		
AMP						<23	64	2				>	103 ^a					>32	>32	53.6	
APR																		≤ 4	≤ 4	6.2	
AMC																		$\leq 2/1$	8/4	4.2	
CEP																		4	16	4.2	
CHL																		8	>64	26.6	
CIP	<157	1	11	17	2													≤ 0.03	0.25	0.5	
COL																		≤ 4	≤ 4	-	
FFN																		4	32	14	
GEN																		≤ 1	≤ 1	6.7	
NAL																		≤ 8	>128	14.6	
NEO																		≤ 2	≤ 2	2.6	
SMX																		129 ^b	>1024	>1024	67.2
SPE																		128	>128	54.2	
STR																		32	>64	45.8	
TET																		>32	>32	92.2	
TMP																		≤ 4	>32	29.7	
XNL																		1	1	-	

AMP, ampicillin; APR, apramycin; AMC, amoxicillin/clavulanic acid; CEP, cephalothin; CHL, chloramphenicol; CIP, ciprofloxacin; COL, colistin; FFN, florphenicol; GEN, gentamicin; NAL, nalidixic acid; NEO, neomycin; SMX, sulphamethoxazole; SPE, spectinomycin; STR, streptomycin; TET, tetracycline; TMP, trimethoprim; XNL, ceftiofur.

(<)minimum value of concentration used; (>) maximum value of concentration used.

Values above the range denote MIC values greater than the highest concentration in the range. MICs equal to or lower than the lowest concentration used are given as the lowest concentration.

^aThe number of resistant isolates.

^bThe number of isolates with intermediate susceptibility.

Table 3. Distribution of resistance and multi-resistance among *Salmonella* isolates from apparently healthy (290) and clinically ill (192) finishing pigs in Spain

Serovar	Source of isolate	No. of isolates tested	Resistant isolates ^a <i>n</i> (%)	MDR isolates ^b <i>n</i> (%)
Typhimurium (including var. Copenhagen) 4,[5],12:i:1,2	Healthy	91	89 (97.8)	70 (76.9)
	Ill	68	68 (100)	65 (95.6)
	Rissen (6,7,14;f,g:-)	Healthy	69	69 (100)
Derby (1,4,[5],12:f,g:[1,2]	Healthy	46	45 (100)	15 (33.3)
	Ill	45	45 (100)	15 (33.3)
	Ill	23	23 (100)	14 (60.8)
4,5,12:i:-	Healthy	13	13 (100)	11 (84.6)
	Ill	3	3 (100)	3 (100)
	Bredeney	Healthy	13	12 (92.3)
(1,4,12,27:l,v:1,7)	Ill	9	9 (100)	8 (88.8)
	Anatum	Healthy	7	7 (100)
3,10,[15][15,34]:e,h:1,6	Ill	13	10 (77)	4 (30.8)
	Others	Healthy	51	31 (60.8)
Total	Ill	31	24 (77.4)	14 (45.2)
	Healthy	290	263 (90.7)	162 (55.9)
	Ill	192	182 (94.8)	123 (64)

^aIsolates resistant to one or more antimicrobials.

^bMDR, multi-drug resistant isolates or isolates with resistance to four or more antimicrobials.

streptomycin ($\chi^2 = 62.4$, $P < 0.001$; $\chi^2 = 14.7$, $P < 0.001$; $\chi^2 = 43.6$, $P < 0.001$ respectively), chloramphenicol ($\chi^2 = 43.5$, $P < 0.001$; $\chi^2 = 29.9$, $P < 0.001$; $\chi^2 = 17.8$, $P < 0.001$ respectively), sulphamethoxazole ($\chi^2 = 76.2$, $P < 0.001$; $\chi^2 = 30.3$, $P < 0.001$; $\chi^2 = 21.8$, $P < 0.001$ respectively) and florphenicol ($\chi^2 = 47.3$, $P < 0.001$; $\chi^2 = 19.3$, $P < 0.001$; $\chi^2 = 8.4$, $P = 0.003$ respectively).

Multi-drug resistance (MDR), defined as resistance to four or more drugs, was observed in more than 50% of the isolates (Table 3). Although the frequency of MDR among *Salmonella* isolates from clinically ill pigs was slightly higher than among those from healthy pigs for the majority of the serovars, no significant differences were detected. MDR was found more frequently among isolates of *S. Typhimurium*, *S. 4,5,12:i:-* and *S. Bredeney* as compared with *S. Rissen* ($\chi^2 = 67.3$, $P < 0.001$; $\chi^2 = 13.2$, $P < 0.001$ and $\chi^2 = 14.0$, $P < 0.001$ respectively) and *S. Derby* ($\chi^2 = 27.9$, $P < 0.001$; $\chi^2 = 5.8$, $P = 0.016$ and $\chi^2 = 5.4$, $P = 0.019$ respectively).

A total of 62 and 52 different antimicrobial resistance patterns were observed among isolates from healthy and clinically ill pigs, comprising 52 and 41 MDR patterns respectively. Table 4 summarizes the distribution of the commonest resistance and MDR patterns by serovar.

Table 4. Distribution of predominant resistance patterns among *Salmonella* isolates from apparently healthy (290) and clinically ill (192) finishing pigs in Spain

Resistance Patterns	No. (%) of isolates of the following serovars with the given resistance pattern											
	All resistant isolates		Typhimurium		Rissen		Derby		Bredeney		All other serovars	
	Healthy	Ill	Healthy	Ill	Healthy	Ill	Healthy	Ill	Healthy	Ill	Healthy	Ill
TET alone	74 (28.1)	33 (18.1)	11 (12.3)	1 (1.5)	36 (52.2)	23 (51.1)	20 (47.6)	5 (21.7)	0	0	7 (14.3)	4 (10.8)
SPE-STR-TET	7 (2.7)	0	0	0	7 (10.1)	0	0	0	0	0	0	0
SMX-TET-TMP	8 (3)	4 (2.2)	5 (5.6)	1 (1.5)	0	1 (2.2)	0	1 (4.3)	2	1 (11.1)	1 (2)	0
AMP-STR-SMX-TET	26 (10)	11 (6)	23 (25.8)	11 (16.2)	0	0	0	0	0	0	3 (6.1)	1 (2.7)
SMX-SPE-TET-TMP	7 (2.7)	1 (0.5)	0	0	1 (1.4)	0	0	0	5 (41.6)	1	1 (2)	0
SMX-SPE-STR-TET	12 (4.6)	12 (6.6)	1 (1.1)	0	0	0	11 (26.2)	10 (43.5)	0	0	0	2 (5.4)
AMP-SMX-SPE-TET-TMP	5 (1.9)	14 (7.7)	0	0	1 (1.4)	7 (15.5)	0	0	0	1 (11.1)	4 (8.2)	6 (16.2)
AMP-CHL-SMX-SPE-TET-TMP	7 (2.7)	0	0	0	5 (7.2)	0	0	0	0	0	2 (4.1)	0
AMP-CHL-SMX-SPE-STR-TET	0	5 (2.7)	0	4 (5.9)	0	0	0	0	0	0	0	1 (2.7)
AMP-AUG-CHL-SMX-SPE-STR-TET	9 (3.4)	0	9 (10.1)	0	0	0	0	0	0	0	0	0
AMP-CHL-FFN-SMX-SPE-STR-TET	24 (9.1)	18 (9.9)	22 (24.7)	18 (26.4)	0	0	1 (2.4)	0	0	0	1 (2)	0
AMP-CHL-SMX-SPE-STR-TET-TMP	13 (4.9)	3 (1.6)	0	2 (2.9)	10 (14.5)	0	0	0	0	0	3 (6.1)	1 (2.7)
AMP-CHL-FFN-NAL-SMX-SPE-STR-TET	5 (1.9)	0	5 (5.6)	0	0	0	0	0	0	0	0	0
AMP-APR-CHL-GEN-SMX-SPE-STR-TET-TMP	6 (2.3)	2 (1.2)	2 (2.2)	0	0	0	2 (4.8)	0	0	0	2 (4.1)	2 (5.4)
Other resistance patterns (50 types healthy and 43 types ill)	60 (22.8)	79 (43.4)	11 (12.3)	31 (45.6)	9 (13)	14 (31.1)	8 (19)	7 (30.4)	7 (58.3)	7 (77.7)	25 (51)	20 (54)
Total isolates	263 (100)	182 (100)	89 (100)	68 (100)	69 (100)	45 (100)	42 (100)	23 (100)	12 (100)	9 (100)	49 (100)	37 (100)

AMP, ampicillin; APR, apramycin; AUG2, amoxicillin/clavulanic acid; CHL, chloramphenicol; FFN, florfenicol; GEN, gentamicin; NAL, nalidixic acid; SMX, sulphamethoxazole, SPE, spectinomycin; STR, streptomycin; TET, tetracycline; TMP, trimethoprim.

The most frequent resistance pattern in both groups of isolates was to tetracycline alone, found particularly among isolates of *S. Rissen* and *S. Derby*. The most common MDR pattern included combined resistance to ampicillin, chloramphenicol, streptomycin, sulfamethoxazole and tetracycline (ACSSuT) with additional resistance to florphenicol and spectinomycin and was found in 42 isolates almost exclusively of *S. Typhimurium*. In total, the ACSSuT profile with additional resistance to any other antimicrobial was detected in 85 isolates belonging to serovar *Typhimurium* (62 isolates), its monophasic variants *S. 4,5,12:i:-* (seven isolates), *S. 4,12:i:-* (one isolate) and also to other serovars, such as *Rissen* (10 isolates), *Derby* (three isolates), *Kapemba* (one isolate) and *Panama* (one isolate).

S. Typhimurium phage-type DT193 was the most frequently identified among isolates from both healthy and clinically diseased pigs (29 and 13 isolates respectively), followed by DT104b (11 and 10 isolates respectively), DTU302 (five and 11 isolates respectively) and DT104 (four and eight isolates respectively). The commonest resistant pattern observed among DT193 was AMP-STR-SMX-TET with 19 isolates from apparently healthy and five from diseased pigs. All *S. Typhimurium* DT104 isolates had the resistant pattern ACSSuT. This pattern was also observed in other phage-types of *S. Typhimurium* (DT104b, DTU302, DT193, DT179, RDCN and NT) as well as in other serovars (*Rissen*, *Derby*, *Wien*, *Kapemba* and *Panama*).

The commonest phage-type among *S. 4,5,12:i:-* isolates was DTU302 which represented 75% and 66.7% of the isolates of this serovar from apparently healthy and clinically diseased pigs respectively. Resistant profile ACSSuT with additional resistance to trimethoprim/sulphamethoxazol or apramycin and gentamicin was found in 50% of *S. 4,5,12:i:-* isolates from healthy pigs and 100% of those from diarrhoeic pigs.

Discussion

The results of the present study demonstrate that antimicrobial resistance is commonly found in *Salmonella* isolates from finishing pigs in Spain. Under 8% of the isolates were susceptible to all antimicrobials tested, indicating that pigs should be taken into consideration as an important reservoir of *Salmonella*-resistant strains. Although estimates from different studies are not directly comparable, owing to differences in the sources of isolates and testing procedures, the results being reported here were consistent with those previously recorded in various regions in Spain (Mateu et al., 2002; Agustín et al., 2005; Astorga et al., 2007), the UK (Threlfall et al., 2003) or the USA (Gebreyes et al., 2000, 2004b; Farrington et al.,

2001). However, antimicrobial resistance was substantially higher than that reported in Canada (Rajic et al., 2004), Holland (Van der wolf et al., 1999) or Belgium (Nollet et al., 2006).

Antimicrobial resistance was slightly higher among isolates from pigs suffering from diarrhoea than in those from apparently healthy pigs, although differences did not reach statistical significance. A number of authors have reported that *Salmonella* isolates from diseased pigs are more likely to present antimicrobial resistance than those from healthy animals or from food products (Poppe et al., 2001; Altekruse et al., 2002). In contrast, Johnson et al. (2005) found that resistance did not differ significantly between isolates from veterinary diagnostic sources and those from monitoring sources.

The highest frequency observed was for resistance to tetracycline, followed by sulphamethoxazole, ampicillin and streptomycin. Similar results have been found in antimicrobial resistance surveys with *Salmonella* isolates of porcine origin from Spain (Mateu et al., 2002; Usera et al., 2002; Agustín et al., 2005; Mejía et al., 2006; Astorga et al., 2007) and other parts of the world (Gebreyes et al., 2000, 2004b; Farrington et al., 2001; Threlfall et al., 2003). Resistance to these antimicrobials is generally attributed to the frequent use of these compounds in veterinary medicine and also, previously, as growth promoters (Van der wolf et al., 1999; Threlfall et al., 2003; Van Duijkeren et al., 2003).

Resistance was also commonly detected to chloramphenicol, an antimicrobial that has been banned in food-producing animals in EU for many years. As previously suggested, this fact might be explained by a genetic link between resistance to chloramphenicol and resistance to other antimicrobials (Poppe et al., 1998, 2001; Gebreyes et al., 2000, 2004a,b; Carlson et al., 2003). On these lines, it is of note that all the chloramphenicol-resistant *Salmonella* isolates of the present study were also resistant to florphenicol, an antimicrobial nowadays in use in pig production in Spain. The frequent occurrence of chloramphenicol resistance in this study might be explained by the high proportion of MDR *S. Typhimurium* isolates that presented the ACSSuT resistance pattern, often associated with phage-type DT104, and included physically linked and chromosomally located penta-resistance alleles for ampicillin, chloramphenicol, streptomycin, sulfonamides and tetracycline coded by the genes *pse-1*, *floR*, *aadA2*, *sul1* and *tet(G)* respectively. It has been described that the gene *floR* can be responsible for resistance to chloramphenicol and florphenicol (Bolton et al., 1999).

Similarly to the findings of other authors studying pig samples, resistance to gentamicin and apramycin was detected in fewer than 10% of the isolates. However, this

result is significantly lower than 23.5% of gentamicin resistant *Salmonella* isolates described by Mateu et al. (2002) in Catalonia. Moreover, cross-resistance between the two antimicrobials was evident; all *Salmonella* isolates that were resistant to apramycin showed resistance or intermediate susceptibility to gentamicin, as previously reported for *E. coli* (Hedges and Shannon, 1984) and *Salmonella* isolates (Threlfall et al., 1986).

More than 95% of the isolates were susceptible to amoxicillin/clavulanic acid, a combination not currently used in pigs in Spain. This percentage is higher than that previously reported in pig samples by a number of authors in Spain and other countries (Mateu et al., 2002; Gebreyes et al., 2004b; Agustín et al., 2005; Mejía et al., 2006). However and in agreement with the results from Rajic et al. (2004) in Canada, there was a relatively high percentage of *Salmonella* isolates from apparently healthy pigs with intermediate susceptibility and therefore resistance to this drug may perhaps be observed more frequently in the future.

As previously described (Mateu et al., 2002; Mejía et al., 2006; Astorga et al., 2007) and despite the wide use of colistin in the treatment and prevention of porcine diarrhoea in Spain, resistance to this polypeptidic drug was uncommon, being detected in only one *S. Derby* isolate in the present study.

Quinolones are among the first choices of drugs to treat Gram-negative sepsis in humans and emergence of quinolone-resistant *Salmonella* has been described in several reports (Threlfall et al., 1997; Molbak et al., 1999; Mateu et al., 2002). In our study, only one *Salmonella* isolate, belonging to serovar Ohio and recovered from a clinically ill pig, was resistant to ciprofloxacin when using the NCCLS guidelines ($>4 \mu\text{g/ml}$). Nevertheless, decreased susceptibility to ciprofloxacin ($\text{MIC} \leq 0.5 \mu\text{g/ml}$) was observed among all of the isolates resistant to nalidixic acid (5–15%). On this point, it has previously been stated that nalidixic acid is a good indicator of reduced fluoroquinolone susceptibility (Hakanen et al., 1999; Poppe et al., 2001). The emergence of resistance to quinolones has been associated with the veterinary use of these drugs (Threlfall et al., 1997; Malorny et al., 1999; Usera et al., 2002). Particularly, enrofloxacin is widely used medically on pigs in Spain and many other countries, so the higher proportion of resistance to nalidixic acid detected among isolates from diseased pigs in the present study could be a consequence of a higher exposure to enrofloxacin in these animals, as compared with healthy pigs.

Resistance to third-generation cephalosporins was found in four *S. Montevideo* isolates recovered from apparently healthy pigs in one farm. To the authors' knowledge, resistance to this class of antimicrobials has

not previously been reported in *Salmonella* isolates of porcine origin in Spain although a limited number of ceftiofur intermediate strains were found by Mateu et al. (2002) and Astorga et al. (2007). Third-generation cephalosporins are currently front-line therapeutics in paediatric patients with invasive *Salmonella* infections and the emergence of resistance to these antimicrobials has been reported in humans and also in food-producing animals (Dunne et al., 2000; Fey et al., 2000; Rankin et al., 2002; Villa et al., 2002).

It has been suggested that there is a relationship between serogroup and serovar and antimicrobial resistance in *Salmonella* (Farrington et al., 2001; Johnson et al., 2005). In agreement with this, in the present study resistance to ampicillin, apramycin, gentamicin, chloramphenicol, spectinomycin, streptomycin and florphenicol was significantly higher among isolates of serogroup B and serovar Typhimurium and its monophasic variants. On the other hand, antimicrobial resistance among *S. Rissen*, the most frequently occurring serovar of serogroup C1 in the present study, was significantly lower for the majority of antimicrobials. These results confirm that the distribution of *Salmonella* serogroups and serovars can influence the overall proportion of resistance in a survey (Gebreyes et al., 2004a; Johnson et al., 2005).

Multi-drug resistance was a common finding and more than 50% of the total of *Salmonella* isolates studied were resistant to four or more antimicrobials. The occurrence of MDR was particularly high among serovar Typhimurium; it was detected in 77% and 95.6% of *S. Typhimurium* isolates from apparently healthy and diseased pigs respectively. However, other prevalent serovars such as Bredeney and Typhimurium monophasic variant 4,5,12:i- showed high frequencies of MDR. In total, multi-resistant isolates were found in 11 different serovars, indicating that the problem is not exclusively associated with *S. Typhimurium*.

As previously described, resistance and multi-resistance patterns vary among different serovars and phage-types (Carramiñana et al., 2004; Gebreyes et al., 2004b; Schroeter et al., 2004; Johnson et al., 2005). In our study, the ACSSuT-SPE-FFN profile was the commonest among *S. Typhimurium* DT104 and related phage-types (104b and U302) isolates whereas the AMP-SMX-STR-TET profile was mostly identified among *S. Typhimurium* DT193 isolates. *S. Typhimurium* DT193 with this resistance profile has often been associated with pigs (Hampton et al., 1995) while in northern England a large outbreak of human salmonellosis caused by *S. Typhimurium* DT193 with this resistant profile was traced to a local pig farm (Maguire et al., 1993). The ACSSuT-SPE-TMP and AMP-SMX-SPE-TET-TMP profiles were associated with

S. Rissen from apparently healthy and clinically ill pigs respectively, whereas the SMX-SPE-STR-TET profile was mainly found among *S. Derby*. Isolates of *S. Typhimurium* monophasic variant 4,5,12:i:-, a serovar that emerged and spread among human isolates of *Salmonella* in 1997 and has been associated with a swine reservoir (Echeita et al., 1999; Cruchaga et al., 2001), and particularly isolates of phage-type DTU302, commonly have a ACSSuT-SPE-TMP profile with additional resistance to gentamicin and apramycin, as reported in the literature (Guerra et al., 2000; De la Torre et al., 2003). It is important to remark that although the penta-resistance pattern ACS-SuT was mostly seen among *S. Typhimurium* isolates, it was also identified among other serovars.

The results of the present study allow us to conclude that antimicrobial resistance and multi-resistance occurs frequently among *Salmonella* isolates from both apparently healthy and clinically ill pigs. Although the low incidence of resistance to fluoroquinolones and cephalosporins is a favourable situation with regard to public health, the detection of a limited number of resistant or intermediate isolates to ceftiofur and ciprofloxacin emphasizes the importance of monitoring antimicrobial resistance among *Salmonella* isolates of porcine origin in order to detect new and emerging resistance trends.

References

- Agustín, A. I., J. J. Carramiñana, C. Rota, and A. Herrera, 2005: Antimicrobial resistance of *Salmonella* spp. from pigs at slaughter in Spain in 1993 and 2001. *Lett. Appl. Microbiol.* 41, 39–44.
- Altekruse, S. F., F. Elvinger, K. Y. Lee, L. K. Tollefson, E. W. Pierson, J. Eifert, and N. Sriranganathan, 2002: Antimicrobial susceptibilities of *Escherichia coli* strains from a turkey operation. *J. Am. Vet. Med. Assoc.* 221, 411–416.
- Anderson, E. S., L. R. Ward, M. J. Saxe, and J. D. de Sa, 1977: Bacteriophage typing designations of *Salmonella typhimurium*. *J. Hyg. (Lond.)* 78, 297–300.
- Astorga, R. J., A. E. Salaberria, A. M. Garcia, S. V. Jimenez, A. C. Martinez, A. A. Garcia, and A. A. Casas, 2007: Surveillance and antimicrobial resistance of *Salmonella* strains isolated from slaughtered pigs in Spain. *J. Food Prot.* 70, 1502–1506.
- Bolton, L. F., L. C. Kelley, M. D. Lee, P. J. Fedorka-Cray, and J. J. Maurer, 1999: Detection of multidrug-resistant *Salmonella enterica* serotype typhimurium DT104 based on a gene which confers cross-resistance to florfenicol and chloramphenicol. *J. Clin. Microbiol.* 37, 1348–1351.
- Boyd, D., G. A. Peters, A. Cloeckert, K. S. Boumedine, E. Chaslus-Dancla, H. Imberechts, and M. R. Mulvey, 2001: Complete nucleotide sequence of a 43-kilobase genomic island associated with the multidrug resistance region of *Salmonella enterica* serovar Typhimurium DT104 and its identification in phage type DT120 and serovar Agona. *J. Bacteriol.* 183, 5725–5732.
- Carlson, S. A., M. T. Wu, and T. S. Frana, 2003: Multiple antibiotic resistance and virulence of *Salmonella enterica* serotype Typhimurium phage type DT 104. In: Torrence, M. E., and R. E. Isaacson (eds), *Microbial Food Safety in Animal Agriculture: Current Topics*, Chapter 14, pp. 123–129. Iowa State Press, Ames, Iowa.
- Carramiñana, J. J., C. Rota, I. Agustin, and A. Herrera, 2004: High prevalence of multiple resistance to antibiotics in *Salmonella* serovars isolated from a poultry slaughterhouse in Spain. *Vet. Microbiol.* 104, 133–139.
- Cruchaga, S., A. Echeita, A. Aladueña, J. García-Peña, N. Frias, and M. A. Usera, 2001: Antimicrobial resistance in *Salmonellae* from humans, food and animals in Spain in 1998. *J. Antimicrob. Chemother.* 47, 315–321.
- De la Torre, E., D. Zapata, M. Tello, W. Mejia, N. Frias, F. J. Garcia Pena, E. M. Mateu, and E. Torre, 2003: Several *Salmonella enterica* subsp. *enterica* serotype 4,5,12:i:- phage types isolated from swine samples originate from serotype typhimurium DT U302. *J. Clin. Microbiol.* 41, 2395–2400.
- Dunne, E. F., P. D. Fey, P. Kludt, R. Reporter, F. Mostashari, P. Shillam, J. Wicklund, C. Miller, B. Holland, K. Stamey, T. J. Barrett, J. K. Rasheed, F. C. Tenover, E. M. Ribot, and F. J. Angulo, 2000: Emergence of domestically acquired ceftriaxone-resistant *Salmonella* infections associated with AmpC beta-lactamase. *JAMA* 284, 3151–3156.
- Echeita, M. A., A. Aladueña, S. Cruchaga, and M. A. Usera, 1999: Emergence and spread of an atypical *Salmonella enterica* subsp. *enterica* serotype 4,5,12:i:- strain in Spain. *J. Clin. Microbiol.* 37, 3425.
- Esaki, H., A. Morioka, K. Ishihara, A. Kojima, S. Shiroki, Y. Tamura, and T. Takahashi, 2004: Antimicrobial susceptibility of *Salmonella* isolated from cattle, swine and poultry (2001–2002): report from the Japanese Veterinary Antimicrobial Resistance Monitoring Program. *J. Antimicrob. Chemother.* 53, 266–270.
- Farrington, L. A., R. B. Harvey, S. A. Buckley, R. E. Droleskey, D. J. Nisbet, and P. D. Inskip, 2001: Prevalence of antimicrobial resistance in *Salmonellae* isolated from market-age swine. *J. Food Prot.* 64, 1496–1502.
- Fey, P. D., T. J. Safranek, M. E. Rupp, E. F. Dunne, E. Ribot, P. C. Iwen, P. A. Bradford, F. J. Angulo, and S. H. Hinrichs, 2000: Ceftriaxone-resistant *Salmonella* infection acquired by a child from a cattle. *N. Engl. J. Med.* 342, 1242–1249.
- García-Feliz, C., J. A. Collazos, A. Carvajal, A. B. Vidal, A. Aladueña, R. Ramiro, M. de la Fuente, M. A. Echeita, and P. Rubio, 2007: *Salmonella enterica* infections in Spanish swine fattening units. *Zoonoses Public Health* 54, 294–300.
- Gebreyes, W. A., P. R. Davies, W. E. M. Morrow, J. A. Funk, and C. Altier, 2000: Antimicrobial resistance of *Salmonella* isolates from swine. *J. Clin. Microbiol.* 38, 4633–4636.
- Gebreyes, W. A., P. R. Davies, P. Turkson, W. E. Morrow, J. A. Funk, C. Altier, and S. Thakur, 2004a: Characterization

- of antimicrobial-resistant phenotypes and genotypes among *Salmonella enterica* recovered from pigs on farms, from transport trucks, and from pigs after slaughter. *J. Food Prot.* 67, 698–705.
- Gebreyes, W. A., S. Thakur, P. R. Davies, J. A. Funk, and C. Altier, 2004b: Trends in antimicrobial resistance, phage types and integrons among *Salmonella* serotypes from pigs, 1997–2000. *J. Antimicrob. Chemother.* 53, 997–1003.
- Guerra, B., I. Laconcha, S. M. Soto, M. A. Gonzalez-Hevia, and M. C. Mendoza, 2000: Molecular characterisation of emergent multiresistant *Salmonella enterica* serotype [4,5,12:i:-] organisms causing human salmonellosis. *FEMS Microbiol. Lett.* 190, 341–347.
- Hakanen, A., P. Kotilainen, J. Jalava, A. Siitonen, and P. Huovinen, 1999: Detection of decreased fluoroquinolone susceptibility in *Salmonellas* and validation of nalidixic acid screening test. *J. Clin. Microbiol.* 37, 3572–3577.
- Hampton, M. D., E. J. Threlfall, J. A. Frost, L. R. Ward, and B. Rowe, 1995: *Salmonella typhimurium* DT 193: differentiation of an epidemic phage type by antibiogram, plasmid profile, plasmid fingerprint and *Salmonella* plasmid virulence (spv) gene probe. *J. Appl. Bacteriol.* 78, 402–408.
- Hedges, R. W., and K. P. Shannon, 1984: Resistance to apramycin in *Escherichia coli* isolated from animals: detection of a novel aminoglycoside-modifying enzyme. *J. Gen. Microbiol.* 130, 473–482.
- Helms, M., S. Ethelberg, and K. Molbak, and the DT104 Study Group, 2005. International *Salmonella* Typhimurium DT104 infections, 1992–2001. *Emerg. Infect. Dis.* 11, 859–867.
- Johnson, J. M., A. Rajic, and L. M. McMullen, 2005: Antimicrobial resistance of selected *Salmonella* isolates from food animals and food in Alberta. *Can. Vet. J.* 46, 141–146.
- Lee, L. A., N. D. Puhr, E. K. Maloney, N. H. Bean, and R. V. Tauxe, 1994: Increase in antimicrobial-resistant *Salmonella* infections in the United States, 1989–1990. *J. Infect. Dis.* 170, 128–134.
- Maguire, H. C., A. A. Codd, V. E. Mackay, B. Rowe, and E. Mitchell, 1993: A large outbreak of human salmonellosis traced to a local pig farm. *Epidemiol. Infect.* 110, 239–246.
- Malorny, B., A. Schroeter, and R. Helmuth, 1999: Incidence of quinolone resistance over the period 1986 to 1998 in veterinary *Salmonella* isolates from Germany. *Antimicrob. Agents Chemother.* 43, 2278–2282.
- Mateu, E. M., M. Martín, L. Darwich, W. Mejía, N. Frías, and F. J. García-Peña, 2002: Antimicrobial susceptibility of *Salmonella* strains isolated from swine in Catalonia, Spain. *Vet. Rec.* 150, 147–150.
- McEwen, S. A., and P. J. Fedorka-Cray, 2002: Antimicrobial use and resistance in animals. *Clin. Infect. Dis.* 34, S93–S106.
- Mejía, W., J. Casal, D. Zapata, G. J. Sánchez, M. Martín, and E. Mateu, 2006: Epidemiology of *Salmonella* infections in pig units and antimicrobial susceptibility profiles of the strains of *Salmonella* species isolated. *Vet. Rec.* 159, 271–276.
- Molbak, K., D. L. Baggesen, F. M. Aarestrup, J. M. Ebbesen, J. Engberg, K. Frydendahl, P. Gerner-Smith, A. M. Petersen, and H. Wegener, 1999: An outbreak of multi-drug resistant, quinolone-resistant *Salmonella enterica* serotype Typhimurium DT104. *N. Engl. J. Med.* 341, 1420–1425.
- National Committee for Clinical Laboratory Standards (NCCLS), 2002: Performance Standards for Antimicrobial Disk and Dilution Susceptibility Tests for Bacteria Isolated from Animals, Approved Standard-Second Edition M31-A2. NCCLS, Villanova, PA.
- National Committee for Clinical Laboratory Standards (NCCLS), 2005: Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing, 15th International Supplement M100-S15. NCCLS, Villanova, PA.
- Nollet, N., K. Houf, J. Dewulf, B. Catry, L. De Zutter, A. De Kruijf, and D. Maes, 2006: Variability in antimicrobial resistance among *Salmonella enterica* strains from fattening pigs and sows. *Microb. Drug Resist.* 12, 74–81.
- Popoff, M. Y., and L. Le Minor, 1992: Antigenic formulas of the *Salmonella* Serovars: WHO collaborating center for reference and research on *Salmonella*. Institut Pasteur, Paris.
- Poppe, C., N. Smart, R. Khakhria, W. Johnson, J. Spika, and J. Prescott, 1998: *Salmonella typhimurium* DT104: a virulent and drug-resistant pathogen. *Can. Vet. J.* 39, 559–565.
- Poppe, C., M. Ayrhoud, G. Ollis, M. Chirino-Trejo, N. Smart, S. Quessy, and P. Michel, 2001: Trends in antimicrobial resistance of *Salmonella* isolated from animals, foods of animal origin, and the environment of animal production in Canada, 1994–1997. *Microb. Drug Resist.* 7, 197–212.
- Rajic, A., M. E. McFall, A. E. Deckert, R. Reid-Smith, K. Manninen, C. Poppe, C. E. Dewey, and S. A. McEwen, 2004: Antimicrobial resistance of *Salmonella* isolated from finishing swine and the environment of 60 Alberta swine farms. *Vet. Microbiol.* 104, 189–196.
- Rankin, S. C., H. Aceto, J. Cassidy, J. Holt, S. Young, B. Love, D. Tewari, D. S. Munro, and C. E. Benson, 2002: Molecular characterization of cephalosporin-resistant *Salmonella enterica* serotype Newport isolates from animals in Pennsylvania. *J. Clin. Microbiol.* 40, 4679–4684.
- Ruiz, M., J. C. Rodriguez, I. Escribano, and G. Royo, 2004: Available options in the management of non typhi *Salmonella*. *Expert Opin. Pharmacother.* 5, 1737–1743.
- Schroeter, A., B. Hoog, and R. Helmuth, 2004: Resistance of *Salmonella* isolates in Germany. *J. Vet. Med. B Infect. Dis. Vet. Public Health* 51, 389–392.
- Schwarz, S., and E. Chaslus-Dancla, 2001: Use of antimicrobials in veterinary medicine and mechanisms of resistance. *Vet. Res.* 32, 201–225.
- Teale, C. J., 2002: Antimicrobial resistance and the food chain. *J. Appl. Microbiol.* 92, 85S–89S.
- Threlfall, E. J., B. Rowe, J. L. Ferguson, and L. R. Ward, 1986: Characterization of plasmids conferring resistance to gentamicin and apramycin in strains of *Salmonella typhimurium* phage type 204c isolated in Britain. *J. Hyg.* 97, 419–426.

