

María Bernad Roche

Aspectos de interés para el control
de la salmonelosis porcina y
propuesta de un nuevo enfoque
integrado granja-matadero
Insights on the control of swine
salmonellosis and proposal for a
new comprehensive farm-

Director/es

Mainar Jaime, Raul Carlos

<http://zaguan.unizar.es/collection/Tesis>



Universidad de Zaragoza
Servicio de Publicaciones

ISSN 2254-7606

Tesis Doctoral

ASPECTOS DE INTERÉS PARA EL CONTROL DE
LA SALMONELOSIS PORCINA Y PROPUESTA DE
UN NUEVO ENFOQUE INTEGRADO GRANJA-
MATADERO

INSIGHTS ON THE CONTROL OF SWINE
SALMONELLOSIS AND PROPOSAL FOR A NEW
COMPREHENSIVE FARM-SLAUGHTERHOUSE

Autor

María Bernad Roche

Director/es

Mainar Jaime, Raul Carlos

UNIVERSIDAD DE ZARAGOZA
Escuela de Doctorado

Programa de Doctorado en Medicina y Sanidad Animal

2024



Universidad
Zaragoza

Tesis Doctoral

Aspectos de interés para el control de la
salmonelosis porcina y propuesta de un
nuevo enfoque integrado granja-matadero

Insights on the control of swine salmonellosis and
proposal for a new comprehensive
farm-slaughterhouse approach

Autora

María Bernad Roche

Director

Raúl Carlos Mainar Jaime

Facultad de Veterinaria

2024



**Departamento de
Patología Animal
Universidad Zaragoza**

D. Raúl C. Mainar Jaime, Profesor Titular del Departamento de Patología Animal de la Universidad de Zaragoza

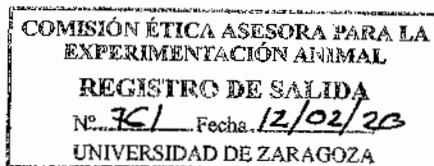
INFORMA:

Que la Tesis doctoral de la que es autora María Bernad Roche, ha sido realizada bajo mi dirección y se corresponde con el Proyecto de Tesis aprobado por la Comisión Académica de Doctorado en julio de 2020. Asimismo, todas las actividades realizadas para la consecución de los objetivos de la Tesis Doctoral han sido desarrolladas en los Seguidimientos anuales del Plan de Investigación e incorporadas en el documento de actividades del doctorando (DAD). La Memoria que será presentada próximamente por María Bernad Roche cumple con todos los requerimientos necesarios para que la autora pueda optar al Grado de Doctor por la Universidad de Zaragoza con la mención de "Doctor Internacional", por lo que autorizo su presentación como compendio de publicaciones para que pueda ser juzgada por el Tribunal correspondiente.





**Comisión ética
asesora para la
experimentación animal
Universidad Zaragoza**



Ref. PI13/20NE

CONTROL DE BUENA PRÁCTICA EN EXPERIMENTACIÓN ANIMAL

Título del procedimiento de experimentación:

Comprehensive control of salmonellosis in fattening pigs: development of new strategies in the farm-slaughterhouse interface

Título del proyecto en el que se incluye:

Comprehensive control of salmonellosis in fattening pigs: development of new strategies in the farm-slaughterhouse interface

Centro de realización: OTROS: Granjas comerciales y mataderos

Investigador responsable: Raúl Carlos Mainar Jaime

Animales o muestras que implica:

especie (s): Cerdo (*Sus scrofa domesticus*)

peculiaridades: Cruce comercial, capa blanca, cebo, ambos sexos

número: 50 /explotación, 20 explotaciones, 2 muestreos

Fecha de presentación: 21 de enero de 2020

Reunida la Comisión Ética Asesora para la Experimentación Animal* el día 31 de enero de 2020, y una vez revisada la documentación disponible en relación a la actividad de experimentación descrita, considera:

Que queda excluida del ámbito de aplicación del RD53/2013, de 1 de febrero, por el que se establecen las normas básicas aplicables para la protección de los animales utilizados en experimentación y otros fines científicos, incluyendo la docencia.

Que el diseño cumple los principios éticos y de protección de los animales utilizados en experimentación y otros fines científicos, incluyendo la docencia, que se ha impuesto la Universidad de Zaragoza.

Por todo ello, se emite **informe FAVORABLE****.

Este informe será válido únicamente para esta actividad. Deberá ser presentada nuevamente a revisión en caso de modificación sustancial de la actividad presentada o cuando la normativa en vigor así lo requiera.

*Órgano habilitado para realizar la evaluación y evaluación retrospectiva (Resolución de 6 de agosto de 2013 de la Dirección General de Alimentación y Fomento Agroalimentario del Gobierno de Aragón).

****Observaciones:** (1) Muestras sanguíneas: Práctica veterinaria clínica no experimental, plan sanitario de la explotación.
(2) Muestras fecales: No considerada procedimiento, Nivel de dolor, sufrimiento, angustia o daño duradero no equivalente al causado por la introducción de una aguja conforme a las buenas prácticas veterinarias.

En Zaragoza, a 6 de febrero de 2020

EL SECRETARIO DE LA COMISIÓN

Jorge Palacio Liesa



**Comisión ética
asesora para la
experimentación animal
Universidad Zaragoza**

LA PRESIDENTA DE LA COMISIÓN

Blanca Ros Latienda

La presente Tesis Doctoral se ha desarrollado en la Unidad de Microbiología e Inmunología del Departamento de Patología Animal de la Facultad de Veterinaria de la Universidad de Zaragoza. La Doctoranda ha formado parte del grupo de investigación Zoonosis Bacterianas: Brucelosis, Salmonelosis y Estreptocócicas (ZooBac) y ha trabajado como personal investigador en el proyecto denominado “Comprehensive control of salmonellosis in fattening pigs: development of new strategies in the farm-slaughterhouse interface” (RTI2018-093915-B-I00) financiado por el Ministerio de Ciencia, Innovación y Universidades y por “ERDF A way of making Europe” de la Unión Europea.

La tesis está constituida por el compendio de cinco trabajos de investigación previamente publicados en diversas revistas científicas indexadas de carácter internacional, que son los siguientes:

- **Publicación I:** Bernad-Roche, M., Casanova-Higes, A., Marín-Alcalá, C.M, Cebollada-Solanas, A. y Mainar-Jaime, R.C. (2021). *Salmonella* infection in nursery piglets and its role in the spread of salmonellosis to further production periods. *Pathogens*, 10(2):123. doi: 10.3390/pathogens10020123.
- **Publicación II:** Bernad-Roche, M., Bellés, A., Grasa, L., Casanova-Higes, A. y Mainar-Jaime, R.C. (2021). Effects of dietary supplementation with protected sodium butyrate on gut microbiota in growing-finishing pigs. *Animals*, 11(7):2137. doi: 10.3390/ani11072137.
- **Publicación III:** Bernad-Roche, M., Marín-Alcalá, C.M., Cebollada-Solanas, A., de Blas, I. y Mainar-Jaime, R.C. (2023). Building a predictive model for assessing the risk of *Salmonella* shedding at slaughter in fattening pigs. *Frontiers in Microbiology*, 14:1232490. doi: 10.3389/fmicb.2023.1232490.
- **Publicación IV:** Bernad-Roche, M., Marín-Alcalá, C.M., Vico, J.P. y Mainar-Jaime, R.C. (2023). *Salmonella* control in fattening pigs through the use of esterified formic acid in drinking water shortly before slaughter. *Animals*, 13(18):2814. doi: 10.3390/ani13182814.
- **Publicación V:** Bernad-Roche, M., Casanova-Higes, A., Marín-Alcalá, C.M. y Mainar-Jaime, R.C. (2022). *Salmonella* shedding in slaughter pigs and the use of esterified formic acid in the drinking water as a potential abattoir-based mitigation measure. *Animals*, 12(13):1620. doi: 10.3390/ani12131620.

Índice general

Abreviaturas	9
RESUMEN	11
SUMMARY	17
INTRODUCCIÓN	23
1. Características y taxonomía de <i>Salmonella</i>	25
2. <i>Salmonella</i> y salud pública	26
2.1. Salmonelosis en la Unión Europea	26
2.2. Salmonelosis en España	28
2.3. Principales fuentes de salmonelosis humana	30
3. Infección por <i>Salmonella</i> en el cerdo	32
3.1. Prevalencia	32
3.2. Principales fuentes de infección en el ganado porcino.....	34
3.3. Patogénesis	35
3.5. Epidemiología.....	38
<i>Salmonella</i> en cerdas reproductoras	38
<i>Salmonella</i> en lechones en la fase de lactación	39
<i>Salmonella</i> en lechones en fase de transición	40
<i>Salmonella</i> en cerdos de cebo	41
3.6. Cerdos como portadores de <i>Salmonella</i> resistente a antibióticos	42
4. Técnicas de diagnóstico y caracterización de <i>Salmonella</i> utilizadas.....	43
4.1. Bacteriología.....	44
4.2. Serología.....	46
4.3. PCR	48
4.4. Electroforesis en gel de campo pulsado (PFGE).....	49
5. Estrategias de control de <i>Salmonella</i>	50
5.1. Higiene y bioseguridad.....	50
5.2 Ácidos orgánicos.....	51
5.3. Probióticos	53
5.4. Prebióticos.....	54
5.5. Aceites esenciales	54
5.6. Bacteriófagos.....	55
5.7. Vacunación	55

6. Planes Nacionales de Control de <i>Salmonella</i> en porcino	57
6.1. Suecia	58
6.2. Noruega	59
6.3. Finlandia	59
6.4. Dinamarca	60
6.5. Alemania.....	61
6.6. Países Bajos	61
6.7. Bélgica	62
6.8. Reino Unido.....	62
6.9. Irlanda	63
6.10. Estonia	63
6.11. España	64
JUSTIFICACIÓN Y OBJETIVOS	67
TRABAJOS PUBLICADOS	73
PUBLICACIÓN I / PUBLICATION I	75
PUBLICACIÓN II / PUBLICATION II	91
PUBLICACIÓN III / PUBLICATION III	105
PUBLICACIÓN IV / PUBLICATION IV	119
PUBLICACIÓN V / PUBLICATION V	133
DISCUSIÓN GENERAL.....	151
CONCLUSIONES	163
CONCLUSIONS	167
BIBLIOGRAFÍA	171
APÉNDICES	203
Características de las revistas científicas	205
Otras contribuciones científicas de la doctoranda	206

Índice de figuras

Figura 1. Taxonomía de <i>Salmonella</i> . Entre paréntesis el número de serotipos identificados en cada grupo.....	26
Figura 2. Evolución número de casos de <i>Salmonella</i> en la UE y de los principales serotipos involucrados.	27
Figura 3. Evolución del número de brotes de <i>Salmonella</i> en la UE y de los principales serotipos involucrados. mST: variante monofásica de <i>S. Typhimurium</i>	28
Figura 4. Evolución del número de casos de salmonelosis en España, en total y por serotipos (Fuente: ISCIII, 2005-2023).....	29
Figura 5. Evolución del número de brotes de salmonelosis en España, en total y por serotipos (Fuente: ISCIII, 2017-2023).....	29
Figura 6. Diagrama Sankey de la distribución de los cinco serotipos principales implicados en casos humanos de salmonelosis adquirida en la UE, notificados por categorías específicas de alimentos de origen animal. A la izquierda, los cinco serotipos más notificados de <i>Salmonella</i> : <i>S. Enteritidis</i> (azul claro), <i>S. Infantis</i> (verde), <i>S. Typhimurium</i> (naranja), <i>S. Typhimurium</i> monofásica (azul oscuro) y <i>S. Derby</i> (morado). Los datos de animales y alimentos procedentes de la misma fuente están agrupados: “broiler” incluye aislados de pollos de engorde y carne de pollo, “bovine” incluye aislados de ganado bovino para producción de carne y de carne bovina, “pigs” incluye aislados de cerdos de engorde y de carne de cerdo, “turkey” incluye aislados de pavos de engorde y de carne de pavo y “layers” incluye aislados de gallinas ponedoras y de huevos. A la derecha, las cinco fuentes consideradas: pollos de engorde (azul), ganado bovino (verde claro), cerdos (rojo), pavos (naranja) y ponedoras (verde oscuro). El grosor de las bandas coloreadas que une las fuentes y los serotipos es proporcional al porcentaje de aislados de cada serotipo procedente de cada fuente. Fuente: EFSA, 2023.	30
Figura 7. Principales serotipos de <i>Salmonella</i> aislados en cerdos de cebo (A) y en cerdas reproductoras (B). Fuente: EFSA, 2008; EFSA, 2009.	33
Figura 8. Infección por <i>Salmonella</i> . Las tres rutas principales de invasión de la mucosa intestinal por <i>Salmonella</i> : adhesión y traslocación a través de células M, invasión directa de las células del epitelio intestinal y captura por células dentríticas. Fuente: Sansonetti, 2004.....	36
Figura 9. Esquema del cultivo bacteriológico de <i>Salmonella</i> según la norma ISO 6579-1:2017.	46
Figura 10. Mecanismo de acción antibacteriana de los ácidos orgánicos.	52

Índice de tablas

Tabla 1. Distribución de los aislados de <i>Salmonella</i> (número y porcentaje de unidades de muestra positivas) con y sin identificación de serotipo entre las diferentes fuentes de infección (comida y animales) en la UE en 2022. Fuente: EFSA, 2023.	31
Tabla 2. Muestras de alimentos analizadas en España en el año 2021. Fuente: AESAN, 2023..	32
Tabla 3. Cebadores utilizados para la identificación mediante PCR de <i>Salmonella</i> spp. (1), <i>S. Enteritidis</i> (2), <i>S. Typhimurium</i> (3) y su variante monofásica (4).....	49
Tabla 4. Planes Nacionales de Control implementados en la Unión Europea.	65

Abreviaturas

ADN	Ácido Desoxirribonucleico
AO/OA	Ácidos Orgánicos (Organic Acids)
BGA	Brilliant Green Agar (Agar Verde Brillante)
BPW	Bufferent Peptone Water (Agua de Peptona Tamponada)
BSP/PSB	Butirato de Sodio Protegido (Protected Sodium Butyrate)
CEN	Comité Europeo de Normalización
DIVA	Differentiating Infected from Vaccinated Animals (Diferenciación de Animales Infectados y Vacunados)
DO/OD	Densidad Óptica (Optical Density)
EFSA	European Food Safety Authority (Autoridad Europea de Seguridad Alimentaria)
ELISA	Enzyme-Linked Immunosorbent assay (Ensayo de inmunoadsorción ligado a enzima)
EMA	European Medicines Agency (Agencia Europea de Medicamentos)
FAO	Food and Agriculture Organization (Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación y la Agricultura)
GC/CG	Grupo Control (Control Group)
GT/TG	Grupo Tratamiento (Treatment Group)
IC/CI	Intervalo de Confianza (Confidence Interval)
ISCIII	Instituto de Salud Carlos III
IgA	Inmunoglobulina A
IgG	Inmunoglobulina G
IgM	Inmunoglobulina M
IL	Interleucina
ISO	International Organization for Standardization (Organización Internacional para la Estandarización)
MSRV	Modified Semi-Solid Rappaport-Vassiliadis Agar (Medio semisólido de Rappaport-Vassiliadis modificado)
mST	Monophasic <i>Salmonella</i> Typhimurium (variante monofásica de <i>S. Typhimurium</i>)
N/D	Información No Disponible
NSCP	National <i>Salmonella</i> Control Programme (Programa Nacional de Control de <i>Salmonella</i>)
OR	Odds Ratio (Razón de probabilidades)
OTU	Operational Taxonomic Unit (Unidad Taxonómica Operativa)
PCR	Polymerase Chain Reaction (Reacción en cadena de la polimerasa)

PFGE	Pulsed-Field Gel Electrophoresis (Electroforesis en campos pulsados)
PNC	Plan Nacional de Control
PSP	Programa de control de <i>Salmonella</i> en Porcino
RVS	Rappaport Vassiliadis Soja Broth (Caldo de Rappaport Vassiliadis Soja)
SAP	<i>Salmonella</i> Action Plan (Plan de Acción frente a <i>Salmonella</i>)
SPI	<i>Salmonella</i> Pathogenicity Island (Isla de Patogenicidad de <i>Salmonella</i>)
spp.	Especies
TSI	Triple Sugar Iron agar (Agar hierro triple azúcar)
UE/EU	Unión Europea (European Union)
UFC	Unidad Formadora de Colonias
XLD	Xylose Lysine Deoxycholate agar (agar xilosa lisina desoxicolato)
ZAP	Zoonosis Action Plan (Plan de Acción de Zoonosis)
ZNCP	Zoonosis National Control Programme (Programa Nacional de Control de Zoonosis)

RESUMEN

La salmonelosis no tifoidea representa un importante problema de salud pública a nivel mundial, siendo una de las zoonosis transmitidas por los alimentos más comunes y de mayor preocupación para las autoridades sanitarias. En la UE, la salmonelosis es la segunda causa de enfermedad gastrointestinal transmitida por los alimentos y la primera causa de brotes de enfermedad (EFSA y ECDC, 2023). El ganado porcino es, tras las aves, una de las principales fuentes de infección para los humanos. Además, España es el primer productor de carne de cerdo de la UE y el tercero del mundo, solo por detrás de China y EE.UU. Sin embargo, España también es el país con mayor prevalencia de salmonelosis porcina de la UE. Por todo ello, el control de la infección por *Salmonella* en cerdos debería ser una prioridad para la industria porcina española.

Esta Tesis Doctoral aborda diferentes aspectos relevantes sobre la infección por *Salmonella* en cerdos, incluyendo su epidemiología, así como la viabilidad de implementar medidas de control eficaces en condiciones de campo reales para reducir su impacto en la salud pública.