- Threlfall, E. J., B. Rowe, and L. R. Ward, 1993: A comparison of multiple drug resistance in *Salmonellas* from humans and food animals in England and Wales, 1981 and 1990. *Epidemiol. Infect.* 111, 189–197.
- Threlfall, E. J., J. A. Frost, L. R. Ward, and B. Rowe, 1996: Increasing spectrum of resistance in multiresistant *Salmonella* Typhimurium. *Lancet* 347, 1053–1054.
- Threlfall, E. J., L. R. Ward, and B. Rowe, 1997: Increasing incidence of resistance to trimethoprim and ciprofloxacin in epidemic *Salmonella* Typhimurium DT104 in England and Wales Eurosurveillance. *Eur. Commun. Dis. Bull.* 2, 81–84.
- Threlfall, E. J., C. J. Teale, R. H. Davies, L. R. Ward, J. A. Skinner, A. Graham, C. Cassar, and K. Speed, 2003: A comparison of antimicrobial susceptibilities in nontyphoidal *Salmonellas* from humans and food animals in England and Wales in 2000. *Microb. Drug Resist.* 9, 183–189.
- Travers, K., and M. Barza, 2002: Morbidity of infections caused by antimicrobial resistant bacteria. *Clin. Infect. Dis.* 34, S131–S134.
- Usara, M. A., A. Aladueña, R. González, M. de la Fuente, J. García-Peña, N. Frías, and M. A. Echeita, 2002: Antibiotic resistance of *Salmonella* spp from animal sources in Spain in 1996 and 2000. *J. Food Prot.* 65, 768–773.
- Van der wolf, P. J., J. H. Bongers, A. R. W. Elbers, F. M. M. C. Franssen, W. A. Hunneman, A. C. A. van Exsel, and M. J. M. Tielen, 1999: *Salmonella* infections in finishing pigs in Netherlands: bacteriological herd prevalence, serogroup and resistance of isolates and risk factors for infection. *Vet. Microbiol.* 67, 263–275.
- Van Duijkeren, E., W. J. Wannet, D. J. Houwers, and W. van Pelt, 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.
- Varma, J. K., K. Molbak, T. J. Barrett, J. L. Beebe, T. F. Jones, T. Rabatsky-Ehr, K. E. Smith, D. J. Vugia, H. G. Chang, and F. J. Angulo, 2005: Antimicrobial-resistant nontyphoidal *Salmonella* is associated with excess bloodstream infections and hospitalizations. *J. Infect. Dis.* 191, 554–561.
- Villa, L., C. Mammina, V. Miriagou, L. S. Tzouveleki, P. T. Tassios, A. Nastasi, and A. Carattoli, 2002: Multidrug and broad-spectrum cephalosporin resistance among *Salmonella enterica* serotype enteritidis clinical isolates in southern Italy. *J. Clin. Microbiol.* 40, 2662–2665.
- Winokur, P. L., A. Brueggemann, D. L. DeSalvo, L. Hoffmann, M. D. Apley, E. K. Uhlenhopp, M. A. Pfäller, and G. V. Doern, 2000: Animal and human multidrug-resistant, cephalosporin-resistant *Salmonella* isolates expressing a plasmid-mediated CMY-2 AmpC β -lactamase. *Antimicrob. Agents Chemother.* 44, 2777–2783.
- World Health Organization, June, 2000: WHO Global Principles for the Containment of Antimicrobial Resistance in Animals Intended for Food, pp. 5–9. World Health Organization, Geneva.

ESTUDIO III: Herd-Level Risk Factors for Faecal Shedding of *Salmonella enterica* in Spanish Fattening Pigs

Pre. Vet. Med. 91 (2009): 130-136.



Contents lists available at ScienceDirect

Preventive Veterinary Medicine

journal homepage: www.elsevier.com/locate/prevetmed

Herd-level risk factors for faecal shedding of *Salmonella enterica* in Spanish fattening pigs

Carina García-Feliz, Ana Carvajal*, Jesús Ángel Collazos, Pedro Rubio

Departamento de Sanidad Animal (Enfermedades Infecciosas y Epidemiología), Facultad de Veterinaria, Universidad de León, E-24071 León, Spain

ARTICLE INFO

Article history:

Received 3 September 2008

Received in revised form 11 April 2009

Accepted 12 May 2009

Keywords:

Salmonella

Herd-level risk factor

Swine

ABSTRACT

Herd-level risk factors for faecal shedding of *Salmonella enterica* were investigated in a cross-sectional study on Spanish finishing units. For this purpose, 10 faecal samples were collected from 10 different pens containing pigs close to market weight in a total of 232 fattening units. The total sample size was proportionally distributed according to the fattener census in each of the regions and provinces of the country in order to ensure a sample representative of the entire swine population. All samples were individually examined by culture of 25 g of faecal material. Data regarding characteristics and management of each fattening unit were collected by means of a questionnaire. Logistic regression was used to detect relationships between the detection of faecal shedding of *S. enterica* and potential herd-level risk factors. The feeding of pelleted feed was associated with an increased risk of culture-positive faecal samples (OR = 2.28; 95% CI: 1.22, 4.26). The odds of a farm being *Salmonella* positive were associated with its size. Fattening units that slaughtered more than 3500 pigs per year had a higher risk for *Salmonella* faecal shedding (OR = 1.78; 95% CI: 0.96, 3.31). Interventions at these two points should be considered when designing or managing growing pig facilities to reduce *Salmonella* faecal shedding by fatteners.

© 2009 Elsevier B.V. All rights reserved.

1. Introduction

According to data from the European Food Safety Authority (EFSA), *Salmonella enterica* is the most common cause of food-borne illness in Europe and more than 160,000 human cases of salmonellosis were reported in the European Union (EU) during 2006 (EFSA, 2007). Eggs and poultry currently remain the main sources for human salmonellosis. Over the last years, however, it has been recognized that contaminated pork is also a significant source of human infections (Maguire et al., 1993; Wegener et al., 1994). The number of human cases of salmonellosis directly attributable to pork or pork products in the EU is unknown, although it has been estimated that 7–20% of

these cases can be related to pork in industrialized countries (Berends et al., 1998; Hald and Wegener, 1999; Steinbach and Kroell, 1999).

It has been demonstrated that *Salmonella* infected pigs usually remain as healthy carriers that may excrete *Salmonella* spp. in faeces or harbour the bacteria in several tissues, particularly the digestive tract, large intestine and ileum, the closely associated lymph nodes or the tonsils (Wood et al., 1989; Fedorka-Cray and Wray, 2000). *Salmonella* carrier pigs entering the slaughterhouse seem to be the most common source of carcass and meat product contamination (Berends et al., 1996; Beloeil et al., 2004a).

Due to the fact that *Salmonella* is identified in all stages of pork production, European authorities have promoted a farm to fork approach including actions at every step of the food chain. *Salmonella* control programmes on the pre-harvest level have to be included in the food safety system, trying to identify highly contaminated farms and using on-

* Corresponding author. Tel.: +34 987 291302; fax: +34 987 291304.
E-mail address: ana.carvajal@unileon.es (A. Carvajal).

farm intervention strategies to reduce the within-farm prevalence of *Salmonella* infection.

With the aim to identify possible measures to reduce *Salmonella* prevalence in slaughter pigs, several studies have investigated herd-level risk factors for *Salmonella* infection. Different feeding practices, including groundness and pH of feed and type of feeding, management procedures such as continuous or all-in/all-out production systems, size of the herd or type of pen partitions and wall separations, as well as several conditions related to the level of hygiene and general health status have been identified as the main factors associated with high prevalence of *Salmonella* infection in swine farms from different countries (Berends et al., 1996; Davies et al., 1997b; Letellier et al., 1999; Van der Wolf et al., 1999, 2001b; Kranker et al., 2001; Stege et al., 2001; Beloeil et al., 2004b; Lo Fo Wong et al., 2004; Nollet et al., 2004).

Recently, the bacteriological prevalence of *Salmonella* infection among Spanish swine finishing farms was estimated to be moderately high, both at the sample (12.5%) and herd levels (43.1%) (García-Feliz et al., 2007). In spite of the importance of Spanish pig production, the second largest pig producer of the EU, there is a lack of information concerning the risk factors for *Salmonella* infection in Spanish swine farms. To our knowledge, there is only one study, focusing on swine herds from Catalonia (Mejía et al., 2006). The objective of the present study was to investigate herd-level risk factors for faecal shedding of *S. enterica* by pigs at the end of the fattening period in Spanish swine farms.

2. Materials and methods

2.1. Study design and sample collection

A cross-sectional study was carried out in Spain from March 2003 to February 2004 to determine the herd prevalence and serovar diversity of *Salmonella* infections in Spanish swine fattening units. The methods for herd selection, sample collection and laboratory testing, the *Salmonella* prevalence at the sample and herd levels, and the serovar and phagetype diversity of the isolates have been described in detail (García-Feliz et al., 2007).

In brief, a total of 232 farms producing market pigs were sampled. Sample size was estimated to be enough to determine the prevalence of *Salmonella* infected farms with an absolute error $\leq 6.5\%$ and 95% confidence level. Farms were selected from those affiliated to veterinary or farmer organisations as well as to feed companies that represented approximately 70% of the swine market production in Spain. The total sample size was proportionally distributed according to the fatter census in each of the regions and provinces of the country to ensure a representative sample of the entire Spanish swine population. Within each farm, pens were defined as subunits of sampling since animals housed in a same pen share several characteristics including nutrition or exposure to infectious agents (McDermott et al., 1994) that would probably result in a common *Salmonella* infectious status. Ten pooled faecal

samples (≥ 25 g) were collected from 10 different pens which guarantee at least one positive sample in a target farm with a prevalence of 25% of positive pens with 95% confidence. Pens were randomly selected by practitioners from those containing finishing swine that were within four weeks of shipment. Pooled faecal samples were collected from five different locations within each sampled pen.

2.2. Microbiological examination

Each sample was investigated separately using the ISO method (ISO 6579: 1993 General guidance on methods for the detection of *Salmonella*) and starting with 25 g of faecal material. One single *Salmonella*-confirmed isolate from each positive sample was frozen and forwarded to the National Reference Laboratory for *Salmonella* and *Shigella* (Health Institute Carlos III, Madrid) for typing. All isolates were serotyped according to the Kauffmann–White scheme (Popoff and Le Minor, 1992), and phage typing of *S. Typhimurium*, *S. 4,5,12:i:-* and *S. 4,12:i:-* was performed with phages provided by the International Phage-typing Reference Laboratory (Colindale, London, England) following international phage-typing methods (Anderson et al., 1977).

Salmonella were recovered from 290 of 2320 faecal floor specimens (12.5%; 95% CI: 11.2–13.8) and 100 out of 232 farms housing fattening pigs had at least one positive sample (43.1%; 95% CI: 37–49.1). The number of positive samples per positive farm ranged from 1 to 10 with a median of 2 (mean 2.9). A total of 24 different serovars were identified. *S. Typhimurium* was the predominant serovar and was identified in 38% of the positive farms. Other frequent serovars were *S. Rissen*, *S. Derby* and *S. 4,12:i:-* with 25%, 14% and 8% of the positive herds, respectively (García-Feliz et al., 2007).

2.3. Data collection

Each of the participating farms was provided with a questionnaire that was completed by the practitioner and submitted together with the faecal samples to the Laboratory of Infectious Diseases at the University of León. This questionnaire (available upon request) included 74 questions distributed into three major parts: general items related to the farm, characteristics and management of the fattening unit and the last concerning hygiene and biosecurity aspects. Sixty-nine percent of the questions (51) were closed (e.g. pre-set options), 21.6% were semi-closed (16) (e.g. information on days or number of animals) and 9.4% were open-ended (7). All questions were related to variables derived from a literature review of potential risk factors for salmonellosis in pigs. Table 1 shows a summary of the variables that were derived from this questionnaire.

Before the start of the study, the questionnaire was pre-tested by five collaborating swine practitioners at five different farms. For this purpose, the practitioners were required to fill in the questions on their own. This was followed by an interview in which the content and interpretation of questions and responses were discussed.

Table 1Summary of variables derived from the questionnaire and assessed as potential risk factors for *Salmonella* faecal shedding in Spanish fattening units.

Subject	Factors
General data on the farms (n = 3)	<i>Location:</i> region. <i>Size:</i> number of pigs slaughtered per year. <i>Type of swine operation</i> (finishing or farrow-to-finish).
Characteristics and management of the fattening units (n = 21)	<i>Production parameters:</i> average daily gain and mortality. <i>Housing:</i> number of barns, number of pigs per barn, number of rooms per barn, number of pens per room, number of pigs per pen, type of pen walls (solid, spindles or combination), type of floor (solid, slatted, partially slatted, straw or others), ventilation and heating systems. <i>Feed and feeding systems:</i> type of ration (pelleted or non-pelleted feed), wet or dry feed, ad libitum or restricted feeding, purchased or home-mixed feed, feeding system (by hand/automatic). <i>Growth promoters:</i> if and sort. <i>Acids</i> (no, water, feed). <i>Drinking practices:</i> type of drinkers (nipple, bowl or bowl/nipple combination drinkers) and number of drinkers per pen.
Hygiene and biosecurity procedures (n = 17)	<i>Facilities:</i> distance to other swine farms (100 m, 100–500 m, 500–1000 m or >1 km), perimetral fence around the farm, bird-proofed nets in windows, sanitary ford in the entry of the farm. <i>Procedures:</i> rodent control (no, occasional or continuous), mandatory procedures for practitioners (boots and coveralls provided, only boots or anything), mandatory procedures for visitors (boots and coveralls provided, only boots or anything). <i>Pig flow in finishers:</i> continuous or all-in/all-out, by rooms or barns. <i>Cleaning and disinfection procedures:</i> methods (by hand, pressure washing or hot water pressure washing), use of chemicals (never, sometimes, always), manure storage and removal. <i>Procedures regarding transport vehicles:</i> vehicles entering within the farm. <i>Water:</i> source. <i>Animals:</i> source of weaned pigs (1 or ≥ 2) and, in case, number of sources.

The number of variables analyzed per subset is indicated in brackets.

2.4. Statistical analysis

In the statistical analysis the farm was taken as the unit of observation with a farm classified as positive if *Salmonella* spp. were isolated from one or more of the faecal samples. Questionnaire data were entered into a data-entry program developed in EpiInfo™ for Windows (CDC, USA) together with the bacteriological results.

In a first step, a descriptive analysis was performed in order to identify variables with a large number of missing observations or a low variability that might be of little value for further investigations. After this validation, a univariate analysis (Chi-square test or ANOVA/Kruskal–Wallis test) was conducted using the *Salmonella* status of the farm as the outcome variable in EpiInfo™. All variables with a significance value $P \leq 0.25$ were selected for further analysis in a multivariate logistic model. A test for linearity was performed for continuous variables that were associated with *Salmonella* shedding by graphing odds against categories of equal size to the continuous variable. When this graphical test revealed a lack of linearity, the continuous variable was categorised according to this result before being entered into the model. Colinearity between selected variables was assessed by a pair-wise calculation of Spearman rank correlations. When two potential risk factors were highly correlated (correlation coefficient > 0.5), only one was used in the multivariate analysis (i.e. the one with the smallest P -value in the univariate analysis). A multivariate logistic model was constructed using a stepwise backward elimination procedure in SPSS 15.0 for Windows (SPSS Inc.). Variables with a $P \leq 0.05$, calculated using the Wald test, were maintained in the model. Confounding was assessed every

time a non-significant variable was dropped from the model by comparing the change in the coefficients for the variables remaining in the model. Variables that modified the coefficients for the independent variables by 25% or more were classified as confounding and retained in the model (Dohoo et al., 2003). Once the main effects model was obtained, two-way interactions amongst independent variables remaining in the model were tested by addition into the model and retained if they were significant ($P \leq 0.05$).

3. Results

A total of 232 farms producing market pigs located in 14 different regions and 43 provinces of Spain were included in the study. More than 60% of the participating farms were finishing farms (64.5%) while the rest (35.5%) were farrow-to-finish farms. All-in/all-out flow was practised in finishers in 81.5% of the farms, mostly by barns (74% of the farms) and less commonly by rooms (26% of the farms). The estimated number of slaughtered pigs per year in each farm ranged from 100 to 187,000 with a median of 3500. There was at least one positive sample from 100 (43.1%) of the 232 participating farms.

Several variables were discarded due to their low variability. Less than 2% of the sampled fattening units used wet feed while restricted feeding was limited to 2.6% of the farms and less than 5% of them used hand administration of food. Low variability was also detected in cleaning and disinfecting procedures and rodent control. The majority of the farms (92%) employed pressure water washing for cleaning and always use chemicals for disinfection (89%) and almost 90% of them reported an

Table 2

Categorical variables identified as being significantly associated ($P < 0.25$) in the univariate analysis of risk factors for the *Salmonella* faecal shedding in a study of 232 Spanish swine fattening units (2003–2004).

Variable	Level	Percentage of herds (%)	Percentage of positive herds (%)	P-value
Type of swine operation	Farrow-to-finish	35.4	34.6	0.234
	Finishing	64.6	44.1	
Heating system	Yes	45.9	51.1	0.015
	No	54.1	33.3	
Type of ration	Pelleted	57.2	49.2	0.006
	Non-pelleted feed	42.8	29.2	
Source of drinking water	Public drinking water	42.3	51.1	0.008
	Own well	57.7	32.3	
Sanitary ford at the entry of the farm	Yes	70.7	37.5	0.221
	No	29.3	47.6	
Source of weaned pigs	1	80.7	38.0	0.171
	≥ 2	19.3	51.2	
Region	14 different	–	–	0.052

Table 3

Continuous variables identified as being significantly associated ($P \leq 0.25$) in the univariate analysis of risk factors for the *Salmonella* faecal shedding in a study of 232 Spanish swine fattening units (2003–2004).

Variable	Mean (SD)		P-value
	<i>Salmonella</i> positive farms	<i>Salmonella</i> negative farms	
Number of pigs slaughtered per year	8270.8 (23924.4)	6768.4 (8189.3)	0.025
Number of barns	3.8 (4.4)	3.1 (2.6)	0.23

Table 4

Final multivariate model of herd-level risk factors for the *Salmonella* faecal shedding in 182 Spanish swine fattening units (2003–2004).

Variable	Level/range	B (SE)	OR	95% CI	P-value
Type of ration	Non-pelleted feed	0 (0)	1		0.009
	Pelleted feed	0.826 (0.318)	2.285	1.22–4.26	
Number of pigs slaughtered per year	<3500	0 (0)	1		0.067
	≥ 3500	0.578 (0.316)	1.783	0.96–3.31	

effective rodent control program. Moreover, recategorisation was performed in variables such as use of acids (yes/no), distance to other swine farms (<1000 m/>1000 m), type of pen walls (solid/not solid) and type of floor (total slatted versus others). Farms that reported more than one type of floor were classified as others while farms with spindles or combination of spindles and solid pen walls were classified as not solid.

The Chi-square univariate analysis revealed nine variables with $P \leq 0.25$ (Tables 2 and 3) which were further analyzed. Linearity testing showed that the Odds Ratios were not linearly distributed for the number of pigs slaughtered per year and this variable was categorised as <3500 or ≥ 3500 using the median as cut point. Moreover, the variables number of pigs slaughter per year (<3500 or ≥ 3500) and number of barns were correlated as seen from the Spearman correlation coefficient ($r = 0.528$). Therefore, the variable number of barns was not offered to the model. Conversely, there was no evidence of collinearity amongst any of the categorical variables identified as potential risk factors. Complete survey data for the potential risk factors

included in the model were available for 182 (78.4%) of the 232 sampled fattening units. The final multivariate model revealed two risk factors for *Salmonella* faecal shedding in Spanish fattening units (Table 4). The Hosmer and Lemeshow goodness-of-fit test indicated that the model fitted the data adequately (Hosmer and Lemeshow Chi-square = 0.17 with 2 d.f., $P = 0.918$). Risk factors associated with higher odds of faecal shedding of *Salmonella* were the use of pelleted feed and a higher number of pigs slaughtered per year (≥ 3500). Final checks on the model showed no significant interactions between variables or confounding.

4. Discussion

With 15% of the total European Union output, Spain ranked second in terms of EU pork production in 2007 (source: Eurostat). In the last decade, Spanish pig production has undergone great changes. Although it has increased by 40% since 1997, the number of pig farms has drastically decreased and nowadays the Spanish swine

production is increasingly concentrated in large swine production units controlled by big companies (Suarez and de Aragon, 2001).

Recently, the EFSA has published a survey on *Salmonella* levels detected in slaughtered pigs across the EU in 2006–2007 (EFSA, 2008). *Salmonella* was estimated on average to be present in one in ten pigs slaughtered for human consumption (10.3%). However, the observed prevalence of slaughter pigs with *Salmonella* in lymph nodes varied significantly between different countries and reached the maximum in Spain (29%).

To our knowledge, the present cross-sectional study is the first large-scale screening conducted in Spain to elucidate factors associated with *Salmonella* spp. infection using a sample representative of the entire swine population. This has allowed us to identify several risk factors related to the feed and herd size of the fattening units.

In general, two main approaches are usually used to study the epidemiology of *Salmonella* infection in pig farms: serological detection using Mix-LPS ELISAs and bacteriological surveys. Moreover, the bacteriological prevalence of *Salmonella* infection can be established at either the farm or the slaughterhouse. Serology does not provide information on the shedding status of a given animal (Kranker et al., 2003; Korsak et al., 2006). Furthermore, estimates of bacteriological prevalence of *Salmonella* infection at the slaughterhouse are increased by new infections occurring during transport and lairage (Hurd et al., 2002). We therefore decided to determine the bacteriological prevalence of *Salmonella* infection using faecal samples collected on the farm. Although faecal culture is highly specific, estimates of sensitivity are low to moderate (Funk et al., 2005). Moreover, this sensitivity is modified by several factors such as amount of faecal material (Funk et al., 2000) or the use of individual versus pooled samples (Arnold et al., 2005). In the present study, 10 pooled faecal samples per farm collected from five different locations within each pen and in 10 different pens as well as 25 g faecal samples were used to assess the microbiological status of each finishing farm in order to increase sensitivity.

The type of ration contributed significantly to the final model in the present study. Accordingly to previous studies in other countries (Jørgensen et al., 1999; Kjeldsen and Dahl, 1999; Lo Fo Wong et al., 2004; Rajić et al., 2007), the odds of a farm being *Salmonella* positive were less than half on farms that fed meal feed compared with those that fed pelleted feed. The pelleting and heat-treatment of feed has long been recommended as an effective method for decontaminating pig feed (Edel et al., 1970). It has, however, been hypothesized that compared to pelleted feed, non-pelleted feed results in a microbiological ecosystem in the gastrointestinal tract that provides poor growing conditions for *Salmonella* (Jørgensen et al., 1999; Kjeldsen and Dahl, 1999).

Many studies have reported a decreased risk for *Salmonella* infection when wet feed was provided (Van der Wolf et al., 1999, 2001b; Beloeil et al., 2004b; Lo Fo Wong et al., 2004; Farzan et al., 2006). Wet feeding often includes a fermentation step that increases the growth of

lactic-acid producing bacteria and yeasts (Prohászka et al., 1990). It has been proposed that the protective effect of liquid feed containing fermented by-products is a result of the combined effects of large amounts of organic acids and large numbers of lactic-acid producing bacteria (Van der Wolf et al., 2001b; Lo Fo Wong et al., 2002).

As a consequence of the lack of variation for this potential risk factor in the study population, we were not able to analyze this relationship. The number of missing data for this particular variable was very low (11 out of 232 farms), but only three fattening units reported the use of wet feeding. In general, liquid feeding is only affordable for large farms due to the investment needed for storage capacity, mixers, pumps, pipelines and computers. The estimated number of slaughtered pigs per year in our study was a mean of 7317 and higher than 3500 in 50% of the participating farms. In spite of the relatively high number of large fattening units, however, our results indicate that the use of automated liquid feeding systems in Spanish swine fattening units is uncommon.

A protective effect of adding organic acids has been demonstrated in swine farms by several studies, both in feed (Van Winsen et al., 2000) and water (Van der Wolf et al., 2001a). Recently, Creus et al. (2007) reported that diets containing formic acid (0.8%) or a combination of lactic and formic acids (0.4% each) were able to reduce *Salmonella* seroprevalence compared to an unacidified diet. In the present study, the addition of organic acids was a common intervention that was used in 40.6% of the farms during the fattening period. Faecal shedding of *Salmonella* was detected in 48.7% of the farms that used organic acids and in 37.8% of the farms that did not. These differences were not statistically significant in the univariate analysis. As previously suggested, the study of the effect of the administration of organic acids in feed or water seems to be difficult to achieve in cross-sectional studies, since this intervention is used both as a preventive and therapeutic measure (Lo Fo Wong et al., 2004).

In the present study we found an association between the size of the farm, estimated as the number of pigs slaughtered per year, and the detection of *Salmonella* shedders. The risk of a finishing batch to shed *Salmonella* increased when the number of slaughtered pigs per year was ≥ 3500 . Herd size is a very complex factor and many related variables, apart from the number of finishing pigs, should be considered simultaneously: the number of barns, rooms per barn and pens per room, the number of pigs per barn and pigs per pen or pig densities in the barn, room and pen levels. Previous studies have reported very inconsistent results, most likely as a consequence of these factors. Van der Wolf et al. (2001b) found that small-to-moderate sized herds (<800 finishers) had higher *Salmonella* seroprevalence than large herds in the Netherlands. Conversely, in agreement with our results, several studies have detected an increasing risk of *Salmonella* seropositivity in large farms from Denmark and France compared to small ones (Dahl, 1997; Mousing et al., 1997; Carstensen and Christensen, 1998; Farzan et al., 2006; Beloeil et al., 2007), while many others have failed to demonstrate this association (Lo Fo Wong et al., 2004; Rajić et al., 2007).

Although large farms usually implement proper biosecurity measures and good management practices more often than smaller ones, the sources for *Salmonella* infection may be increased in large farms. Other factors, such as pig density at the pen level, pig-to-pig contact or degree of stress might also explain at least part of the differences encountered in *Salmonella* faecal shedding by finishers from large and small herds.

Rajić et al. (2007) reported that multisite operations or individual grow-to-finish farms had a greater risk for swine salmonellosis than farrow-to-finish farms in Canada. A similar result was described by Davies et al. (1997b) in North Carolina. In the present study, the prevalence of *Salmonella* faecal shedding was 44% among finishing farms and 35% among farrow-to-finish farms. Although the type of swine operation was used to the model, this variable was not retained in the final equation. We therefore cannot associate higher odds of swine salmonellosis to finishing farms.

In spite of the relatively high number of sampled farms, the present study failed to identify associations between several characteristics of the fattening unit at either the univariate or multivariate analysis levels, such as the type of floor, type of wall separations or type of drinkers. It has been suggested that closed pen separations that do not allow the direct contact between pigs from different pens can prevent *Salmonella* transmission (Dahl et al., 1996). Conversely, several studies have shown that fully slatted flooring have a protective effect compared to other types of flooring, such as partial slatted floors (Nollet et al., 2004) or flush-gutter flooring (Davies et al., 1997a; Davies, 1998) that allow a higher contact of the pig with faecal material. Bahnson et al. (2006) reported that the odds for *Salmonella* carriage were lower in farms using nipple drinkers, which prevent more water pooling and contamination with faecal material compared to those that employ bowl or bowl/nipple combination drinkers. In accordance with our results, many other studies have failed to detect these associations (Van der Wolf et al., 2001b; Lo Fo Wong et al., 2004; Rajić et al., 2007).

It is generally accepted that hygiene and biosecurity measures, such as strict cleaning and disinfection protocols, hygiene facilities, strict all-in/all-out policy or eradication of rodents, are relevant tools in the control of swine salmonellosis (Berends et al., 1996; Lo Fo Wong et al., 2002; Funk and Gebreyes, 2004). We were not able to analyze variables of interest like cleaning and disinfections procedures or rodent control due to the lack of variation in the study population. Moreover, in agreement with the results from other studies (Davies et al., 1997b; Nollet et al., 2004; Rajić et al., 2007), we were not able to demonstrate any benefit from all-in/all-out flow in finishers over continuous production.

Three variables concerning hygiene and biosecurity were selected to be included in the multivariate analysis, although none of them was finally retained in our model: source of drinking water, sanitary ford at the entry of the farm and source of weaned pigs. Lo Fo Wong et al. (2004) found that recruiting pigs from more than three supplier herds was a risk factor for *Salmonella* seropositivity in a study that included 359 finishing herds from Germany,

Denmark, Greece, The Netherlands and Sweden. In our study, *Salmonella* faecal shedding was detected in more than 50% of the farms that reported more than one source of weaned pigs and in 38% of integrated finishing units using a single source. The lack of association between the number of supplier herds and *Salmonella* infection might be a consequence of the relatively low variation of this factor in our study, since less than 20% of the farms reported more than one source. This resulted in a diminished statistical power to detect relationships.

5. Conclusion

Our study confirms that pelleted feed is associated with an increased risk of *Salmonella* detection in faecal samples from finishing pigs and therefore should be considered as a possible intervention point for the control of swine salmonellosis in Spanish finishing units. Conversely, faecal *Salmonella* shedding was more commonly detected in large units when compared to small ones.

Acknowledgments

We gratefully acknowledge the pig farmers and veterinarians, their organisations and the feed companies for their active cooperation in the development of the present research. G.F. Bayón provided excellent technical assistance. This work was funded by the Ministerio de Agricultura, Pesca y Alimentación and the Ministerio de Ciencia y Tecnología Project No. GL2002-04161-C02-01.

References

- Anderson, E.S., Ward, L.R., Saxe, M.J., Sa, J.D., 1977. Bacteriophage Typing Designations of *Salmonella typhimurium*. J. Hyg. 78, 297–300.
- Arnold, M.E., Cook, A., Davies, R., 2005. A modelling approach to estimate the sensitivity of pooled faecal samples for isolation of *Salmonella* in pigs. J. R. Soc. Interface 2, 365–372.
- Bahnson, P.B., Fedorka-Cray, P.J., Ladely, S.R., Mateus-Pinilla, N.E., 2006. Herd-level risk factors for *Salmonella enterica* subsp. *enterica* in U.S. market pigs. Prev. Vet. Med. 76, 249–262.
- Beloeil, P.A., Chauvin, C., Proux, K., Flavet, C., Madec, F., Alioum, A., 2007. Risk Factors for *Salmonella* seroconversion of fattening pigs in farrow-to-finish herds. Vet. Res. 38, 835–848.
- Beloeil, P.A., Chauvin, C., Proux, K., Madec, F., Fravallo, P., Alioum, A., 2004a. Impact of the *Salmonella* status of market-age pigs and the pre-slaughter process on *Salmonella* caecal contamination at slaughter. Vet. Res. 35, 513–530.
- Beloeil, P.A., Fravallo, P., Fablet, C., Jolly, J.P., Eveno, E., Hascoet, Y., Chauvin, C., Salvat, G., Madec, F., 2004b. Risk factors for *Salmonella enterica* subsp. *enterica* shedding by market-age pigs in French farrow-to-finish herds. Prev. Vet. Med. 63, 103–120.
- 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.
- Berends, B.R., Van Knapen, F., Mossel, D.A., Burt, S.A., Snijders, J.M., 1998. Impact on human health of *Salmonella* spp. on pork in The Netherlands and the anticipated effects of some currently proposed control strategies. Int. J. Food Microbiol. 44, 219–229.
- Carstensen, B., Christensen, J., 1998. Herd size and sero-prevalence of *Salmonella enterica* in Danish swine herds: a random-effects model for register data. Prev. Vet. Med. 34, 191–203.
- Creus, E., Pérez, J.F., Peralta, B., Bauceles, F., Mateu, E., 2007. Effect of acidified feed on the prevalence of *Salmonella* in market-age pigs. Zoonoses Public Health 54, 314–319.
- Dahl, J., 1997. Cross-sectional epidemiological analysis of the relations between different herd factors and *Salmonella*-seropositivity. In: Proc. 8th Int. Symp. Soc. Vet. Epidemiol. Econ., Paris, France, pp. 1–3.

- Dahl, J., Wingstrand, A., Baggesen, D.L., Nielsen, B., 1996. Spread of *Salmonella* infection in pens and between pens. In: Proc. 11th Int. Pig Vet. Soc. Congress, Bologna, Italy, p. 172.
- Davies, P.R., 1998. Fecal shedding of *Salmonella* by pigs housed in buildings with open-flushed gutters. Swine Health Prod. 6, 101–106.
- Davies, P.R., Morrow, W.E., Jones, F.T., Deen, J., Fedorka-Cray, P.J., Gray, J.T., 1997a. Risk of shedding *Salmonella* organisms by market-age hogs in a barn with open-flush gutters. J. Am. Vet. Med. Assoc. 210, 386–389.
- Davies, P.R., Morrow, W.E., Jones, F.T., Deen, J., Fedorka-Cray, P.J., Harris, I.T., 1997b. Prevalence of *Salmonella* in finishing swine raised in different production systems in North Carolina, USA. Epidemiol. Infect. 119, 237–244.
- Dohoo, I.R., Martin, S.W., Stryhn, H., 2003. Veterinary Epidemiologic Research. AVC Inc., Charlottetown, Prince Edward Island, Canada.
- Edel, W., van Schothorst, M., Guinée, P.A., Kampelmacher, E.H., 1970. Effect of feeding pellets on the prevention and sanitation of *Salmonella* infections in fattening pigs. Zentralbl. Veterinärmed. B. 17, 730–738.
- EFSA, 2007. The community summary report on trends and sources of zoonoses, zoonotic agents, antimicrobial resistance and foodborne outbreaks in the European Union in 2006. EFSA J. 130, 1–352.
- 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.
- Farzan, A., Friendship, R.M., Dewey, C.E., Warriner, K., Poppe, C., Klotins, K., 2006. Prevalence of *Salmonella* spp. on Canadian pig farms using liquid or dry-feeding. Prev. Vet. Med. 73, 241–254.
- Fedorka-Cray, P.J., Wray, C., 2000. *Salmonella* infections in pigs. In: Wray, C., Wray, A. (Eds.), *Salmonella* in Domestic Animals. CAB International, London, UK, pp. 191–207.
- Funk, J.A., Davies, P.R., Nichols, M.A., 2000. The effect of sample weight on detection of *Salmonella enterica* in swine feces. J. Vet. Diagn. Invest. 12, 412–418.
- Funk, J.A., Gebreyes, W.A., 2004. Risk factors associated with *Salmonella* prevalence on swine farms. Swine Health Prod. 12, 246–251.
- Funk, J.A., Harris, I.T., Davies, P.R., 2005. Comparison of fecal culture and Danish Mix-ELISA for determination of *Salmonella enterica* subsp. *enterica* prevalence in growing swine. Vet. Microbiol. 107, 115–126.
- García-Feliz, C., Collazos, J.A., Carvajal, A., Vidal, A.B., Aladueña, A., Ramiro, R., de la Fuente, M., Echeita, M.A., Rubio, P., 2007. *Salmonella enterica* infections in Spanish swine fattening units. Zoonoses Public Health 54, 294–300.
- Hald, T., Wegener, H.C., 1999. Quantitative assessment of the sources of human salmonellosis attributable to pork. In: Proc. 3th Int. Symp. on the Epidemiol. and Control of *Salmonella* in Pork, Washington DC, USA, pp. 200–205.
- Hurd, H.S., McKean, J.D., Griffith, R.W., Wesley, I.V., Rostagno, M.H., 2002. *Salmonella enterica* infections in market swine with and without transport and holding. Appl. Environ. Microbiol. 68, 2376–2381.
- Jørgensen, L., Dahl, J., Wingstrand, A., 1999. The effect of feeding pellets, meal and heat treatment on the *Salmonella*-prevalence of finishing pigs. In: Proc. 3th Int. Symp. on Epidemiol. and Control of *Salmonella* in Pork, Washington DC, USA, pp. 308–312.
- Kjeldsen, N.J., Dahl, J., 1999. The effect of feeding non-heat treated, non-pelleted feed compared to feeding pelleted, heat-treated feed on the *Salmonella*-prevalence of finishing pig. In: Proc. 3th Int. Symp. on Epidemiol. and Control of *Salmonella* in Pork, Washington DC, USA, pp. 313–316.
- Korsak, N., Degeye, J.N., Etienne, G., Beduin, J.M., China, B., Ghafir, Y., Daube, G., 2006. Use of a serological approach for prediction of *Salmonella* status in an integrated pig production system. Int. J. Food Microbiol. 108, 246–254.
- Kranker, S., Alban, L., Boes, J., Dahl, J., 2003. Longitudinal study of *Salmonella enterica* serotype Typhimurium infection in three Danish farrow-to-finish swine herds. J. Clin. Microbiol. 41, 2282–2288.
- Kranker, S., Dahl, J., Wingstrand, A., 2001. Bacteriological and serological examination and risk factor analysis of *Salmonella* occurrence in sow herds, including risk factors for high *Salmonella* seroprevalence in receiver finishing herds. Berl. Munch. Tierärztl. Wochenschr. 114, 350–352.
- Letellier, A., Messier, S., Paré, J., Ménard, J., Quessy, S., 1999. Distribution of *Salmonella* in swine herds in Québec. Vet. Microbiol. 67, 299–306.
- 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.
- Lo Fo Wong, D.M.A., Hald, T., van der Wolf, P.J., Swanenburg, M., 2002. Epidemiology and control measures for *Salmonella* in pigs and pork. Livest. Prod. Sci. 76, 215–222.
- Maguire, H.C., Codd, A.A., Mackay, V.E., Rowe, B., Mitchell, E., 1993. A large outbreak of human salmonellosis traced to a local pig farm. Epidemiol. Infect. 110, 239–246.
- McDermott, J.J., Schukken, Y.H., Shoukri, M.M., 1994. Study design and analytical methods for data collected from clusters of animals. Prev. Vet. Med. 18, 175–191.
- 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.
- 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.
- Nollet, N., Maes, D., De Zutter, L., Duchateau, L., Houf, K., Huysmans, K., Imberechts, H., Geers, R., de Kruijf, A., Van Hoof, J., 2004. Risk factors for the herd-level bacteriologic prevalence of *Salmonella* in Belgian slaughter pigs. Prev. Vet. Med. 65, 63–75.
- Popoff, M.Y., Le Minor, R., 1992. Antigenic Formulas of the *Salmonella* serovars. WHO Collaborating Centre for References and Research on *Salmonella*. Publ. Institut Pasteur, Paris, France.
- Prohászka, L., Jayarao, B.M., Fábán, A., Kovács, S., 1990. The role of intestinal volatile fatty acids in the *Salmonella* shedding of pigs. Zentralbl. Veterinärmed. B 37, 570–574.
- Rajić, A., O'Connor, B.P., Deckert, A.E., Keenilside, J., McFall, M.E., Reid-Smith, R.J., Dewey, C.E., McEwen, S.A., 2007. Farm-level risk factors for the presence of *Salmonella* in 89 Alberta swine-fattening barns. Can. J. Vet. Res. 71, 264–270.
- Stege, H., Christensen, J., Nielsen, J.P., Willeberg, P., 2001. Data-quality issues and alternative variable-screening methods in a questionnaire-based study on subclinical *Salmonella enterica* infection in Danish pig herds. Prev. Vet. Med. 48, 35–54.
- Steinbach, G., Kroell, U., 1999. *Salmonella* infections in swine herds—epidemiology and importance for human diseases. Dtsch. Tierärztl. Wochenschr. 106, 282–288.
- Suarez, P., de Aragon, J.F., 2001. Thoughts on Spanish pig production. PigLetter 21, 13–18.
- Van der Wolf, P.J., Bongers, J.H., Elbers, A.R., Franssen, F.M., Hunneman, W.A., van Exsel, A.C., Tielen, M.J., 1999. *Salmonella* infections in finishing pigs in The Netherlands: bacteriological herd prevalence, serogroup and antibiotic resistance of isolates and risk factors for infection. Vet. Microbiol. 67, 263–275.
- Van der Wolf, P.J., van Schie, F.W., Elbers, A.R., Engel, B., van der Heijden, H.M., Hunneman, W.A., Tielen, M.J., 2001a. Administration of acidified drinking water to finishing pigs in order to prevent *Salmonella* infections. Vet. Q. 23, 121–125.
- Van der Wolf, P.J., Wolbers, W.B., Elbers, A.R., van der Heijden, H.M., Koppen, J.M., Hunneman, W.A., van Schie, F.W., Tielen, M.J., 2001b. Herd level husbandry factors associated with the serological *Salmonella* prevalence in finishing pig herds in The Netherlands. Vet. Microbiol. 78, 205–219.
- Van Winsen, R.L., Lipman, L.J.A., Biesterveld, S., Urlings, H.A.P., Snijders, J.M.A., van Knapen, F., 2000. Mechanism of *Salmonella* reduction in fermented pig feed. J. Sci. Food Agric. 83, 342–346.
- Wegener, H.C., Baggesen, D.L., Gaarslev, K., 1994. *Salmonella* Typhimurium phage types from human salmonellosis in Denmark, 1988–1993. APMIS 102, 521–525.
- Wood, R.L., Pospischil, A., Rose, R., 1989. Distribution of persistent *Salmonella* Typhimurium infection in internal organs of swine. Am. J. Vet. Res. 50, 1015–1021.

IV. DISCUSIÓN GENERAL

Esta tesis doctoral se presenta bajo la modalidad de compendio de publicaciones. En ella se incluyen tres trabajos publicados, en los que la primera firmante es la autora de la tesis, participando también los directores de la misma. A continuación se presenta una discusión general de los resultados obtenidos en los trabajos presentados.

En una primera etapa, el objetivo fue determinar la prevalencia bacteriológica de *Salmonella* así como la distribución de los serotipos predominantes en las explotaciones porcinas con cerdos de cebo de España.

Para ello, se diseñó un estudio transversal que se realizó entre marzo de 2003 y febrero de 2004 y que incluyó tanto a granjas de cebo, como a granjas de ciclo cerrado en un único punto y a granjas de producción en múltiples puntos. Se llevó a cabo un muestreo estratificado por CC.AA. y por provincias, en función del censo de explotaciones con cerdos de cebo. Las Comunidades de Canarias, Islas Baleares, Madrid, Cantabria y Asturias no se incluyeron en el muestreo puesto que su producción de cerdos de cebo era menor al 1% del total del país.

El muestreo se hizo siguiendo la metodología internacionalmente aceptada para la determinación de la prevalencia bacteriológica. Para ello, en cada explotación de cebo se tomaron 10 muestras de heces procedentes de 10 corrales elegidos al azar entre los que contenían cerdos de cebo con pesos próximos al sacrificio. Estas muestras fueron tomadas directamente del suelo y en 5 puntos diferentes para cada corral.

En total se recogieron y se procesaron individualmente para la detección de *Salmonella* 2.320 muestras de heces procedentes de 232 explotaciones porcinas distribuidas por la geografía española. Es importante señalar que este trabajo fue el primero de esta índole realizado en España con una muestra muy representativa del conjunto del territorio nacional.

Aunque en nuestro estudio decidimos emplear técnicas de bacteriología para el diagnóstico, hay que señalar que, en la actualidad, la gran mayoría de los programas de control de salmonelosis porcina que se han puesto en marcha en países de la UE coinciden en utilizar la serología como herramienta principal de diagnóstico. Las técnicas serológicas habitualmente empleadas son Mix-LPS-ELISAs que combinan diferentes antígenos somáticos para el tapizado de las placas (Nielsen *et al.*, 1995; Van der Heijden *et al.*, 1998; Van der Wolf *et al.*, 1999) permitiendo la detección de la mayoría de las infecciones causadas por bacterias de género *Salmonella* en el ganado porcino. Empleando los resultados de estas técnicas, las explotaciones se clasifican en tres categorías: granjas libres o poco infectadas, granjas moderadamente infectadas y granjas altamente infectadas y, seguidamente, en función de esta clasificación se ejecutan diferentes protocolos de actuación. La detección serológica de la infección permite superar

algunos de los problemas asociados a la detección directa de *Salmonella* por cultivo bacteriológico como son la intermitencia de la eliminación o los bajos niveles o incluso la ausencia de eliminación fecal en los cerdos portadores. Además, el tiempo necesario para alcanzar el diagnóstico es mucho menor y estas técnicas serológicas son económicamente viables cuando se llevan a cabo campañas de control a gran escala.

En cualquier caso, el uso de técnicas de bacteriología convencional es absolutamente imprescindible como punto de partida para el diseño de los programas de control de *Salmonella*. Mediante estas técnicas se puede determinar la prevalencia basal en las explotaciones. Otro dato fundamental se obtiene mediante el aislamiento y tipificación de las cepas. Esta tipificación permite conocer los serogrupos de *Salmonella* más frecuentes en una determinada área o región. La sensibilidad teórica de las pruebas serológicas para el diagnóstico de salmonelosis que se utilicen posteriormente en los programas de control depende principalmente de los serogrupos implicados en la infección en la población de cerdos estudiada. Por consiguiente es imprescindible conocer qué serogrupos están presentes en esa población para, en primer lugar, estimar la sensibilidad teórica de las pruebas serológicas comerciales y para, en su caso, diseñar pruebas específicas que permitan detectar las infecciones causadas por serotipos de *Salmonella* clasificados en aquellos serogrupos no detectables por las pruebas comerciales.

Por otra parte, la prevalencia bacteriológica de la infección por *Salmonella* en cerdos puede determinarse tanto en la granja como en el matadero obteniéndose resultados considerablemente diferentes.

En nuestro estudio, dado que nuestro objetivo principal era determinar la proporción de explotaciones infectadas por *Salmonella* decidimos tomar las muestras en las granjas. Diferentes trabajos han demostrado que el empleo de muestras recogidas en el matadero se asocia a una sobreestimación de los valores de prevalencia de esta infección, consecuencia, principalmente, de la contaminación cruzada entre lotes de animales procedentes de diferentes explotaciones que comparten espacios durante el transporte y, particularmente, en los corrales de espera del matadero. En este sentido, se ha demostrado la capacidad de *Salmonella* para aislarse en el ciego a las 4-6 horas tras la exposición oral a la bacteria (Fedorka-Cray *et al.*, 1995) y Hurd *et al.* (2002) demostraron que los aislamientos de *Salmonella* se multiplicaban hasta 7 veces tras el sacrificio en el matadero en comparación con los animales, procedentes de la misma explotación, que fueron sacrificados en la granja.

La prevalencia aparente de la infección por *Salmonella* fue del 12,5 % (IC 95 %: 11,2-13,8 %) a nivel de muestras mientras que en el 43,1 % de las explotaciones (IC 95 %: 37-49,1 %), se aisló *Salmonella* en al menos una de las muestras de heces recogidas, lo que permite afirmar

que esta infección está muy difundida en las granjas porcinas en el conjunto del país. Estos valores fueron superiores a los encontrados en otros países europeos como Holanda o Dinamarca (Van der Wolf *et al.*, 1999; Christensen *et al.*, 2002). Nuestros datos están en concordancia con el estudio posterior de prevalencia basal de la salmonelosis en cerdos de cebo que se realizó en toda la UE y en el que España resultó ser el país europeo con mayor porcentaje de muestras positivas a *Salmonella* (EFSA, 2008). Sin embargo, hay que señalar que los datos obtenidos en el presente estudio fueron semejantes o ligeramente inferiores a los descritos en algún otro país de la UE como Irlanda así como otros países como Canadá o EEUU (Rowe *et al.*, 2003; Rajic *et al.*, 2005; Rodriguez *et al.*, 2006).

Estos resultados globales son algo superiores a los descritos por otros autores en diferentes regiones de nuestro país, como el 28 % de explotaciones positivas a *Salmonella* descrito en Cataluña (Mejía *et al.*, 2006) o el 33 % descrito en Andalucía (Astorga *et al.*, 2007).

Es importante tener en cuenta que es enormemente complejo establecer comparaciones entre las estimaciones de prevalencia bacteriológica de la salmonelosis obtenidas en diferentes trabajos. Por un lado, existe una gran variabilidad entre las formas de producción de cada país y, por otro, las estimaciones de prevalencia están afectadas en gran medida por las estrategias de muestreo, desde el diseño del estudio hasta el tamaño de la muestra, y los protocolos de aislamiento utilizados (Funk *et al.*, 2000; Hurd *et al.*, 2001; Rajic *et al.*, 2005).

En cuanto a la sensibilidad del cultivo microbiológico, diversos estudios han demostrado un incremento de la sensibilidad directamente asociado al aumento del volumen de la muestra de heces (Funk *et al.*, 2000) y al número de muestras incluidas o representadas en las mezclas de heces, en caso de emplearse (Arnold *et al.*, 2005). En este sentido, la mayor prevalencia observada en nuestro estudio en comparación con otros trabajos podría explicarse, al menos parcialmente, por el empleo de 10 muestras de heces recogidas directamente del suelo y tomadas en cinco puntos diferentes de cada corral muestreado, lo que asegura una sensibilidad muy superior a la de los estudios realizados sobre muestras de cerdos individuales. Además, para cada una de las muestras de heces se procesó individualmente un volumen elevado, 25 g, hecho que también se asocia a una mayor sensibilidad.

En lo que respecta a la comparación entre las diferentes CC.AA. estudiadas, se encontró que la prevalencia aparente de granjas infectadas por *Salmonella* en Castilla y León, C.A. que engloba a más del 10 % del censo de cerdos de cebo del país, fue significativamente inferior a la del resto de CC.AA. El riesgo de que en una granja se detectara al menos una muestra de heces positiva a *Salmonella* fue 4 veces inferior en esta CC.AA. en comparación con el resto del país (OR= 4,04; IC 95 %: 1,54-11,22). Sin embargo, no se pudo demostrar ninguna correlación entre

la prevalencia de explotaciones y muestras positivas y los datos de censo o de densidad de cerdos de cebo en las diferentes CC.AA. muestreadas. No obstante, es importante remarcar que Aragón, Cataluña y Murcia, regiones en las que se concentra más del 50 % del censo de cerdos de cebo y que presentan las mayores densidades de producción porcina en España, registraron valores de prevalencia muy altos tanto de explotaciones como de muestras positivas a *Salmonella*.

El 41,9% de las explotaciones muestreadas fueron explotaciones de cebo integradas en un sistema de producción en múltiples puntos mientras que el 24,8% fueron cebos de ciclos cerrados en un único punto y el 33,3% granjas de cebo. La prevalencia aparente de la infección fue muy similar en las granjas de producción en múltiples puntos y en los cebaderos (42 y 42,8%, respectivamente) y ligeramente inferior en las granjas de ciclo cerrado un único punto (36,5%) aunque las diferencias no alcanzaron la significación estadística.

A pesar de que solo se recogió una colonia de cada cultivo sospechoso, se identificaron un total de 24 serotipos de *Salmonella* diferentes, lo que apunta hacia la existencia de múltiples fuentes de infección en las granjas porcinas, tal y como ha sido propuesto previamente (Baggesen *et al.*, 1996). En este sentido, Rodríguez *et al.* (2006) demostraron la existencia de una mayor variabilidad en lo que respecta a los serotipos de *Salmonella* en las muestras procedentes de explotaciones porcinas en comparación con las obtenidas en otras producciones como las de ganado vacuno, ovino o la avicultura.

S. Typhimurium fue el serotipo predominante tanto en las explotaciones (40 %) como en las muestras (31,4 %), al igual que en las explotaciones porcinas de otros países (Baggesen *et al.*, 1996; van der Wolf *et al.*, 1999; Rowe *et al.*, 2003; Rajic *et al.*, 2005). El segundo serotipo más frecuentemente aislado fue *S. Rissen*, que se identificó en el 25 % de las explotaciones positivas. Estos resultados, además, concuerdan con los obtenidos por otros autores en diferentes regiones de España (Mejía *et al.*, 2003; Astorga *et al.*, 2007). Resulta importante destacar que este serotipo ha mostrado un notable incremento desde el año 2000 entre los aislados de *Salmonella* de origen humano en España (Echeita *et al.*, 2005b), llegando a ocupar el sexto puesto en importancia en los años 2002-2003 (Echeita *et al.*, 2005b) y vinculándose principalmente al cerdo y derivados (De Frutos *et al.*, 2005). Por otro lado, *S. Derby*, un serotipo que se ha demostrado que es capaz de establecer infecciones persistentes en explotaciones porcinas (Baggesen *et al.*, 1996), fue identificado en el 16 % de las muestras y el 14 % de las explotaciones positivas. A este respecto, un clon del *S. Derby* ha sido recientemente identificado en España en muestras de cerdo, productos derivados del cerdo y en humanos (Valdezate *et al.*, 2005).