Para comprender mejor la epidemiología de la salmonelosis, el primer artículo de la tesis (**Publicación I: “*Salmonella* infection in nursery piglets and its role in the spread of salmonellosis to further production periods”**) investiga la dinámica de infección por *Salmonella* en lechones al inicio de la etapa de transición, una fase productiva de la que apenas existe información disponible, y el papel que esta podría jugar en periodos productivos posteriores. Para ello, se analizaron los nódulos linfáticos mesentéricos, el contenido intestinal y el jugo muscular de 389 lechones, machos, de 6 semanas de edad, destinados a consumo humano procedentes de cinco explotaciones seropositivas de abuelas (cerdas dedicadas a la producción de cerdas para producción de lechones). También se analizaron 191 muestras fecales de suelo procedentes de unidades de cerdas de cría de las mismas explotaciones. En este estudio se observó una elevada prevalencia de infección (36,5%; IC95%=31,9-41,4) y de excreción (37,3%; IC95%=32,6-42,2) en los lechones, estando la excreción asociada significativamente con la infección (OR=12,7; IC95%=7,3-22,0; $P<0,001$), lo que indica que los lechones de transición pueden infectarse subclínicamente y actuar como portadores activos de *Salmonella* en la explotación, incluso en condiciones de bioseguridad alta, como era el caso de las explotaciones que formaban parte del estudio. También se observó un bajo nivel de anticuerpos maternos específicos frente a *Salmonella* (mediana 4,7%DO; IC95% 3,0-6,0), lo que sugería que el inicio de la transición es un periodo de alto riesgo de infección. Por otro lado, se detectó resistencia a cefalosporinas de 3ª y 4ª generación a pesar de que los lechones nunca habían sido tratados con antibióticos, indicando que estos lechones podrían actuar también como vectores de resistencia antimicrobiana. Por último, se detectaron los mismos serotipos (principalmente *S. Rissen*, la variante monofásica de *S. Typhimurium* y *S. Derby*) y clones de *Salmonella* en los aislados procedentes de lechones y de las cerdas de cría, sugiriendo que los lechones infectados juegan un papel significativo en la infección de las cerdas de cría y, en consecuencia, de los cerdos de cebo en el caso de las explotaciones de producción. Estos resultados indican que los lechones de transición juegan un papel destacable en el mantenimiento y la transmisión de *Salmonella* en las explotaciones. Por lo tanto, el control y la reducción de la infección por *Salmonella* en lechones de transición podrían ayudar

a disminuir el riesgo de contaminación en las siguientes fases de la cadena productiva y, en consecuencia, de los mataderos y las canales destinadas a consumo humano.

Entre las estrategias de control de *Salmonella* más ampliamente utilizadas en el ganado porcino se encuentran los ácidos orgánicos. Estos se suelen utilizar como aditivos en el pienso o en el agua de bebida de los animales. En el segundo estudio (**Publicación II: “Effects of dietary supplementation with protected sodium butyrate on gut microbiota in growing-finishing pigs”**), el objetivo fue evaluar los cambios que se producen en la microbiota intestinal de los cerdos tras la suplementación alimentaria del pienso con butirato de sodio protegido durante todo el periodo de cebo (≈ 90 días). Para ello, se obtuvieron muestras de un gramo de contenido de colon de 18 animales, 9 cerdos pertenecientes al grupo tratado con el butirato (GT) y 9 al grupo control sin tratar (GC). Para evaluar los cambios en la microbiota entre ambos grupos, se extrajo el ADN bacteriano de las muestras y se analizó el ARN ribosomal 16S mediante secuenciación de amplicones de alto rendimiento. Los grupos compartían el 75,4% de las 4697 unidades taxonómicas operativas (OTU) identificadas. No se observaron diferencias significativas en alfa-diversidad, pero se detectaron diferencias significativas en algunos taxones específicos entre los grupos. El filo *Deinococcus-Thermus*, que está asociado con la producción de carotenoides y que posee propiedades antioxidantes, antiapoptóticas y antiinflamatorias, aunque aparecía poco representado, estaba incrementado en el GT ($P=0,032$). Las familias *Prevotellaceae*, *Lachnospiraceae*, *Peptostreptococcaceae*, *Peptococcaceae* y *Terrisporobacter* estaban también incrementadas en el GT. Miembros de estas familias tienen la capacidad de fermentar polisacáridos complejos de la dieta y de producir mayores cantidades de ácidos grasos de cadena corta. En cuanto a las especies, únicamente *Clostridium butyricum* apareció aumentada en el GT ($P=0,048$). *C. butyricum* es un probiótico ampliamente utilizado en medicina humana, y también se ha asociado con unos efectos globales positivos en el intestino (aumento de la altura de las vellosidades, mejora del peso corporal, reducción de la diarrea, etc.) en cerdos destetados. Así, aunque la adición de butirato de sodio a la dieta durante todo el periodo de cebo no modificó la riqueza global de la composición de la microbiota de estos cerdos al sacrificio, su presencia en el intestino pudo haber favorecido el aumento de taxones bacterianos específicos asociados a unos mejores parámetros de salud intestinal.

Tras haber profundizado en estos aspectos de interés para el control de la salmonelosis porcina, los siguientes estudios de la tesis se centraron en ofrecer una propuesta de control integral, que fuera factible para todas las partes interesadas, es decir explotaciones y mataderos.

Teniendo en cuenta que la contaminación de carne de cerdo con *Salmonella* es un problema importante para los mataderos y que está relacionada con la presencia de *Salmonella* en las heces de los cerdos en el momento del sacrificio, poder predecir el riesgo de excreción de *Salmonella* en los cerdos que llegan al matadero podría ayudar a reducir la contaminación de los mataderos y las canales. Con este objetivo, en el siguiente estudio (**Publicación III: Building a predictive model for assessing the risk of *Salmonella* shedding at slaughter in fattening pigs**), se seleccionaron 30 lotes de 50 cerdos cada uno procedentes de 30 unidades de cebo diferentes. Se identificaron los animales y se tomaron muestras de sangre para la detección de anticuerpos frente a *Salmonella* aproximadamente un mes antes del

sacrificio. También se tomaron muestras fecales del suelo de 10 corrales por unidad de cebo para detección de *Salmonella* y se cumplimentó un cuestionario de bioseguridad en cada explotación. En el matadero, se recogieron muestras de contenido de colon de cada cerdo identificado previamente para evaluar la excreción de *Salmonella*. A partir de los datos obtenidos de dos tercios de los cerdos analizados, se desarrolló un modelo predictivo para la excreción de *Salmonella* al sacrificio mediante análisis de regresión logística de efectos aleatorios, con la excreción de *Salmonella* como la variable dependiente y la serología de los cerdos y otras características ambientales y propias de la explotación como variables independientes. En el modelo se incluyó la explotación como variable de agrupación. Los datos del tercio restante de cerdos se utilizaron para la validación del modelo. De los 1500 cerdos seleccionados inicialmente en las explotaciones, 1341 (89%) se recuperaron en el matadero y se analizaron. Se detectó *Salmonella* en 13 (43,3%; IC95%=27,4-60,8) de las unidades de cebo. La seroprevalencia media de los lotes (punto de corte %DO $\geq$ 40) entre las unidades de cebo fue del 31,7% (IC95%=21,8-41,0) y un total de 316 cerdos (23,6%; IC95%=21,4-25,9) excretaron *Salmonella* al sacrificio. El modelo predecía razonablemente bien (Área bajo la curva=0,76; $P<0,05$) si un cerdo excretaría *Salmonella* al sacrificio con una sensibilidad del 71,6% y una especificidad del 73,6%. La serología, el porcentaje de corrales positivos a *Salmonella* en la granja y el nivel de bioseguridad interna mostraron una asociación significativa ($P<0,05$) con la excreción de *Salmonella* en el matadero, según revelaron diversos escenarios analizados en este estudio. Se destacó que, aunque la serología puede ser útil para identificar lotes de cerdos con riesgo de excreción de *Salmonella* al llegar al matadero, en algunas ocasiones podría no ser necesaria. Estos hallazgos sugieren que es crucial tener en cuenta otros factores propios de la explotación además de la serología al diseñar estrategias de control de *Salmonella* en la industria porcina. Además, reconocer que la serología podría no ser necesaria en todos los casos también puede ayudar a optimizar recursos y priorizar medidas de control más eficaces, contribuyendo significativamente a mejorar la eficacia de los programas de control de *Salmonella* y a garantizar la seguridad alimentaria en la industria porcina.

Como ya se ha mencionado anteriormente, una de las principales estrategias de control de *Salmonella* aplicadas en el ganado porcino es la adición de ácidos orgánicos al pienso o al agua de bebida de los animales. Teniendo en cuenta que los animales tienen que ayunar y que, además, el ayuno y el estrés asociado pueden influir en la excreción de *Salmonella*, para los siguientes dos estudios (**Publicación IV** y **Publicación V**), se decidió administrar un ácido orgánico en el agua de bebida de los animales. De este modo, los animales tuvieron acceso al tratamiento durante más tiempo, incluyendo el periodo previo al sacrificio.

En el cuarto estudio (**Publicación IV: *Salmonella* control in fattening pigs through the use of esterified formic acid in drinking water shortly before slaughter**), se evaluó si utilizar una forma esterificada de ácido fórmico (MOLI-M C1, Molimen SL, Barcelona, España) en el agua de bebida (10 kg/1000 L) cinco días antes del sacrificio podría ser una estrategia útil para reducir la excreción de *Salmonella* en los cerdos al momento del sacrificio. Para ello, se seleccionaron tres explotaciones de cebo comerciales positivas a *Salmonella* que dispusieran de al menos dos naves de cebo con niveles similares de infección. En cada explotación, se asignó una nave como grupo control (GC) y la otra como grupo tratado (GT). Una vez en el

matadero, se seleccionaron aleatoriamente 40 animales de cada nave y se tomaron muestras fecales para detección y cuantificación de *Salmonella*. *Salmonella* estuvo presente en el 35% (IC95%=29,24-41,23) de las muestras recogidas. La prevalencia fue significativamente mayor en el GC que en el GT (50% vs. 20%; $P<0,001$). En todas las explotaciones el GT mostró un porcentaje inferior de excretores que el GC. Un modelo logístico de efectos aleatorios mostró que la “probabilidad” de excretar *Salmonella* fue 5,63 veces mayor (IC95%=2,92-10,8) para el GC que para el GT. Así, la proporción de cerdos excretando *Salmonella* que se evitó en el GT debido al uso de esta forma de ácido orgánico, es decir, la eficiencia del tratamiento, fue del 82,2%. Además, un análisis de *Chi-cuadrado* para tendencias mostró que, a mayor cuantificación de *Salmonella*, mayor probabilidad de que la muestra perteneciera al GC. Estos resultados sugerían que añadir este tipo de ácido orgánico al agua de bebida de los animales cinco días antes del sacrificio podría reducir la proporción de cerdos excretores de *Salmonella*, así como la carga de *Salmonella* en el intestino de los animales excretores.

Como complemento a lo anterior, en el último estudio (**Publicación V: *Salmonella* shedding in slaughter pigs and the use of esterified formic acid in the drinking water as a potential abattoir-based mitigation measure**), se evaluó por un lado la proporción de cerdos que llegan excretando *Salmonella* al matadero y, por otro lado, la eficacia del mismo ácido fórmico esterificado utilizado en el estudio anterior, pero en este caso aplicado exclusivamente en el agua de bebida de la sala de espera del matadero. Así, en primer lugar, y con el objetivo de determinar la prevalencia de excreción de *Salmonella* en esta etapa y de caracterizar las cepas aisladas, se muestreó una población de 1068 cerdos procedentes de 24 explotaciones diferentes. La excreción de *Salmonella* estuvo presente en el 27,3% de los cerdos, y la variante monofásica de *S. Typhimurium*, un serotipo zoonótico emergente, fue la más prevalente (46,9%). La resistencia a antibióticos en los aislados de *Salmonella* fue frecuente, pero pocos aislados mostraron resistencia a antibióticos de importancia crítica para humanos (5% a cefalosporinas de tercera generación, 0% a colistina y 0% a carbapenemas). Sin embargo, la resistencia a tigeciclina, un antibiótico derivado de la tetraciclina utilizado para tratar infecciones graves causadas por bacterias extremadamente resistentes a los medicamentos, fue moderadamente alta (15%). En segundo lugar, se evaluó la eficacia de la adición del ácido fórmico esterificado en el agua de bebida de la sala de espera del matadero para el control de la excreción de *Salmonella* en el matadero. Para ello, en un primer momento se seleccionaron 7 explotaciones conocidas por ser seropositivas a *Salmonella*. A la llegada al matadero de los cerdos de estas explotaciones, se asignaban 40 de ellos a un corral de la sala de espera donde se les proporcionaba agua de bebida tratada con ácido fórmico (3 kg /1000 L; GT), mientras que el resto de los animales del camión se distribuían en otros corrales con el agua de bebida sin tratar (GC). Tras la evisceración, se tomaron muestras fecales para la detección de *Salmonella* de los 40 cerdos pertenecientes al GT y de otros 40 pertenecientes al GC. Se observó que el ácido fue capaz de reducir la proporción de excretores de 60,7% en el GC a 44,3% en el GT ($P<0.01$). Tras considerar el factor agrupamiento (granja) y posibles variables de confusión, la “probabilidad” de excretar *Salmonella* en el GC fue 2,75 (IC95%=1,80-4,21) veces superior a la del GT, sugiriendo que la eficiencia en la reducción de la excreción podría ser hasta del 63,6%. Esta estrategia podría utilizarse como complemento a la anterior y así contribuir a mitigar la problemática de la contaminación ambiental en los mataderos.

SUMMARY

Non-typhoidal salmonellosis represents an important public health problem worldwide, being one of the most common foodborne zoonoses and one of the major concerns for health authorities. In the EU, salmonellosis is the second cause of foodborne gastrointestinal illness and the first cause of disease outbreaks (EFSA and ECDC, 2023). Pigs are, after poultry, one of the main sources of infection for humans. Furthermore, Spain is the first pork producer in the EU and the third in the world, only behind China and the US. However, Spain is also the country with the highest prevalence of swine salmonellosis in the EU. For all these reasons, controlling *Salmonella* infection in pigs should be a priority for the Spanish pig industry.

This Doctoral Thesis focuses on various relevant aspects of *Salmonella* infection in pigs, including its epidemiology and the feasibility of implementing effective control measures under current field conditions to reduce its impact on Public Health.

To better understand the epidemiology of salmonellosis, the first article of the thesis (**Publication I: “*Salmonella* infection in nursery piglets and its role in the spread of salmonellosis to further production periods”**) investigates the dynamics of *Salmonella* infection in piglets at the beginning of the nursery stage, a productive phase for which little information is available, and the role that this could play in subsequent productive periods. To this end, mesenteric lymph nodes, intestinal contents, and meat juice samples from 389 six-week-old male piglets intended for human consumption from five seropositive breeding farms (sows producing sows for piglet production) were analyzed. In addition, 191 pooled floor fecal samples from gilt development units from the same farms were also analyzed. In this study, a high prevalence of infection (36.5%; 95%CI=31.9-41.4) and shedding (37.3%; 95%CI=32.6-42.2) among piglets was observed, with shedding being significantly associated with infection (OR=12.7; 95%CI=7.3-22.0; $P<0.001$), indicating that nursery piglets can become subclinically infected and act as active *Salmonella* carriers on the farm, even under conditions of high biosecurity, as was the case in the farms participating in the study. A low level of specific maternal antibodies against *Salmonella* was also observed (median 4.7%OD; 95% CI=3.0-6.0), suggesting that the beginning of the nursery is a period of high risk of infection. On the other hand, resistance to 3rd- and 4th- generation cephalosporins was detected in piglet isolates although the piglets never received antibiotics, indicating that they could be vectors of antimicrobial resistance. Finally, the same serotypes (mainly *S. Rissen*, the monophasic variant of *S. Typhimurium*, and *S. Derby*) and *Salmonella* clones were detected in isolates from piglets and gilts, suggesting that infected piglets play a significant role in the infection of gilts and, consequently, of finishing pigs in the case of production farms. These results show that nursery piglets play a critical role in maintenance and transmission of *Salmonella* on farms. Therefore, controlling and reducing *Salmonella* infection in nursery piglets could help reduce the risk of contamination in subsequent stages of the pork production chain and, consequently, in abattoirs and carcasses intended for human consumption.

Among all the *Salmonella* control strategies available to the pig industry, organic acids are one of the most widely used. They are often applied as additives in animal feed or drinking water. In the second study (**Publication II: “Effects of dietary supplementation with protected sodium butyrate on gut microbiota in growing-finishing pigs”**), the aim was to assess the changes in the gut microbiota of pigs after dietary supplementation with protected sodium

butyrate (PSB) during the growing-finishing period (≈ 90 days). For this purpose, one gram of colon content was collected from 18 pigs (nine from the treatment group, TG, and nine from the control group, CG). Bacterial DNA was extracted, and high-throughput 16S rRNA amplicon sequencing was used to assess changes in microbiota between groups. The groups shared 75.4% of the 4,697 operational taxonomic units (OTUs) identified. No differences in alpha diversity were found, but significant differences were detected between groups for some specific taxa. The low represented *Deinococcus-Thermus* phylum, associated with the production of carotenoids with antioxidant, anti-apoptotic, and anti-inflammatory properties, was increased in the TG ($P=0.032$). *Prevotellaceae*, *Lachnospiraceae*, *Peptostreptococcaceae*, *Peptococcaceae*, and *Terrisporobacter* were increased in the TG. Members of these families can ferment complex dietary polysaccharides and produce higher amounts of short-chain fatty acids. Regarding species, only *Clostridium butyricum* was increased in the TG ($P=0.048$). *C. butyricum* is known as a probiotic in humans, but it is also associated with overall positive gut effects (increased villus height, improved body weight, reduced diarrhea...) in weanling pigs. Thus, although the addition of PSB to the diet did not modify the overall richness of the microbiota composition in these slaughter pigs, its presence in the intestine may have favored the increase of specific bacterial taxa associated with better gut health parameters.

After addressing these aspects of interest for the control of swine salmonellosis, the following studies focused on offering a new comprehensive control approach that could be feasible for all stakeholders, namely, farms and slaughterhouses.

Given that *Salmonella* pork contamination is a major problem for slaughterhouses, and that it is related to the presence of *Salmonella* in the feces of pigs at the time of slaughter, the ability to predict the risk of excretion of *Salmonella* in pigs arriving at the slaughterhouse could facilitate the reduction of contamination in slaughterhouses and carcasses. For this purpose, in the following study (**Publication III: “Building a predictive model for assessing the risk of *Salmonella* shedding at slaughter in fattening pigs”**), 30 batches of 50 pigs each were selected from 30 different fattening units. The pigs were tagged and bled for the detection of antibodies against *Salmonella* approximately one month before slaughter. Additionally, pooled floor fecal samples were also collected from 10 pens per unit for *Salmonella* detection, and a questionnaire on biosecurity was administered to each farm. At the abattoir, colon content was collected from each tagged pig for *Salmonella* shedding assessment. A predictive model for *Salmonella* shedding at slaughter was built with two-thirds of the pigs by employing random-effects logistic regression analysis, with *Salmonella* shedding as the dependent variable and pig serology and other farm/environmental characteristics as the independent variables. The model included the farm as the grouping factor. Data from the remaining one-third of the pigs were used for model validation. Out of 1,500 pigs initially selected, 1,341 (89%) were identified at the abattoir and analyzed. *Salmonella* was detected in 13 (43.3%; 95%CI=27.4-60.8) fattening units. The mean batch seroprevalence (cut-off OD ≥ 40) among the fattening units was 31.7% (95%CI=21.8-41.0), with a total of 316 pigs (23.6%; 95%CI=21.4-25.9) shedding *Salmonella* at slaughter. The model predicted reasonably well (Area under the curve=0.76; $P<0.05$) whether a pig would shed *Salmonella* at slaughter, with estimates of sensitivity and specificity at 71.6% and 73.6%, respectively. The study found that serology, the percentage of *Salmonella*-positive pens on the farm, and the internal biosecurity score were significantly associated ($P<0.05$) with *Salmonella* shedding at the abattoir. Several

possible scenarios were considered. The study highlighted that, although serology may help identify batches of pigs at risk of shedding *Salmonella* upon their arrival at the slaughterhouse, it may not be necessary in some scenarios. These findings indicate that it is essential to consider farm-specific factors in addition to serology when designing *Salmonella* control strategies in the swine industry. Furthermore, recognizing that serology may not be necessary in all cases can also assist in optimizing resources and prioritizing more effective control measures, significantly enhancing the effectiveness of *Salmonella* control programs and ensuring food safety within the pork production chain.

As previously stated, one of the main strategies employed to control *Salmonella* in pigs is the addition of organic acids to the animals' feed or drinking water. Given that pigs must fast prior to be sent to slaughter and that fasting and its associated stress can influence *Salmonella* shedding, in the two following studies (**Publication IV** and **Publication V**), we decided to administer an organic acid to the drinking water instead of to the feed. This approach allowed for a more prolonged period of treatment, including the days and hours before slaughter.

The fourth study (**Publication IV: “*Salmonella* control in fattening pigs through the use of esterified formic acid in drinking water shortly before slaughter”**) sought to determine the efficacy of using a form of esterified formic acid (MOLI-M C1, Molimen SL, Barcelona, Spain) in drinking water (10 kg/1000 L) five days before slaughter as a strategy to reduce *Salmonella* shedding in slaughter pigs. Thus, three *Salmonella*-positive commercial fattening farms, with at least two fattening units with similar infection levels were selected. From each farm, one unit was allocated to the control group (CG) and the other to the treatment group (TG). Once at the slaughterhouse, 40 pigs from each unit were randomly selected, and their fecal content was collected for *Salmonella* detection and quantification. *Salmonella* was present in 35% (95%CI=29.24-41.23) of the samples collected. The prevalence was significantly higher in the CG compared to the TG (50% vs. 20%; $P<0.001$). In all of the farms, the TG showed a lower percentage of pigs shedding *Salmonella* than the CG. A random-effects logistic model indicated that the odds of shedding *Salmonella* were 5.63 times higher (95% CI=2.92-10.8) for the CG than for the TG. Thus, the proportion of pigs shedding *Salmonella* prevented in the TG due to using this form of organic acid, that is, its efficiency, was 82.2%. Furthermore, a *Chi-square* analysis for trends showed that the higher the *Salmonella* count, the higher the odds of the sample belonging to the CG. These results suggest that the addition of this type of organic acid to drinking water five days prior to slaughter could reduce the proportion of *Salmonella*-shedding pigs and the *Salmonella* load in the guts of shedder animals.

To complement the previous work, in the latest study (**Publication V: “*Salmonella* shedding in slaughter pigs and the use of esterified formic acid in the drinking water as a potential abattoir-based mitigation measure”**), we assessed, on the one hand, the proportion of pigs shedding *Salmonella* when arriving to the slaughterhouse and, on the other hand, the efficacy of the same esterified formic acid used in the previous study, but after being applied exclusively in the drinking water while at lairage. Firstly, to determine the prevalence of *Salmonella* shedding at this stage and to characterize the isolated strains, a population of 1,068 pigs from 24 farms was evaluated. *Salmonella* shedding was present in 27.3% of pigs, with the monophasic variant of *S. Typhimurium*, an emerging zoonotic serotype, being the most prevalent (46.9%). Antibiotic resistance (AMR) in *Salmonella* isolates was frequent, yet

few isolates exhibited AMR to antimicrobials of critical importance for humans (5% to third-generation cephalosporins, 0% to colistin, and 0% to carbapenems). However, AMR to tigecycline, a tetracycline-derived antibiotic used to treat serious infections caused by extremely drug-resistant bacteria, was moderately high (15%). Secondly, the efficacy of an esterified formic acid in the lairage drinking water was also evaluated as a potential abattoir-based *Salmonella* shedding control measure. Thus, seven farms identified as *Salmonella*-seropositive in previous routine analyses were selected. Upon arrival at the slaughterhouse, 40 pigs from each farm were randomly allocated to a pen in the lairage room where the drinking water was treated with formic acid (3 kg /1000 L; TG), while the rest of the animals from the truck were allocated to other pens with the untreated drinking water (CG). After evisceration, fecal samples were collected from the 40 pigs belonging to the TG and another 40 belonging to the CG for the purpose of *Salmonella* detection. The proportion of shedders was found to have been reduced from 60.7% in the CG to 44.3% in the TG ($P<0.01$). After accounting for clustering (farm) and confounding factors, the odds of shedding *Salmonella* in the CG were 2.75 times higher (95%CI=1.80-4.21) than those of the TG, suggesting a potential efficiency of reduction in shedding as high as 63.6%. This strategy could be employed as a complement to the previous one and thus contribute to mitigating the problem of environmental contamination in slaughterhouses.

INTRODUCCIÓN

Salmonella fue descubierta por Theobald Smith en 1885, durante la investigación de una epidemia de cólera en cerdos en Nueva York (Salmon, 1885). Su aislamiento a partir de cerdos enfermos hizo pensar que sería la causante de esta epidemia e inicialmente se la denominó *Hog-cholera bacillus*. Más tarde se demostró que el cólera porcino era en realidad una infección vírica y que el bacilo de Smith era un agente secundario. Aunque la bacteria fue aislada por Smith, desde 1900 el nombre del género *Salmonella* debe su nombre a Daniel E. Salmon, quien lideraba el grupo de investigación (*Salmonella* Subcommittee of the Nomenclature Committee of the International Society for Microbiology, 1934). La bacteria terminó denominándose *Salmonella choleraesuis*.

Poco antes, en 1880, el bacteriólogo alemán Karl Joseph Eberth había identificado una bacteria similar que asoció con la fiebre tifoidea. Posteriormente, en 1884, el bacteriólogo alemán Georg Theodor Gaffky aisló y cultivó la bacteria en medios de laboratorio, lo que permitió un estudio más detallado de sus propiedades y su relación con la enfermedad (Barnett, 2016). Se denominó *Salmonella typhi*. El descubrimiento de que la fiebre tifoidea se contraía tras el consumo de alimentos o agua contaminados con esta bacteria supuso un avance significativo en la comprensión de las enfermedades transmitidas por los alimentos y el agua.

Tras observar que las infecciones por *Salmonella* podían dar lugar a diferentes cuadros clínicos, así como que el patógeno podía infectar a una amplia gama de hospedadores, se comenzaron a investigar técnicas para su caracterización. Así, en el siglo XX se desarrolló el sistema de serotipificación para clasificar las diferentes cepas de *Salmonella* en función de sus antígenos de superficie y se empezó a investigar más exhaustivamente su patogénesis, transmisión y prevención. Como resultado de estos estudios se diferenciaron las denominadas salmonelas tifoideas (asociadas con una afectación del estado general del individuo) de las no tifoideas (caracterizadas por un cuadro fundamentalmente gastroentérico) y se llegaron a desarrollar vacunas para prevenir las primeras. Mientras que en los países desarrollados las salmonelosis tifoideas se han podido controlar gracias a la mejora de las condiciones higiénico-sanitarias y a las vacunas, las salmonelosis no tifoideas siguen suponiendo un problema importante. Por ello, desde finales del siglo XX comenzaron a implementarse regulaciones en materia de seguridad alimentaria, así como medidas de control para reducir la contaminación y propagación de las salmonelas no tifoideas en productos alimenticios. En la actualidad, continúa la investigación sobre *Salmonella*, sus características genéticas, su resistencia a los antibióticos, las estrategias de prevención y los métodos de detección más efectivos porque, a pesar de los avances, *Salmonella*, y en particular las salmonelas no tifoideas, siguen siendo un importante problema de salud pública en todo el mundo.

1. Características y taxonomía de *Salmonella*

Las bacterias pertenecientes al género *Salmonella*, forman parte de la familia *Enterobacteriaceae*. Presentan forma bacilar, son Gram negativas, anaerobias facultativas, intracelulares facultativas y mayoritariamente móviles gracias a la presencia de flagelos peritricos. Son bacterias ubiquitarias, muy resistentes en el medio ambiente, pudiendo permanecer viables fuera del hospedador durante meses. Infectan a un amplio abanico de hospedadores (animales de sangre fría y caliente) que actúan como reservorios y vectores de transmisión de la infección. Pueden crecer en un amplio rango de temperaturas (de 2 a 54 °C) y de pH (de 3,8 a 9,5), y resisten bien temperaturas de congelación y la desecación. *Salmonella* puede causar diferentes enfermedades tanto en humanos como en animales y, dado que puede transferirse de animales a humanos, la salmonelosis se considera una enfermedad zoonótica. En la Unión Europea (UE), la salmonelosis humana es la segunda zoonosis más notificada, tras la campilobacteriosis, y *Salmonella* el agente causal más notificado en brotes asociados al consumo de alimentos (EFSA y ECDC, 2023).

El género *Salmonella* está compuesto por dos especies: *Salmonella enterica* y *Salmonella bongori*. La especie más común y de interés clínico es *Salmonella enterica* que a su vez se divide en seis subespecies en función de características bioquímicas y parentesco genómico (Brenner *et al.*, 2000) (Figura 1). Una de ellos es *S. enterica* subsp. *enterica* (o subgrupo I), que se divide en cinco serogrupos: A, B, C, D y E. Cada serogrupo comprende múltiples serotipos o serovariedades en función de la estructura de los antígenos somáticos (O) y flagelares (H). La fórmula antigénica de todos los serotipos de *Salmonella* conocidos está enumerada en el esquema de White-Kauffmann-Le Minor (Grimont y Weill, 2007). Según el último informe publicado en 2014, el número total de serotipos identificados alcanzaría los 2.659 (Issenhuth-Jeanjean *et al.*, 2014). La mayoría (59%) de los serotipos conocidos pertenecen a *Salmonella enterica* subsp. *enterica* y son responsables del 99% de las infecciones por *Salmonella* en humanos y animales de sangre caliente (Brenner *et al.*, 2000).

Los diferentes serotipos de *Salmonella* se pueden agrupar o clasificar también en función de si son específicos de hospedador (infectan y causan enfermedad en una sola especie de hospedador), adaptados a hospedador (causan enfermedad principalmente en un hospedador, pero también en algunas otras especies) o no específicos de hospedador. Por ejemplo, *Salmonella* Typhi, *S. Gallinarum* y *S. Abortusovis* están asociados casi exclusivamente con enfermedad sistémica en humanos, aves y ovinos, respectivamente, y se consideran específicos de hospedador. Los serotipos adaptados a hospedador pueden causar enfermedad en más de una especie hospedadora como, por ejemplo, *S. Dublin* y *S. Choleraesuis*, que suelen asociarse con enfermedad sistémica severa en vacuno y porcino, respectivamente, pero que también pueden causar enfermedad menos frecuentemente en otros hospedadores mamíferos incluidos los humanos. Sin embargo, la mayoría de los serotipos son inespecíficos, como *S. Typhimurium* y *S. Enteritidis*, siendo capaces de producir enfermedad en un amplio rango de hospedadores (Uzzau *et al.*, 2000).

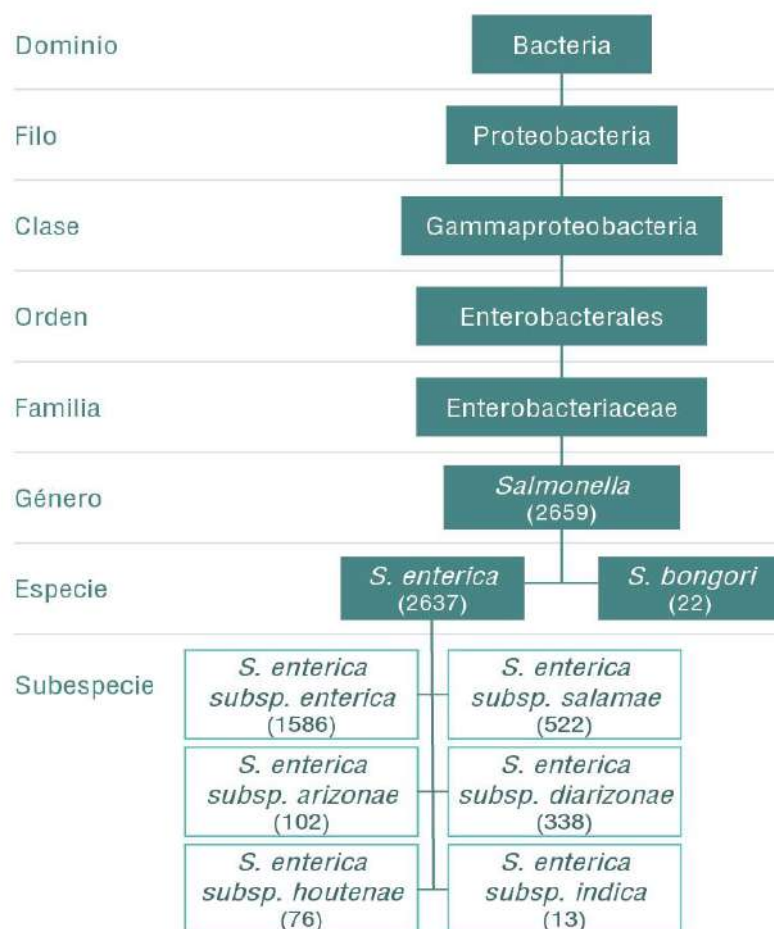


Figura 1. Taxonomía de *Salmonella*. Entre paréntesis, el número de serotipos identificados en cada grupo.

2. *Salmonella* y salud pública

Las infecciones por *Salmonella* no tifoidea son comunes y representan un importante problema para la salud pública a nivel mundial. Son una de las cuatro causas principales de infecciones gastrointestinales transmitidas por los alimentos. Algunos estudios han estimado que se producen aproximadamente 93,8 millones de casos anualmente en todo el mundo, de los cuales el 85% estarían relacionados con el consumo de alimentos contaminados. Se calcula que las salmonelosis no tifoideas serían responsables de unas 155.000 defunciones anuales (Majowicz *et al.*, 2010).

2.1. Salmonelosis en la Unión Europea

En la UE, la salmonelosis sigue siendo un problema importante de salud pública, manteniéndose en niveles similares a años precedentes (Figura 2). En el último informe de la EFSA y del ECDC de 2023, referente a los datos de 2022, la salmonelosis fue la segunda infección humana gastrointestinal más notificada transmitida por los alimentos, solo por detrás de la campilobacteriosis. Sin embargo, obtuvo el puesto número uno en cuanto a brotes de enfermedad de origen alimentario.

En el año 2022 se contabilizaron un total de 65.208 casos humanos confirmados de salmonelosis no tifoidea, con una tasa de notificación de 15,3/100.000 habitantes, similar a la del año anterior. La proporción de casos hospitalizados (11.287) fue del 38,9%, ligeramente mayor que en 2021 y con una tasa de letalidad del 0,22% (81 muertes) similar a la de 2021. En 2020, se había observado un significativo descenso en el número de casos, que tuvo que ver con las restricciones asociadas a la pandemia por COVID-19, y su impacto en actividades diarias como eventos sociales, visitas médicas y viajes, y con la salida del Reino Unido de la UE, al dejar de contabilizarse los casos británicos.

La información disponible en cuanto a los serotipos de *Salmonella* involucrados estaba disponible en el 72,3% del número total de casos confirmados (47.122 casos de 65.208) para 25 estados miembros. Al igual que en años anteriores, los tres serotipos de *Salmonella* más notificados en 2022 fueron *S. Enteritidis* (54,6%), *S. Typhimurium* (12,1%) y su variante monofásica o mST (10,4%), suponiendo el 77,1% de los casos humanos confirmados. Por detrás de ellos, en cuarto lugar se situó *S. Infantis* y en quinto lugar *S. Newport*.

En cuanto a brotes, en 2022 se notificaron un total de 1014 brotes de salmonelosis en la UE, lo que supone un 17,6% del total de brotes de origen alimentario (EFSA y ECDC, 2023). Esta cifra supone un 31,2% más que el año anterior, acercándose gradualmente a niveles prepandémicos. Se disponía información sobre el serotipo en el 50,6% (N=531) de los brotes de *Salmonella*. El serotipo predominante fue *S. Enteritidis* (N=395), seguido por *S. Typhimurium* (N=57) y mST (N=21). Aunque no se llegó a niveles prepandémicos, el número de brotes de salmonelosis notificados en el año 2022 aumentó respecto a los años anteriores (Figura 3).

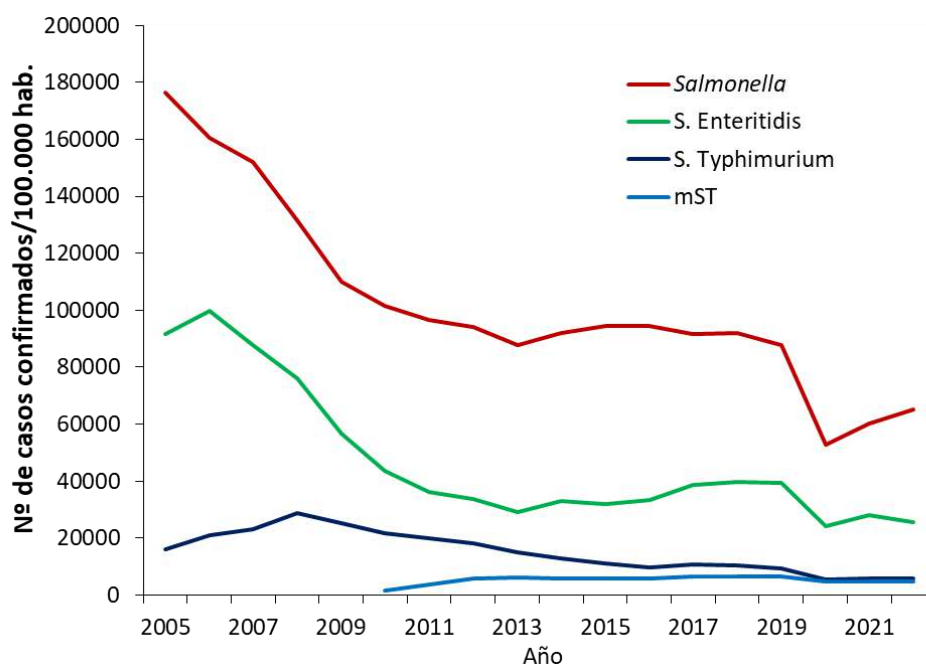


Figura 2. Evolución número de casos de *Salmonella* en la UE y de los principales serotipos involucrados.