El serotipo que ocupó el cuarto lugar en frecuencia de aislamiento en nuestro estudio fue *S.* 4,5,12:i:-, un serotipo que emergió y se diseminó entre los aislados humanos a partir de 1997 y que se ha vinculado al consumo de productos de origen porcino (Echeita *et al.*, 1999). Se ha descrito que este serotipo es una variante monofásica de cepas *S.* Typhimurium DT U302 (Echeita *et al.*, 1999; 2001; De la Torre *et al.*, 2003) y que está frecuentemente asociado al perfil de multirresistencia a antimicrobianos R-ACSSuT (ampicilina, cloranfenicol, estreptomicina, sulfamidas y tetraciclina) así como a resistencias adicionales a gentamicina y trimetoprim-sulfametoxazol (De la Torre *et al.*, 2003).

Tal y como se ha expuesto anteriormente, el conocimiento de los serogrupos más prevalentes de *Salmonella* es enormemente importante puesto que determina la sensibilidad de los Mix-LPS-ELISAs comerciales que pueden ser empleados en la detección serológica de explotaciones infectadas por *Salmonella*. La mayoría de estas técnicas están diseñadas para la detección de las infecciones causadas por serotipos de *Salmonella* de los serogrupos B, C1 y D1 (Nielsen *et al.*, 1995; van der Heijden *et al.*, 1998) que son los más comunes en España y en Europa. Los resultados obtenidos en el presente estudio nos permiten señalar que el empleo de estas técnicas serológicas teóricamente permitiría la detección del 91 % de las granjas con cerdos de cebo infectadas por *Salmonella* de nuestro país. Este valor es semejante al descrito en estudios previos llevados a cabo en países como Dinamarca (Baggesen *et al.*, 1996), Holanda (van der Wolf *et al.*, 1999) o Canadá (Letellier *et al.*, 1999; Rajic *et al.*, 2005) y avalaría la utilidad de la gran mayoría de los Mix-LPS-ELISA comerciales en las granjas porcinas de cebo españolas.

Todos los aislados del serotipo Typhimurium así como los de *S.* 4,5,12:i:- y *S.* 4,12:i:- fueron fagotipificados, identificándose hasta 9 fagotipos diferentes así como una elevada proporción de aislados no tipificables (24,2 %). El fagotipo DT 193 fue el más frecuente seguido del DT 104, DT 104b y DT U302. Es importante destacar que estos fagotipos han sido también los más frecuentemente identificados entre los aislados de *S.* Typhimurium de origen humano en España (Echeita *et al.*, 2005b). Además, el 23 % de los aislados de *S.* Typhimurium fueron identificados como pertenecientes a los fagotipos DT 104, DT U302 o DT 104b. Estos fagotipos, que se detectaron en casi el 30 % de las granjas infectadas por *S.* Typhimurium han sido asociados a patrones de multirresistencia a antimicrobianos (De la Torre *et al.*, 2003; Gebreyes *et al.*, 2004b; Johnson *et al.*, 2005) y tienen por ello una gran relevancia en salud pública.

Teniendo en cuenta que un punto fundamental para la puesta en marcha de un programa de control de *Salmonella* es la identificación de posibles factores asociados a la entrada y la diseminación de la *Salmonella* en las explotaciones, simultáneamente al estudio descriptivo de prevalencia, se llevó a cabo un estudio analítico con el fin de identificar factores de riesgo para

esta infección en las granjas con cerdos de cebo de nuestro país.

Para ello se diseñó una encuesta en la que se incluyeron un total de 74 preguntas, divididas en tres apartados: características generales de la explotación, características y manejo de las unidades de cebo y aspectos relativos a la higiene y medidas de bioseguridad. Los cuestionarios fueron cumplimentados por los veterinarios de las explotaciones y fueron remitidos junto con las muestras de heces. El análisis se llevó a cabo tomando la explotación como unidad y considerando una granja como positiva cuando se identificó *Salmonella* en al menos una de las muestras de heces. En una primera etapa, se llevó a cabo un análisis bivariado que permitió seleccionar un total de 7 variables cualitativas y 2 variables cuantitativas para ser incluidas, en una segunda etapa, en el análisis por regresión logística. Al modelo final contribuyeron de modo significativo dos variables, el tipo de pienso utilizado y el tamaño de las explotaciones.

De acuerdo con lo descrito en otros trabajos (Jorgensen *et al.*, 1999; Kjeldsen & Dahl, 1999; Lo Fo Wong *et al.*, 2004a; Rajic *et al.*, 2007), en nuestro estudio el riesgo de que una explotación fuera positiva a *Salmonella* fue 2,3 veces superior en las explotaciones que utilizaban pienso granulado en comparación con las explotaciones que empleaban harinas. A pesar que la granulación y su tratamiento térmico han sido descritos como un método eficaz para la descontaminación del pienso (Edel *et al.*, 1970), también se ha observado que la alimentación a base de piensos granulados favorece determinadas condiciones en el ecosistema gastrointestinal que facilitan la multiplicación de *Salmonella* (Jorgensen *et al.*, 1999; Kjeldsen & Dahl, 1999).

Además, en el presente estudio se encontró asociación entre el tamaño de la explotación, estimado en base al número de cerdos de cebo sacrificados al año, y la presencia de animales eliminadores de *Salmonella*. Las explotaciones en las que el número de animales sacrificados anualmente alcanzaba o superaba los 3.500 cerdos tenían 1,8 veces más riesgo de presentar al menos un animal eliminador. El tamaño de la explotación es una variable enormemente compleja en la que, aparte del número de cerdos sacrificados al año, intervienen otras muchas variables como son el número de naves, el número de corrales por nave, el número de cerdos por nave o por corral o la densidad de cerdos en la nave o el corral. A este respecto, estudios anteriores han descrito resultados inconsistentes. Así, van der Wolf *et al.* (2001b) describieron que las explotaciones con un tamaño relativamente pequeño (<800 cerdos) tenían una mayor seroprevalencia de *Salmonella* que las explotaciones grandes. Por el contrario, y de acuerdo con nuestros resultados, otros estudios han descrito que el riesgo de seropositividad a *Salmonella* es superior en las explotaciones de gran tamaño en comparación con las pequeñas (Dahl, 1997; Mousing *et al.*, 1997; Carstensen & Christensen, 1998; Farzan *et al.*, 2006; Beloeil *et al.*, 2007). Otros autores no han logrado encontrar ninguna asociación (Lo Fo Wong *et al.*, 2004a; Rajic *et*

al., 2007). Por lo general, las explotaciones de mayor tamaño tienen implementados mejores programas de bioseguridad que las de menor tamaño. Sin embargo, el número de fuentes de infección suele incrementarse en relación directa al tamaño. Otros factores como la densidad de cerdos por corral, el grado de estrés o de contacto entre cerdos puede explicar, en parte, las diferencias encontradas entre la prevalencia de animales eliminadores de *Salmonella* en explotaciones porcinas grandes y pequeñas.

La relación entre la dieta líquida y la infección por *Salmonella* no pudo ser investigada debido a la falta de variabilidad observada para esta variable en nuestro estudio. Diversos estudios han descrito que este tipo de dieta, particularmente la alimentación líquida fermentada, disminuye el riesgo para la infección por *Salmonella* en las explotaciones porcinas (van der Wolf *et al.*, 1999, 2001b; Beloeil *et al.*, 2004; Lo Fo Wong *et al.*, 2004a; Farzan *et al.*, 2006) como consecuencia de la combinación de elevadas concentraciones de ácidos orgánicos y de bacterias ácido lácticas que crean un ambiente gastrointestinal desfavorable para la multiplicación de *Salmonella* (van der Wolf *et al.*, 2001c; Lo Fo Wong *et al.*, 2002). En general, la utilización de alimentación líquida es rentable en explotaciones con un tamaño razonablemente grande. La inversión inicial es elevada y se recupera más rápidamente en estas explotaciones por la mejora de los parámetros productivos. Este tipo de alimentación es especialmente rentable en las explotaciones situadas en zonas geográficas con disponibilidad de subproductos de la industria alimentaria, principalmente de la industria láctea.

El tamaño medio de las explotaciones incluidas en nuestro estudio fue elevado. El número de cerdos sacrificados por año alcanzó un valor medio de 7.317 y fue superior a 3.500 en el 50 % de las explotaciones participantes. Sin embargo, los resultados de nuestra encuesta indican que los sistemas de alimentación líquida estaban entonces escasamente implantados en las explotaciones porcinas de nuestro país. Aunque la alimentación líquida aún no es habitual, sí es cada vez más común y muchas de las explotaciones nuevas cuentan con este tipo de alimentación. En nuestro estudio, tan solo tres explotaciones de las 232 incluidas empleaban este tipo de alimentación.

Por el contrario, la adición de ácidos orgánicos en el pienso o el agua resultó ser una práctica muy común durante la fase de cebo en las explotaciones porcinas de nuestro país, siendo utilizada por el 40 % de las granjas incluidas en el presente estudio. La adición de ácidos ha sido descrita como un factor de protección para la salmonelosis porcina (van Winsen *et al.*, 2000; van der Wolf *et al.*, 2001a). En nuestro país, Creus *et al.* (2007) demostraron que dietas que contenían ácido fórmico (0,8 %) o una combinación de ácido láctico y fórmico (0,4 % cada uno) eran capaces de disminuir la seroprevalencia de la infección en comparación con dietas sin acidificar. Sin embargo, en el presente estudio, la infección por *Salmonella* fue detectada con más frecuencia

en las explotaciones que utilizaban ácidos orgánicos aunque las diferencias no alcanzaron significación estadística en el análisis bivariado. A este respecto, coincidimos con Lo Fo Wong *et al.* (2004a) en señalar que el estudio del efecto de medidas como la administración de ácidos orgánicos en la dieta es muy difícil de demostrar en estudios transversales, ya que este tipo de actuaciones se llevan a cabo habitualmente tanto de forma preventiva como terapéutica.

Algunos estudios han identificado como factor de riesgo para la infección por *Salmonella* determinadas características estructurales de las unidades de engorde como el tipo de separación entre corrales, el tipo de suelo o el tipo de bebederos. Se ha descrito que la utilización de separaciones sólidas que dificultan el contacto directo entre cerdos de diferentes corrales puede prevenir la transmisión de *Salmonella* (Dahl *et al.*, 1996). Asimismo, los suelos de rejilla se han identificado como un factor de protección al disminuir el contacto de los cerdos con las heces (Davies *et al.*, 1997a; Davies, 1998; Nollet *et al.*, 2004). En cuanto a los bebederos, Bahnson *et al.* (2006) describieron que el riesgo de infección era menor en granjas que utilizaban bebederos de chupete, probablemente por prevenir mejor la contaminación del agua con materia fecal en comparación con los bebederos de cazoleta. Sin embargo y en coincidencia con otros estudios, en el presente trabajo no se consiguió identificar ninguna asociación entre estas variables y la eliminación de *Salmonella* (van der Wolf *et al.*, 2001a; Lo Fo Wong *et al.*, 2004a; Rajic *et al.*, 2007).

Una de las principales herramientas para el control de la salmonelosis en las explotaciones porcinas es la instauración de programas de bioseguridad y medidas higiénicas como pueden ser los sistemas de manejo “todo dentro-todo fuera”, la utilización de estrictos protocolos de limpieza y desinfección, la presencia de aseos y vestuarios para la higiene y el cambio de ropa tanto del personal como de las visitas o programas eficaces de control de roedores (Berends *et al.*, 1996; Lo Fo Wong *et al.*, 2002; Funk & Gebreyes, 2004). En el presente estudio no se pudieron analizar las variables relativas a los protocolos de limpieza y desinfección y a los programas de control de roedores debido a la poca variabilidad que mostraron.

Al igual que en otros trabajos (Davies *et al.*, 1997b; Nollet *et al.*, 2004; Rajic *et al.*, 2007) no se logró demostrar ningún beneficio de los sistemas de manejo “todo dentro-todo fuera” frente a sistemas de manejo continuos para la prevención de la infección por *Salmonella*. Además, aunque tres variables relativas a higiene y bioseguridad fueron incluidas en el análisis multivariado, el origen del agua de bebida (abastecimiento público/pozo propio), la existencia de vado sanitario o equivalente a la entrada de la explotación y el número de orígenes de los lechones, ninguna de ellas fue retenida en el modelo final.

Finalmente y dado que la literatura señala de forma muy particular al ganado porcino como posible reservorio de aislados resistentes y multirresistentes de *Salmonella*, completamos el presente trabajo realizando un tercer estudio con el objetivo de describir y evaluar la resistencia y multirresistencia antimicrobiana en aislados de *Salmonella* procedentes de cerdos de cebo.

Para ello, se utilizaron los 290 aislados de *Salmonella* obtenidos en el estudio anterior, procedentes de cerdos de cebo aparentemente sanos, así como 192 aislados obtenidos a partir de muestras de heces de cerdos de cebo con cuadros clínicos de diarrea remitidas para su análisis al Laboratorio de Enfermedades Infecciosas de la Facultad de Veterinaria de León entre enero de 2003 y febrero de 2004. Para todos estos aislados se determinó el perfil de resistencia empleando la técnica de microdilución en caldo frente a 17 antimicrobianos: amoxicilina-clavulánico, ampicilina, apramicina, cefalotin, ceftiofur, ciprofloxacina, cloranfenicol, colistina, florfenicol, gentamicina, ácido nalidíxico, neomicina, espectinomina, estreptomina, sulfametoxazol, trimetoprim-sulfametoxazol y tetraciclina.

Los resultados obtenidos ponen de manifiesto la elevada frecuencia de resistencias antimicrobianas entre los aislados de *Salmonella* procedentes de cerdos de cebo en España. Así, en nuestro estudio, a pesar de que todos los aislados de sensibilidad intermedia fueron incluidos en la categoría de sensibles con el fin de evitar una sobreestimación de las resistencias, tan solo el 8 % del total de aislados de *Salmonella* analizados fueron sensibles a todos los antimicrobianos. Estos datos concuerdan con los obtenidos en otros estudios realizados en diferentes regiones de España (Mateu *et al.*, 2002; Agustín *et al.*, 2005; Astorga *et al.*, 2007), en el Reino Unido (Threfall *et al.*, 2003) o en EE.UU. (Gebreyes *et al.*, 2000; 2004b; Farrington *et al.*, 2001). Sin embargo, la proporción de resistencia fue notablemente superior a la descrita por otros autores en Canadá (Rajic *et al.*, 2004), Holanda (van der Wolf *et al.*, 1999) o Bélgica (Nollet *et al.*, 2006).

Aunque no se alcanzaron diferencias estadísticamente significativas, la resistencia antimicrobiana fue ligeramente superior en los aislados procedentes de cerdos con diarrea (94,8 %) que en los procedentes de cerdos aparentemente sanos (90,7 %). Algunos autores han descrito que los aislados de *Salmonella* procedentes de animales enfermos tienen mayor probabilidad de presentar resistencia antimicrobiana que aquellos procedentes de animales sanos (Poppe *et al.*, 2001; Altekruze *et al.*, 2002). Por el contrario, Johnson *et al.* (2005) no encontraron diferencias significativas entre los niveles de resistencia antimicrobiana de aislados procedentes de casos clínicos y los procedentes de estudios de vigilancia.

La tetraciclina fue el antimicrobiano al que correspondieron los porcentajes más elevados de resistencia, seguido por el sulfametoxazol, la ampicilina y la estreptomina. Estos resultados son similares a los descritos en otros estudios con cepas de *Salmonella* de origen porcino en

España (Mateu *et al.*, 2002; Usera *et al.*, 2002; Agustín *et al.*, 2005; Mejía *et al.*, 2006; Astorga *et al.*, 2007) y en otras partes del mundo (Gebreyes *et al.*, 2000; 2004b; Farrington *et al.*, 2001; Threlfall *et al.*, 2003). La resistencia a estos antimicrobianos está generalmente vinculada a su frecuencia de uso en medicina veterinaria y como promotores de crecimiento antes de su prohibición (van der Wolf *et al.*, 1999; van Duijkeren *et al.*, 2003; Threlfall *et al.*, 2003).

También fue relativamente frecuente la resistencia al cloranfenicol, a pesar de ser un antimicrobiano cuya utilización en producción animal lleva prohibida años en la UE. Se ha propuesto que la persistencia de esta resistencia al cloranfenicol puede ser debida a la existencia una relación genética que la une a la resistencia a otros compuestos (Poppe *et al.*, 1998; 2001; Carlson *et al.*, 2003; Gebreyes *et al.*, 2000; 2004c). Así, la elevada proporción de cepas resistentes al cloranfenicol encontradas en nuestro estudio puede ser explicada por la existencia de un alto número de aislados de *S. Typhimurium* con el patrón de pentaresistencia ACSSuT (ampicilina, cloranfenicol, estreptomina, sulfamidas y tetraciclina), patrón generalmente asociado al fagotipo DT 104, aunque también se ha descrito en otros fagotipos de este mismo serotipo (Gebreyes *et al.*, 2000). En estas cepas, el mecanismo de multiresistencia está asociado a la presencia de integrones que alojan casetes que codifican resistencia a múltiples antimicrobianos y que se transmiten en su totalidad, por lo que la resistencia a ciertos antimicrobianos continúa detectándose aunque lleven años sin utilizarse. Además, todas las cepas resistentes al cloranfenicol presentaron a su vez resistencia al florfenicol, un antimicrobiano que se usa en la actualidad en producción porcina en España. Algunos autores han descrito un mecanismo de resistencia cruzada asociado a la presencia del gen floR que codifica la resistencia para ambos antimicrobianos (Bolton *et al.*, 1999).

La resistencia a la apramicina y a la gentamicina se detectó en menos del 10 % de los aislados de *Salmonella*, resultados muy similares a los encontrados en otros estudios realizados sobre aislados procedentes de cerdo. Además, la presencia de resistencia cruzada entre ambos antimicrobianos fue evidente: todos los aislados que presentaron resistencia a la apramicina presentaron a su vez resistencia o sensibilidad intermedia a la gentamicina. Este hecho ha sido descrito anteriormente en aislados de *E. coli* (Hedges & Shannon *et al.*, 1984) y de *Salmonella* (Threlfall *et al.*, 1986).

Más del 95 % de los aislados fueron sensibles a la combinación amoxicilina/clavulánico, aunque esta combinación que no suele usarse en producción porcina en España. Sin embargo, y de acuerdo con lo descrito por Rajic *et al.* (2004), existió un porcentaje relativamente elevado de aislados con sensibilidad intermedia a este antimicrobiano y, por lo tanto, cabe la posibilidad de que la resistencia a amoxicilina/clavulánico pueda ser más frecuente en un futuro.

Por otra parte, a pesar de que la colistina es uno de los fármacos más frecuentemente utilizados en España tanto en el tratamiento como en la profilaxis de enfermedades entéricas en el ganado porcino y de acuerdo con lo descrito por otros autores en nuestro país (Mateu *et al.*, 2002; Mejía *et al.*, 2006; Astorga *et al.*, 2007), la resistencia a este polipéptido fue muy poco frecuente en nuestro estudio, detectándose tan solo en una cepa de *S. Derby*.

Las quinolonas son, junto con el trimetoprim y las cefalosporinas, antimicrobianos de elección para el tratamiento de salmonelosis invasivas en el hombre (Lee *et al.*, 1994). Las cefalosporinas de tercera generación se emplean particularmente en el tratamiento de salmonelosis invasivas en los niños, donde el uso de fluoroquinolonas está contraindicado debido a sus efectos adversos (Bryan & Scheld *et al.*, 1992; Cherubin *et al.*, 1986). A este respecto, es preocupante la emergencia de aislados de *Salmonella* resistentes a estos antimicrobianos tanto en animales como en el hombre (Threlfall *et al.*, 1997a; Molback *et al.*, 1999; Fey *et al.*, 2000; Dunne *et al.*, 2000; Mateu *et al.*, 2002; Rankin *et al.*, 2002; Villa *et al.*, 2002). En nuestro estudio, tan solo un aislado de *Salmonella* del serotipo Ohio y obtenido del grupo de cerdos con diarrea fue resistente a ciprofloxacina. No obstante, la resistencia al ácido nalidíxico fue más frecuente ya que estuvo presente en el 5 % de los aislados de cerdos aparentemente sanos y en el 15 % de los procedentes de cerdos con diarrea. Todos los aislados con resistencia al ácido nalidíxico presentaron a su vez sensibilidad reducida a la ciprofloxacina en coincidencia con las observaciones que han apuntado a la utilidad del ácido nalidíxico como un buen indicador de la reducción de sensibilidad a fluoroquinolonas (Hakanen *et al.*, 1999; Poppe *et al.*, 2001). Además, se identificaron 4 aislados de *S. Montevideo* procedentes de una misma explotación donde no existían manifestaciones clínicas de diarrea resistentes a ceftiofur, siendo ésta la primera descripción de la que tenemos conocimiento de resistencia a cefalosporinas de tercera generación en aislados de origen porcino en España. En este sentido, Mateu *et al.* (2002) y Astorga *et al.* (2007) habían descrito previamente la existencia de aislados porcinos con sensibilidad intermedia a ceftiofur en nuestro país.

La multiresistencia, definida como la resistencia a cuatro o más antimicrobianos, fue muy frecuente, manifestándose en más del 50 % de los aislados de *Salmonella*, y particularmente en los aislados de *S. Typhimurium* presentándose en el 77 % y el 95,6 % de los aislados de este serotipo procedentes de cerdos aparentemente sanos y enfermos, respectivamente. Sin embargo, no fue un problema exclusivo de *S. Typhimurium* ya que se detectó en un total de once serotipos diferentes. Así, se detectaron elevados porcentajes de multiresistencia en aislados de serotipos como Bredeney así como en la variante monofásica de *S. Typhimurium* 4,5,12:i:-.

En concordancia con observaciones previas, los patrones de resistencia y multiresistencia variaron en función de los diferentes serotipos y fagotipos de *Salmonella* (Carramiñana *et al.*, 2004; Schoeter *et al.*, 2004; Gebreyes *et al.*, 2004b; Johnson *et al.*, 2005). En nuestro estudio, el patrón de resistencia más común entre los aislados de *S. Typhimurium* DT 104 y fagotipos relacionados (DT 104b y DT U302) fue R-ACSSuT-SPE-FFN (ampicilina, cloranfenicol, estreptomina, sulfamidas y tetraciclina con resistencia adicional a espectinomicina y florfenicol), mientras que entre los aislados de *S. Typhimurium* DT 193 fue R-AMP-SMX-STR-TET (ampicilina, sulfametoxazol, estreptomina y tetraciclina). El fagotipo DT 193 con este patrón de resistencia ha sido asociado con anterioridad al ganado porcino (Maguire *et al.*, 1993; Hampton *et al.*, 1995). Los patrones R-ACSSuT-SPE-TMP (ampicilina, cloranfenicol, estreptomina, sulfamidas y tetraciclina con resistencia adicional a espectinomicina y trimetoprim) y R-AMP-SMX-SPE-TET-TMP (ampicilina, sulfametoxazol, espectinomicina, tetraciclina y trimetoprim) estuvieron asociados a aislados de *S. Rissen* procedentes de cerdos aparentemente sanos y enfermos, respectivamente, mientras que el patrón R-SMX-SPE-STR-TET (sulfametoxazol, espectinomicina, estreptomina y tetraciclina) fue identificado principalmente en aislados de *S. Derby*. Entre los aislados de la variante monofásica de *S. Typhimurium* 4,5,12:i:-, en particular de su fagotipo U302, el patrón más frecuentemente identificado fue R-ACSSuT-SPE-TMP (ampicilina, cloranfenicol, estreptomina, sulfamidas, tetraciclina, espectinomicina y trimetoprim) con resistencia adicional a la gentamicina y a la apramicina, de acuerdo a lo descrito en otros estudios (Guerra *et al.*, 2000; De la Torre *et al.*, 2003).

Los resultados de este estudio nos indican que la resistencia y la multiresistencia antimicrobiana son muy frecuentes entre los aislados españoles de *Salmonella* de origen porcino. La detección de aislados con resistencia o sensibilidad reducida a cefalosporinas de tercera generación y quinolonas apoya la necesidad de establecer programas de vigilancia de resistencia antimicrobiana en estos aislados.

V. CONCLUSIONES

1. La prevalencia de la infección por *Salmonella enterica* en cerdos de cebo en España es elevada, detectándose al menos una muestra positiva en el 43,1 % de las explotaciones (IC 95 %: 37-49,1 %). Este resultado pone de manifiesto que las explotaciones porcinas son un importante reservorio de esta bacteria y que la carne de cerdo y otros productos de origen porcino deben ser tomados en cuenta como potencial fuente de infección en los casos de salmonelosis en el hombre en España, tal y como se ha descrito en otros países europeos.
2. Las técnicas ELISA habitualmente empleadas en el diagnóstico serológico de la salmonelosis porcina detectan anticuerpos contra los serogrupos B, C1 y D1, que en nuestro estudio se han identificado en el 91 % de las explotaciones porcinas infectadas. Por tanto, si se emplearan estas técnicas para el diagnóstico serológico en España un 9% de las explotaciones infectadas no serían detectadas.
3. El serotipo más prevalente fue *Salmonella* Typhimurium seguido de *Salmonella* Rissen, *Salmonella* Derby y *Salmonella* 4,[5],12:i:-, todos ellos serotipos relativamente frecuentes en los casos de salmonelosis en el hombre en España. Por otra parte, la gran variedad de serotipos detectados, hasta 24 diferentes, podría ser indicativa de la existencia de múltiples fuentes de infección en las explotaciones porcinas de nuestro país.
4. El presente trabajo demuestra la existencia de una amplia diversidad de fagotipos entre los aislados de *Salmonella* Typhimurium obtenidos. Entre los más prevalentes destacan el fagotipo DT104, el DT104b y el DTU302, frecuentemente asociados a perfiles de multirresistencia y a infecciones en el hombre en España.
5. En España, al igual que en otros países, el uso de pienso granulado en cerdos de cebo está asociado a un incremento del riesgo de la detección de *Salmonella enterica* en las heces (OR= 2,28; IC 95 %: 1,22-4,26) siendo éste, por tanto, un posible punto de intervención para el control de la salmonelosis en las unidades de engorde. Además, el riesgo de eliminación fecal de *Salmonella enterica* fue superior en las explotaciones de tamaño grande (OR=1,78; IC 95 %: 0,96-3,31) por lo que también este aspecto debería ser tomado en cuenta para el establecimiento de medidas más intensas de control en las explotaciones de mayor tamaño.
6. La resistencia y la multirresistencia a antimicrobianos es muy común entre los aislados de *Salmonella enterica* procedentes de cerdos de cebo tanto aparentemente sanos como de cerdos con procesos diarreicos. Por consiguiente, el ganado porcino debe ser tenido en consideración como potencial reservorio de cepas de *Salmonella* resistentes y multirresistentes en España.

7. Aunque la resistencia a las quinolonas y a las cefalosporinas, antimicrobianos de elección en el tratamiento de la salmonelosis en el hombre, fue poco frecuente, hemos detectado un cierto número de aislados de *Salmonella enterica* con resistencia o sensibilidad intermedia al ceftiofur y a la ciprofloxacina. Este hecho pone de manifiesto la importancia de la vigilancia de la resistencia antimicrobiana en los aislados de *Salmonella enterica* procedentes del ganado porcino con el fin de limitar la posible diseminación de estas resistencias a través de la cadena alimentaria.

8. La multiresistencia, definida como la resistencia a cuatro o más antimicrobianos, fue particularmente relevante entre los aislados del serotipo Typhimurium, entre los cuales fue muy frecuente el patrón de resistencia R-ACSSuT. Este patrón incluye resistencia a ampicilina, cloranfenicol, estreptomina, sulfametoxazol y tetraciclina y se presenta solo o asociado a resistencia a otros antimicrobianos. Sin embargo, la multiresistencia no fue un fenómeno exclusivo de este serotipo y éste y otros patrones de multiresistencia se detectaron también en otros serotipos.

VI. RESUMEN GENERAL

1. RESUMEN GENERAL

El uso de técnicas de bacteriología convencional es imprescindible como punto de partida para el diseño de los programas de control de *Salmonella* puesto que permiten determinar la prevalencia basal en las explotaciones así como conocer los serogrupos de *Salmonella* más frecuentes en una especie y en una determinada área o región. Este conocimiento es necesario para diseñar técnicas de diagnóstico serológico que permitan detectar, al menos teóricamente, los anticuerpos específicos frente a los principales serogrupos de *Salmonella*. Por ello, nuestro primer objetivo fue determinar la prevalencia bacteriológica de *Salmonella* así como los principales serotipos implicados en la infección en las explotaciones porcinas con cerdos de cebo de España. Para ello se diseñó un estudio transversal que se realizó entre marzo de 2003 y febrero de 2004, siendo el primero de esta índole realizado en España empleando una muestra representativa del conjunto del territorio nacional. Se llevó a cabo un muestreo estratificado por Comunidades Autónomas y por provincias, en función del censo de cerdos de cebo, incluyendo tanto granjas de cebo, como granjas de ciclo cerrado en un único punto y granjas de producción en múltiples puntos. En cada explotación se tomaron 10 muestras de heces, directamente del suelo y en 5 puntos diferentes en cada corral, en 10 corrales elegidos al azar entre los que contenían cerdos de cebo con pesos próximos al peso de sacrificio. En total, se recogieron 2.320 muestras de heces procedentes de 232 explotaciones porcinas distribuidas por la geografía española. Todas ellas fueron procesadas de forma individual, partiendo de un volumen de 25 g, para la detección e identificación de *Salmonella enterica* y todos los aislados obtenidos fueron serotipados y, en su caso, fagotipados.