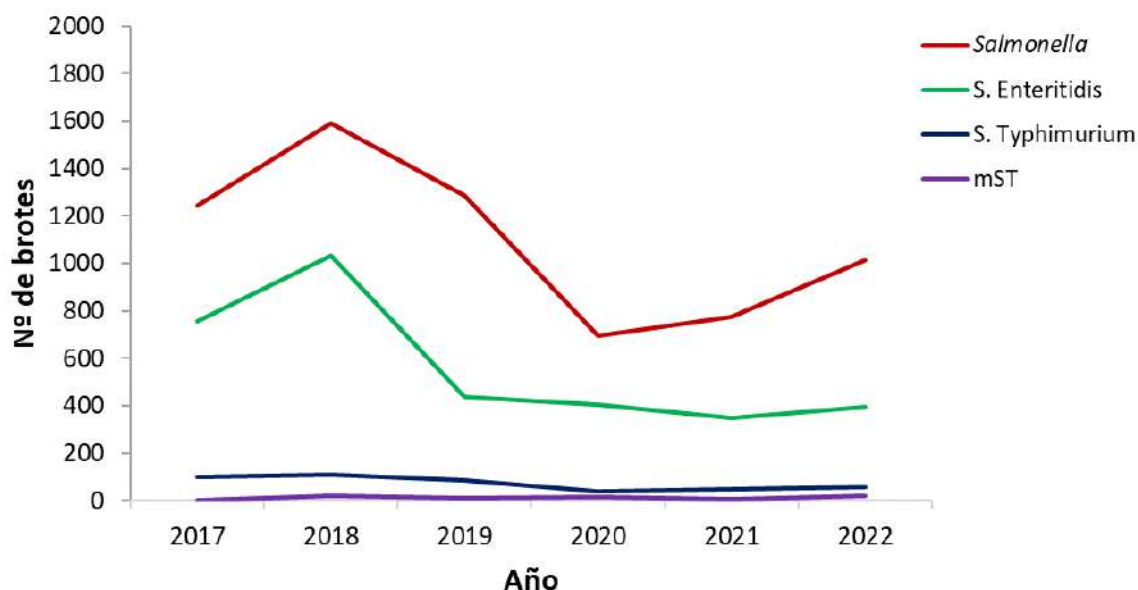


Figura 3. Evolución del número de brotes de *Salmonella* en la UE y de los principales serotipos involucrados.

mST: variante monofásica de *S. Typhimurium*.

2.2. Salmonelosis en España

En España, al igual que en la UE, *Salmonella* es una de las principales causas de enfermedad gastroentérica, solo por detrás de *Campylobacter*, y también es el principal agente causal en brotes de enfermedad de origen alimentario.

Según los últimos informes del ISCIII y de la EFSA y ECDC (2023), y teniendo en cuenta que no se dispone de información sobre la cobertura poblacional y que no se abarcaron todas las comunidades autónomas, en 2022 se notificaron 8.832 casos de salmonelosis no tifoidea en España (Figura 4). La incidencia acumulada fue de 25,5 casos por cada 100.000 habitantes. A diferencia de la tendencia de la enfermedad en la UE, en España el repunte de los casos fue mucho mayor, habiéndose alcanzado ya los niveles pre-pandemia. Además, el principal serotipo de *Salmonella* identificado fue *S. Typhimurium* (708 casos; 49% del total con información disponible), seguido de cerca por *S. Enteritidis* (630 casos; 43%), siendo así los mismos serotipos que los observados en la UE, pero invertidos en orden de frecuencia (Figura 4).

Además, se notificaron 258 brotes de salmonelosis, con un total de 1.332 casos asociados, de los cuales 185 requirieron hospitalización. Se dispone de información sobre el serotipo de *Salmonella* en 59 brotes (23% del total). En la mayoría de los brotes se identificó *S. Enteritidis* (44 brotes), seguido por *S. Typhimurium* (11 brotes), mST (1 brote) y *S. Virchow* (1 brote) (Figura 5). Los huevos y sus productos derivados fueron los principales alimentos implicados, lo que explica que el mayor número de brotes se debiesen a *S. Enteritidis* puesto que este serotipo está principalmente relacionado con las aves como fuentes de infección.

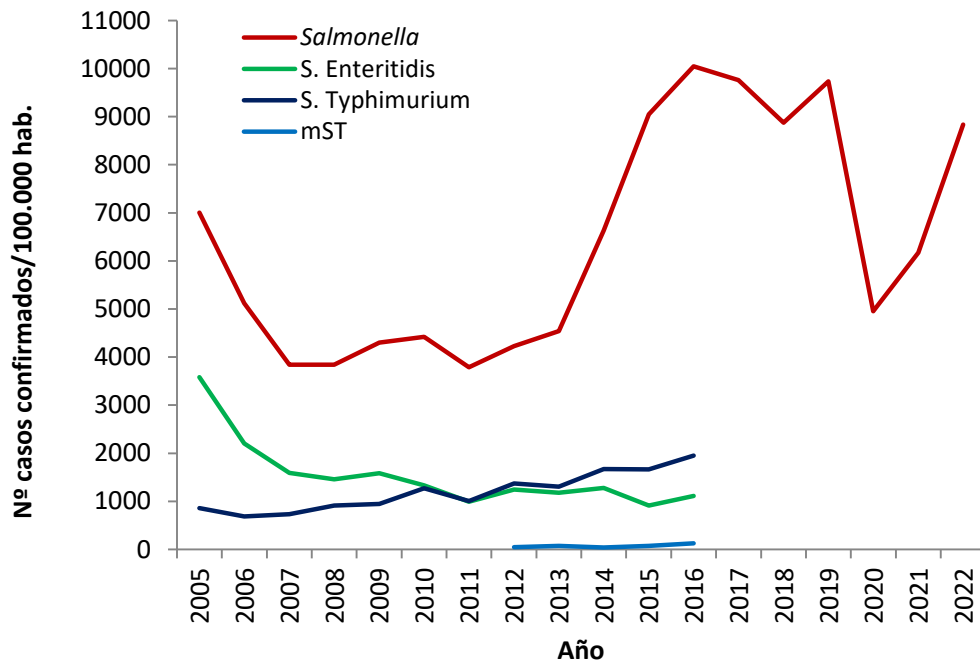


Figura 4. Evolución del número de casos de salmonelosis en España, en total y por serotipos (Fuente: ISCI, 2005-2023).

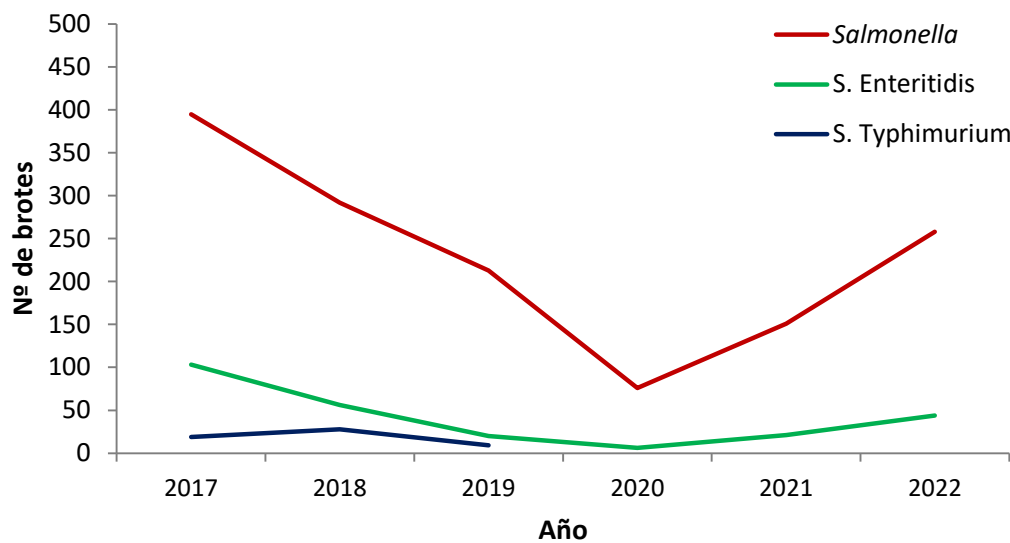


Figura 5. Evolución del número de brotes de salmonelosis en España, en total y por serotipos (Fuente: ISCI, 2017-2023).

2.3. Principales fuentes de salmonelosis humana

De acuerdo con los datos publicados por la EFSA y el ECDC (2023), en la UE, las principales fuentes de infección de *S. Enteritidis* fueron los pollos de engorde (71,7%), las gallinas ponedoras y los huevos (24,9%). Los aislados de *S. Typhimurium* se distribuyeron entre diferentes fuentes, aunque estuvieron relacionados principalmente con los pollos de engorde y los cerdos (41,0% y 29,6%, respectivamente), seguidos por las gallinas ponedoras, los bovinos y los pavos (14,1%, 8,6% y 6,4%, respectivamente). La variante monofásica de *S. Typhimurium* se relacionó principalmente con los cerdos (59,7%) y con los pollos de engorde (21,5%) como principales fuentes de infección. *S. Infantis* se relacionó estrictamente con el pollo de engorde (95,6%). Y, por último, *S. Derby* se relacionó con los cerdos (68,2%), con los pollos de engorde (14,4%) y los pavos (13,3%) (Figura 6). De todos modos, estos resultados hay que tomarlos con cautela, pues la distribución de los serotipos entre las diferentes fuentes estaba bastante desequilibrada en cuanto a número de aislados por fuente de infección, además de que la mayoría de los aislados serotipados considerados procedían de poblaciones avícolas cubiertas por los planes nacionales de control, especialmente los pollos de engorde (Tabla 1).

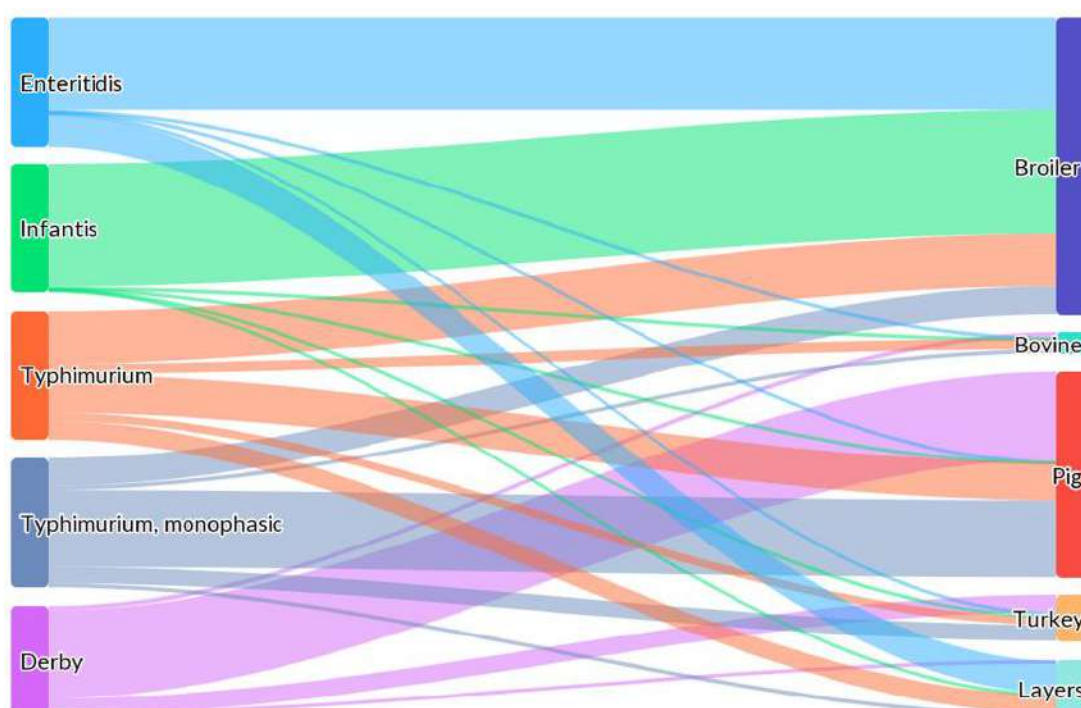


Figura 6. Diagrama Sankey de la distribución de los cinco serotipos principales implicados en casos humanos de salmonelosis adquirida en la UE, notificados por categorías específicas de alimentos de origen animal. A la izquierda, los cinco serotipos más notificados de *Salmonella*: *S. Enteritidis* (azul claro), *S. Infantis* (verde), *S. Typhimurium* (naranja), *S. Typhimurium* monofásica (azul oscuro) y *S. Derby* (morado). Los datos de animales y alimentos procedentes de la misma fuente están agrupados: “broiler” incluye aislados de pollos de engorde y carne de pollo, “bovine” incluye aislados de ganado bovino para producción de carne y de carne bovina, “pigs” incluye aislados de cerdos de engorde y de carne de cerdo, “turkey” incluye aislados de pavos de engorde y de carne de pavo y “layers” incluye aislados de gallinas ponedoras y de huevos. A la derecha, las cinco fuentes consideradas: pollos de engorde (azul), ganado bovino (verde claro), cerdos (rojo), pavos (naranja) y ponedoras (verde oscuro). El grosor de las bandas coloreadas que une las fuentes y los serotipos es proporcional al porcentaje de aislados de cada serotipo procedente de cada fuente. Fuente: EFSA, 2023.

Tabla 1. Distribución de los aislados de *Salmonella* (número y porcentaje de unidades de muestra positivas) con y sin identificación de serotipo entre las diferentes fuentes de infección (alimentos y animales) en la UE en 2022. Fuente: EFSA, 2023.

Fuente	Unidades de muestreo positivas a <i>Salmonella</i> sin serotipado de los aislados		Unidades de muestreo positivas a <i>Salmonella</i> con serotipado de los aislados	
	N	%	N	%
Pollos de engorde	1762	13,1	9028	50,6
Carne de pollo	2395	17,8	4046	22,7
Cerdos	10	0,07	14	0,08
Carne de cerdo	7548	56,2	999	5,6
Vacuno	8	0,06	117	0,66
Carne de vacuno	290	2,2	230	1,3
Pavos	666	5,0	2174	12,2
Carne de pavo	413	3,1	204	1,1
Gallinas ponedoras	320	2,4	990	5,5
Huevos y productos derivados del huevo	27	0,20	46	0,26
Total	13.439	100	17.848	100

En el caso de España, y aunque no se dispone de información específica de la fuente de infección de los casos humanos de salmonelosis en 2022, considerando que los principales serotipos identificados fueron *S. Typhimurium* (708 casos, 49% del total con información disponible) y *S. Enteritidis* (630 casos, 43%), y que estos casos estarían principalmente relacionados con los cerdos y las aves, respectivamente, cabría esperar que estas dos fuesen las principales fuentes de infección. Teniendo en cuenta que en nuestro país predominan los casos de *S. Typhimurium*, existiría la posibilidad de que los casos de salmonelosis humana estuviesen más asociados con el consumo de cerdo que en la UE. De hecho, se ha estimado que en los países del sur de Europa los cerdos serían la principal fuente de salmonelosis humana, alcanzando el 43,6% del total de los casos (Bonardi, 2017).

En cuanto a los brotes de salmonelosis, el consumo de alimentos contaminados fue el principal mecanismo de transmisión identificado en los brotes (229 brotes, 95% de los brotes con información disponible), siendo los huevos y derivados los principales alimentos implicados (94 brotes, 53% del total con información disponible).

En el último informe disponible de la Agencia Española de Seguridad Alimentaria y Nutrición (AESAN, 2023) relativo a los datos disponibles de 2021 sobre vigilancia de zoonosis alimentarias, se observó que el mayor porcentaje de muestras de alimentos positivas a *Salmonella* estaba relacionado con la carne de ave y de cerdo, siendo este porcentaje similar en ambos casos (Tabla 2).

Tabla 2. Muestras de alimentos analizadas en España en el año 2021. Fuente: AESAN, 2023.

Fuente	N muestras analizadas	N (%) muestras positivas a <i>Salmonella</i>
Agua potable	1	0 (0,00)
Alimentos infantiles y para usos nutricionales especiales	358	1 (0,28)
Carne de ave y derivados	4892	263 (5,38)
Carne de cerdo y derivados	7532	381 (5,06)
Carne de otras especies y derivados	1191	9 (0,76)
Carne de vacuno y derivados	2415	32 (1,33)
Cereales, harinas y derivados	947	0 (0,00)
Comida procesada, platos preparados y ensaladas “ready to eat”	3831	4 (0,10)
Frutas, verduras, zumos y semillas	2384	0 (0,00)
Huevos y ovoproductos	721	18 (2,50)
Leche y productos lácteos	2271	5 (0,22)
Pescados y productos de la pesca	2324	12 (0,52)
Salsas, hierbas aromáticas y especias	337	4 (1,19)
Bebidas no alcohólicas	5	0 (0,00)
Total	29.209	729 (2,5)

3. Infección por *Salmonella* en el cerdo

3.1. Prevalencia

La salmonelosis porcina es una infección ciertamente prevalente tanto en la UE como en España. En un estudio llevado a cabo por la EFSA entre 2006-2007, se determinó que la prevalencia media de *Salmonella* en linfonodos ileocecales en cerdos de matadero era del 10,3%, presentando España la prevalencia más alta de todos los estados miembros con un 29% de animales infectados. En este mismo estudio se estimó que la prevalencia en canales era del 8,3%, aunque solo 13 estados miembros participaron en este segundo estudio, entre los cuales no se encontraba España (EFSA, 2008).

En efecto, algunos estudio llevados a cabo a nivel nacional han demostrado que existe una alta prevalencia de *Salmonella* en explotaciones porcinas de cebo. Por ejemplo, en un estudio llevado a cabo entre 2003-2004, se aisló *Salmonella* en las heces de de las cuadras en un 43,1% de las explotaciones de cebo analizadas (García-Feliz *et al.*, 2009). En otro estudio realizado en Aragón en el periodo 2008-2009 se detectaron cerdos de cebo infectados (linfonodos mesentéricos) en el 94,1% de las explotaciones estudiadas (Vico *et al.*, 2011). Más recientemente, en un trabajo que abarca los años 2002-2013, 2015, 2017 y 2019 se observó que el 37,8% de las explotaciones de cebo españolas eran positivas a *Salmonella* a partir de muestras obtenidas del contenido cecal de cerdos en el matadero (Teng *et al.*, 2020).

Con relación a explotaciones de madres, otro estudio realizado por la EFSA a partir de muestras fecales de cuadras estimó en un 28,7% la proporción de granjas de abuelas (cerdas para obtención de animales de reposición) positivas a *Salmonella* y en un 33,3% la de explotaciones de producción. De nuevo, en España la prevalencia de *Salmonella* fue de las más altas, con un 64% y un 53,1%, respectivamente (EFSA, 2009).

Aunque el cerdo es susceptible a la infección por una amplia variedad de serotipos de *Salmonella*, algunos de ellos se consideran más adaptados a este hospedador. En el estudio mencionado anteriormente (EFSA, 2008), se detectaron más de 80 serotipos diferentes en los nódulos linfáticos mesentéricos de cerdos de cebo tras el sacrificio. Los serotipos más frecuentemente observados fueron *S. Typhimurium* (40%), *S. Derby* (41,62%) y *S. Rissen* (5,8%) (Figura 7A). En el estudio llevado a cabo en cerdas reproductoras, se identificaron más de 50 serotipos diferentes procedentes de las heces de estos animales. Los serotipos más frecuentemente aislados fueron *S. Derby* (23,9%), *S. Typhimurium* (17,9%), *S. London* (6,4%), *S. Livingstone* (5,4%), *S. Infantis* (5%) y *S. Rissen* (4,5%) (EFSA, 2009) (Figura 7B).

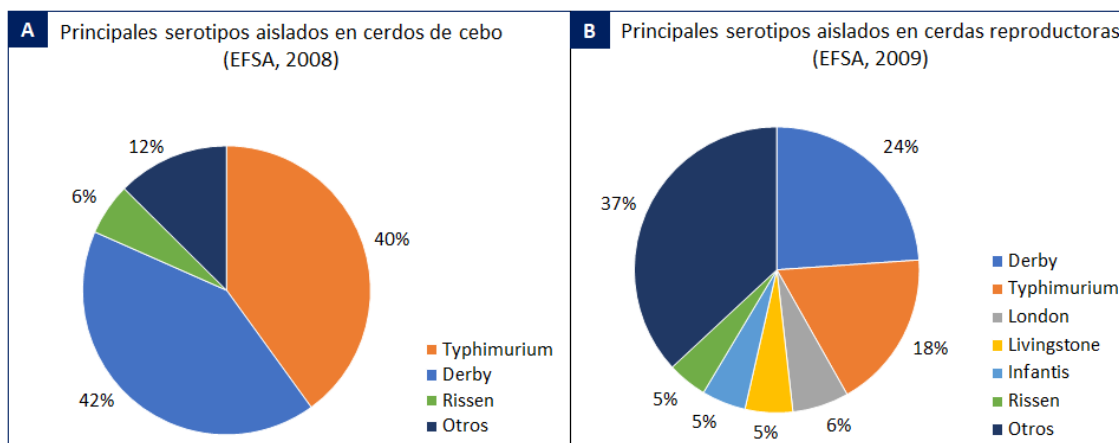


Figura 7. Principales serotipos de *Salmonella* aislados en cerdos de cebo (A) y en cerdas reproductoras (B). Fuente: EFSA, 2008; EFSA, 2009.

Desde el punto de vista clínico, los serotipos más relevantes en el ganado porcino son *S. Choleraesuis* y *S. Typhimurium*. Mientras que *S. Choleraesuis* es prevalente en otras regiones productoras del mundo como Estados Unidos o Brasil (Schwartz *et al.*, 1999; Chiu, Su y Chu, 2004; Meneguzzi *et al.*, 2021), su incidencia en Europa es mínima, habiéndose documentado casos excepcionalmente (Davies *et al.*, 2004; Pedersen *et al.*, 2015; Leekitcharoenphon *et al.*, 2019; Savic *et al.*, 2021). Los principales serotipos identificados en granjas porcinas europeas con sintomatología clínica son *S. Typhimurium* y su variante monofásica. Estos están generalmente asociados con brotes de enterocolitis en cerdos, lo que resulta en pérdidas económicas debido al retraso en el crecimiento (Farzan *et al.*, 2010) y al coste del tratamiento (Ojha y Kostrzynska, 2007). Sin embargo, es difícil determinar su papel como agente etiológico de diarrea porque con frecuencia se aísla junto con otros enteropatógenos así como en animales sanos.

Actualmente, tanto en España como en el resto de Europa, *S. Typhimurium* y su variante monofásica son los serotipos más frecuentemente aislados en explotaciones porcinas, siendo también los principales serotipos involucrados en los casos de toxiinfecciones alimentarias en humanos por consumo de productos porcinos. No obstante, los cerdos pueden infectarse por cualquier serotipo de *Salmonella* y todos ellos pueden ser potencialmente patógenos para el hombre y vehicularse a través de la cadena alimentaria hasta el consumidor final. Otros serotipos zoonóticos frecuentemente aislados en España en explotaciones porcinas son *S. Rissen*, *S. Anatum* y *S. Derby*.

3.2. Principales fuentes de infección en el ganado porcino

Existen numerosas fuentes potenciales de infección de *Salmonella* en cerdos (Rostagno y Callaway, 2012) que, además, están presentes a lo largo de toda la cadena de producción porcina (Callegari *et al.*, 2015).

Los propios cerdos son el principal reservorio de *Salmonella* (Zamora-Sanabria y Alvarado, 2017) por lo que en el momento de la adquisición de los cerdos los ganaderos deberían conocer cuál es el estatus de *Salmonella* de sus proveedores (de Busser *et al.*, 2013a). Junto con la compra de cerdos infectados, la compra de pienso comercial procesado contaminado con *Salmonella* puede ser otra posible ruta de introducción del patógeno a las explotaciones (Molla *et al.*, 2010). Así, un ambiente de fabricación de pienso contaminado con *Salmonella* (Magossi *et al.*, 2019), los camiones que transportan el pienso (Fedorka-Cray *et al.*, 1997) o la contaminación del pienso almacenado en la granja (Zamora-Sanabria y Alvarado, 2017), pueden dar como resultado cerdos alimentados con pienso contaminado con *Salmonella*. Una amplia variedad de vectores, incluyendo personas, tanto visitantes como trabajadores de la explotación (Callegari *et al.*, 2015), roedores (Andrés-Barranco *et al.*, 2014; Martelli *et al.*, 2017; Zamora-Sanabria y Alvarado, 2017), insectos (Zamora-Sanabria y Alvarado, 2017) y aves silvestres (Andrés-Barranco *et al.*, 2014) pueden introducir y transmitir *Salmonella* en la explotación porcina.

Una vez establecida la infección por *Salmonella* en un rebaño, esta puede mantenerse en cerdos portadores infectados subclínicamente que pueden excretar de forma intermitente *Salmonella* en sus heces (Funk *et al.*, 2001; Nollet *et al.*, 2005a; Pires, Funk y Bolin, 2013). De hecho, es la excreción de *Salmonella* en las heces lo que suele dar lugar a la contaminación ambiental y del material de la granja, que terminan siendo las principales fuentes de infección para los cerdos (Wales *et al.*, 2009). La contaminación ambiental puede persistir a pesar de los esfuerzos de limpieza y desinfección implementados (Funk *et al.*, 2001; Wales *et al.*, 2009), pues *Salmonella* puede sobrevivir en el estiércol durante meses (Lynch *et al.*, 2018) y ha llegado a aislarse a partir de muestras de suelo circundantes de las granjas de cerdos (Rodríguez *et al.*, 2006), suponiendo un riesgo de repetidas infecciones de origen ambiental.

A lo largo de la cadena de producción porcina, el transporte y la sala de espera en el matadero también se han descrito como fuentes potenciales de infección por *Salmonella* para los cerdos sacrificados (Hurd *et al.*, 2002; Boughton *et al.*, 2007; de Busser *et al.*, 2011; Wilhem

et al., 2017). Los animales infectados subclínicamente se convierten en excretores activos debido al estrés asociado con el ayuno (Verbrugghe *et al.*, 2011) y el transporte (Callegari *et al.*, 2015), lo que da lugar a la contaminación de los camiones y de los corrales en la sala de espera del matadero.

Los cerdos infectados por *Salmonella* que llegan al matadero se han identificado como un riesgo potencial de contaminación de las canales durante el sacrificio (Berends *et al.*, 1996; Botteldoorn *et al.*, 2003; Argüello *et al.*, 2013a). A lo largo de la cadena de sacrificio existen varios puntos críticos como el proceso de escaldado, de pelado y de la evisceración que pueden dar lugar a la contaminación de las canales con las heces y los microorganismos que las acompañan (de Busser *et al.*, 2013a).

3.3. Patogénesis

La infección por *Salmonella* en el ganado porcino sucede principalmente por ingestión (Boyen *et al.*, 2008). También se ha descrito el contacto nariz-nariz y la transmisión por aerosoles como otras posibles vías de transmisión (Fedorka-Cray *et al.*, 1995; Proux *et al.*, 2001; Oliveira, Carvalho y Garcia, 2006).

Una exposición de los cerdos a ambientes con bajos recuentos de *Salmonella* Typhimurium (10^2 - 10^3 UFC/100 cm²) pueden ser suficientes para la infección (Boughton *et al.*, 2007). Varios tipos de tejidos, incluyendo los linfonodos mesentéricos, puede ser positivos a *Salmonella* 2-4 horas después de la exposición a ambientes altamente contaminados con *Salmonella* (Boughton *et al.*, 2007).

Tras la ingesta oral, la primera barrera del hospedador a la que se enfrenta *Salmonella* es la β -defensina epitelial 1, expresada a concentraciones antimicrobianas en la lengua (Shi *et al.*, 1999). Cuando esta barrera es superada, *Salmonella* coloniza las tonsilas, donde la bacteria puede residir en las células de las criptas tonsilares (Fedorka-Cray *et al.*, 1995), aunque mayoritariamente se mantiene extracelularmente (van Parys *et al.*, 2010).

El ambiente ácido del estómago es la siguiente barrera que tiene el hospedador frente a *Salmonella*. El estómago porcino tiene un pH medio de 4,4 (Merchant *et al.*, 2011), pero puede alcanzar valores inferiores a 2 en el fundus y en el píloro (Boyen *et al.*, 2008). La composición y la textura del pienso puede influenciar el pH del estómago y el contenido de ácidos orgánicos (Mikkelsen *et al.*, 2004). La producción de ácido gástrico se considera un mecanismo eficiente para la destrucción de los patógenos ingeridos, aunque muchos patógenos bacterianos, incluyendo *Salmonella*, pueden soportar estas condiciones ácidas del estómago (Smith, 2003). Así, *Salmonella* puede adaptarse y llegar a sobrevivir en ambientes de pH bajo mediante la inducción de la respuesta ácido tolerante y mediante la producción de proteínas de choque ácido (Audia, Webb y Foster, 2001).

Cuando alcanza el intestino delgado, *Salmonella* se enfrenta a factores antibacterianos como las sales biliares, la lisozima y las defensinas (Boyen *et al.*, 2008) y también se expone al choque osmótico, a la reducida disponibilidad de oxígeno en el tracto digestivo y a la microbiota intestinal (Álvarez-Ordóñez *et al.*, 2011). La mayor concentración de bilis en las

zonas más altas del intestino delgado podría explicar la preferencia de colonización del tracto gastrointestinal bajo, principalmente del íleon, ciego y colon (Boyen *et al.*, 2008).

En la parte distal del intestino, las adhesinas favorecen la adherencia de *Salmonella* al epitelio intestinal. Entre ellas, se ha demostrado que las fimbrias de tipo 1 son importantes para la unión a los enterocitos y, posteriormente, para promover la colonización intestinal (Althouse *et al.*, 2003). *Salmonella* invade diferentes tipos de células epiteliales como enterocitos, células M y células caliciformes, actuando las placas de Peyer como principal puerta de entrada (Schauser, Olsen y Larsson, 2004). Junto con los linfocitos B y T, las placas de Peyer albergan macrófagos y células dendríticas que, tras la endocitosis, pueden propagar *Salmonella* sistémicamente a través de la sangre y del sistema linfático (Althouse *et al.*, 2003; Hallstrom y McCormick, 2011). Intracelularmente, *Salmonella* puede sobrevivir y encontrarse libre en el citoplasma o en el interior de vacuolas aptas para la supervivencia y replicación bacteriana (Hallstrom y McCormick, 2011). Se han descrito numerosos factores de virulencia diferentes que juegan un papel clave en la patogénesis de *Salmonella*, incluyendo estructuras de superficie (fimbrias o pili), plásmidos y toxinas (Boyen *et al.*, 2008; Jajere, 2019). Además, también se han identificado diferentes islas de patogenicidad en *Salmonella* (SPI), es decir, agrupaciones de genes dentro del cromosoma bacteriano que codifican diversos factores de virulencia con diferentes funciones en la patogénesis y en la virulencia de las infecciones por *Salmonella* (Jajere, 2019). Por ejemplo, los genes SPI-1 tienen un papel crucial en la invasión y colonización del intestino porcino y en la inducción del flujo de neutrófilos en la luz intestinal (Boyen *et al.*, 2006). La función de los genes de SPI-2 está relacionada con la habilidad de *Salmonella* para sobrevivir dentro de los macrófagos (Cirillo *et al.*, 1998).

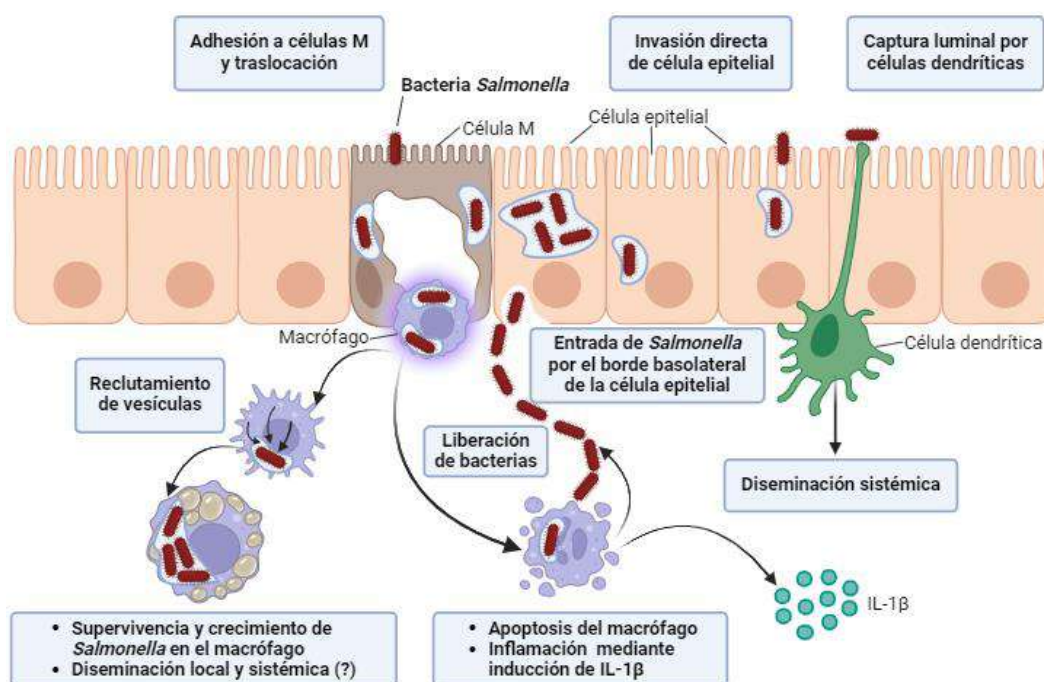


Figura 8. Infección por *Salmonella*. Las tres rutas principales de invasión de la mucosa intestinal por *Salmonella*: adhesión y traslocación a través de células M, invasión directa de las células del epitelio intestinal y captura por células dendríticas. Fuente: Sansonetti, 2004.

La respuesta inmune, incluyendo la llegada de neutrófilos a la luz intestinal y la producción de citoquinas como la IL-8, también forman parte de la primera línea de defensa contra la infección por *Salmonella* (Boyen *et al.*, 2008). La presencia de números altos de neutrófilos permite que los cerdos hagan frente a la infección (Foster *et al.*, 2003), aunque también pueden provocar patología intestinal. Sin embargo, una respuesta inmune insuficiente suele dar lugar a la colonización y replicación de *Salmonella* (Boyen *et al.*, 2008). Tras la infección, *Salmonella* puede permanecer en las tonsilas, en los intestinos (íleon, ciego y colon) y en los linfonodos mesentéricos, en la mayoría de los casos (y dependiendo del serotipo) sin signos clínicos en cerdos portadores (Wood, Pospischil y Rose, 1989; Boyen *et al.*, 2008). Debido a situaciones de estrés, como por ejemplo el ayuno (Verbrugghe *et al.*, 2011) y el transporte (Callegari *et al.*, 2015), estos animales portadores infectados subclínicamente pueden pasar a ser excretores activos.

3.4. Sintomatología

La manifestación clínica de las infecciones por *Salmonella* en cerdos es muy variable. Existen una serie de factores determinantes, incluyendo la dosis infectiva, el serotipo y la respuesta inmune de los cerdos infectados, que pueden influenciar la manifestación clínica (Rostagno y Callaway, 2012). Aunque, en general, los principales serotipos asociados a sintomatología son *S. Choleraesuis* y *S. Typhimurium*.

Los serotipos particularmente adaptados al hospedador, como *S. Choleraesuis* en el caso del cerdo, suelen dar lugar a enfermedad sistémica severa, a menudo fatal (Boyen *et al.*, 2008). La infección por *S. Choleraesuis* se asocia a una presentación clínica septicémica que 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 tras la infección, mientras que la diarrea, por lo general, no se presenta hasta 4-5 días después (Reed, Olander y Thaker, 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, Olander y Thaker, 1986; Wilcock y Schawrtz, 1992). Puede causar brotes clínicos graves en las explotaciones porcinas, muchas veces acompañados de una elevada tasa de mortalidad en cerdos de cebo. *S. Choleraesuis* se ha notificado solo ocasionalmente en Europa pero es mucho más común en Asia y América. En España, el aislamiento de *S. Choleraesuis* en explotaciones porcinas es escaso y poco común, aunque se ha descrito en jabalíes (Gil-Molino *et al.*, 2019), en cerdo ibérico (Gil-Molino *et al.*, 2020), en cerdos criados en extensivo (Hernández *et al.*, 2013) y, en algunos casos, en cerdos comerciales (Mateu *et al.*, 2002).