Se aisló *Salmonella* en al menos una de las muestras recogidas en el 43,1 % de las explotaciones (IC 95 %: 37-49,1 %) y en el 12,5 % (IC 95 %: 11,2-13,8 %) de las muestras de heces. La caracterización serológica permitió identificar un total de 24 serotipos diferentes de *Salmonella*, siendo *S. Typhimurium*, *S. Derby* y *S. Rissen* los más frecuentes. Además, todos los aislados del serotipo *Typhimurium* así como los de *S. 4,5,12:i:-* y *S. 4,12:i:-* fueron fagotipados, identificándose hasta 9 fagotipos diferentes así como una elevada proporción de aislados no tipables (24,2 %). El fagotipo DT 193 fue el más frecuente aunque los fagotipos DT 104, DT 104b y DT U302, frecuentemente asociados a patrones de multirresistencia a antimicrobianos, fueron igualmente muy frecuentes y se identificaron en casi el 30 % de las explotaciones infectadas por *S. Typhimurium*.

Teniendo en cuenta que otro punto fundamental para el diseño de programas de control de *Salmonella* es la identificación de posibles factores asociados a la entrada y la diseminación de esta bacteria en las explotaciones porcinas, simultáneamente al estudio descriptivo de prevalencia, se llevó a cabo un estudio analítico con el fin de identificar factores de riesgo para esta infección

en las granjas con cerdos de cebo de nuestro país. Se diseñó un cuestionario en el que se recogió información acerca de un total de 74 variables, agrupadas en tres categorías: características generales de la explotación, características y manejo de las unidades de cebo y aspectos relativos a la higiene y medidas de bioseguridad. Estos cuestionarios fueron cumplimentados por los veterinarios de las explotaciones y fueron remitidos junto con las muestras de heces para el diagnóstico de salmonelosis.

El análisis se llevó a cabo tomando la explotación como unidad y considerando una granja como positiva cuando se identificó *Salmonella* en al menos una de las 10 muestras de heces. En una primera etapa, se llevó a cabo un análisis bivariado que permitió seleccionar un total de 7 variables cualitativas y 2 variables cuantitativas que fueron incluidas, en una segunda etapa, en un análisis multivariado por regresión logística. Al modelo final contribuyeron de modo significativo dos variables, el tipo de pienso utilizado y el tamaño de las explotaciones. El riesgo de detección de *Salmonella* en las heces fue superior en las explotaciones que empleaban pienso granulado en comparación con las que empleaban piensos en harina (OR= 2,28; IC 95 %: 1,22-4,26). Además, este riesgo estuvo asociado al tamaño de la granja. Así, las explotaciones que sacrificaban más de 3.500 cerdos al año mostraron un riesgo superior al de las explotaciones más pequeñas (OR=1,78; IC 95 %: 0,96-3,31). Estos factores de riesgo deberían incluirse como posibles puntos de intervención para el control de la salmonelosis en las unidades de engorde en nuestro país.

Finalmente y dado que la literatura señala de forma muy particular al ganado porcino como posible reservorio de aislados resistentes y multirresistentes de *Salmonella*, nos planteamos completar el presente trabajo realizando un tercer estudio con el objetivo de describir y evaluar la resistencia y multirresistencia antimicrobiana en aislados de *Salmonella* procedentes de cerdos de cebo. Para ello, se utilizaron todos los aislados obtenidos en el estudio de prevalencia, procedentes de cerdos de cebo aparentemente sanos, así como 192 aislados obtenidos a partir de muestras de heces de cerdos de cebo remitidas para su análisis al Laboratorio de Enfermedades Infecciosas de la Facultad de Veterinaria de León entre Enero de 2003 y Febrero de 2004 y procedentes de animales con un cuadro clínico de diarrea. Para todos estos aislados se determinó el perfil de resistencia empleando la técnica de microdilución en caldo frente a 17 antimicrobianos: amoxicilina-clavulánico, ampicilina, apramicina, cefalotin, ceftiofur, ciprofloxacina, cloranfenicol, colistina, florfenicol, gentamicina, ácido nalidíxico, neomicina, espectinomicina, estreptomycin, sulfametoxazol, trimetoprim-sulfametoxazol y tetraciclina.

El 90,7 % de los aislados obtenidos en cerdos sanos y el 94,8 % de los procedentes de cerdos con diarrea mostraron resistencia a al menos uno de los antimicrobianos valorados. Las frecuencias más elevadas de resistencia correspondieron a tetraciclina, sulfametoxazol,

estreptomicina, espectinomicina, ampicilina, cloranfenicol y trimetoprim-sulfametoxazol. Por el contrario, menos del 10 % de los aislados fueron resistentes a amoxicilina-clavulánico, neomicina, cefalotina, apramicina y gentamicina, mientras que la resistencia a ciprofloxacina, colistina y ceftiofur fue inferior al 1 %. Además, la resistencia antimicrobiana fue particularmente elevada entre los aislados del serogrupo B y los serotipos *S. Typhimurium* y su variante monofásica 4,5,12:i:-.

La multirresistencia, definida como la resistencia a cuatro o más antimicrobianos, fue detectada en más del 50 % de los aislados incluidos en el presente estudio y particularmente entre los aislados de *S. Typhimurium* así como entre los aislados de otros serotipos como *S. Bredeney* y la variante monofásica de *S. Typhimurium*, *S. 4,5,12:i:-*.

2. ABSTRACT

The use of conventional bacteriological techniques is an essential starting point for designing *Salmonella* control programmes, since these are used to determine base prevalence rates on farms and to identify the most frequent *Salmonella* serogroups in a species within a specific area or region. Such information is necessary in order to design serological diagnostic techniques for detecting, at least theoretically, the specific antibodies against the main *Salmonella* serogroups. Consequently, our first objective was to determine the bacteriological prevalence of *Salmonella* and the most important serotypes involved in infection on pig fattening farms in Spain. To this end we designed a cross-sectional study which was conducted between March 2003 and February 2004. This is the first time a study of this kind using a nationally representative sample has been carried out in Spain. Stratified sampling was carried out at regional and provincial level based on the census of fattening pigs, and included multi-site, individual finishing as well as farrow to finish pig farms. Within each farm, 10 faecal samples were taken directly from the floor from 10 pens randomly selected among those containing fattening pigs close to market weight and at 5 different points in each pen. In total, 2,320 samples were collected from 232 pig farms located throughout Spain. All samples were processed individually, using a base volume of 25 g, in order to detect and identify *Salmonella enterica*. All isolates obtained were serotyped and, where appropriate, phagotyped.

Salmonella was isolated in at least one of the samples collected from 43.1% of farms (CI 95%: 37-49.1%) and in 12.5% of faecal samples (CI 95%: 11.2-13.8%). A total of 24 different *Salmonella* serotypes were identified through serological characterisation, *S. Typhimurium*, *S. Derby* and *S. Rissen* being the most frequent. In addition, all isolates of the serotype *Typhimurium* and those of *S. 4,5,12:i:-* and *S. 4,12:i:-* were phagotyped. Up to 9 different phagotypes were identified, together with a high proportion of isolates which was not possible to typify (24.2%). The most frequent phagotype was DT193, although DT 104, DT 104b and DT U302 phagotypes, frequently associated with antimicrobial multiresistance patterns, were also very frequent, and were identified in almost 30% of farms infected with *S. Typhimurium*.

Bearing in mind that another fundamental aspect in the design of *Salmonella* control programmes is the identification of possible factors associated with the entry and spread of these bacteria on pig farms, an analytical study was conducted simultaneously with the descriptive study in order to identify infection risk factors for pig fattening farms in Spain. A questionnaire was designed to collect information on a total of 74 variables grouped into three categories: general characteristics of the farm, characteristics and management of the fattening units and aspects concerning hygiene and biosafety measures. These questionnaires were completed by the

farm veterinary practitioners, and were submitted together with the faecal samples for microbiological diagnosis.

The analysis was conducted by considering the farm as the unit of observation with a farm classified as positive if *Salmonella spp.* were isolated from one or more of the faecal samples. In the first stage, a bivariate analysis was carried out in order to select a total of 7 qualitative variables and 2 quantitative variables which were included, in the second stage, in a multivariate analysis by logistic regression. Two variables made a significant contribution to the final model: the type of feed used and farm size. The risk of detecting *Salmonella* in faeces was higher in farms using pelleted feed compared with those using meal feed (OR= 2.28; IC 95 %: 1.22-4.26). Furthermore, this risk was associated with farm size. Thus, farms which slaughtered more than 3,500 pigs annually presented a higher risk than smaller farms (OR=1.78; IC 95 %: 0.96-3.31). These risk factors should be included as possible points of intervention for controlling salmonellosis in fattening units in Spain.

Lastly, given that the literature has indicated swine in particular as a possible reservoir of resistant and multiresistant *Salmonella* isolates, we proposed to complete the present study with a third research to describe and assess antimicrobial resistance and multiresistance of *Salmonella* isolates from fattening pigs. To this end, we used all the isolates obtained in the prevalence study from apparently healthy pigs, and 192 isolates obtained from faecal samples taken from fattening pigs suffering from diarrhoea and sent for analysis to the Laboratory for Infectious Diseases at the Faculty of Veterinary Science at the University of León between January 2003 and February 2004,. The broth microdilution technique was used to determine the resistance profile of all these isolates against 17 antimicrobials: amoxicillin/clavulanic acid, ampicillin, apramycin, cephalothin, ceftiofur, ciprofloxacin, chloramphenicol, colistin, flophenicol, gentamicin, nalidixic acid, neomycin, spectinomycin, streptomycin, sulfamethoxazole, trimethoprin-sulfamethoxazole and tetracycline.

90.7% of the isolates obtained from healthy pigs, and 94.8% of those from pigs with diarrhoea presented resistance to at least one of the antimicrobials tested. The highest resistance frequencies corresponded to tetracycline, sulfamethoxazole, streptomycin, spectinomycin, ampicillin, chloramphenicol and trimethoprin-sulfamethoxazole. In contrast, less than 10% of isolates were resistant to amoxicillin/clavulanic acid, neomycin, cephalothin, apramycin and gentamicin, whilst resistance to ciprofloxacin, colistin and ceftiofur was less than 1%. Furthermore, antimicrobial resistance was especially high among isolates from serogroup B, the *S. Typhimurium* serotype and the monophasic variant *S.* 4,5,12:i:-.

Multiresistance, defined as resistance to four or more antimicrobials, was detected in over 50% of the isolates included in the present study, and particularly among the isolates of *S. Typhimurium* and among isolates from other serotypes such as *S. Bredeney* and the monophasic variant of *S. Typhimurium*, *S. 4,5,12:i:-*.

VII. BIBLIOGRAFÍA

- Aarestrup F.M., Hendriksen R.S., Lockett J., Gay K., Teates K., McDermott P.F., White D.G., Hasman H., Sørensen G., Bangtrakulnonth A., Pornreongwong S., Pulsrikarn C., Angulo F.J., Gerner-Smidt P. (2007). International spread of multidrug-resistant *Salmonella* Schwarzengrund in food products. **Emerg Infect Dis.** **13(5):**726-31.
- Agustín A.I., Carramiñana J.J., Rota C., Herrera A. (2005). Antimicrobial resistance of *Salmonella* spp. from pigs at slaughter in Spain in 1993 and 2001. **Lett. Appl. Microbiol.** **41:** 39-44.
- Aho M. (1992). Problems of *Salmonella* sampling. **Int. Food Microbiol.** **15:** 225-235.
- 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.
- Alekshun M.N., Levy S.B. (2000). Bacterial drug resistance: response to survival threats, in: Storz G., Hengge-Aronis R. (Eds.). **Bacterial stress responses**. ASM Press, Washington D.C., pp. 323-366.
- Altekruse S.F., Timbo B.B., Mowbray J.C., Bean N.H., Potter M.E. (1998). Cheese-associated outbreaks of human illness in the United States, 1973 to 1992: sanitary manufacturing practices protect consumers. **J. Food Prot.** **61:** 1405-1407.
- Altekruse S.F., Elvinger F., Lee K.Y., Tollefson L.K., Pierson E.W., Eifert J., Sriranganathan N. (2002). Antimicrobial susceptibilities of *Escherichia coli* strains from a turkey operation. **J. Am. Vet. Med. Assoc.** **221:** 411-416.
- Amass S.F., Vyverberg B.D., Ragland D., Dowell C.A., Anederson C.D., Stover J.H., Beaudry D.J. (2000). Evaluating the efficacy of boot baths in biosecurity protocols. **Swine Health and Production.** **8:** 169-173.
- 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.
- Anderson R.C., Stanker L.H., Young C.R., Buckley S.A., Genovese K.J., Harvey R.B., DeLoach J.R., Keith N.K., Nisbet, D.J. (1999). Effect of competitive exclusion treatment on colonization of early-weaned pigs by *Salmonella* serovar Cholerasuis. **Swine Health and Production.** **7:** 155-160.

- Angulo F.J., Johnson K.R., Tauxe R.V., Cohen M.L. (2000). Origins and consequences of antimicrobial-resistant nontyphoidal *Salmonella*: implications for the use of fluoroquinolones in food animals. **Microb. Drug Resist.** **6**: 77-83.
- Angulo F. (1997). Multidrug-resistant *Salmonella* Typhimurium definitive type 104. **Emerg. Infect. Dis.** **3**: 414.
- Arnold M.E., A.J.C., Davies R.H. (2005). A modelling approach to estimate the sensitivity of pooled faecal samples for isolation of *Salmonella* in pigs. **Journal of the Royal Society, Interface/the Royal Society.** **2**: 365-372.
- Astorga R.J., Salaberria A.E., Garcia A.M., Jimenez S.V., Martinez A.C., Garcia A.A., Casas A.A. (2007). Surveillance and antimicrobial resistance of *Salmonella* strains isolated from slaughtered pigs in Spain. **J. Food Prot.** **70**: 1502-1506.
- Bager F., Petersen J. (1991). Sensitivity and specificity of different methods for the isolation of *Salmonella* from pigs. **Acta Vet. Scand.** **32**:473-481.
- Bager F. (1994). *Salmonella* in Danish Pig Herds: Risk Factors and Source of Infection. **Proceedings of the XVII Nordic Veterinary Congress**, Reykjavik, Iceland, pp. 79-82.
- Bager F., Madsen M., Christensen J., Aarestrup F.M. (1997). Avoparcin used as a growth promoter is associated with the occurrence of vancomycin-resistant *Enterococcus faecium* on Danish poultry and pig farms. **Prev. Vet. Med.** **31**: 95-112.
- Baggesen D.L., Wegener H.C., Bager F., Stege H., Christensen J. (1996). Herd prevalence of *Salmonella enterica* infections in Danish slaughter pigs determined by microbiological testing. **Prev. Vet. Med.** **26**: 201-213.
- Baggesen D.L., Sandvang D., Aarestrup F.M. (2000). Characterization of *Salmonella enterica* serovar Typhimurium DT104 isolated from Denmark and comparison with isolates from Europe and the United States. **J. Clin. Microbiol.** **38**: 1581-1586.
- Bahnsen P.B., Fedorka-Cray P.J., Mateus-Pinella N., Franssen F.M., Grass J., Gray J.T. (2001). Herd level risk for *Salmonella* culture positive status in slaughtered pigs. **Proceedings of the 4th International Symposium on the Epidemiology and Control of Salmonella in Pork**, Leipzig, Germany, pp, 244-249.

- Bahnson P.B., Fedorka-Cray P.J., Ladely S.R., Mateus-Pinilla N.E. (2006). Herd-level risk factors for *Salmonella enterica* subsp. *enterica* in U.S. market pigs. **Prev. Vet. Med.** **76**: 249-262.
- Bailey J.S., Blankenship L.C., Cox N.A. (1991). Effect of fructooligosaccharide on *Salmonella* colonization of the chicken intestine. **Poult. Sci.** **70**: 2433-2438.
- Bailey J.S., Cox N.A. (1992). Universal pre-enrichment broth for the simultaneous detection of *Salmonella* and *Listeria* in foods. **J. Food Prot.** **55**: 256-259.
- Baquar N., Threlfall E.J., Rowe B., Stanley J. (1994). Phage Type 193 of *Salmonella* Typhimurium contains different chromosomal genotypes and multiple IS200 profiles. **FEMS Microbiol. Lett.** **115**: 291-295.
- Barber D.A., Bahnson P.B., Isaacson R., Jones C.J., Weigel R.M. (2002). Distribution of *Salmonella* in swine production ecosystems. **J. Food Prot.** **65**: 1861-1868.
- Barrow P.A. (1999). Virulence of *Salmonella enterica* serovar Enteritidis. En: Saeed A.M. (Ed.) ***Salmonella enterica* serovar Enteritidis in humans and animals**, Iowa State University Press, Ames, USA, pp. 173-181.
- Batchelor M., Hopkins K.L., Threlfall E.J., Clifton-Hadley F.A., Stallwood A.D., Davies R.H., Liebana E. (2005). Characterization of AmpC-mediated resistance in clinical *Salmonella* isolates recovered from humans during the period 1992 to 2003 in England and Wales. **J. Clin. Microbiol.** **43**: 2261-2265.
- Baur B., Hanselmann K., Schlimme W., Jenni B. (1996). Genetic transformation in freshwater: *Escherichia coli* is able to develop natural competence. **Appl. Environ. Microbiol.** **62**: 3673-3678.
- Beloil P.A., Chauvin C., Proux K., Rose N., Queguiner S., Eveno E., Houdayer C., Rose V., Fravallo P., Madec F. (2003). Longitudinal serological responses to *Salmonella enterica* of growing pigs in a subclinically infected herd. **Prev. Vet. Med.** **60** (3): 207- 226.
- Beloil P.A., Fravallo P., Fablet C., Jolly J.P., Eveno E., Hascoet Y., Chauvin C., Salvat G., Madec F. (2004). Risk factors for *Salmonella enterica* subsp. *enterica* shedding by market-age pigs in French farrow-to-finish herds. **Prev. Vet. Med.** **63**:103-120.

- Beloel P.A., Chauvin C., Proux K., Flavet C., Madec F., Alioum A. (2007). Risk Factors for *Salmonella* seroconversion of fattening pigs in farrow –to-finish herds. **Vet. Res.** **38**: 835-848.
- Bennett P.M. (1995). The spread of drug resistance. In: Baumberg S., Young J.P.W., Wellington E.M.H., Saunders J.R. (Eds.). **Population Genetics in Bacteria**, University Press, Cambridge, pp. 317- 344.
- Bennett P.M. (1999). Integrons and gene cassettes: a genetic construction kit for bacteria. **J. Antimicrob. Chemother.** **43**:1-4.
- 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.
- Berends B.R., Van Knapen F., Mossel D.A., Burt S.A., Snijders J.M., (1998). Impact on human health of *Salmonella* spp. on pork in The Netherlands and the anticipated effects of some currently proposed control strategies. **Int. J. Food Microbiol.** **44**:219-229.
- Bianca W. (1968). Thermoregulation. In: Hafez, E.S.E. (Ed.), **Adaptation of Domestic Animals**. pp. 97-118.
- Blackburn C. de W. (1993). Rapid and alternative methods for the detection of *Salmonella* in foods. **J. Appl. Bacteriol.** **75**: 199-214.
- Blaha Th. (2004). The present state of the German QS *Salmonella* monitoring and reduction programme. **Dtsch. Tierärztl. Wschr.** **111**: 324-326.
- Blankenship L.C., Bailey J. S., Cox N.A., Stern N.J., Brewer R., Williams O. (1993). Two-step mucosal competitive exclusion flora treatment to diminish *Salmonellae* in commercial broiler chickens. **Poult. Sci.** **72**:1667-1672.
- Boatman M. (1998). Survey of antimicrobial usage in animal health in the European union, Boatman consulting by order of FEDESA.
- Bolton L.F., Kelley L.C., Lee M.D., Fedorka-Cray P.J., Maurer J.J. (1999). Detection of multidrug-resistant *Salmonella enterica* serotype Typhimurium DT104 based on a gene which confers cross-resistance to florfenicol and chloramphenicol. **J. Clin. Microbiol.** **37**: 1348-1351.

- Botteldoorn N., Heyndrickx M., Rijpens N., Grijspeerdt K., Herman L. (2003). *Salmonella* on pig carcasses: positive pigs and cross contamination in the slaughterhouse. **J. Appl. Microbiol.** **95**: 891-903.
- Boyd D., Cloeckeaert A., Chaslus-Dancla E., Mulvey M.R. (2002). Characterization of variant *Salmonella* genomic island 1 multidrug resistance regions from serovars Typhimurium DT104 and Agona. **Antimicrob. Agents. Chemother.** **46**: 1714-1722.
- Brenner, F.W., Villar, R.G., Angulo, F.J., Tauxe, R., Swaminathan, B. (2000). *Salmonella* nomenclature. **J. Clin. Microbiol.** **38**: 2465-2467.
- Briggs C. E., Fratamico P.M. (1999). Molecular characterization of an antibiotic resistance gene cluster of *Salmonella* Typhimurium DT104. **Antimicrob. Agents Chemother.** **43**:846–849.
- Brooks P.H. (2003). Liquid feeding as a means to promote pig health. London Swine Conference; Maintaining Your Competitive Edge.
- Bruun T., Sørensen G., Forshell L.P., Jensen T., Nygard K., Kapperud G., Lindstedt B.A., Berglund T., Wingstrand A., Petersen R.F., Müller L., Kjelsø C., Ivarsson S., Hjertqvist M., Löfdahl S., Ethelberg S. (2009). An outbreak of *Salmonella* Typhimurium infections in Denmark, Norway and Sweden, 2008. **Euro Surveill.****14** (10): pii: 19147.
- Bryan J.P., Scheld W.M. (1992). Therapy of experimental meningitis due to *Salmonella* Enteritidis. **Antimicrob. Agents Chemother.** **36**: 949-954.
- Buchholz U., Brodhun B., Brockmann S.O., Dreweck C.M., Prager R., Tschape H., Ammon A. (2005). An outbreak of *Salmonella* Munchen in Germany associated with raw pork meat. **J. Food Prot.** **68**: 273-276.
- Callow B.R. (1959). A new phage-typing scheme for *Salmonella* Typhimurium. **J. Hyg. (Lond).** **57**: 346-359.
- Cannon R.M., Nicholls T.J. (2002). Relationship between sample weight, homogeneity and sensitivity of faecal culture for *Salmonella enterica*. **J. Vet. Diagn. Invest.** **14**: 60-62.

- Carlson S.A., Wu M.T., Frana T.S. (2003). Multiple antibiotic resistance and virulence of *Salmonella enterica* serotype Typhimurium phage type DT 104. In: Torrence, M.E., Isaacson, R.E. (Eds.), **Microbial Food Safety in Animal Agriculture: Current Topics**. Blackwell Publishing, Chapter 14, pp. 123-129.
- Carramiñana J.J., Rota C., Agustín I., Herrera A. (2004). High prevalence of multiple resistance to antibiotics in *Salmonella* serovars isolated from a poultry slaughterhouse in Spain. **Vet. Microbiol.** **104**: 133-139.
- Carstensen B., Christensen J. (1998). Herd size and sero-prevalence of *Salmonella enterica* in Danish swine herds: a random-effects model for register data. **Prev. Vet. Med.** **34**: 191-203.
- Casey P.G., Butler D., Gardiner G.E., Tangney M., Simpson P., Lawlor P.G., Stanton C., Ross R.P., Hill C., Fitzgerald G.F. (2004). *Salmonella* carriage in an Irish pig herd: correlation between serological and bacteriological detection methods. **J. Food Prot.** **67**: 2797-2800.
- Casey P.G., Gardiner G.E., Casey G., Bradshaw B., Lawlor P.G., Lynch P.B., Leonard F.C., Stanton C., Ross R.P., Fitzgerald G.F., Hill C. (2007). A five-strain probiotic combination reduces pathogen shedding and alleviates disease signs in pigs challenged with *Salmonella enterica* Serovar Typhimurium. **Appl. Environ. Microbiol.** **73**: 1858-1863.
- Chambers R.M., McAdam P., de Sa J.H.D., Ward L.R., Rowe B. (1987). A phage-typing scheme for *Salmonella* Virchow. **FEMS Microbiol. Lett.** **40**: 155-157.
- Champagne M.J., Ravel A., Daignault D. (2005). A comparison of sample weight and culture methods for the detection of *Salmonella* in pig feces. **J. Food Prot.** **68**: 1073- 1076.
- Cherrington C.A., Huis in't Veld J.H. (1993). Comparison of classical isolation protocols with a 24 h screen to detect viable *Salmonellas* in faeces. **J. Appl. Bacteriol.** **75**:65-68.
- Cherubin C.E., Eng R.H., Smith S.M., Goldstein E.J. (1986). Cephalosporin therapy for salmonellosis. Questions of efficacy and cross resistance with ampicillin. **Arch. Intern. Med.** **146**: 2149-2152.
- Chiu C.H., Su L.H., Chu Ch. (2004). *Salmonella enterica* serovar Choleraesuis: epidemiology, pathogenesis, clinical disease and treatment. **Clin. Microbiol. Rev.** **17**: 311-322.

- Chow E.Y., Wu J.T., Jauho E.S., Heegaard P.M., Nilsson E., Harris I.T., Manninen K. (2004). Evaluation of a covalent mix-enzyme linked immunosorbent assay for screening of *Salmonella* antibodies in pig serum. **Can. J. Vet. Res.** **68**: 134-139.
- Christensen J., Rudemo M. (1998). Multiple change-point analysis applied to the monitoring of *Salmonella* prevalence in Danish pigs and pork. **Prev. Vet. Med.** **36**:131-43.
- Christensen J., Baggesen D.L., Nielsen B., Stryhn H. (2002). Herd prevalence of *Salmonella* spp. in Danish pig herds after implementation of the Danish *Salmonella* Control Program with reference to a pre-implementation study. **Vet. Microbiol.** **88**: 175-188.
- Christensen J., Baggesen D.L., Soerensen V., Svensmark B. (1999). *Salmonella* level of Danish swine herds based on serological examination of meat -juice samples and *Salmonella* occurrence measured by bacteriological follow-up. **Prev. Vet. Med.** **40**: 277-292.
- Christianson L., Hahn G.L., Meader N. (1982). Swine performance model for summer conditions. **Int. J. Biometeorol.** **26**: 137-147.
- Cloekaert A., Sidi Boumedine K., Flaujac G., Imberechts H., D'Hooghe I., Chaslus-Dancla E. (2000). Occurrence of a *Salmonella enterica* serovar typhimurium DT104-like antibiotic resistance gene cluster including the floR gene in *S. enterica* serovar agona. **Antimicrob. Agents Chemother.** **44**:1359-1361.
- Collazos J.A. (2008). Aportaciones al diagnóstico y control de la salmonelosis porcina. Tesis Doctoral. Universidad de León.
- Collins M.D., Gibson G.R. (1999). Probiotics, prebiotics, and synbiotics: approaches for modulating the microbial ecology of the gut. **The American Journal of Clinical Nutrition.** **69**:1052S.
- Cormican M., Butler C., Morris D., Corbett-Feeney G., Flynn J. (1998). Antibiotic resistance amongst *Salmonella enterica* species isolated in the Republic of Ireland. **J. Antimicrob. Chemother.** **42**:116-118.
- Corrégé I., Dubroca S. (2005). Cleaning and disinfecting processes compared. **Pig Prog.** **21**: 18-20.