Las infecciones por serotipos de *Salmonella* no específicos de hospedador son generalmente subclínicas, aunque también pueden dar lugar a enfermedad entérica y enfermedad sistémica fatal (Boyen *et al.*, 2008). *S. Typhimurium* es el serotipo que más frecuentemente se asocia con las denominadas formas entéricas de salmonelosis. El principal signo clínico inicial es una diarrea acuosa verde-amarillenta, que se manifiesta a las 48h de la infección. Esta suele acompañarse de signos sistémicos como fiebre, letargia e inapetencia. Generalmente, afecta a animales de entre 6 y 8 semanas y se resuelve al cabo de 7-10 días (Fedorka-Cray *et al.*, 1994). Las muertes agudas suelen atribuirse a septicemia y endotoxemia,

mientras que la diarrea puede resultar en mortalidad debido a la deshidratación unos días después de la infección. En general, la mortalidad es baja, pero la morbilidad puede ser muy elevada (Wilcock y Schawrtz, 1992). La mayoría de los cerdos se recuperan completamente, aunque algunos de ellos pueden quedar debilitados de forma crónica y los cerdos recuperados pueden permanecer como portadores subclínicos (Gray y Fedorka-Cray, 1996; Griffith *et al.*, 2019). Además, las infecciones por *Salmonella* pueden reducir la ganancia de peso de los cerdos (Boyen *et al.*, 2009; Farzan y Friendship, 2010; de Ridder *et al.*, 2014).

En España, hasta el momento, la mayoría de las infecciones por *Salmonella* son subclínicas. Los pocos casos en los que se observan signos clínicos suelen estar asociados a *S. Typhimurium* (Betancor y Yim, 2012).

3.5. Epidemiología

La mayoría de los estudios sobre la epidemiología de la infección por *Salmonella* en cerdos se han centrado en la fase de cebo, puesto que son estos animales los que finalmente están destinados a consumo humano. Sin embargo, aunque la infección por *Salmonella* en los cebaderos podría deberse a causas externas, también podría tener su origen en las fases de producción previas, como podrían ser las cerdas reproductoras, el periodo de lactación o la fase de transición, que han sido menos estudiadas.

***Salmonella* en cerdas reproductoras**

En general, la prevalencia de salmonelosis en cerdas reproductoras es alta. En Europa el 28,7% de las explotaciones de madres son positivas a *Salmonella*, siendo muy superior en España (64%; EFSA, 2009). En Alemania, uno de los principales productores porcinos europeos, se ha observado que la presencia de *Salmonella* en las explotaciones también es habitual, con un 23,2% de muestras positivas a *Salmonella* a partir de hisopos de botas, un 6% de muestras fecales positivas y un 68,7% (punto de corte 15% DO) y 40% (punto de corte 40% DO) de muestras de suero positivas en cerdas reproductoras (Hollmann *et al.*, 2022).

En otras áreas geográficas como Estados Unidos, se han detectado prevalencias de excreción altas, de entre el 50% y el 61% en cerdas sacrificadas (Bearson, 2022), y de infección de entre el 5% y el 37% a partir de muestras de nódulos linfáticos inguinales superficiales (Bessire *et al.*, 2018). Estos últimos niveles de infección relativamente bajos podrían estar asociados al tipo de muestra utilizada, dado que es más frecuente detectar *Salmonella* en nódulos linfáticos mesentéricos que en nódulos linfáticos inguinales (Hurd *et al.*, 2001). Otros estudios han mostrado una seroprevalencia del 95% en cerdas, con un 21% de ellas excretando el patógeno en las heces durante el periodo previo al parto (Bearson *et al.*, 2014). También se ha observado que incluso en casos de elevada seroprevalencia, la prevalencia de excreción puede ser baja (Lynch *et al.*, 2017). De hecho, la observación de bajas prevalencias de excreción es relativamente común en cerdas reproductoras (Funk *et al.*, 2001; Kranker *et al.*, 2003; Rowe *et al.*, 2003; Nollet *et al.*, 2005b), probablemente debido al patrón de excreción intermitente en infecciones subclínicas en animales adultos (Funk *et al.*, 2001). Este patrón podría variar en función de las diferentes etapas del ciclo productivo. En algunos estudios se ha observado un aumento en la excreción de *Salmonella* en el último periodo de gestación

(Funk *et al.*, 2001), mientras que en otros ocurría tras el destete (Nollet *et al.*, 2005b; Nollet *et al.*, 2005c) o incluso en el momento del parto (Lynch *et al.*, 2017).

La presencia habitual de altas tasas de infección de *Salmonella* en explotaciones de cerdas reproductoras podría estar relacionada con el hecho de que el control de la infección en estos animales no ha sido un tema de particular interés. Sin embargo, las cerdas juegan un papel fundamental en el mantenimiento de la infección en las explotaciones, aumentando la probabilidad de exposición a la bacteria (EFSA, 2009). Las cerdas parecen actuar como fuente de infección para los lechones (Casanova-Higes *et al.*, 2019). El estrés asociado al parto favorecería la reactivación de la excreción de *Salmonella*, permitiendo que los lechones se infectasen al entrar en contacto con las heces de las madres en las salas de maternidad (Hein y Allrich, 1992). Sin embargo, la relación entre el estado epidemiológico de las cerdas y el de los lechones no parece estar del todo clara y requiere una mayor investigación (Hollmann *et al.*, 2022).

La introducción y mantenimiento de cerdas de reposición portadoras de *Salmonella* puede ser también un factor de riesgo en explotaciones consideradas libres de *Salmonella* (Dahl, 2011), y en explotaciones ya contaminadas en las que se podrían introducir de este modo nuevos serotipos (Davies, Funk y Morgan-Morrow, 2000; Penmetchsa *et al.*, 2009; Schut *et al.*, 2019).

En general, estos datos sugieren que *Salmonella* circula en muchas granjas de cerdas reproductoras, por lo que una proporción importante de ellas acaban infectadas, constituyendo un riesgo potencial para la contaminación del ambiente de la explotación con *Salmonella* y, en consecuencia, la posterior infección de los lechones.

***Salmonella* en lechones en la fase de lactación**

Existe una importante falta de información sobre la epidemiología de la infección por *Salmonella* en las fases productivas previas al cebo, como la lactación y la transición, a pesar de que ambas pueden influenciar la dinámica de infección durante el periodo de cebo (Wales, Cook y Davies, 2011).

Durante la lactación, el calostro ingerido por los lechones durante las primeras horas tras el parto les proporciona energía e inmunidad materna que les ayudará a enfrentarse a los patógenos que puedan estar presentes en el ambiente en sus primeros días de vida (Rooke y Bland, 2002). Se ha sugerido que esta inmunidad adquirida podría proteger de la infección por *Salmonella* en los lechones (Parada *et al.*, 2013; Schut *et al.*, 2019). Se desconoce la duración exacta y la efectividad de la inmunidad materna, pero se le atribuye un papel importante en el control de la diseminación de la infección. Sin embargo, existen pocos estudios sobre la prevalencia de infección por *Salmonella* en lechones durante la fase de lactación (Wales, Cook y Davies, 2011), probablemente debido a la dificultad que supone sacrificar a animales de esta edad para el adecuado estudio de la infección.

En general, los trabajos relacionados con la prevalencia de *Salmonella* a estas edades se han centrado en la prevalencia de excreción a partir de muestras fecales obtenidas mediante hisopos rectales, observándose una prevalencia de excreción inferior al 10% en la

mayoría de los casos (Funk *et al.*, 2001; Barber *et al.*, 2002; Beloeil *et al.*, 2003; Roesler *et al.*, 2005; Schut *et al.*, 2019), e incluso inferior al 5% (Lynch *et al.*, 2018). Sin embargo, la pequeña muestra de heces obtenida a partir de hisopos rectales podría dar lugar a una infraestimación de la prevalencia real, puesto que la sensibilidad de la bacteriología a partir de muestras de heces está directamente relacionada con la cantidad de heces utilizada para su análisis (Hurd, Stabel y Carlson, 1999; Funk, Davies y Nichols, 2000; Sangvatanakul, 2007). Por otro lado, la ausencia de excreción no garantiza la ausencia de infección puesto que la excreción de *Salmonella* en cerdos suele ser intermitente (Nielsen *et al.*, 1995; Beloeil *et al.*, 2003; Scherer *et al.*, 2008; Pires, Funk y Bolin, 2013).

En este sentido, en un estudio reciente llevado a cabo en lechones recién destetados sacrificados para su consumo se observó que la prevalencia de infección por *Salmonella* en linfonodos mesentéricos y la prevalencia de *Salmonella* en contenido intestinal era alta (aproximadamente del 36% en ambos casos), lo que sugiere que los lechones podrían jugar un rol activo en el mantenimiento de la infección en las subsiguientes etapas de la producción porcina (Casanova-Higes *et al.*, 2019).

***Salmonella* en lechones en fase de transición**

La etapa de transición es el periodo comprendido entre el destete a las 3 o 4 semanas de vida de los lechones y hasta las 10 semanas de edad, aproximadamente, justo antes de entrar al cebadero. Es una fase productiva crítica en la que los lechones son susceptibles a diversas infecciones entéricas. Una de las consecuencias del destete es la modificación de la microbiota intestinal de los lechones, caracterizada por una reducción significativa en el número de lactobacilos (Konstantinov *et al.*, 2006), debido principalmente al cambio repentino de ambiente (Gresse *et al.*, 2017) y de dieta, que pasa de ser mayoritariamente líquida (leche de las cerdas) durante la lactación a una dieta sólida (pienso *pre-starter*) al comienzo de la transición. Estos cambios, junto con la caída de anticuerpos maternos (Bianchi *et al.*, 1995), que son la única defensa inmune a esta edad, y el estrés ligado a la separación del lechón de su madre y a la mezcla con nuevos lechones, predispone a los animales recién destetados a infecciones por bacterias Gram negativas como *Escherichia coli* o *Salmonella* (Callaway *et al.*, 2006).

Mientras que la infección por *E. coli* ha sido ampliamente estudiada y confirmada como un patógeno entérico prevalente a esta edad (Weber *et al.*, 2017), la prevalencia de infección por *Salmonella* apenas ha sido estudiada. Sin embargo, se acepta que los lechones tras el destete serían los más afectados clínicamente si se infectasen por *Salmonella* (Bonardi, 2017). Ambas bacterias presentan una estrecha relación y son susceptibles a la misma clase de antibióticos, por lo que los tratamientos contra la colibacilosis podrían enmascarar las infecciones por *Salmonella* a esta edad. Hasta hace poco, el uso de antibióticos como profilácticos, principalmente aminoglicósidos y polimixinas, como la colistina, junto con el óxido de zinc era una práctica común en los sistemas de producción porcina intensivos, particularmente durante el periodo de transición (EMA, 2014; EMA, 2016). En España, la colistina se ha administrado en periodos de hasta 15 días como tratamiento antibiótico en el pienso durante años, debido a su alta eficacia contra bacterias Gram negativas (Quesada *et al.*, 2015). Probablemente por ello, hasta ahora en la etapa de transición no eran comunes los

problemas relacionados con *Salmonella*. Sin embargo, el alarmante aumento de resistencias antimicrobianas ha provocado que las autoridades sanitarias hayan puesto en marcha una serie de regulaciones en la UE limitando e incluso prohibiendo su uso. Por un lado, la prohibición del uso de colistina como profiláctico y reducción a 7 días máximo de administración en granja (EMA, 2016). Y, por otro, los Reglamentos CE 1334/2003 y 1095/2016 que establecen que el óxido de zinc sólo podrá utilizarse en dosis no medicinales, con un límite legal máximo de 150 ppm (bajas dosis como aditivo en pienso) de zinc en pienso completo (Bonetti *et al.*, 2021) a partir de Junio 2022. Estas nuevas regulaciones podrían favorecer un incremento en la incidencia de salmonelosis en transición, por lo que a partir de ahora el panorama podría ser diferente.

En el estudio de Casanova-Higes *et al.* (2019), se observó que la prevalencia de *Salmonella* en lechones lactantes procedentes de maternidades seropositivas era alta, confirmando que lechones de 4 semanas de edad aparentemente sanos pueden actuar como portadores de la infección al menos hasta el destete. Teniendo en cuenta la alta proporción de lechones infectados por *Salmonella* al destete, es probable que la transición también presente altas tasas de infección. Por ello, parece lógico pensar que, durante los últimos años, se ha pasado por alto la infección por *Salmonella* en el periodo de transición debido a los tratamientos antibióticos preventivos.

Sin embargo, apenas se han llevado a cabo estudios de campo que determinen la prevalencia de *Salmonella* durante la etapa de transición, aunque se han identificado infecciones activas de *Salmonella* en explotaciones de transición porcinas (Lafoz del Río *et al.*, 2020; Nair *et al.*, 2020). Realizar estudios de campo adecuados para estimar la prevalencia de infección por *Salmonella* en cerdos de transición resulta caro puesto que requerirían del sacrificio poco ético de un elevado número de animales jóvenes.

***Salmonella* en cerdos de cebo**

La fase de engorde o de cebo ha sido la más estudiada en cuanto a la dinámica de infección por *Salmonella*, junto con el sacrificio, puesto que se trata del último eslabón de la cadena productiva previo a la comercialización de la carne de cerdo. La prevalencia de infección observada es variable según estudios, pero en general se podría decir que es medio-alta (24,6% Davies *et al.*, 1997; 23% van der Wolf *et al.*, 1999; 53% Kranker *et al.*, 2003; 66,7% Rajic *et al.*, 2005; 46% Farzan *et al.*, 2008; 31% Vico *et al.*, 2011; 20,8% Pires, Funk y Bolin, 2013; 91% Nair *et al.*, 2018). En muchos de estos estudios se describen los factores de riesgo asociados a la infección como son la deficiente limpieza y desinfección entre lotes, la contaminación del pienso y del agua, el estado sanitario de los animales, la contaminación cruzada por botas y utensilios contaminados, la densidad animal, la presencia de vectores como roedores, la contaminación durante el transporte al matadero, etc.

En general, al inicio de la etapa de cebo se observan bajos niveles tanto de infección como de excreción de *Salmonella*, probablemente debido al uso de antimicrobianos durante la fase de transición (Fraile, 2016; Li, 2017). Más adelante, a partir del segundo tercio de la fase de cebo, los niveles de infección tienden a aumentar, posiblemente debido a la excreción intermitente de la bacteria por los cerdos portadores subclínicos. Esta excreción intermitente se ve favorecida en momentos de estrés (cambios ambientales, reagrupación, ayuno), que

provocarían la reactivación de la excreción de la bacteria hasta entonces acantonada en los nódulos linfáticos mesentéricos (Nielsen *et al.*, 1995; Rostagno, Hurd y McKean, 2009; Pires *et al.*, 2013). Así, se alcanzaría un mayor número de animales infectados al final del cebo, en el momento previo al transporte para su sacrificio en matadero (Schut *et al.*, 2019). El ayuno previo al sacrificio, el transporte al matadero, la reagrupación con otros animales y la estabulación en un nuevo ambiente como son los corrales de la sala de espera del matadero, son factores estresantes que pueden reactivar la excreción de grandes cantidades de la bacteria por parte de los animales portadores, favoreciendo la rápida infección de animales sanos no infectados hasta ese momento (Beloeil *et al.*, 2004; Argüello *et al.*, 2013a). Esta excreción que ocurre en la entrada al matadero actúa como uno de los principales factores de riesgo de contaminación ambiental del matadero y, por consiguiente, de las canales destinadas a consumo humano.

3.6. Cerdos como portadores de *Salmonella* resistente a antibióticos

Además del problema que supone el hecho de que un cerdo sea portador de *Salmonella* y por lo tanto una potencial fuente de infección gastrointestinal en humanos, existe también el problema de que estas bacterias actúen como fuente de resistencia a los antibióticos. La emergencia y diseminación de cepas de *Salmonella* resistentes a antibióticos es un problema creciente en salud pública (FAO, 2015; Gargano *et al.*, 2021; Mthembu, Zishiri y El Zowalaty, 2021; Algarni *et al.*, 2022). Aunque generalmente el tratamiento de la salmonelosis humana no requiere terapia antimicrobiana debido a la naturaleza autolimitante de la infección, en el caso de personas inmunodeprimidas, ancianos o niños, así como en el caso de enfermedad sistémica, puede resultar esencial (Ruiz *et al.*, 2004). Asimismo, los casos de salmonelosis causados por cepas resistentes podrían ser más graves que aquellos causados por bacterias sensibles e incluso la duración de la enfermedad podría ser mayor (Lee *et al.*, 1994; Travers y Barza, 2002; Varma *et al.*, 2005).

Actualmente, es frecuente aislar cepas de *Salmonella* resistentes a varios antibióticos e incluso cepas multirresistentes (Franco *et al.*, 2015; Long *et al.*, 2022; Luo *et al.*, 2023), siendo algunas de ellas especialmente patógenas. Un claro ejemplo de ello es el clon *S. Typhimurium* DT104 (Wall *et al.*, 1994) surgido en Reino Unido a comienzos de 1980 y caracterizado por un perfil específico de resistencia que incluye la ampicilina, el cloranfenicol o florfenicol, la estreptomina, el sulfametoxazol y la tetraciclina. Este perfil de resistencia parece estar genéticamente codificado en el cromosoma de la bacteria ligado a varios integrones ya identificados (Briggs y Fratamico, 1999) y se ha relacionado con aislados de origen porcino (Hampton *et al.*, 1995). Además, este clon está ampliamente diseminado entre el ser humano y otros animales (Esaki *et al.*, 2004) y se caracteriza por causar, generalmente, una enfermedad grave.

Este mismo perfil de multirresistencia se ha observado también en aislados de otros serotipos, lo que podría estar relacionado con una transmisión horizontal de la resistencia. En particular, la variante monofásica de *S. Typhimurium*, también relacionada con reservorios porcinos (EFSA y ECDC, 2023), presenta habitualmente el fenotipo de multirresistencia típico de *S. Typhimurium*, al que se le ha sumado resistencia a la gentamicina y apramicina, sugiriendo que estas resistencias podrían ser una característica intrínseca de esta variante

monofásica (Guerra *et al.*, 2000; de la Torre *et al.*, 2003) que le habría ayudado a generar una ventaja evolutiva sobre otros serotipos.

Asimismo, se han descrito patrones de resistencia comunes a otros serotipos como S. Rissen, S. Derby, S. Wein, S. Kapemba o S. Panama (Gebreyes *et al.*, 2000; Porrero *et al.*, 2002; Gebreyes y Thakur, 2005), y también patrones de resistencia específicos de serotipo (Carramiñana *et al.*, 2004; Schroeter, Hoog y Helmuth, 2004). En los últimos años, se ha detectado resistencia a fluoroquinolonas y cefalosporinas de tercera generación, antibióticos de elección para el tratamiento de salmonelosis sistémicas (Jiang *et al.*, 2014; Pietsch *et al.*, 2021; Yin *et al.*, 2022; Cuypers *et al.*, 2018; Sevilla *et al.*, 2021), así como a colistina, un antibiótico de último recurso en medicina humana (Sevilla *et al.*, 2021; Bertelloni *et al.*, 2022).

La facilidad con la que *Salmonella* adquiere resistencia podría tener que ver con el hecho de que muchos de los genes de resistencia de bacterias Gram negativas están localizados en integrones. En este sentido, se ha demostrado la existencia de una relación significativa entre la multirresistencia y la presencia de integrones en aislados de la familia *Enterobacteriaceae*. Las cepas multirresistentes en las que se detectan integrones tendrían una mayor facilidad para adquirir genes de resistencia adicionales en comparación con cepas del mismo patrón de resistencia, pero sin integrones, lo que sugiere que la presencia de integrones facilitaría la adquisición de otros genes de resistencia (Leverstein-van Hall *et al.*, 2003). En el caso concreto de *Salmonella*, son los integrones de clase 1 los que están ampliamente distribuidos entre los diferentes serotipos (Guerra *et al.*, 2000; Randall *et al.*, 2004; White *et al.*, 2003). Aunque la resistencia a los antibióticos suele manifestarse principalmente debido a la presión selectiva generada por el uso de estos medicamentos, se ha registrado la presencia de resistencia a ciertos antimicrobianos incluso en ausencia de dicha presión. Un estudio comparativo entre aislados de *Salmonella* obtenidos de explotaciones porcinas convencionales y de explotaciones porcinas que no emplean antibióticos reveló que, si bien la resistencia a antibióticos es más frecuente en las explotaciones que hacen uso rutinario de estos fármacos, también se pueden identificar aislados multirresistentes en explotaciones libres de antibióticos (Gebreyes, Thakur y Morrow, 2006).

4. Técnicas de diagnóstico y caracterización de *Salmonella* utilizadas

Dado que la manifestación clínica de las infecciones de *Salmonella* puede parecerse a otras enfermedades entéricas en el cerdo (por ejemplo, colibacilosis o disentería porcina) y que la coinfección con otros patógenos puede complicar el diagnóstico, la detección de *Salmonella* es necesaria para establecer un diagnóstico final. Además, en el caso del cerdo las infecciones suelen ser subclínicas y la excreción de *Salmonella* por animales infectados presenta un patrón intermitente (Gray y Fedorka, 1996; Pires, Funk y Bolin, 2013), por lo que su detección es complicada y en algunos casos es necesario combinar diferentes tipos de análisis.

4.1. Bacteriología

Salmonella se puede detectar a partir de diferentes tipos de muestra, incluyendo heces, contenido intestinal, fluidos orales, tonsilas, linfonodos mesentéricos, hisopos de canales y ambientales, así como muestras de pienso y agua. Se han descrito numerosos métodos para la detección y confirmación de *Salmonella* y su posterior caracterización.

La Organización Internacional de Normalización (ISO, por sus siglas en inglés), junto con el Comité Europeo de Normalización (CEN, por sus siglas en francés) desarrolló normas internacionales para la detección de *Salmonella* a partir de diferentes tipos de muestras. Estos protocolos permiten la comparación de resultados entre diferentes laboratorios. En general, para todos los tipos de muestras, el procedimiento de aislamiento consiste en las siguientes etapas: 1) pre-enriquecimiento no selectivo, 2) enriquecimiento selectivo, 3) plaqueo en medio selectivo, 4) confirmación bioquímica de colonias sospechosas y 5) caracterización fenotípica o genotípica del aislado (Figura 9). Las muestras utilizadas para la detección de *Salmonella* en la presente tesis han sido muestras fecales y contenido intestinal de colon.

La norma ISO 6579:2002/Amd 1:2007 Anexo D, fue específicamente desarrollada para la detección de *Salmonella* spp. en heces animales y muestras ambientales de producción primaria. En 2017 se publicó la norma ISO 6579-1:2017, una nueva norma internacional que incorporaba la anterior norma ISO 6579:2002/Amd 1:2007 con algunas modificaciones que se consideran menores (por ejemplo, se ha extendido el rango de temperaturas de incubación, se permite la elección entre caldo o agar semisólido de Rappaport-Vassiliadis, dos pruebas bioquímicas de confirmación se han convertido en opcionales, etc.). Esta versión actualizada de la norma es la que se ha utilizado para la detección y aislamiento de *Salmonella* en la presente tesis.

El cultivo directo sin enriquecimiento selectivo o no selectivo, puede ser útil en el caso de enfermedad clínica. En ese caso, el animal puede excretar *Salmonella* en grandes cantidades, por encima de 10^6 - 10^7 UFC/g de heces (Griffith *et al.*, 2019). En caso de animales portadores infectados subclínicamente y de muestras ambientales, el número de bacterias de *Salmonella* viables puede ser demasiado bajo para ser detectado sin pre-enriquecimiento no selectivo. El pre-enriquecimiento no selectivo también ayuda a la recuperación de bacterias dañadas. Posteriormente y dado que las bacterias de *Salmonella* suelen estar acompañadas por un número considerablemente mayor de otras especies bacterianas, tanto en heces como en muestras ambientales, es necesario el enriquecimiento selectivo para poder llegar a aislarla.

En la primera etapa del aislamiento de *Salmonella*, el agua de peptona tamponada (BPW, por sus siglas en inglés) es el caldo de cultivo de pre-enriquecimiento no selectivo de elección. Se diluyen las muestras en proporción 1:10 en BPW y se mezclan hasta que quedan disueltas de forma homogénea.

Para la segunda etapa de enriquecimiento selectivo, existen diferentes caldos de cultivo disponibles como, por ejemplo, el caldo de Rappaport-Vassiliadis con soja (RVS) y el caldo Muller-Kauffmann tetraciónato con novobiocina, y medios de cultivo semisólidos como el medio semisólido modificado de Rappaport-Vassiliadis (MSRV) y el medio semisólido de

diagnóstico de *Salmonella* (DIASALM). En la norma ISO 6597-1:2017 se recomienda el uso de placas de MSRV con novobiocina (10 mg/L) para fines científicos. MSRV es el medio que presenta una mayor tasa de detección de *Salmonella* en muestras de cerdos contaminadas de forma natural (de Busser *et al.*, 2013b).

Tras el enriquecimiento selectivo, se pica con el asa de siembra en el margen de la zona de migración típica de las placas de MSRV y se siembra en dos medios de cultivo sólidos diferentes. Según la citada norma, se utiliza el medio agar xilosa lisina desoxicolato (XLD) y un segundo medio complementario que puede ser el agar verde brillante (BGA, por sus siglas en inglés), el agar bismuto sulfito o el agar cromogénico, por ejemplo. En las placas de agar XLD, las colonias típicas de *Salmonella* tienen el centro negro y una zona ligeramente transparente de color rojizo debido al cambio de color del indicador del medio.

En la siguiente etapa, se utilizan diferentes pruebas bioquímicas para la confirmación de las colonias de *Salmonella* sospechosas. Entre ellas, la prueba de la descarboxilación de la lisina, prueba de la ureasa, prueba del indol y el agar triple azúcar hierro (TSI, por sus siglas en inglés). Una vez confirmada la colonia como positiva a *Salmonella*, puede ser caracterizada posteriormente mediante diferentes pruebas fenotípicas (por ejemplo, el clásico serotipado por aglutinación) y genotípicas (por ejemplo, electroforesis en gel de campos pulsados o PCR).

La especificidad del cultivo bacteriológico es del 100% (ISO, 2007), mientras que la sensibilidad variará en función del tipo de muestra analizada (heces, calzas, linfonodos), de si es una muestra individual o una mezcla de muestras (*pool*), de la cantidad/peso de muestra y de la combinación de medios de cultivo y de protocolos de cultivo utilizados (Wilkins *et al.*, 2010). La excreción intermitente de *Salmonella* por cerdos infectados subclínicamente también influye en los resultados obtenidos en muestras fecales individuales (Funk *et al.*, 2001; Pires, Funk y Bolin, 2013). Se estima que la sensibilidad del cultivo de heces es del 72% (Wilkins *et al.*, 2010). Además, el cultivo bacteriológico es un proceso que consume mucho tiempo ya que se tarda al menos 4 días en obtener colonias sospechosas de *Salmonella* y requiere de personal capacitado (Figura 9). Estos inconvenientes son especialmente importantes en aquellos casos en los que es necesario un diagnóstico rápido (por ejemplo, en brotes clínicos) o cuando el número de muestras a procesar es elevado.

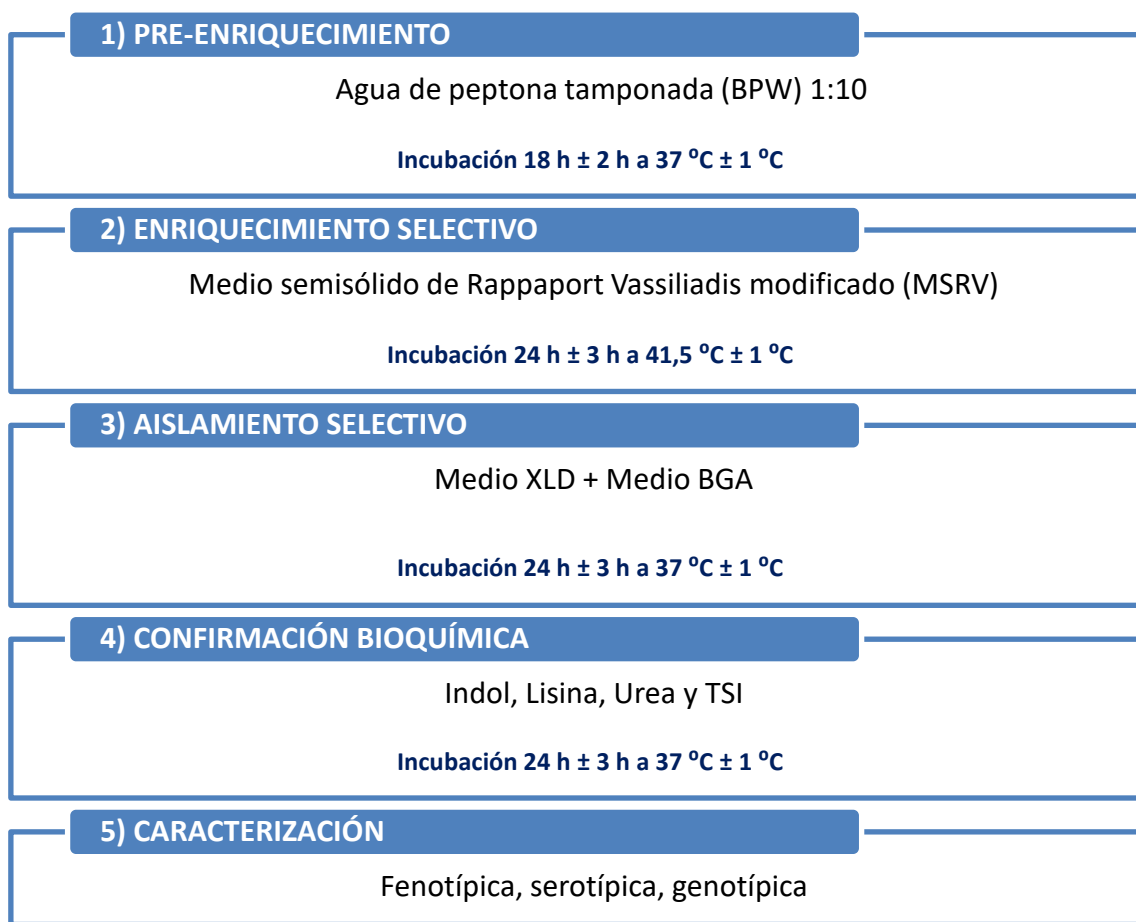


Figura 9. Esquema del cultivo bacteriológico de *Salmonella* seguido en esta tesis de acuerdo con la norma ISO 6579-1:2017.

4.2. Serología

Una forma de diagnosticar *Salmonella* indirectamente es por medio de técnicas serológicas. En cerdos, se pueden detectar anticuerpos específicos anti-*Salmonella* tanto en suero procedente de muestras de sangre como en jugo muscular a partir del tejido muscular del diafragma.

La toma de muestras de suero o carne en el matadero es mucho más fácil que la toma de muestras de sangre en la explotación y, además, evita el estrés de los animales. Sin embargo, en numerosos estudios se han observado diferencias significativas entre los resultados obtenidos en muestras de suero y de jugo muscular. La utilización de jugo muscular generalmente da lugar a una subestimación de la seroprevalencia, enfatizando la necesidad de considerar e interpretar cuidadosamente los resultados obtenidos de análisis serológicos en los programas de vigilancia según el tipo de muestra utilizada (Wilhelm *et al.*, 2007; Hiller *et al.*, 2011; Vico y Mainar-Jaime, *et al.*, 2018).

El ensayo más comúnmente utilizado es el basado en inmunoadsorción ligado a enzimas (ELISA, por sus siglas en inglés). Existen diferentes kits de ELISA comerciales disponibles y adecuados para la detección de anticuerpos específicos anti-*Salmonella* tanto en suero como en jugo muscular. Entre ellos, HerdCheck® Swine *Salmonella* (IDEXX Laboratories, Westbrook, ME, EEUU), Salmotype®Pig Screen (Labor Diagnostik, Leipzig, Alemania) y PrioCHECK® *Salmonella* (Prionics, Schlieren-Zurich, Suiza). En general se trata de ELISAs que detectan anticuerpos contra el lipopolisacárido de la membrana de *Salmonella* de los serogrupos más prevalentes, a saber, serogrupo B (que incluye serotipos como *S. Typhimurium* y *S. Derby*), C1 (*S. Choleraesuis*, *S. Infantis*, etc.) y D (*S. Enteritidis*, *S. Dublin*, etc.). Sin embargo, se han observado diferencias sustanciales entre los resultados para una misma muestra cuando esta se analizaba con diferentes kits de ELISA, siendo HerdCheck® Swine *Salmonella* el que ha mostrado una mejor precisión diagnóstica, con una sensibilidad del 88% y una especificidad del 74% (Vico *et al.*, 2010). Por ello, el ELISA utilizado en esta tesis es este último.

Los resultados del HerdCheck® Swine *Salmonella* se expresan en valores porcentuales de densidad óptica (%DO) de la muestra, con respecto a sueros control positivo y negativo, tras su lectura a una longitud de onda de 650 nm. La cantidad de anticuerpos presente en la muestra es directamente proporcional a la intensidad de color leída por el espectrofotómetro. Las instrucciones del fabricante proporcionan las siguientes fórmulas para expresar los resultados:

$$M/P = \frac{\text{Media de la muestra} - CN\bar{x}}{CP\bar{x} - CN\bar{x}} \qquad DO\% = \frac{M/P}{2,5} \cdot 100$$

Donde M/P es el cociente de muestra positiva; CN $\bar{x}$ es la media del valor de los controles negativos; y CP $\bar{x}$ es la media del valor de los controles positivos. Para obtener un resultado comparable a esta escala %DO, se ha determinado experimentalmente un factor de correlación (2,5). Se divide el valor M/P por este factor para obtener un valor aproximado de %DO.

El punto de corte utilizado para determinar si una muestra es considerada positiva (mayor o igual que el valor del punto de corte) o negativa (menor que el punto de corte) depende de las instrucciones del fabricante, del objetivo planteado y, si es el caso, de la legislación nacional de cada país. Para el HerdCheck® Swine *Salmonella*, el punto de corte científico recomendado para muestras individuales es M/P-ratio $\geq 0,25$ o DO $\geq 10\%$, mientras que, para cribados generales a gran escala, o para un control más estricto, se han propuesto diferentes valores de puntos de corte (M/P-ratio $\geq 1,00$ o DO $\geq 40\%$ y M/P-ratio $\geq 0,50$ o DO $\geq 20\%$, respectivamente) (Blaha y Kreienbrock, 2006).

La serología se ha utilizado principalmente en los programas nacionales de control de *Salmonella* para clasificar las explotaciones en categorías de riesgo. Por ejemplo, en los programas de vigilancia de Países Bajos y Alemania se utiliza un punto de corte de DO $\geq 40\%$ para cribados generales, mientras que en Dinamarca se utiliza un punto de corte más estricto, DO $\geq 20\%$ (Correia-Gomes, Leonard y Graham, 2021).

En comparación con el análisis bacteriológico, el análisis serológico es rápido y relativamente económico. Además, dado que mide la respuesta del cerdo frente a infecciones previas por *Salmonella*, es independiente del hecho de que el cerdo esté excretando o no la bacteria en ese momento. Sin embargo, desde el punto de vista de la salud pública, la presencia (excreción) de bacterias vivas de *Salmonella* que pueden infectar a los cerdos, contaminar el ambiente y resultar en la contaminación cruzada de las canales, es más importante que la presencia de anticuerpos específicos anti-*Salmonella* y esta solo puede ser confirmada mediante análisis bacteriológicos.

Numerosos estudios han observado una correspondencia débil entre resultados bacteriológicos y serológicos en el cerdo, especialmente a nivel individual (Botteldoorn *et al.*, 2003; Funk, Harris y Davies, 2005; Nollet *et al.*, 2005a; Farzan *et al.*, 2007; Vico *et al.*, 2010; Methner *et al.*, 2011; van Parys *et al.*, 2013). Sin embargo, a nivel de grupo, se ha descrito una mejor concordancia entre serología y cultivo microbiológico (Farzan *et al.*, 2007).

4.3. PCR

La reacción en cadena de la polimerasa (PCR, por sus siglas en inglés) puede utilizarse tanto para el diagnóstico rápido de *Salmonella* como para su posterior caracterización. Para diagnóstico rápido, la PCR convencional y la PCR a tiempo real son los métodos de elección (Bell *et al.*, 2016). La alta especificidad y sensibilidad de la PCR, así como el rápido resultado obtenido, son las principales ventajas de la PCR. Sin embargo, se han identificado numerosas desventajas dependiendo del protocolo utilizado. Entre ellas, la necesidad de enriquecimiento para alcanzar el límite del umbral de detección y la imposibilidad de diferenciar entre bacterias vivas o muertas (Bell *et al.*, 2016).