- Correia M., Boavida F., Grosso F., Salgado M.J., Lito L.M., Cristino J.M., Mendo S., Duarte A. (2003). Molecular characterization of a new class 3 integron in *Klebsiella pneumoniae*. *Antimicrob. Agents Chemother.* **47**:2838-2843.
- Corry J.E.L., Kitchell A.O., Roberts T.A. (1969). Interaction in the recovery of *Salmonella* Typhimurium damaged by heat or gamma radiation. *J. Appl. Bacteriol.* **32**: 415-511.
- Cote S., Letellier A., Lessard L., Quessy S. (2004). Distribution of *Salmonella* in tissues following natural and experimental infection in pigs. *Can. J. Vet. Res.* **68**:241-248.
- Coulson J.C., Butterfield J., Thomas C. (1983). The herring gull *Larus argentatus* as a likely transmitting agent of *Salmonella* Montevideo to sheep and cattle. *J. Hyg. (Lond)* **91**:437-443.
- Courvalin P. (1995). Impact of molecular biology on antibiotic susceptibility: testing and therapy. *Am. J. Med.* **99**: 21S-25S.
- Courvalin P. (1996). Molecular and epidemiologic aspects of the resistance to antibiotics: example of glycopeptides on enterococci. *C. R. Seances Soc. Biol. Fil.* **190**: 467-9.
- Cox J. (1999). *Salmonella*. In: Robinson R.K., Batt C.A., Patel P.D. (Eds.). **Encyclopedia of Food Microbiology**. AcademicPress, San Diego, California, pp. 1928-1976.
- Craven S.E., Stern N.J., Line E., Bailey J.S., Cox N.A., Fedorka-Cray P. (2000). Determination of the incidence of *Salmonella* spp., *Campylobacter jejuni*, and *Clostridium perfringens* in wild birds near broiler chicken houses by sampling intestinal droppings. *Avian Dis.* **44**:715-720.
- Creus E., Pérez J.F., Peralta B., Baucells F., Mateu E. (2007). Effect of acidified feed on the prevalence of *Salmonella* in market-age pigs. *Zoonoses Public Health.* **54**:314-319.
- Crosa J.H., Brenner D.J., Ewing W.H., Falkow S. (1973). Molecular relationships among the *Salmonelleae*. *J. Bacteriol.* **115**: 307-315.
- Cruchaga S., Echeita A., Aladueña A., García-Peña J., Frías N., Usera M.A. (2001). Antimicrobial resistance in *Salmonellae* from humans, food and animals in Spain in 1998. *J. Antimicrob. Chemother.* **47**: 315-321.
- Curiale M.S., Gangar V., Gravens C. (1997). VIDAS enzyme-linked fluorescent immunoassay for detection of *Salmonella* in foods: collaborative study. *J. AOAC Int.* **80**:491-504.

- Czerny C.P., Osterkorn K., Wittkowski G., Huber M. (2001). Meat juice ELISA for determination of the *Salmonella* incidence in slaughter pigs in Bavaria. **Berl. Münch. Tierärztl. Wschr.** **114**: 35-39.
- Dahl, J., Wingstrand A., Baggesen D.L., Nielsen B. (1996). Spread of *Salmonella* in pens and between pens. **Proceedings of the 14th International Pig Veterinary Society Congress**, Bologna, Italy, 172.
- Dahl J. (1997). Cross-sectional epidemiological analysis of the relations between different herd factors and *Salmonella*-seropositivity, in: **Proc. 8th Int. Symposium on Veterinary Epidemiology and Economics**, Paris, France. pp. 1-3.
- 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.
- Damman D., Bahnson P.B., Weigel R.M. (1999). An estimate of *Salmonella* prevalence on Illinois swine farms using mesenteric lymph node cultures. **Proceedings of the 3rd International Symposium on the Epidemiology and Control of Salmonella in Pork**. Washington DC, USA, pp. 123-125.
- DANMAP (2009). Use of antimicrobial agents and occurrence of antimicrobial resistance in bacteria from food animals, foods and humans in Denmark. ISSN 1600-2032 (<http://www.danmap.org>).
- D'Aoust J.Y., Oaley E., Sewell A.M. (1990). Performance of the micraplate BacTrac ELISA technique for detection of food-borne *Salmonella*. **J. Food Prot.** **53**: 841- 845.
- D'Aoust J.Y., Sewell A.M., Jean A. (1992). Efficacy of prolonged (48 h) selective enrichment for the detection of food-borne *Salmonella*. **Int. J. Food Microbiol.** **15**: 121-130.
- D'Aoust J.Y., Sewell A.M. (1986). Slow rehydration for detection of *Salmonella* spp. in feeds and feed ingredients. **Appl. Environ. Microbiol.** **51**:1220-1223.
- Davies, J. (1994). Origin, acquisition and dissemination of resistance genes. **Science.** **264**: 375-382.
- Davies J. (1998). Unanswered questions concerning antibiotic resistance. **Clin. Microbiol. Infect.** **4**: 2-3.

- Davies P.R., Morrow W.E.M., Jones F.T., Deen J., Fedorka-Cray P.J., Harris I.T. (1997a). Prevalence of *Salmonella* in finishing swine raised in different production systems in North Carolina, USA. **Epidemiol. Infect.** **119**: 237-244.
- Davies P.R., Morrow W.E., Jones F.T., Deen J., Fedorka-Cray P.J., Gray J.T. (1997b). Risk of shedding *Salmonella* organisms by market-age hogs in a barn with open-flush gutters. **J. Am. Vet. Med. Assoc.** **210**: 386-389.
- Davies P.R. (1998). Fecal shedding of *Salmonella* by pigs housed in buildings with open-flushed gutters. **Swine Health Prod.** **6**: 101-106.
- Davies P.R., Bovee F.G., Funk J.A., Morrow W.E., Jones F.T., Deen J. (1998). Isolation of *Salmonella* serotypes from feces of pigs raised in a multiple-site production system. **J. Am. Vet. Assoc.** **212**: 1925-1929.
- Davies P.R., Funk J.A., Morrow M. (2000a). Fecal shedding of *Salmonella* by gilts before and after introduction to a swine breeding farm. **Swine Health Production.** **8**: 25-29.
- Davies P.R., Turkson P.K., Funk J.A., Nichols M.A., Ladely S.R., Fedorka-Cray P.J. (2000b). Comparison of methods for isolating *Salmonella* bacteria from faeces of naturally infected pigs. **J. Appl. Microbiol.** **89**: 169-177.
- Davies R.H., Wray C. (1995). Mice as carriers of *Salmonella* Enteritidis on persistently infected poultry units. **Vet. Rec.** **137**: 337-341.
- Davies R.H., Wray C. (1997). Distribution of *Salmonella* on 23 pig farms in the U.K. **Proceedings of the 2nd International Symposium on the Epidemiology and Control of Salmonella in Pork**. Copenhagen, pp.137-141.
- Davies R.H., Bedford S., Shankster S. (2001). Enhanced culture techniques for the detection of *Salmonella*. **Vet. Rec.** **148**: 539-540.
- Davies R.H., Breslin M. (2001) Environmental contamination and detection of *Salmonella enterica* serovar Enteritidis in laying flocks. **Vet. Rec.** **149**:699-704.
- Davies R.H., Dalziel R., Gibbens J.C., Wilesmith J.W., Ryan J.M.B., Evans S.J., Byrne C., Paiba G.A., Pascoe S.J.S., Teale C.J. (2004). National survey for *Salmonella* in pigs, cattle and sheep at slaughter in Great Britain (1999-2000). **J. Appl. Microbiol.** **96**: 750-760.
- Davison J. (1999). Genetic exchange between bacteria in the environment. **Plasmid.** **42**: 73-91.

- Dawe D. L., Troutt H. F. (1976). Treatment of experimentally induced salmonellosis in weanling pigs with trimethoprim and sulfadiazine, p. M4. In **Proceedings of the 4th International Congress of the Pig Veterinary Society**, Ames, Iowa.
- De Frutos C., Ortiz E., Herrero A., Ayala J.L., Fernández B. (2005). Análisis de los serotipos de *Salmonella* spp. aislados durante los años 2002, 2003, y 2004 por los laboratorios de Sanidad Animal en España. **Bol. Epidemiol. Sem. CNE IS-CIII. 13**:133-144.
- De la Torre E., Zapata D., Tello M., Mejia W., Frias N., Garcia Pena F.J., Mateu E.M., Torre E. (2003). Several *Salmonella enterica* subsp. *enterica* serotype 4,5,12:i:- phage types isolated from swine samples originate from serotype typhimurium DT U302. **J. Clin. Microbiol. 41**: 2395-2400.
- Deprez P., Deroose P., van den Hende C., Muylle E., Oyaert W. (1987). Liquid versus dry feeding in weaned piglets: the influence on the small intestine morphology. **J. Vet. Med. 34**: 254-259
- Desenclos J.C, Bouvet P., Pierre V. (1996). Epidemiologie des infections à *Salmonella*: Tendances récentes en France et en Europe. **Bulletin de Société Française de Microbiologie. 11**: 209-215.
- Dibb-Fuller M.P., Allen-Vercoe E., Thorns C.J., Woodward M.J. (1999). Fimbriae -and flagella-mediated association with and invasion of cultured epithelial cells by *Salmonella* Enteritidis. **Microbiology. 145**: 1023-1031.
- Donné E., Pasmans F., Boyen F., Van Immerseel F., Adriaensen C., Hernalsteens J.P., Ducatelle R., Haesebrouck F. (2005) Survival of *Salmonella* serovar Typhimurium inside porcine monocytes is associated with complement binding and suppression of the production of reactive oxygen species. **Vet. Microbiol. 107**: 205-214.
- Dunlop R.H., McEwen S.A., Meek A.H., Black W.D., Friendship R.M., Clarke R.C. (1998). Prevalences of resistance to seven antimicrobials among fecal *Escherichia coli* of swine on thirty-four farrow-to-finish farms in Ontario, Canada. **Prev. Vet. Med. 34**: 265-282.
- Dunne E.F., Fey P.D., Kludt P., Reporter R., Mostashari F., Shillam P., Wicklund J., Miller C., Holland B., Stamey K., Barrett T.J., Rasheed J.K., Tenover F.C., Ribot E.M., Angulo F.J. (2000). Emergence of domestically acquired ceftriaxone-resistant *Salmonella* infections associated with AmpC beta-lactamase. **JAMA. 284**: 3151-3156.

- Dusch H., Altwegg M. (1995). Evaluation of five new plating media for isolation of *Salmonella* species. **J. Clin. Microbiol.** **33**: 802-804.
- Echeita M.A., Aladueña A., Cruchaga S., Usera M.A. (1999). Emergence and spread of an atypical *Salmonella enterica* subsp. *enterica* serotype 4,5,12:i:- strain in Spain. **J. Clin. Microbiol.** **37**: 3425.
- Echeita M.A., Herrera S., Usera M.A. (2001). Atypical, fljB-negative *Salmonella enterica* subsp. *enterica* strain of serovar 4,5,12:i:- appears to be a monophasic variant of serovar Typhimurium. **J. Clin. Microbiol.** **39**: 2981-2983
- Echeita M.A., Aladueña A.M., Díez R., Arroyo M., Cerdán F., Gutiérrez R., de la Fuente M., González-Sanz R., Herrera-León S., Usera M.A. (2005a). Serotype and phage type distribution of human *Salmonella* strains isolated in Spain, 1997-2001. **Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica.** **23**: 127-134.
- Echeita M.A., Aladueña A., González-Sanz R., de La Fuente M., Cerdán F., Arroyo M., Gutiérrez R. (2005b). Análisis de las cepas de *Salmonella* spp. aisladas de muestras clínicas de origen humano en España. Años 2002 y 2003. **Boletín Epidemiológico Semanal CNE ISCIII.** **13**: 85-96.
- Echeita M.A., Aladueña A.M., de la Fuente M., González-Sanz R., Díez R., Arroyo M., Cerdán F., Gutiérrez R., Herrera S. (2007). Análisis de las cepas de *Salmonella* spp. aisladas de muestras clínicas de origen humano en España. Años 2004 y 2005 (I). **Boletín Epidemiológico Semanal CNE ISCIII.** **15**: 145-156.
- Eckmann L., Rudolf M.T., Ptasznik A., Schultz C., Jiang T., Wolfson N., Tsien R., Fierer J., Shears S.B., Kagnoff M.F., Traynor-Kaplan A.E. (1997). D-myoinositol 1,4,5,6-tetrakisphosphate produced in human intestinal epithelial cells in response to *Salmonella* invasion inhibits phosphoinositide 3-kinase signaling pathways. **Proceedings of the National Academy of Sciences USA.** **94**: 14456-14460.
- Edel W., van Schothorst M., Guinee P.A.M., Kampelmacher E.H. (1970). Effect of feeding pellets on the prevention and sanitation of *Salmonella* infections in fattening pigs. **Zentralblatt für Veterinärmedizin.** **17**: 730-738.
- Edel W., van Schothorst M., Guinee P.A.M., Kampelmacher E.H. (1974). *Salmonella* in pigs on farms feeding pellets and on farms feeding meal. **Zentralblatt für Bakteriologie.** **226**: 314-323.

- EFSA. (2005). Community Summary Report on Trends and Sources of Zoonoses, Zoonotic Agents and Antimicrobial resistance in the European Union in 2004. **The EFSA Journal**, **130**.
- EFSA. (2006). The Community Summary Report on Trends and Sources of Zoonoses, Zoonotic Agents, Antimicrobial Resistance and Foodborne Outbreaks in the European Union in 2005. **The EFSA Journal**, **94**.
- EFSA (2008a). 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. **The EFSA Journal**.**135**: 1-111.
- EFSA (2008b). Technical guidance-Update of the criteria used in the assessment of bacterial resistance to antibiotics of human or veterinary importance. **The EFSA Journal**. **732**: 1-15.
- EFSA (2009a). Report on the availability of molecular typing methods for *Salmonella*, *Campylobacter*, verotoxigenic *Escherichia coli*, *Listeria monocytogenes* and *Staphylococcus aureus* isolates from food, animals and feedingstuffs in European Union Member States (and in some other reporting countries). **The EFSA Journal**. **272**: 1-52.
- EFSA (2009b). Analysis of the baseline survey on the prevalence of *Salmonella* in holdings with breeding pigs, in the EU, 2008, Part A: *Salmonella* prevalence estimates. **The EFSA Journal**. **7(12)**: [93 pp.].
- EFSA. (2010). The Community Summary Report on trends and sources of zoonoses, zoonotic agents and food-borne outbreaks in the European Union in 2008. **The EFSA Journal**. **8 (1)**: 1496.
- Ekperigin H.E., Nagaraja K.V. (1998). Microbial food borne pathogens. *Salmonella*. **Vet. Cl. N. Am. Food Anim. Pract.** **14**: 17-29.
- EMEA (1999). Antibiotic resistance in the European union associated with therapeutic use of veterinary medicines. Report and qualitative risk assessment, by the committee for veterinary medicinal products.

- Eriksson J., Löfström C., Aspán A., Gunnarsson A., Karlsson I., Borch E., de Jong B., Rådström P. (2005). Comparison of genotyping methods by application to *Salmonella* Livingstone strains associated with an outbreak of human salmonellosis. **Int. J. Food Microbiol.** **104**: 93-103.
- Esaki H., Morioka A., Ishihara K., Kojima A., Shiroki S., Tamura Y., Takahashi T. (2004). Antimicrobial susceptibility of *Salmonella* isolated from cattle, swine and poultry (2001-2002): report from the Japanese Veterinary Antimicrobial Resistance Monitoring Program. **J. Antimicrob. Chemother.** **53**: 266-270.
- Evans S.J., Davies R.H. (1996). Case-control study of multiple-resistant *Salmonella* Typhimurium DT 104 infection in cattle in Great Britain. **Vet. Rec.** **139**: 557-558.
- Ewing W.N., Cole D.J.A. (1994). The living gut: an introduction to micro-organisms in nutrition. Context Publications, 1st Edition, Dungannon, N.Ireland, pp 220.
- FAO/WHO (2001). Health and nutritional properties of probiotics in food including powder milk with live lactic acid bacteria, a joint FAO/WHO expert consultation. Cordoba, Argentina, 1 – 4 October 2001.
- Farmer J.J., Davis B.R., Hickman-Brenner F.W., McWhorter A., Huntley-Carter G.P., Asbury M.A., Riddle C., Wathen-Grady H.G., Elias C., Fanning G.R., et al. (1985). Biochemical identification of new species and biogroups of Enterobacteriaceae isolated from clinical specimens. **J. Clin. Microbiol.** **21**: 46-76.
- Farrington L.A., Harvey R.B., Buckley S.A., Droleskey R.E., Nisbet D.J., Inskip P.D. (2001). Prevalence of antimicrobial resistance in *Salmonellae* isolated from market-age swine. **J. Food Prot.** **64**: 1496-1502.
- Farzan A., Friendship R.M., Dewey C.E., Warriner K., Poppe C., Klotins K. (2006). Prevalence of *Salmonella* spp. on Canadian pig farms using liquid or dry-feeding. **Prev. Vet. Med.** **73**: 241-254.
- FEDESA (1997). Antibiotics and Animals. FEDESA/FEFANA Press release. 8 September. Brussels, Belgium.
- Fedoraka-Cray P.J., Whipp S.C., Isaacson R.E., Nord N., Lager K. (1994). Transmission of *Salmonella* Typhimurium to swine. **Vet. Microbiol.** **41**: 333-344.

- Fedorka-Cray P.J., Kelley L.C., Stabel T.J., Gray J.T., Laufer J.A. (1995). Alternate routes of invasion may affect pathogenesis of *Salmonella* Typhimurium in swine. **Infect. Immun.** **63**: 2658-2664.
- Fedorka-Cray P.J., Harris D.L., Whipp S.C. (1997a). Using isolated weaning to raise *Salmonella*-free swine. **Veterinary Medicine.** **92**: 375-382.
- Fedorka-Cray P.J., Hogg A., Gray J.T., Lorenzen K., Velásquez J., Von Behren P. (1997b). Feed and feed trucks as sources of *Salmonella* contamination in swine. **Swine Health Prod.** **5**:189-193.
- Fedorka-Cray P.J., Bailey J.S., Stern N.J., Cox N.A., Ladely S.R., Musgrove M. (1999). Mucosal competitive exclusion to reduce *Salmonella* in swine. **J. Food Prot.** **62**: 1376-1380.
- Fedorka-Cray P.J., Wray, C. (2000). *Salmonella* infections in pigs. In: Wray, C., Wray, A. (Eds.), ***Salmonella in Domestic Animals***. CAB International, London, UK, pp. 191-207.
- Fey P.D., Safranek T.J., Rupp M.E., Dunne E.F., Ribot E., Iwen P.C., Bradford P.A., Angulo F.J., Hinrichs S.H. (2000). Ceftriaxone-resistant *Salmonella* infection acquired by a child from a cattle. **N. Engl. J. Med.** **342**: 1242-1249.
- Fluit A.C., Schmitz F.J. (1999). Class 1 integrons, gene cassettes, mobility, and epidemiology. **Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis.** **18**: 761-770.
- Fluit A.C., Schmitz F.J. (2004). Resistance integrons and super-integrons. **Clin. Microbiol. Infect.** **10**:272-28.
- Frenzen P.D., Buzby J.C., Roberts T. (1999). An updated estimate of the economic costs of human illness due to foodborne *Salmonella* in the United States. **Proceedings of the 3rd International Symposium on the Epidemiology and Control of Salmonella in Pork**, Washington, D.C., pp. 215-218.
- Funk J.A., Davies P.R., Nichols M.A. (2000). The effect of fecal sample weight on detection of *Salmonella enterica* in swine feces. **Journal of Veterinary Diagnostic Investigation.** **12**: 412-418.
- Funk J.A., Davies P.R., Gebreyes W.A. (2001a). Risk factors associated with *Salmonella enterica* prevalence in three-site swine production systems in North Carolina, USA. **Berliner und Münchener Tierärztliche Wochenschrift.** **114**: 335-338.

- Funk J.A., Davies P.R., Nichols M.A. (2001b). Longitudinal study of *Salmonella enterica* in growing pigs reared in multiple-site swine production systems. **Vet. Microbiol.** **83**: 45-60.
- Funk J.A. (2003). Pre-harvest food safety diagnostic for *Salmonella* serovars: Part 1: Microbiological culture. **Journal of Swine Health Production.** **11**: 87-90.
- Funk J.A., Gebreyes W.A. (2004). Risk factors associated with *Salmonella* prevalence on swine farms. **Journal of Swine Health Production.** **2**: 246-251.
- Funk J.A., Harris I.T., Davies P.R. (2005). Comparison of fecal culture and Danish Mix-ELISA for determination of *Salmonella enterica* subsp. *enterica* prevalence in growing swine. **Vet. Microbiol.** **107**: 115-126.
- García-Feliz C., Collazos J.A., Carvajal A., Vidal A.B., Aladueña A., Ramiro R., de la Fuente M., Echeita M.A., Rubio P. (2007). *Salmonella enterica* infections in Spanish swine fattening units. **Zoonoses Public Health.** **54**:294-300.
- Geary T.M., Brooks P.H., Morgan T. (1996). Performance of weaner pigs fed ad libitum with liquid feed at different dry matter concentrations. **J. Sci. Food Agri.** **72**: 17-24.
- Gebreyes W.A., Turner M.B., Funk J.A., Altier C., Davies P.R. (1999). *Salmonella* prevalence, serotypes, and patterns of antimicrobial resistance in cohorts of nursery and finishing pigs. **Proceedings of the 3rd International Symposium on the Epidemiology and Control of Salmonella in Pork**, Washington, DC., pp. 250-251.
- Gebreyes W.A., Davies P.R., Morrow W.E.M., Funk J.A., Altier C. (2000). Antimicrobial resistance of *Salmonella* isolates from swine. **J. Clin. Microbiol.** **38**: 4633-4636.
- Gebreyes W.A., Davies P.R., Turkson P.K., Morrow W.E., Funk J.A., Altier C. (2004a). *Salmonella enterica* serovars from pigs on farms and after slaughter and validity of using bacteriologic data to define herd *Salmonella* status. **J. Food Prot.** **67**: 691-697.
- Gebreyes W.A., Thakur S., Davies P.R., Funk J.A., Altier C. (2004b). Trends in antimicrobial resistance, phage types and integrons among *Salmonella* serotypes from pigs, 1997-2000. **J. Antimicrob. Chemother.** **53**: 997-1003.

- Gebreyes W.A., Davies P.R., Turkson P., Morrow W.E., Funk J.A., Altier C., Thakur S. (2004c). Characterization of antimicrobial-resistant phenotypes and genotypes among *Salmonella enterica* recovered from pigs on farms, from transport trucks, and from pigs after slaughter. **J. Food Prot.** **67**: 698-705.
- Gebreyes W.A., Thakur S. (2005). Multidrug-resistant *Salmonella enterica* serovar Muenchen from pigs and humans and potential interserovar transfer of antimicrobial resistance. **Antimicrob. Agents Chemother.** **49**: 503-511.
- Gebreyes W.A., Thakur S., Morrow W.E. (2006). Comparison of prevalence, antimicrobial resistance, and occurrence of multidrug-resistant *Salmonella* in antimicrobial-free and conventional pig production. **J. Food Prot.** **69**: 743-748.
- Genovese K.J., Anderson R.C., Harvey R.B., Nisbet D.J. (2000). Competitive exclusion treatment reduces the mortality and fecal shedding associated with enterotoxigenic *Escherichia coli* infection in nursery-raised pigs. **Can. J. Vet. Res.** **64**: 204-207.
- Genovese K.J., Anderson R.C., Harvey R.B., Callaway T.R., Poole T.L., Edrington T.S., Fedorka-Cray P.J., Nisbet D.J. (2003). Competitive exclusion of *Salmonella* from the gut of neonatal and weaned pigs. **J. Food Prot.** **66**: 1353-1359.
- Giltsdorf A., Jansen A., Alpers K., Dieckmann H., van Treeck U., Hauri A.M., Fell G., Littmann M., Rautenberg P., Prager R., Rabsch W., Roggentin P., Schroeter A., Miko A., Bartelt E., Braunig J., Ammon A. (2005). A nation wide outbreak of *Salmonella* Bovismorbificans PT24, Germany, December 2004-March 2005. **Euro Surveill.** **10(3)**: E050324.1.
- Goren E., de Jong W.A., Doornenbal P., Koopman J.P., Kennis H.M. (1984). Protection of chicks against *Salmonella* infection induced by spray application of intestinal microflora in the hatchery. **Vet. Q.** **6**: 73-79.
- Grafanakis E., Leontides L., Genigeorgis C. (2001). Seroprevalence and antibiotic sensitivity of serotypes of *Salmonella enterica* in Greek pig herds. **Vet. Rec.** **148**: 407-411.
- Gray J. T., Fedorka-Cray P.J., Stabel T.J., Ackermann M.R. (1995). Influence of inoculation route on the carrier state of *Salmonella choleraesuis* in swine. **Vet. Microbiol.** **47**: 43-59.
- Gray J.T., Stabel T.J., Fedorka-Cray P.J. (1996a). Effect of dose on the immune response and persistence of *Salmonella* Choleraesuis infection in swine. **Am. J. Vet. Res.** **57**: 313-319.

- Gray J.T., Fedorka-Cray P.J., Stabel T.J., Kramer T.T. (1996b). Natural transmission of *Salmonella* Choleraesuis in swine. **Appl. Environ. Microbiol.** **62**:141-146
- Grimont P.A.D., Weill F. (2007). Antigenic Formulae of the *Salmonella* serovars. 9th ed Paris: World Health Organization Collaborating Centre for Reference and Research on *Salmonella*, Institut Pasteur.
- Guerra B., Laconcha I., Soto S.M., González-Hevia M.A., Mendoza M.C. (2000). Molecular characterisation of emergent multiresistant *Salmonella enterica* serotype [4,5,12:i:-] organisms causing human salmonellosis. **FEMS Microbiol. Lett.** **190**: 341-347.
- Gutzmann F., Layton H., Simkins K., Jarolmen H. (1976). Influence of antibiotic-supplemented feed on occurrence and persistence of *Salmonella* Typhimurium in experimentally infected swine. **American of Journal Veterinary Medicine Research.** **37**: 649-655.
- Haesebrouck F., Pasmans F., Chiers K., Maes D., Ducatelle R., Decostere A. (2004). Efficacy of vaccines against bacterial diseases in pigs: what can we expect? **Vet. Microbiol.** **100**: 255-268.
- Hägglom P. (1994a). Monitoring and control of *Salmonella* in animal feed. In:Öijeberg Bengtsson S, editor. **NVI/WHO International course on Salmonella control in animal production and products**. Malmö: SVA. p 265.
- Hägglom P. (1994b). Cleaning of feed-mills. In **Proc. Int. Course on Salmonella Control in Animal Production and Products**. August, -Malmö, Sweden. National Veterinary Institute, Uppsala, Sweden 185-188.
- Hakanen A., Kotilainen P., Jalava J., Siitonen A., Huovinen P. (1999). Detection of decreased fluoroquinolone susceptibility in *Salmonellas* and validation of nalidixic acid screening test. **J. Clin. Microbiol.** **37**: 3572-3577.
- Hald T., Wegener H.C. (1999). Quantitative assesment of the sources of human salmonellosis attributable to pork. In: **Proceedings of the Third International Symposium on the Epidemiology and Control of Salmonella in Pork**, Washington, D.C, USA, pp. 200-205.
- Hald T., Vose D., Wegener H.C., Koupeev T. (2004). A Bayesian approach to quantify the contribution of animal-food sources to human salmonellosis. **Risk Anal.** **24**: 255-269.

- Hall R.M., Collis C.M. (1998). Antibiotic resistance in gram-negative bacteria: the role of gene cassettes and integrons. **Drug Resist. Updat.** **1**: 109-119.
- Hampton M.D., Threlfall E.J., Frost J.A., Ward L.R., Rowe B. (1995). *Salmonella* Typhimurium DT 193: differentiation of an epidemic phage type by antibiogram, plasmid profile, plasmid fingerprint and *Salmonella* plasmid virulence (spv) gene probe. **J. Appl. Bacteriol.** **78**: 402-408.
- Hansen C.F. (2004). Effect of feed form, potato protein concentrate, dried sugar beet pulp and zinc gluconate on *Salmonella* gastrointestinal conditions and performance in finishers. Tesis doctoral. The Royal Veterinary and Agricultural University. Copenhagen.
- Harris I.T., Fedorka-Cray P.J., Gray J.T., Thomas L.A., Ferris K. (1997). Prevalence of *Salmonella* organisms in swine feed. **J. Am. Vet. Assoc.** **210**: 382-385.
- Harris I. T. (2003). Serologic basis for assessment of subclinical *Salmonella* infection in swine. **Swine Health Prod.** **11**: 247-251.
- Harvey R.B., Droleskey R.E., Hume M.E., Anderson R.C., Genovese K.J., Andrews K., Nisbet D.J. (2002). In vitro inhibition of *Salmonella enterica* serovars Choleraesuis and Typhimurium, *Escherichia coli* F-18, and *Escherichia coli* O157:H7 by a porcine continuous-flow competitive exclusion culture. **Current Microbiology.** **45**: 226-229.
- Hautekiet V., Geert V., Marc V., Rony G. (2008). Development of a sanitary risk index for *Salmonella* seroprevalence in Belgian pig farms. **Prev. Vet. Med.** **86**: 75-92.
- Hedges R.W., Shannon K.P. (1984). Resistance to apramycin in *Escherichia coli* isolated from animals: detection of a novel aminoglycoside-modifying enzyme. **J. Gen. Microbiol.** **130**: 473-482.
- Helms M., Ethelberg S., Molbak K., and the DT 104 Study Group, (2005). International *Salmonella* Typhimurium DT 104 infections, 1992-2001. **Emerg. Infect. Dis.** **11**: 859-867.
- Henken A.M., Frankena K., Goelema J.O., Graat E.A., Noordhuizen J.P. (1992). Multivariate epidemiological approach to salmonellosis in broiler breeder flocks. **Poult. Sci.** **71**: 838-843.
- Hensel M. (2000). *Salmonella* Pathogenicity Isly 2. **Molecular Microbiology.** **36**: 1015-1023.

- Henzler D.J., Opitz M.H. (1992). The role of mice in the epizootiology of *Salmonella* Enteritidis infection in chicken layer farms. **Avian Diseases**. **36**: 625-631.
- Herrero A., Rodicio M.R., González-Hevia M.A., Mendoza M.C. (2006). Molecular epidemiology of emergent multidrug-resistant *Salmonella enterica* serotype Typhimurium strains carrying the virulence resistance plasmid pUO-StVR2. **J. Antimicrob. Chemother.** **57**: 39-45.
- Hilker J.S. (1975). Enrichment serology and fluorescent antibody procedures to detect *Salmonellae* in foods. **Journal of Milk and Food Technology**. **38**: 227-231.
- Hooper D.C. (1999). Mechanisms of fluoroquinolone resistance. **Drug Res. Updates** **2**: 38-55.
- 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.
- Hoorfar J., Mortensen A. V. (2000). Improved culture methods for isolation of *Salmonella* organisms from swine feces. **Am. J. Vet. Res.** **61**: 1426-1429.
- Hurd H.S., Stabel T.J., Carlson S. (2001a). Sensitivity of various fecal sample collection techniques for detection of *Salmonella* Typhimurium in finishing hogs. **Proceedings of the Third International Symposium for Epidemiology and Control of Salmonella in Pork**. Washington DC, USA. pp. 63-64.
- Hurd H.S., Gailey J.K., McKean J.D., Rostagno M.H. (2001b). Rapid infection in market-weight swine following exposure to a *Salmonella* Typhimurium-contaminated environment. **Am. J. Vet. Res.** **62**: 1194-1197.
- Hurd, H.S., Gailey J.K., McKean J.D., Rostagno M.H. (2001c). Experimental rapid infection in market swine following exposure to a *Salmonella* contaminated environment. **Berliner und Münchener Tierärztliche Wochenschrift**. **114**: 382-384.
- Hurd H.S., McKean J.D., Griffith R.W., Wesley I.V., Rostagno M.H. (2002). *Salmonella enterica* infections in market swine with and without transport and holding. **Appl. Environ. Microbiol.** **68**: 2376-2381.
- Hurd H.S., Mc Kean J.D., Griffith R.D., Rostagno M.H. (2003). Estimation of the *Salmonella enterica* prevalence in finishing swine. **Epidemiol. Infect.** **132**: 127-135.

- Jack R.W., Tagg J.R., Ray B. (1995). Bacteriocins of grampositive bacteria. **Microbiology Reviews. 59:** 171-200.
- Jensen B.B., Mikkelsen L.L. (1998). Feeding liquid diets to pigs. En: Garnsworthy, P.C., Wiseman, J. (Eds.). **Recent Advances in Animal Nutrition**. Nottingham University Press, Thrumpton, Nottingham, pp. 107-126.
- Jensen B.B., Højberg O., Mikkelsen L.L., Hedeman S., Canibe N. (2003). Enhancing intestinal function to treat and prevent intestinal disease. **9th International Symposium on Digestive Physiology in Pigs**, Alberta, Canada, (1): 103-119.
- Johnson J.M., Rajic A., McMullen L.M. (2005). Antimicrobial resistance of selected *Salmonella* isolates from food animals and food in Alberta. **Can. Vet. J. 46:** 141-146.
- Jones K., Bradshaw S.B. (1996). Biofilm formation by the Enterobacteriaceae: a comparison between *Salmonella* Enteritidis, *Escherichia coli* and a nitrogenfixing strain of *Klebsiella pneumoniae*. **J. Appl. Bacteriol. 80:** 458-464.
- Jørgensen L., Dahl J., Wingtrand A. (1999) The effect of feeding pellets, meal and heat treatment on the *Salmonella*-prevalence of finishing pigs, **Proc.3th International Symposium on Epidemiology and Control of Salmonella in Pork**, Washington, pp. 308-312.
- Jørgensen L., Kjærsgaard H.D., Wachamann H., Jensen B., Knudsen B. (2001). Effect of pelleting and use of lactic acid in feed on *Salmonella* prevalence and productivity in weaners. **Proceedings of the 4th International Symposium on the Epidemiology and Control of Salmonella in Pork**, Leipzig, Germany, 109-111.
- Juven B.J., Cox N.A., Bailey J.S., Thompson J.E., Charles O.W., Schutze J.V. (1984). Recovery of *Salmonella* from artificially contaminated poultry feed in non-selective and selective broth media. **J. Food Prot. 47:** 299-302.
- Kaldhøne P., Nayak R., Lynne A.M., David D.E., McDermott P.F., Logue C.M., Foley S.L. (2008). Characterization of *Salmonella enterica* serovar Heidelberg from turkey-associated sources. **Appl. Environ. Microbiol. 74:** 5038-5046
- Kérouanton A, Marault M, Lailier R, Weill FX, Feurer C, Espié E, Brisabois A (2007). Pulsed-field gel electrophoresis subtyping database for foodborne *Salmonella enterica* serotype discrimination. **Foodborne Pathog. Dis. 4:** 293-303.

- Khalil K., Lindblom G.B., Mazhar K., Kaijser B. (1994). Flies and water as reservoirs for bacterial enteropathogens in urban and rural areas in and around Lahore. Pakistan. **Epidemiol. Infect.** **113**: 435-444.
- Kingsley R.A., Bäumlér A.J. (2000). Host adaptation and the emergence of infectious disease: the *Salmonella* paradigm. **Molecular Microbiol.** **36**: 1006-1014.
- Kjeldsen N.J., Dahl J. (1999) The effect of feeding non-heat treated, non-pelleted feed compared to feeding pelleted, heat-treated feed on the *Salmonella*-prevalence of finishing pig, **Proc. 3th International Symposium on Epidemiology and Control of Salmonella in Pork**, Washington, pp.313-316.
- Korsak N., Jacob B., Groven B., Etienne G., China B., Ghafir Y., Daube G. (2003). *Salmonella* contamination of pigs and pork in an integrated pig production system. **J. Food Prot.** **66**: 1126-1133.
- Kotetishvili M., Stine O.C., Kreger A., Morris J.G.Jr., Sulakvelidze A. (2002). Multilocus sequence typing for characterization of clinical and environmental *Salmonella* strains. **J. Clin. Microbiol.** **40**: 1626-1635.
- Kramer T.T., Roof M.B., Matheson R.R. (1992). Safety and efficacy of an attenuated strain of *Salmonella* Choleraesuis for vaccination of swine. **Am. J. Vet. Res.** **53**: 444-448.
- Kranker S., Dahl J., Wingstry A. (2001). Bacteriological and serological examination and risk factor analysis of *Salmonella* occurrence in sow herds, including risk factors for high *Salmonella* seroprevalence in receiver finishing herds. **Berliner und Münchener Tierärztliche Wochenschrift.** **114**: 350-352.
- Kranker S., Alban L., Boes J., Dahl J. (2003). Longitudinal study of *Salmonella enterica* serotype Typhimurium infection in three Danish farrow-to-finish swine herds. **J. Clin. Microbiol.** **41**: 2282-2288.
- Lan R., Davison A.M., Reeves P.R., Ward L.R. (2003). AFLP analysis of *Salmonella enterica* serovar Typhimurium isolates of phage types DT 9 and DT 135: diversity within phage types and its epidemiological significance. **Microbes Infect.** **5**: 841-850.
- Lawson A.J., Desai M., O'Brien S.J., Davies R.H., Ward L.R., Threlfall E.J. (2004). Molecular characterisation of an outbreak strain of multiresistant *Salmonella enterica* serovar Typhimurium DT104 in the UK. **Clin. Microbiol. Infect.** **10**: 143-147.

- Le Minor L., Vernon M., Popoff M. (1982). Taxonomie des *Salmonella*. **Ann Inst Pasteur Microbiol** **133B**: 223-243.
- Le Minor L., Popoff M.Y., Laurent B., Hermant D. (1986). Individualisation d'une septième sous-espèce de *Salmonella*: *S. choleraesuis* subsp. *indica* subsp. nov. **Ann Inst Pasteur Microbiol** **137B**: 211-217.
- Le Minor L., Popoff M.Y. (1987). Request for an opinion. Designation of *Salmonella enterica* sp. nov., nom. rev., as the type and only species of the genus *Salmonella*. **International Journal of Systematic Bacteriology**, **37**: 465-468.
- Lee J.A., Ghosh A.C., Mann P.G., Tee G.H. (1972). *Salmonellas* on pig farms and in abattoirs. **J. Hyg. (Lond)**, **70**: 141-150.
- Lee L.A., Puhf N.D., Maloney E.K., Bean N.H., Tauxe R.V. (1994). Increase in antimicrobial-resistant *Salmonella* infections in the United States, 1989-1990. **J. Infect. Dis.** **170**: 128-134.
- Leontides L.S., Grafanakis E., Genigeorgis C. (2003). Factors associated with the serological prevalence of *Salmonella enterica* in Greek finishing swine herds. **Epidemiol. Infect.** **131**: 599-606.
- Letellier A., Messier S., Pare J., Menard J., Quessy S. (1999). Distribution of *Salmonella* in swine herds in Québec. **Vet. Microbiol.** **67**: 299-306.
- Letellier A., Messier S., Lessard L., Quessy S. (2000). Assessment of various treatments to reduce carriage of *Salmonella* in swine. **Can. J. Vet. Res.** **64**: 27-31.
- Leverstein-van Hall M.A., Blok H.E.M., Donders A.R.T., Paauf A., Fluit A.C., Verhoef J. (2003). Multidrug resistance among Enterobacteriaceae is strongly associated with the presence of integrons and is independent of species or isolate origin. **J. Infect. Dis.** **187**: 251-259.
- Levy S.B. (1997). Antibiotic resistance: an ecological imbalance. **Ciba Found Symp.** **207**: 1-9; discussion 9-14.
- Liébana E. (2002a). Molecular tools for epidemiological investigations of *S. enterica* subspecies *enterica* infections. **Res. Vet. Sci.** **72**: 169-175.

- Liebana E., Crowley C.J., Garcia-Migura L., Breslin M.F., Corry J.E., Allen V.M., Davies R.H. (2002b). Use of molecular fingerprinting to assist the understanding of the epidemiology of *Salmonella* contamination within broiler production. **Br. Poult. Sci.** **43**: 38-46.
- Liebana E., Garcia-Migura L., Guard-Petter J., McDowell S.W., Rankin S., Opitz H.M., Clifton-Hadley F.A., Davies R.H. (2002c). *Salmonella enterica* serotype Enteritidis phage types 4, 7, 6, 8, 13a, 29 and 34: a comparative analysis of genomic fingerprints from geographically distant isolates. **J. Appl. Microbiol.** **92**: 196-209
- Liebana E., Garcia-Migura L., Clouting C., Clifton-Hadley F.A., Breslin M., Davies R.H. (2003). Molecular fingerprinting evidence of the contribution of wildlife vectors in the maintenance of *Salmonella* Enteritidis infection in layer farms. **J. Appl. Microbiol.** **94**: 1024-1029.
- Linder T., Springer S., Steinbach G., Selvitz H.J. (2001). Inmuprophilaxis as a method to help to reduce of *Salmonella* infections in swine. **Proceedings 4th International Symposium on the Epidemiology and Control of Salmonella and other food borne pathogens in Pork**, Leipzig, Germany, pp. 89-91.
- Linton A.H., Hedges A.J., Bennett P.M. (1988). Monitoring for the development of antimicrobial resistance during the use of olaquinox as a feed additive on commercial pig farms. **J. Appl. Bacteriol.** **64**: 311-327.
- Lo Fo Wong D.M.A., Hald T. (2000). *Salmonella* in Pork (SALINPORK): Preharvest and Harvest Control Options based on Epidemiologic, Diagnostic and Economic Research. En: **Final Report to the Commission of the European Communities**. Agriculture and Fisheries FAIR1 CT95-0400.
- Lo Fo Wong D.M.A., Hald T., van der Wolf P.J., Swanenburg M. (2002). Epidemiology and control measures for *Salmonella* in pigs and pork. **Livest. Prod. Sci.** **76**: 215-222.
- Lo Fo Wong D.M.A., Dahl J., van der Wolf P.J., Wingstry A., Leontides L., von Altröck A. (2003). Recovery of *Salmonella enterica* from seropositive finishing pig herds. **Vet. Microbiol.** **97**: 201-214.
- Lo Fo Wong D.M.A., Dahl J., Stege H., van der Wolf P.J., Leontides L., von Altröck A., Thorberg B.M. (2004a). Herd-level risk factors for subclinical *Salmonella* infection in European finishing-pig herds. **Prev. Vet. Med.** **62**: 253-266.

- Lo Fo Wong D.M., Dahl J., Wingstrand A., van der Wolf P.J., von A.A. Thorberg B.M. (2004b). A European longitudinal study in *Salmonella* seronegative- and seropositive-classified finishing pig herds. **Epidemiol. Infect.** **132**: 903-914.
- Loynachan A.T., Nugent J.M., Erdman M.M., Harris D.L. (2004). Acute infection of swine by various *Salmonella* serovars. **J. Food Prot.** **67**: 1484-1484.
- Loynachan A.T., Harris D.L. (2005). Dose determination for acute *Salmonella* infection in pigs. **Appl. Environ. Microbiol.** **71**: 2753-2755.
- Lumsden J.S., Wilkie B.N., Clarke R.C. (1991). Resistance to fecal shedding of *Salmonellae* in pigs and chickens vaccinated with an aromatic-dependent mutant of *Salmonella* Typhimurium. **Am. J. Vet. Res.** **52**: 1784-1787.
- Lumsden J.S., Wilkie B.N. (1992). Immune response of pigs to parenteral vaccination with an aromatic- dependent mutant of *Salmonella* Typhimurium. **Can. J. Vet. Res.** **56**: 296-302.
- Lundbeck H.; Plazikowski U., Silverstolpe L. (1955). The Swedish *Salmonella* outbreak of 1953. **J. Appl. Bacteriol.** **18**: 535-548.
- Maciorowski K.G., Herrera P., Jones F.T., Pillai S.D., Ricke S.C. (2006). Cultural and Immunological Detection Methods for *Salmonella* spp. in Animal Feeds - A Review. **Vet. Res. Commun.** **30**: 127-137.
- Maguire H.C., Codd A.A., Mackay V.E., Rowe B., Mitchell E. (1993). A large outbreak of human salmonellosis traced to a local pig farm. **Epidemiol. Infect.** **110**: 239-246.
- Malorny B., Schroeter A., Helmuth R. (1999). Incidence of Quinolone Resistance Over the Period 1986 to 1998 in Veterinary *Salmonella* Isolates from Germany. **Antimicrob. Agents Chemother.** **43**: 2278-2282.
- MARAN (2002). Monitoring of Antimicrobial Resistance and Antibiotic Usage in Animals in the Netherlands in 2002. (<http://www.vwa.nl>).
- Martinetti G, Altwegg M. (1990). rRNA gene restriction patterns and plasmid analysis as a tool for typing *Salmonella* Enteritidis. **Res. Microbiol.** **141**: 1151-1162.
- Massova I., Mobashery S. (1998). Kinship and diversification of bacterial penicillin-binding proteins and beta-lactamases. **Antimicrob. Agents Chemother.** **42**: 1-17.

- Mateu E.M., Martín M., Darwich L., Mejía W., Frías N., García-Peña F.J. (2002). Antimicrobial susceptibility of *Salmonella* strains isolated from swine in Catalonia, Spain. **Vet. Rec.** **150**: 147-150.
- McDermid A.S., Lever M.S. (1996). Survival of *Salmonella* Enteritidis PT4 and *Salmonella* Typhimurium Swindon in aerosols. **Lett. Appl. Microbiol.** **23**:107-109.
- McEwen S.A., Fedorka-Cray P.J. (2002). Antimicrobial use and resistance in animals. **Clin. Infect. Dis.** **34**: S93-S106.
- Medeiros A.A. (1997). Evolution and dissemination of beta-lactamases accelerated by generations of beta-lactam antibiotics. **Clin. Infect. Dis.** **24**: S19-45.
- Mejía W., Zapata D., Martín M., Casal J., Mateu E. (2003). Epidemiology of Salmonellosis in fattening units of Catalonia (Spain): A bacteriological survey. In: **Proceedings of the Fifth International Symposium on the Epidemiology and Control of Salmonella in Pork**. Crete, Greece. pp. 4-7.
- 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.
- Mikkelsen L.L., Jensen B.B. (1997). Effect of fermented liquid feed (FLF) on growth performance and microbial activity in the gastrointestinal tract of weaned piglets. En: Laplace J.P., Fevrier C., Barbeau A. **Digestive physiology in pigs**. EAAP Publication n°. 88, INRA, Paris. pp. 639-642.
- Mikkelsen L.L., Naughton P.J., Hedemann M.S., Jensen B.B. (2004). Effects of physical properties of feed on microbial ecology and survival of *Salmonella enterica* serovar Typhimurium in the pig gastrointestinal tract. **Appl. Environ. Microbiol.** **70**: 3485-3492.
- Mirolid S., Rabsch W., Rohde M., Stender S., Tschape H., Russmann H., Igwe E. Hardt,W. (1999). Isolation of a temperate bacteriophage encoding the type III effector protein SopE from an epidemic *Salmonella* typhimurium strain. **Proc. Natl. Acad. Sci USA.** **96**: 9845–9850.
- Mølbak K., Hald D.T. (1997). An outbreak of *Salmonella* Typhimurium in the county of Funen during late summer. A case-controlled study. **Ugeskrift for laeger.** **159**: 5372-5377.

- Mølbak K., Baggesen D.L., Aarestrup F.M., Ebbesen J.M., Engberg J., Frydendahl K., Gerner-Smidt P., Petersen A.M., Wegener H. (1999). An outbreak of multi-drug resistant, quinolone-resistant *Salmonella enterica* serotype Typhimurium DT104. **New England Journal of Medicine. 341:** 1420-1425.
- Mølbak K., Gerner-Smidt P., Wegener H.C. (2002). Increasing quinolone resistance in *Salmonella enterica* serotype Enteritidis. **Emerg. Infect Dis. 8:**514-515.
- Møller K., Jensen T.K., Jorsal S.E., Leser T.D., Carstensen B. (1998). Detection of *Lawsonia intracellularis*, *Serpulina hyodysenteriae*, weakly beta-hemolytic intestinal spirochetes, *Salmonella enterica*, and haemolytic *Escherichia coli* from swine herds with and without diarrhea among growing pigs. **Vet. Microbiol. 62:** 59-72.
- Moreno M.A., Domínguez L., Teshager T., Herrero I.A., Porrero M.C. (2000). Antibiotic resistance monitoring: the Spanish programme. The VAV Network. Red de Vigilancia de Resistencias Antibióticas en Bacterias de Origen Veterinario. **Int. J. Antimicrob. Agents. 14:** 285-90.
- Morgan I.R., Krautil F.L., Craven. J.A. (1987). Effect of time in lairage on caecal and carcass *Salmonella* contamination of slaughter pigs. **Epidemiol. Infect. 98:** 323-330.
- Morrow W.E., See M.T., Eisemann J.H., Davies P.R., Zering K. (2002). Effect of withdrawing feed from swine on meat quality and prevalence of *Salmonella* colonization at slaughter. **J. Am. Vet. Med. Assoc. 220:** 497-502.
- Morse E.V., Duncan M.A. (1974). Salmonellosis an environmental health problem. **J. Am. Vet. Med. Assoc. 165:** 1015-1019.
- 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.
- Mulder R.W.A.W. (1995). Impact of transport and related stresses of the incidence and extent of human pathogens in pig meat and poultry. **J. Food Safety. 15:** 239-246.
- Murray C.J. (2000). Environmental Aspects of *Salmonella*. (p.265-283) In: WRAY,C.; WRAY,A. **Salmonella in Domestic Animals**. CABI Publishing, Wallingford pp. 265-283.

- Naas T., Mikami Y., Imai T., Poirel L., Nordmann, P. (2001). Characterization of In53, a class 1 plasmid- and composite transposon-located integron of *Escherichia coli* which carries an unusual array of gene cassettes. **J. Bacteriol.** **183**: 235-249.
- NARMS (2007). National Antimicrobial Resistance Monitoring System: Enteric Bacteria. Animal Arm Annual Report. <http://www.ars.usda.gov>
- Nielsen B., Baggesen D., Bager F., Haugegaard J., Lind P. (1995). The serological response to *Salmonella* serovars Typhimurium and Infantis in experimentally infected pigs. The time course followed with an indirect anti-LPS ELISA and bacteriological examinations. **Vet. Microbiol.** **47**: 205-218.
- Nielsen B., Ekerøth L., Bager F., Lind, P. (1998). Use of muscle juice as a source of antibodies for serological detection of *Salmonella* infection in slaughter pig herds. **Journal of Veterinary Diagnostic Investigation.** **10**: 158-163.
- Niefeld J.C., Feder I., Kramer T.T., Schoneweis D., Chengappa M.M. (1998a). Preventing *Salmonella* infection in pigs with offsite weaning. **Swine Health Prod.** **6**: 27-32.
- Niefeld J.C., Kelly B., Dritz S.S., Feder I., Gally J.C. (1998b). Comparison of conventional and delayed secondary enrichment for isolation of *Salmonella* spp. from swine samples. **Journal of Veterinary Diagnostic Investigation.** **10**: 285-287.
- Nollet N., Maes D., De Zutter L., Duchateau L., Houf K., Huysmans K., Imberechts H., Geers R., de Kruif A., van Hoof J. (2004). Risk factors for the herd-level bacteriologic prevalence of *Salmonella* in Belgian slaughter pigs. **Prev. Vet. Med.** **65**: 63-75.
- Nollet N., Houf K., Dewulf J., De Kruif A., De Zutter L., Maes D. (2005a). *Salmonella* in sows: a longitudinal study in farrow-to-finish pig herds. **Vet. Res.** **36**: 645- 656.
- Nollet N., Maes D., Duchateau L., Hautekiet V., Houf K., van Hoof J., De Zutter L., De Kruif A., Geers R. (2005b). Discrepancies between the isolation of *Salmonella* from mesenteric lymph nodes and the results of serological screening in slaughter pigs. **Vet. Res.** **36**: 545-555.
- Nollet N., Houf K., Dewulf J., Catry B., De Zutter L., De Kruif A., Maes D. (2006). Variability in antimicrobial resistance among *Salmonella enterica* strains from fattening pigs and sows. **Microb. Drug Resist.** **12**: 74-81.

- NORM/NORM-VET (2000-2002). Consumption of Antimicrobial Agents and Occurrence of Antimicrobial Resistance in Norway, ISSN:1502-2307. (<http://www.zoonose.no>).
- Nurmi E., Rantala M. (1973). New aspects of *Salmonella* infection in broiler production. **Nature**. **241**: 210-211.
- O'Carroll J.M., Davies P.R., Correa M.T., Slenning B.D. (1999). Effects of sample storage and delayed secondary enrichment on detection of *Salmonella* spp in swine feces. **Am. J. Vet. Res.** **60**: 359-362.
- O'Connor A.M., McKean J.D., Beary J.H., Brockus S.L. (2006). Prevalence of exposure to *Salmonella* spp in finishing swine marketed in Iowa. **Am. J. Vet. Res.** **67**: 829-833.
- Ohmae K., Yonezawa S., Terakado N. (1981). R plasmid with carbadox resistance from *Escherichia coli* of porcine origin. **Antimicrob. Agents Chemother.** **19**: 86-90.
- Ohmae K., Yonezawa S., Terakado N. (1983). Epizootiological studies on R plasmid with carbadox resistance. **Nippon Juigaku Zasshi.** **45**: 165-170.
- Oldfield E.C. 3rd (2001). Emerging foodborne pathogens: keeping your patients and your families safe. **Rev. Gastroenterol. Disord.** **1**: 177-186.
- Oliveira C.J., Carvalho L.F., Fernandes S.A., Tavechio A.T., Domingues F.J. (2005). Prevalence of pigs infected by *Salmonella* Typhimurium at slaughter after an enterocolitis outbreak. **Int. J. Food Microbiol.** **105**: 267-271.
- Oliveira C.J., Carvalho L.F., Garcia T.B. (2006). Experimental airborne transmission of *Salmonella* Agona and *Salmonella* Typhimurium in weaned pigs. **Epidemiol. Infect.** **134**: 199-209.
- Oliveira C.J., Garcia T.B., Carvalho L.F., Givisiez P.E. (2007). Nose-to-nose transmission of *Salmonella* Typhimurium between weaned pigs. **Vet. Microbiol.** **125**: 355-361.
- Olsen J.E., Brown D.J., Baggesen D.L., Bisgaard M. (1992). Biochemical and molecular characterization of *Salmonella enterica* serovar Berta, and comparison of methods for typing. **Epidemiol. Infect.** **108**: 243-260.
- Olson A.B., Andrysiak A.K., Tracz D.M., Guard-Bouldin J., Demczuk W., Ng L.K., Maki A., Jamieson F., Gilmour M.W. (2007). Limited genetic diversity in *Salmonella enterica* serovar Enteritidis PT13. **BMC Microbiol.** **7**: 87.

- Ortmann R. (1999). Immunisierungsversuche mit der *Salmonella* Typhimurium- Lebendvakzine Salmoporc R zur Bekämpfung von Salmonellen-Infektionen in Ferkelerzeugerbetrieben. Hannover.
- Osterberg J., Vagsholm I., Boqvist S., Lewerin S.S. (2006). Feed-borne outbreak of *Salmonella* Cubana in Swedish pig farms: risk factors and factors affecting the restriction period in infected farms. **Acta Vet. Scan.** **47**: 13-21.
- Osterkorn K., Czerny C.P., Wittkowski G., Huber M. (2001). Sampling plan for the establishment of a serologic *Salmonella* surveillance for slaughter pigs with meat juice ELISA. **Berliner und Münchener Tierärztliche Wochenschrift.** **114**: 30-34.
- Östling C.E., Lindgren S.E. (1993). Inhibition of enterobacteria and Listeria growth by lactic, acetic and formic acids. **J. Appl. Bacteriol.** **75**: 18-24.
- Paulsen I.T., Brown M.H., Skurray R.A. (1996). Proton dependent multidrug efflux systems. **Microbiol. Rev.** **60**: 575-608.
- Peterz M., Wiberg C. Narberg P. (1989). The effect of incubation temperature and magnesium chloride concentration on growth of *Salmonella* in homemade and in commercially available dehydrated Rappaport- Vassiliadis broths. **J. Appl. Bacteriol.** **66**: 523-528.
- Petrow S., Kasatiya S.S., Pelletier J., Ackermann H.W., Peloquin J. (1974) A phage typing scheme for *Salmonella* Newport. **Ann. Microbiol (Paris).** **125**: 433-445.
- Popoff M.Y., Le Minor L. (1997). Antigenic formulas of the *Salmonella* serovars, **7th revision**. **WHO Collaborating Centre for Reference and Research on Salmonella**. Institut Pasteur, Paris.
- Popoff M.Y. (2001). Antigenic Formulas of the *Salmonella* Serovars, **8th ed., WHO Collaborating Centre for Reference and Research on Salmonella**, Institut Pasteur, Paris, France.
- Poppe C., Smart N., Khakhria R., Johnson W., Spika J., Prescott J. (1998). *Salmonella* Typhimurium DT104: a virulent and drug-resistant pathogen. **Can. Vet. J.** **39**: 559-565.

- Rajić A., McFall M.E., Deckert A.E., Reid-Smith R., Manninen K., Poppe C., Dewey C.E., McEwen S.A. (2004). Antimicrobial resistance of *Salmonella* isolated from finishing swine and the environment of 60 Alberta swine farms. **Vet. Microbiol.** **104**: 189-196.
- Rajić A., Keenlside J., McFall M.E., Deckert A.E., Muckle A.C., O'Connor B.P., Manninen K., Dewey C.E., McEwen S.A. (2005). Longitudinal study of *Salmonella* species in 90 Alberta swine finishing farms. **Vet. Microbiol.** **105**: 47-56.
- Rajić A., O'Connor B.P., Deckert A.E., Keenlside J., McFall M.E., Reid-Smith R.J., Dewey C.E., McEwen S.A. (2007). Farm-level risk factors for the presence of *Salmonella* in 89 Alberta swine-finishing barns. **Can. J. Vet. Res.** **71**: 264-270.
- Ralph A. Gianella. (1996). *Salmonella*. In: **Medical Microbiology**, 4th Edition. Edited by Samuel Baron. University of Texas Medical Branch at Galveston, Galveston, Texas. Chapter 21.
- Randall L.P., Cooles S.W., Osborn M.K., Piddock L.J., Woodward M.J. (2004). Antibiotic resistance genes, integrons and multiple antibiotic resistance in thirty-five serotypes of *Salmonella enterica* isolated from humans and animals in the UK. **J. Antimicrob. Chemother.** **53**: 208-216.
- Rankin S.C., Aceto H., Cassidy J., Holt J., Young S., Love B., Tewari D., Munro D.S., Benson C.E. (2002). Molecular characterization of cephalosporin-resistant *Salmonella enterica* serotype Newport isolates from animals in Pennsylvania. **J. Clin. Microbiol.** **40**: 4679-4684.
- Recchia G.D., Hall R.M. (1997). Origins of the mobile gene cassettes found in integrons. **Trends Microbiol.** **5**: 389-394.
- Reddy K.R., Rajesh P.K., Krishnan M., Sekar U. (2005). Antibiotic susceptibility pattern and plasmid profile of multidrug resistant *Salmonella typhi*. **Indian J. Med. Microbiol.** **23**: 208.
- Reed W.M., Olander H.J., Thacker H.L. (1986). Studies on the pathogenesis of *Salmonella* Typhimurium and *Salmonella* Choleraesuis var kuzendorf infection in weanling pigs. **Am. J. Vet. Res.** **47**: 75-83.

- Reeves M.W., Evins G.M., Heiba A.A., Plikaytis B.D., Farmer J.J. (1989). 3rd. Clonal nature of *Salmonella typhi* and its genetic relatedness to other *Salmonellae* as shown by multilocus enzyme electrophoresis, and proposal of *Salmonella bongori* comb. nov. **J. Clin. Microbiol.** **27**: 313-320.
- Renwick S.A., Irwin R.J., Clarke R.C., McNab W.B., Poppe C., McEwen S.A. (1992). Epidemiological associations between characteristics of registered broiler chicken flocks in Canada and the *Salmonella* culture status of floor litter and drinking water. **Can. Vet. J.** **33**: 449-458.
- Ricci A., Vio P., Cibin V., Mancin M., Amato S., Barco L., Marangon S. (2005). Foodborne Pathogens Monitoring in Pigs in the Veneto Region of Italy. **Proceedings of the 6th International Symposium on the Epidemiology and Control of Salmonella and other foodborne pathogens in Pork**, California, USA., pp. 19-23.
- Ridley A.M., Threlfall E.J., Rowe B. (1998). Genotypic characterization of *Salmonella* Enteritidis phage types by plasmid analysis, ribotyping, and pulsed-field gel electrophoresis. **J. Clin. Microbiol.** **36**: 2314-2321.
- Roberts M.C. (1996). Tetracycline resistance determinants: mechanisms of action, regulation of expression, genetic mobility, and distribution. **FEMS Microbiol. Rev.** **19**: 1-24.
- Rodriguez A., Pangloli P., Richards H.A., Mount J.R., Draughon F.A. (2006). Prevalence of *Salmonella* in diverse environmental farm samples. **J. Food. Prot.** **69**: 2576-2580.
- Rostagno M.H., Gailey J.K., Hurd H.S., Mckean J.D., Leite R.C. (2005). Culture methods differ on the isolation of *Salmonella enterica* serotypes from naturally contaminated swine fecal samples. **Journal of Veterinary Diagnostic Investigation.** **17**: 80-83.
- Roth F.X. (2000). Ácidos orgánicos en nutrición porcina: eficacia y modo de acción. **XVI Curso de especialización FEDNA** (Fundación Española para el Desarrollo de la Nutrición Animal), ExpoAviga, Barcelona. pp. 171-181
- Rowe T.A., Leonard F.C., Kelly G., Lynch P.B., Egan J., Quirke A.M., Quinn P.J. (2003). *Salmonella* serotypes present on a sample of Irish pig farms. **Vet. Rec.** **153**: 453-456.
- Rowe-Magnus D.A., Mazel D. (2002) The role of integrons in antibiotic resistance gene capture. **Int. J. Med. Microbiol.** **292**: 115-125.

- Ruiz M., Rodriguez J.C., Escribano I., Royo G. (2004). Available options in the management of non typhi *Salmonella*. **Expert Opin. Pharmacother.** **5**: 1737-1743.
- Russell J.B., Diez-Gonzalez F. (1998). The effects of fermentation acids on bacterial growth. **Adv. Microb. Physiol.** **39**: 205-234.
- Sanchez S., Hofacre Ch. L., Lee M.D., Maurer J.J., Doyle M.P. (2002). Animal sources of salmonellosis in humans. **J. Am. Vet. Med. Assoc.** **221**: 492-497.
- Schmidt P.L., O'Connor A.M., McKean J.D., Hurd H.S. (2004). The association between cleaning and disinfection of lairage pens and the prevalence of *Salmonella enterica* in swine harvest. **J. Food Prot.** **67**: 1384-1388.
- Schrezenmeir J., de Vrese M. (2001). Probiotics, prebiotics and synbiotics-approaching a definition. **The American Journal of Clinical Nutrition.** **73**: 361S-364S.
- Schroeter A., Hoog B., Helmuth R. (2004). Resistance of *Salmonella* isolates in Germany. **J. Vet. Med. B. Infect. Dis. Vet. Public Health.** **51**: 389-392.
- Schwartz K.J. (1999). Salmonellosis. In: Straw, B.E., D'Allaire, S., Mengeling, W.L., Taylor, D.J. (Eds.), **Diseases of Swine**. Blackwell, Oxford, pp. 535-551.
- Schwarz S., Noble W.C. (1999). Aspects of bacterial resistance to antimicrobial agents used in veterinary dermatological practice. **Vet. Dermatol.** **10**: 163-176.
- Schwarz S., Kehrenberg C., Walsh T.R. (2001). Use of antimicrobial agents in veterinary medicine and food animal production. **Int. J. Antimicrob. Agents.** **17**: 431-437.
- Sefton A.M. (2002). Mechanisms of antimicrobial resistance: their clinical relevance in the new millennium. **Drugs.** **62**: 557-566.
- Shelobolina E.S., Sullivan S.A., O'Neill K.R., Nevin K.P., Lovley D.R. (2004). Isolation, characterization, and U(VI)-reducing potential of a facultatively anaerobic, acid-resistant Bacterium from Low-pH, nitrate- and U(VI)-contaminated subsurface sediment and description of *Salmonella* subterranea sp. nov. **Appl. Environ. Microbiol.** **70**: 2959-2965.

- Sibley J., Yue B., Huang F., Harding J., Kingdon J., Chirino-Trejo M., Appleyard G.D. (2003). Comparison of bacterial enriched-broth culture, enzyme linked immunosorbent assay, and broth culture-polymerase chain reaction techniques for identifying asymptomatic infections with *Salmonella* in swine. **Can. J. Vet. Res.** **67**: 219-24.
- Skovgaard N., Christensen S.G., Gulistani A.W. (1985). *Salmonellas* in Danish pigs: a comparison of three isolation methods. **J. Hyg. (Lond).** **95**: 69-75.
- Smith J.T., Lewin C.S. (1993) Mechanisms of antimicrobial resistance and implications for epidemiology. **Vet. Microbiol.** **35**: 233-242.
- Sorensen L.L., Alban L., Nielsen B., Dahl J. (2004). The correlation between *Salmonella* serology and isolation of *Salmonella* in Danish pigs at slaughter. **Vet. Microbiol.** **101**: 131-141.
- Springer S., Lindner T., Steinbach G., Selbitz H.J. (2001). Investigation of the efficacy of a genetically-stabile live *Salmonella* Typhimurium vaccine for use in pigs. **Berliner und Münchener Tierärztliche Wochenschrift.** **114**: 342-345.
- Stanisich V.A. (1988). Identification and analysis of plasmids at the genetic level, in: Grinsted J., Bennett P.M. (Eds.), **Plasmid Technology**, Academic Press, London, pp. 11-48.
- Steer T., Carpenter H., Tuohy K., Gibson G.R. (2000). Perspectives on the role of the human gut microbiota and its modulation by pro and prebiotics. **Nutrition Research Reviews.** **13**: 229-254.
- Stege H., Christensen J., Nielsen J.P., Baggesen D.L., Enoe C., Willeberg P. (2000). Prevalence of subclinical *Salmonella enterica* infection in Danish finishing pig herds. **Prev. Vet. Med.** **44**: 175-188.
- Steinbach G., Kroell U. (1999) *Salmonella* infections in swine herds--epidemiology and importance for human diseases. **Dtsch. Tierarztl. Wochenschr.** **106**: 282-288.
- Stellwagen A.E., Craig N.L. (1998). Mobile DNA elements: controlling transposition with ATP-dependent molecular switches. **Trends Biochem. Sci.** **23**: 486-490.
- Sternberg Lewerin S., Boqvist S., Engström B., Häggblom P. (2005). The effective control of *Salmonella* in Swedish poultry. In: Mead GC, editor. **Food safety control in the poultry**. cambridge: Woodhead Publishing Limited. p 544.

- SVARM (2008). Swedish Veterinary Antimicrobial Resistance Monitoring. National Veterinary Institute, Uppsala, Sweden, www.sva.se
- Swaminathan B., Barrett T.J., Hunter S.B., Tauxe R.V.; CDC PulseNet Task Force (2001). PulseNet: the molecular subtyping network for foodborne bacterial disease surveillance, United States. **Emerg. Infect. Dis.** **7**: 382-389.
- Swanenburg M., Urlings H.A., Snijders J.M., Keuzenkamp D.A., van Knapen F. (2001). *Salmonella* in slaughter pigs: prevalence, serotypes and critical control points during slaughter in two slaughterhouses. **Int. J. Food Microbiol.** **70**: 243-254.
- SWEDRES/SVARM (2003). Swedish Veterinary Antimicrobial Resistance Monitoring/Swedish Antibiotic Utilisation and Resistance in Human Medicine. ISSN 1650-6332. (<http://www.sva.se>).
- Teale C.J. (2002). Antimicrobial resistance and the food chain. **J. Appl. Microbiol.** **92**: 85S-89S.
- Thornton L., Gray S., Bingham P., Salmon R.L., Hutchinson D.N., Rowe B., Newton D., Syed Q.U. (1993). The problems of tracing a geographically widespread outbreak of salmonellosis from a commonly eaten food: *Salmonella* Typhimurium DT193 in north west England and north Wales in 1991. **Epidemiol. Infect.** **111**: 465-471.
- Threlfall E.J., Rowe B., Ferguson J.L., Ward L.R. (1986). Characterization of plasmids conferring resistance to gentamicin and apramycin in strains of *Salmonella* Typhimurium phage type 204c isolated in Britain. **J. Hyg.** **97**: 419-426.
- Threlfall E.J., Rowe B., Ward L.R. (1993). A comparison of multiple drug resistance in *Salmonella* from humans and food animals in England and Wales, 1981 and 1990. **Epidemiol. Infect.** **111**: 189-197.
- Threlfall E.J., Hampton M.D., Chart H., Rowe B. (1994). Use of plasmid profile typing for surveillance of *Salmonella* Enteritidis phage type 4 from humans, poultry and eggs. **Epidemiol. Infect.** **112**: 25-31.
- Threlfall E.J., Frost J.A., Ward L.R., Rowe B. (1996). Increasing spectrum of resistance in multiresistant *Salmonella* Typhimurium. **Lancet.** **347**: 1053-1054.

- Threlfall E.J., Ward L.R., Rowe B. (1997a). Increasing incidence of resistance to trimethoprim and ciprofloxacin in epidemic *Salmonella* Typhimurium DT 104 in England and Wales. *Eurosurveillance*. **Eur. Commun. Dis. Bull.** **2**: 81-84.
- Threlfall E.J., Ward L.R., Skinner J.A., Rowe B. (1997b). Increase in multiple antibiotic resistance in nontyphoidal *Salmonella* from humans in England and Wales: a comparison of data for 1994 and 1996. **Microb. Drug Resist.** **3**: 263-266.
- Threlfall E.J. (2000). Epidemic *Salmonella* Typhimurium DT 104 a truly international epidemic clone. **J. Antimicrob. Chemother.** **46**: 7-10.
- Threlfall E.J., Teale C.J., Davies R.H., Ward L.R., Skinner J.A., Graham A., Cassar C., Speed K. (2003). A comparison of antimicrobial susceptibilities in nontyphoidal *Salmonella* from humans and food animals in England and Wales in 2000. **Microb. Drug Resist.** **9**: 183-189.
- 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.
- Torpdahl M., Sorensen G., Ethelberg S., Sandø G., Gammelgård K., Porsbo L.J. (2006). A regional outbreak of *S. Typhimurium* in Denmark and identification of the source using MLVA typing. **Euro Surveill.** **11**: 134-6.
- Torre E., Threlfall E.J., Hampton M.D., Ward L.R., Gibert I., Rowe B. (1993). Characterization of *Salmonella* Virchow phage types by plasmid profile and IS200 distribution. **J. Appl. Bacteriol.** **75**: 435-440.
- Travers K., Barza M. (2002). Morbidity of infections caused by antimicrobial resistant bacteria. **Clin. Inf. Dis.** **34**: S131-S134.
- Tribe I.G., Walker J. (2000). An outbreak of *Salmonella* Typhimurium phage type 44 linked to a restaurant in South Australia. **Commun. Dis. Intell.** **24**: 347.
- Trieu-Cuot P., Courvalin P. (1986). Evolution and transfer of aminoglycoside resistance genes under natural conditions. **J. Antimicrob. Chemother.** **18**: 93-102.
- Usera M.A., Aladueña A., González R., de la Fuente M., García-Peña J., Frías N., Echeita M.A. (2002). Antibiotic resistance of *Salmonella* spp from animal sources in Spain in 1996 and 2000. **J. Food. Prot.** **65**: 768-773.

- Uyttendaele M., Vanwildemeersch K., Debevere J. (2003). Evaluation of real-time PCR vs automated ELISA and a conventional culture method using a semi-solid medium for detection of *Salmonella*. **Lett. Appl. Microbiol.** **37**: 386-391.
- Uzzau S., Brown D.J., Wallis T., Rubino S., Leori G., Bernard S., Casadesus J., Platt D.J., Olsen J.E. (2000). Review: Host adapted serotypes of *Salmonella enterica*. **Epidemiol. Infect.** **125**: 229-255.
- Valdezate S., Vidal A., Herrera-León S., Pozo J., Rubio P., Usera M.A., Carvajal A., Echeita M.A. (2005). *Salmonella* Derby clonal spread from pork. **Emerg. Infect. Dis.** **11**: 694-698.
- Valdezate S., Astorga R., Herrera-León S., Perea A., Usera M.A., Huerta B., Echeita A. (2007). Epidemiological tracing of *Salmonella enterica* serotype Abortusovis from Spanish ovine flocks by PFGE fingerprinting. **Epidemiol. Infect.** **135**: 695-702.
- VALIDATION LIST N° 102 (2005). **Int. J. Syst. Evol. Microbiol.** **55**: 547-549.
- Valkenburgh S., van Oosterom R., Stenvers O., Aalten M., Braks M., Schimmer B., et al. (2007). Zoonoses and zoonotic agents in humans, food, animals and feed in the Netherlands 2003-2006. **RIVM-rapportnummer**: 330152001.
- Van der Gaag M., Saatkamp H.W., Huirne R.B.M. (2001). Elicitation of expert knowledge on dynamics of *Salmonella* infections and contamination in the pork chain. In: **Proceedings of the 4th International Symposium on the Epidemiology and Control of Salmonella in Pork**, Leipzig, Germany., pp. 259-261.
- Van der Heijden H.M.J.F. (2001). First international ring trial of ELISAs for *Salmonella*- antibody detection in swine. **Berliner und Münchener Tierärztliche Wochenschrift.** **114**: 389-392.
- Van der Heijden H.M.J.F., Boleij P.H.M., Loeffen W.L.A., Bongers J.H., van der Wolf P.J., Tielen M.J.M. (1998). Development and validation of an indirect ELISA for the detection of antibodies against *Salmonella* in swine. **Proceedings of the 15th International Pig Veterinary Society Congress**. Birmingham, UK. Vol. 2: 69.

- Van der Wolf P.J., Bongers J.H., Elbers A.R., Franssen F.M., Hunneman W.A., van Exsel A.C., Tielen M.J. (1999). *Salmonella* infections in finishing pigs in The Netherlands: bacteriological herd prevalence, serogroup and antibiotic resistance of isolates and risk factors for infection. **Vet. Microbiol.** **67**: 263-275.
- Van der Wolf P.J., Wolbers W.B., Elbers A.R.W., van der Heijden H.M.J.F., Koppen J.M.C.C., Hunneman W.A., van Schie F.W., Tielen M.J.M. (2001a). Herd level husbandry factors associated with the serological *Salmonella* prevalence in finishing pig herds in The Netherlands. **Vet. Microbiol.** **78**: 205-219.
- Van der Wolf P.J., Lo Fo Wong D.M., Wolbers W.B., Elbers A.R., van der Heijden H.M., van Schie F.W., Hunneman W.A., Willeberg P., Tielen M.J. (2001b). A longitudinal study of *Salmonella enterica* infections in high-and low-seroprevalence finishing swine herds in The Netherlands. **Vet. Q.** **23**: 116-121.
- Van der Wolf P.J., van Schie F.W., Elbers A.R., Engel B., van der Heijden H.M., Hunneman W.A., Tielen M.J. (2001c). Administration of acidified drinking water to finishing pigs in order to prevent *Salmonella* infections. **Vet. Q.** **23**: 121-125.
- Van Diemen P.M., Kreukniet M.B., Galina L., Brumstead N., Wallis T.S. (2002). Characterisation of a resource population of pigs screened for resistance to salmonellosis. **Veterinary Immunology and Immunopathology.** **88**: 183-196.
- Van Duijkeren 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.
- Van Immerseel F. (2003). Early protection against *Salmonella* infection in chickens by modification of the initial host-pathogen interactions. Tesis doctoral. Universiteit Gent.
- Van Pelt W., van de Giessen A.W., van Leeuwen W.J., Wannet W., Henken A.M., Evers E.G., de Wit M.A., van Duynhoven Y.T. (1999). Oorsprong, omvang en kosten van humane salmonellose. Deel I. Oorsprong van humane salmonellose met betrekking tot varken, rund, kip, ei en overige bronnen. **Infect. Bull.** **10**:240-243.
- Van Pelt W., van der Zee H., Wannet W.J., van de Giessen A.W., Mevius D.J., Bolder N.M., Komijn R.E., van Duynhoven Y.T. (2003). Explosive increase of *Salmonella* Java in poultry in the Netherlands: consequences for public health. **Euro Surveill.** **8**: 31-35.

- Van Winsen R.L., Urlings H.A.P., Snijders J.M.A. (1997). Feed as a vehiculum of *Salmonella* in pigs. **Proceedings of the second International Symposium on Epidemiology and Control of Salmonella in Pork**, Copenhagen, Denmark.
- Van Winsen R.L., Lipman L.J.A., Biesterveld S., Urlings H.A.P., Snijders J.M.A., van Knapen F. (2000). Mechanism of *Salmonella* reduction in fermented pig feed. **J. Sci. Food Agric.** **83**: 342-346.
- 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. (2001a). Monitoring of transmission of *Salmonella enterica* serovars in pigs using bacteriological and serological detection methods. **Vet. Microbiol.** **80**: 267-274.
- Van Winsen R.L., Lipman L.J., Biesterveld S., Urlings B.A., Snijders J.A., van Knapen F. (2001b). Mechanism of *Salmonella* reduction in fermented pig feed. **Journal of the Science of Food and Agriculture.** **81**: 342-346.
- Van Winsen R.L., Keuzenkamp D., Urlings B.A., Lipman L.J., Snijders J.A., Verheijden J.H. van Knapen F. (2002). Effect of fermented feed on shedding of Enterobacteriaceae by fattening pigs. **Vet. Microbiol.** **87**: 267-276.
- Varma J.K., Molbak K., Barrett T.J., Beebe J.L., Jones T.F., Rabatsky-Ehr T., Smith K.E., Vugia D.J., Chang H.G., Angulo F.J. (2005). Antimicrobial-resistant nontyphoidal *Salmonella* is associated with excess bloodstream infections and hospitalizations. **J. Infect. Dis.** **191**: 554-561.
- Veling J., Wilpshaar H., Frankena K., Bartels C., Barkema H.W. (2002). Risk factors for clinical *Salmonella enterica* subsp. *enterica* serovar Typhimurium infection on Dutch dairy farms. **Prev. Vet. Med.** **54**: 157-168.
- Vidal A.B. (2005). Salmonelosis porcina: monitorización y bases para su control. Tesis doctoral. Universidad de León.
- Villa L., Mammina C., Miriagou V., Tzouveleki L.S., Tassios P.T., Nastasi A., Carattoli A. (2002). Multidrug and broad-spectrum cephalosporin resistance among *Salmonella enterica* serotype enteritidis clinical isolates in southern Italy. **J. Clin. Microbiol.** **40**: 2662-2665.

- Vimal D.B., Khullar M., Gupta S., Ganguly N.K. (2000). Intestinal mucins: the binding sites for *Salmonella* Typhimurium. **Molecular and Cellular Biochemistry**. **204**: 107-117.
- Voogt N., Raes M., Wannet W.J., Henken A.M., van de Giessen A.W. (2001). Comparison of selective enrichment media for the detection of *Salmonella* in poultry faeces. **Lett. Appl. Microbiol.** **32**: 89-92.
- Walker W.A., Duffy L.C. (1998). Diet and bacterial colonization: Role of probiotics and prebiotics. **The Journal of Nutritional Biochemistry** **9**: 668-675.
- Wall P.G., Morgan D., Lamden K., Ryan M., Griffin M., Threlfall E.J. (1994). A case control study of infection with an epidemic strain of multiresistant *Salmonella* typhimurium DT 104 in England and Wales. **Communicable Disease Report CDR Review**. **4**: R130-135.
- Waltman W.D. (2000). Methods for the Cultural Isolation of *Salmonella*. En: Wray C., Wray A. (Eds.), **Salmonella in Domestic Animals**. CABI Publishing, Wallingford, UK, pp. 335-372.
- Wegener H.C., Baggesen D.L., Gaarslev K. (1994). *Salmonella* Typhimurium phage types from human salmonellosis in Denmark 1988-1993. **APMIS**. **102**: 521-525.
- Wegener H.C., Baggesen D.L. (1996). Investigation of an outbreak of human salmonellosis caused by *Salmonella enterica* ssp. *enterica* serovar Infantis by use of pulsed field gel electrophoresis. **Int. J. Food Microbiol.** **32**: 125-131.
- Welsh J. McClland M. (1990). Fingerprinting genomes using PCR with arbitrary primers. **Nucleic Acids Res.** **18**: 7213-7218.
- White D.G., Zhao S., McDermott P.F., Ayers S., Friedman S., Sherwood J., Breider-Foley M., Nolan L.K. (2003). Characterization of integron mediated antimicrobial resistance in *Salmonella* isolated from diseased swine. **Can. J. Vet. Res.** **67**: 39-47.
- Wiedemann B., Heisig P. (1994). Mechanisms of quinolone resistance. **Infection**. **22**: 73-79.
- Wierup M. (1997). Principles for integrated surveillance and control of *Salmonella* in swine production. In Proc. **2nd International Symposium on epidemiology and control of Salmonella in pork (ISECSP)**, Copenhagen, 20-22 August. Danish Bacon & Meat Council, Copenhagen, pp. 42-49.

- Wilcock B.P., Schwartz K. (1992). Salmonellosis. En: Leman A.D., Straw B.E., Mengeling W.E., D'Allaire S., Taylor D.J. (Eds.) **Diseases of Swine**, 7th edition, Iowa State University Press, Ames, Iowa, pp. 570-583.
- Williams D.R., Hunter D., Binder J., Hough E. (1981). Observations on the occurrence of *Salmonella* Choleraesuis and other *Salmonellas* in two herds of feeder pigs. **J. Hyg. (Lond)**, **86**: 369-377.
- Williams J.G., Kubelik A.R., Livak K.J., Rafalski J.A., Tingey S.V. (1990). DNA polymorphisms amplified by arbitrary primers are useful as genetic markers. **Nucleic Acids Res.** **18**: 6531-6535.
- Williams L.P., Newell K.W. (1967). Patterns of *Salmonella* excretion in market swine. **Am. J. Publ. Health.** **57**: 466-471.
- Williams L.P., Newell K.W. (1968). Sources of *Salmonellas* in market swine. **J. Hyg. (Lond)**, **66**: 281-293.
- Wilson P.D., Wilson D.R., Brocklehurst T.F., Coleman H.P., Mitchell G., Waspe C.R., Jukes S.A., Robins M.M. (2003). Batch growth of *Salmonella* Typhimurium LT2: stoichiometry and factors leading to cessation of growth. **Int. J. Food Microbiol.** **89**: 195-203.
- Wingstrand A., Dahl J., Thomsen L.K., Jorgensen L., Jensen B.B. (1997). Influence of dietary administration of organic acids and increase feed structure on *Salmonella* Typhimurium infection in pig. In: **Proceedings of the Second International Symposium on Epidemiology and Control of Salmonella in Pork**, 20-22 August. Copenhagen, Denmark, pp. 170-172.
- Winokur P.L., Brueggemann A., DeSalvo D.L., Hoffmann L., Apley M.D., Uhlenhopp E.K., Pfaller M.A., Doern G.V. (2000). Animal and human multidrug-resistant, cephalosporin-resistant *Salmonella* isolates expressing a plasmid-mediated CMY-2 AmpC beta-lactamase. **Antimicrob. Agents Chemother.** **44**: 2777-2783.
- Witte W., Klare I. (1999) Antibiotikaresistenz bei bakteriellen Infektionserregern: Mikrobiologisch-epidemiologische Aspekte. **Bundesgesundheitsblatt Gesundheitsforschung Gesundheitsschutz.** **42**: 8-16.

- Wiuuff C., Thorberg B.M., Engvall A., Lind P. (2002). Immunochemical analyses of serum antibodies from pig herds in a *Salmonella* non-endemic region. **Vet. Microbiol.** **85**: 69-68.
- Wood R.L., Pospischil A., Rose R. (1989). Distribution of persistent *Salmonella* Typhimurium infection in internal organs of swine. **Am. J. Vet. Res.** **50**: 1015-1021.
- Wood R.L., Rose R. (1992). Populations of *Salmonella* Typhimurium in internal organs of experimentally infected carrier swine. **Am. J. Vet. Res.** **53**: 653-658.
- World Health Organization, June (2000). WHO global principles for the containment of antimicrobial resistance in animals intended for food, pp. 5-9. World Health Organization, Geneva.
- Wray C., Sojka W.J. (1977). Reviews of the progress of dairy science: bovine salmonellosis. **J. Dairy Res.** **44**: 383-425.
- Wray C. (1994). Mammalian salmonellosis. En: Beran G.W., Steele J.H. (Eds.). **Handbook of Zoonoses**. Section A: Bacterial, Rickettsial, Chlamydial, and Mycotic. Second edition, CRC Press, Boca Raton, pp. 289-302.
- Wray C., McLaren I.M., Jones Y.E. (1998). The epidemiology of *Salmonella* Typhimurium in cattle: plasmid profile analysis of definitive phage type (DT) 204c. **J. Med. Microbiol.** **47**: 483-487.
- Zhang S., Adams L.G., Nunes J., Khare S., Tsohis R.M., Bäumlner A.J. (2003). Secreted effector proteins of *Salmonella enterica* serotype Typhimurium elicit host-specific chemokine profiles in animal models of typhoid fever and enterocolitis. **Infect. Immun.** **71**: 4795-4803.
- Zhou D., Galan J. (2001). *Salmonella* entry into host cells: the work in concert of type III secreted effector proteins. **Microbes and Infection.** **3**: 1293-1298.