En este trabajo, se ha utilizado una PCR múltiple (Soumet *et al.*, 1999) para la detección de *Salmonella* y la identificación de los serotipos *S. Typhimurium* y *S. Enteritidis*, los de mayor importancia en salud pública. Esta PCR se llevó a cabo con tampón Taq de PCR al 1X, 0,6 mM dNTP, 1,0 µM para cada cebador y 1 U de Taq polimerasa de ADN de Biotools (volumen final de 25 µl). Los cebadores ST11 (5'- GCCAACCATTGCTAAATTGGCGCA-3') y ST15 (5'- GGTAGAAATCCCAGCGGGTACTGG-3') amplifican un fragmento cromosómico aleatoriamente clonado específico de *Salmonella*, la pareja de cebadores S1 (5'- GCCGTACACGAGCTTATAGA-3') y S4 (5'- ACCTACAGGGGCACAATAAC-3') amplifican un gen plasmídico específico de virulencia de *S. Enteritidis* y los cebadores Fli15 (5'- CGGTGTTGCCAGTTGGTAAT-3') y Typ04 (5'- ACTGGTAAAGATGGCT-3') amplifican el gen *fliC* específico de *S. Typhimurium*. Los parámetros de amplificación de esta PCR fueron los siguientes: desnaturalización a 94 °C durante 4 min, seguida por 30 ciclos de 94 °C durante 20 s, 55 °C durante 1 min y 72 °C durante 20 s para la amplificación, y una etapa final de 72 °C durante 10 min para la extensión.

Posteriormente, para diferenciar entre *S. Typhimurium* y su variante monofásica, se utilizó una PCR dúplex a partir de una colonia de cada cultivo positivo a *S. Typhimurium* detectado con la PCR anterior. Esta PCR dúplex permite la amplificación simultánea de un fragmento entre los genes *fljB* y *fljA* y el gen flagelar de la fase 2 (*fljB*) (Tennant *et al.*, 2010; Barco *et al.*, 2011). La PCR se llevó a cabo con tampón Taq de PCR al 1X, 2,5 mM MgCl₂, 0,6

mM dNTP y 1 U de Taq polimerasa de ADN de Biotools (volumen final de 25 µl). La mezcla con los cebadores contenía estos cebadores en una concentración de 0,1 µM para FFLIB (5'-CTGGCGACGATCTGTCGATG-3') y RFLIA (5'-GCGGTATACAGTGAATTCAC-3') y a una concentración de 1,0 µM para sense-59 (5'-CAACAACAACCTGCAGCGTGTGCG-3') y antisense-83 (5'-GCCATATTTTCAGCCTCTCGCCCG-3'). Los parámetros de los ciclos de la PCR fueron los siguientes: desnaturalización a 95 °C durante 2 min, seguida por 30 ciclos de 95 °C durante 30s, 64 °C durante 30 s y 72 °C durante 1,5 min para la amplificación, y una etapa final de 72 °C durante 10 min para la extensión. Todas las secuencias utilizadas se muestran en la Tabla 3.

En ambos casos, los productos obtenidos de la PCR se separaron en geles de agarosa al 2% (p/v), se tiñeron con GelGreen y se visualizaron utilizando un analizador de imagen de geles (iBright 1500, Invitrogen, Termofischer, Singapur).

Tabla 3. Cebadores utilizados para la identificación mediante PCR de *Salmonella* spp. (1), *S. Enteritidis* (2), *S. Typhimurium* (3) y su variante monofásica (4).

Cebador	Secuencia (5' a 3')	Amplicón (pb)	Referencia
ST11 (1)	GCCAACCATTGCTAAATTGGCGCA	429	Soumet <i>et al.</i> , 1999
ST15 (1)	GGTAGAAATTCCCAGCGGGTACTGG		
S1 (2)	GCCGTACACGAGCTTATAGA	250	
S4 (2)	ACCTACAGGGGCACAATAAC		
Fli15 (3)	CGGTGTTGCCAGGTTGGTAAT	620	
Typ04 (3)	ACTGGTAAAGATGGCT		
FFLIB (3)	CTGGCGACGATCTGTCGATG	250 o 1000	Tennant <i>et al.</i> , 2010 Barco <i>et al.</i> , 2011
RFLIA (3)	GCGGTATACAGTGAATTCAC		
sense-59 (4)	CAACAACAACCTGCAGCGTGTGCG	1389	
antisense-83 (4)	GCCATATTTTCAGCCTCTCGCCCG		

4.4. Electroforesis en gel de campo pulsado (PFGE)

La electroforesis en gel de campo pulsado (PFGE) es un análisis genotípico que se utiliza como método de caracterización bacteriana y que está basado en la digestión del ADN con una o varias enzimas de restricción, lo que permite cortarlo en fragmentos más pequeños. En esta tesis la enzima utilizada fue *XbaI*. Estos fragmentos de ADN se separan a lo largo de un gel de agarosa en un campo eléctrico que cambia de dirección periódicamente y se visualizan como bandas. Los patrones de bandas generados para cada bacteria se pueden analizar en un software bioinformático y ser comparados entre ellos o con una base de datos de referencia (PulseNet) que almacena alrededor de 350.000 patrones de PFGE diferentes (Ferrari *et al.*, 2017).

El análisis por PFGE es considerado la técnica “gold standard” para el genotipado de *Salmonella* (Wattiau, Boland y Bertrand, 2011; Ferrari *et al.*, 2017), a pesar de que tiene algunas limitaciones como el hecho de proporcionar información menos detallada que la secuenciación masiva (WGS, por sus siglas en inglés), la duración del procedimiento y la limitada capacidad de discriminación de cepas estrechamente relacionadas como *S. Typhimurium* y sus variantes monofásicas y los fagotipos DT104 y DT104b.

5. Estrategias de control de *Salmonella*

El aumento que se está produciendo a nivel mundial en los niveles de resistencia a los antibióticos y su impacto en salud pública, así como las recientes normativas europeas que limitan el uso de antimicrobianos como profilácticos, como es el caso de la colistina (EMEA/V/A/106), o el óxido de zinc (Decisión de Ejecución C (2017) 4529), instan a buscar alternativas para el control de bacterias zoonóticas como *Salmonella*.

Las principales estrategias de control de *Salmonella* estudiadas han sido las relacionadas con la mejora de los niveles de higiene y bioseguridad en las explotaciones consideradas de alto riesgo, y con el uso de ácidos orgánicos como aditivos en la alimentación o agua de bebida. Además, otras estrategias que se plantean son el uso de probióticos, prebióticos y bacteriófagos. Por último, también se ha propuesto la vacunación con resultados esperanzadores en algunos casos. Sin embargo, esta última no sería compatible con los planes nacionales de control desarrollados por algunos países por su incompatibilidad con el uso de la serología como herramienta diagnóstica.

5.1. Higiene y bioseguridad

La bioseguridad en producción porcina se define como la protección del ganado porcino frente a la introducción y posterior propagación de agentes infecciosos (Amass y Clark, 1999). La bioseguridad externa tiene como finalidad la prevención de la entrada de patógenos en la explotación y la bioseguridad interna tiene como objetivo la reducción de la propagación de los patógenos dentro de un rebaño (Laanen *et al.*, 2013).

Los principales factores de riesgo para las infecciones de *Salmonella* en porcino, incluyendo aquellos relacionados con la bioseguridad, la higiene, el manejo y la alimentación, se han evaluado y revisado en numerosos artículos e informes científicos (Berends *et al.*, 1996; Bahnson *et al.*, 2006; Beloeil *et al.*, 2007; Rostagno y Callaway, 2012; Gotter *et al.*, 2012; Correia-Gomes *et al.*, 2013; Parada *et al.*, 2017; Sánchez-Rodríguez *et al.*, 2018; Vico *et al.*, 2020; Alarcón *et al.*, 2021). Entre todos ellos, por un lado estarían los factores que favorecen la introducción y transmisión de la infección en la explotación, por ejemplo, a través de fómites contaminados como vehículos, botas y ropa (Beloeil *et al.*, 2007; Andrés *et al.*, 2015), o por la presencia de animales ajenos a la explotación como aves silvestres y roedores que pueden actuar como vectores del patógeno (Daniels, Hutchings y Greig, 2003; Andrés *et al.*, 2013; Andrés-Barranco *et al.*, 2014) y, por otro lado, factores que favorecen el mantenimiento de la infección una vez ya introducida, como pueden ser una limpieza y desinfección deficientes (Dahl *et al.*, 1997; Martelli *et al.*, 2017; Walia *et al.*, 2017).

Teniendo en cuenta que la infección de los cerdos por *Salmonella* puede tener un origen múltiple (Swanenburg *et al.*, 2001a; Barber *et al.*, 2002; Vieira-Pinto, Tenreiro y Martins, 2006; Rostagno y Callaway, 2012; Campos *et al.*, 2019), la bioseguridad frente a *Salmonella* resulta compleja, y para obtener unos buenos resultados se hace necesaria la aplicación continuada de medidas preventivas a lo largo de todas las fases del ciclo productivo. Esto supone un trabajo activo y constante por parte de los ganaderos que además suele conllevar un elevado coste económico (Alban *et al.*, 2005; Andrés *et al.*, 2015).

Sin embargo, la identificación de los factores de riesgo presentes en una explotación puede ayudar a entender cuáles pueden tener un mayor peso en el riesgo de *Salmonella* y determinar qué medidas de control son más factibles y efectivas a nivel de explotación para reducir su prevalencia (Mainar-Jaime e Iguácel-Soteras, 2011; Smith *et al.*, 2023). Además, los rebaños pueden así clasificarse según las prácticas de bioseguridad e higiene presentes (Biocheck.UGent scoring system; <https://biocheckgent.com/en>), lo que podría utilizarse como una herramienta para la vigilancia de *Salmonella* basada en riesgos (Baptista *et al.*, 2010). La realización de encuestas de bioseguridad de forma periódica también puede ser una herramienta económicamente rentable para valorar el riesgo de salmonelosis en la explotación y detectar los posibles fallos de bioseguridad en la misma.

5.2 Ácidos orgánicos

Los ácidos orgánicos pueden presentar actividad bacteriostática y bactericida. Tienen la capacidad de promover un ambiente intestinal favorable para la microbiota intestinal beneficiosa y al mismo tiempo presentan actividad antimicrobiana frente a bacterias patógenas, lo que los ha convertido en una potencial estrategia de control (Tugnoli *et al.*, 2020). Extracelularmente, son capaces de reducir el pH, creando un ambiente hostil para bacterias patógenas y reforzando la barrera gástrica con la proliferación de bacterias ácido-lácticas productoras de bacteriocinas que compiten con *Salmonella* por nutrientes y receptores (de Lange *et al.*, 2010). Además, son ácidos débiles que en su estado no disociado (en ambientes de bajo pH), son capaces de atravesar las membranas bacterianas y alcanzar el citoplasma bacteriano cercano al pH neutro donde se disocian y liberan protones y aniones de ácido orgánico. Todo ello resulta en la disrupción del pH intracelular bacteriano y de los procesos metabólicos vitales de la célula, como la síntesis de proteínas y de ADN, y en posibles efectos tóxicos directos (Wales, Allen y Davies, 2010) (Figura 10).

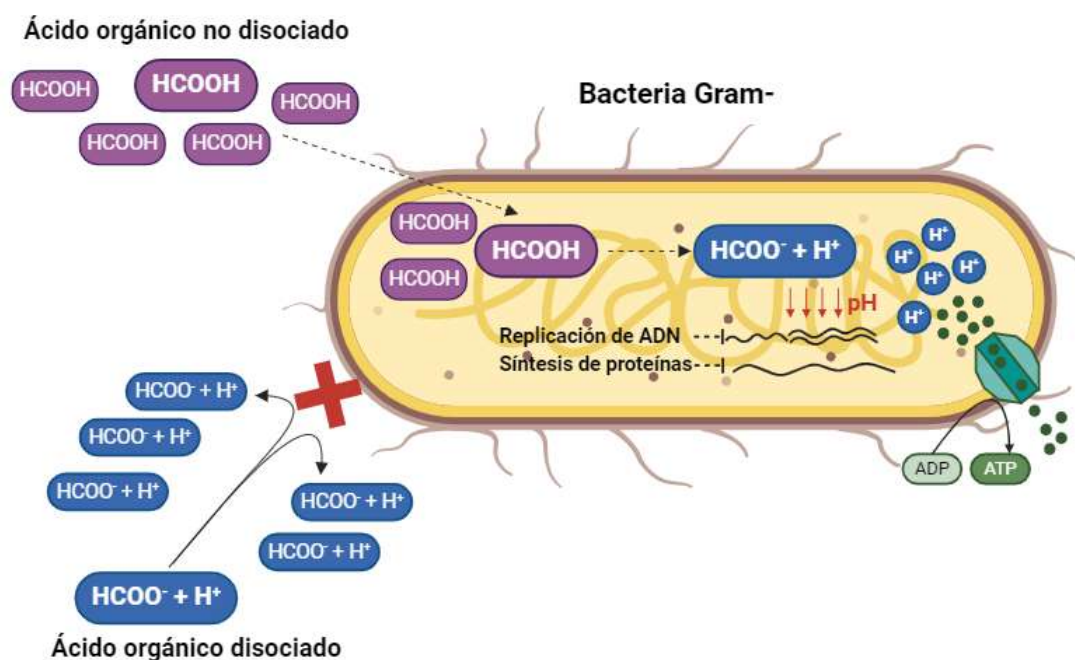


Figura 10. Mecanismo de acción antibacteriana de los ácidos orgánicos.

Este efecto se produce principalmente en el estómago y en los tramos anteriores del intestino delgado dado que los ácidos orgánicos se absorben precisamente en estos primeros tramos del intestino, dificultando su llegada a las zonas más distales del yeyuno, íleon y ciego (Creus-Gibert, Andrés-Barranco y Mainar-Jaime, 2014). Este hecho supone una limitación, puesto que no alcanza los tramos posteriores donde principalmente se encuentra *Salmonella*. Por ello, se han desarrollado técnicas como la microencapsulación y la esterificación para permitir que el ácido pueda llegar y actuar en los tramos posteriores del intestino (van Immerseel *et al.*, 2005; Rossi *et al.*, 2010; Tugnoli *et al.*, 2020).

El efecto antibacteriano de los ácidos orgánicos depende de la especie bacteriana diana, del tipo de ácido orgánico, de la concentración y de la forma física del producto administrado (Boyen *et al.*, 2008). En ocasiones, la composición del producto aplicado puede consistir en la mezcla de diferentes agentes del mismo grupo químico o incluso de uno diferente para conseguir un efecto sinérgico o combinado (Wales, Allen y Davies, 2010).

Estos ácidos orgánicos pueden aplicarse como aditivos alimentarios tanto en el pienso como en el agua de bebida. La ventaja que supone utilizarlos como suplemento en el agua de bebida en comparación con el pienso, es que se trata de una forma más flexible de tratar a los animales (van der Wolf *et al.*, 2001). Además, se puede incluso aplicar durante el ayuno hasta el transporte al matadero e, incluso, en la sala de espera del matadero (Casanova-Higes *et al.*, 2018). Sin embargo, hay que tener en cuenta que los ácidos orgánicos en su forma libre son corrosivos y la cantidad necesaria de algunos de ellos para alcanzar un efecto bactericida implica la disminución del pH del agua de bebida a niveles inferiores a la palatabilidad (por debajo de pH 3,5 para cerdos). Así, su aplicación en forma de sales, ésteres, o su microencapsulación, permiten la administración de una mayor cantidad de ácido sin modificar el pH, el olor, o la palatabilidad del agua (van der Wolf *et al.*, 2001; Cantini, 2015).

Junto con la amplia variedad de ácidos orgánicos disponibles (ácido acético, ácido láctico, ácido fórmico, ácido butírico, ácido propiónico, etc.) que tienen la capacidad de reducir el pH del tracto gastrointestinal de los cerdos, existe una gran diversidad de protocolos y dosis utilizadas, lo que podría explicar la variabilidad observada en los resultados de eficacia en los estudios de campo publicados (Papenbrock *et al.*, 2005; O'Connor *et al.*, 2008; de Busser *et al.*, 2009; Martín-Peláez *et al.*, 2010; Wales, Allen y Davies, 2010; Calveyra *et al.*, 2012; Argüello *et al.*, 2013b; Wilhelm *et al.*, 2012; Walia *et al.*, 2016; Lynch *et al.*, 2017; Walia *et al.*, 2017), así como la controversia existente sobre su utilización práctica como estrategia de control.

Aunque los ácidos orgánicos pueden resultar eficaces, existe la preocupación de que el uso excesivo o inadecuado de estos compuestos pudiera contribuir al desarrollo de resistencia bacteriana (Helmy *et al.*, 2023; Rebelo *et al.*, 2023).

5.3. Probióticos

Los probióticos son microorganismos vivos que, cuando se administran en cantidades adecuadas, pueden conferir beneficios para la salud (Hill *et al.*, 2014). Entre los beneficios más destacables se encontrarían el hecho de propiciar el crecimiento de bacterias beneficiosas, disminuir el crecimiento de bacterias patógenas como *Salmonella*, mejorar la salud gastrointestinal, fortalecer la regulación y la respuesta inmune, así como la integridad y morfología de la barrera epitelial del intestino delgado, y aumentar la capacidad de digerir y fermentar nutrientes (Cho, Zhao y Kim, 2011; Patil *et al.*, 2015; Liu *et al.*, 2018).

En lo que respecta al control de agentes patógenos, los probióticos pueden modificar la composición de la microbiota intestinal de los cerdos, creando un entorno menos favorable para su crecimiento a través de la competencia por nutrientes y espacio, así como por la producción de sustancias antimicrobianas. Además, también se ha sugerido que los probióticos utilizados como aditivos en producción porcina podrían mejorar la utilización del pienso, la ganancia media diaria, la ingesta diaria promedio de alimento y el índice de conversión (Zimmermann *et al.*, 2016; Liao y Nyachoti, 2017). Entre las bacterias estudiadas como probióticos para cerdos se incluyen varias especies del género *Lactobacillus* como *L. murinus*, *L. salivarius* o *L. pentosus*, varias especies del género *Bacillus* como *B. licheniformis* o *B. subtilis*, o también *Enterococcus faecium* y *Clostridium butyricum*.

Los efectos observados sobre la infección de *Salmonella* en cerdos tras suplementar el pienso con probióticos son contradictorios. En algunos casos, se ha observado una mejoría clínica y microbiológica (Casey *et al.*, 2007), o una reducción en la colonización y excreción de *Salmonella* (Barba-Vidal *et al.*, 2017a; Barba-Vidal *et al.*, 2017b). Sin embargo, otros autores no han observado ningún efecto en la prevalencia de *Salmonella* en las heces, en el tracto gastrointestinal o en los linfonodos intestinales (Walsh *et al.*, 2012). En general, los probióticos se suelen administrar tanto a través del pienso como en el agua de bebida (Walsh *et al.*, 2012).

5.4. Prebióticos

Los prebióticos son sustancias no digeribles que estimulan selectivamente el crecimiento y la actividad de microorganismos beneficiosos en el tracto gastrointestinal, como las bacterias probióticas (Gibson y Roberfroid, 1995). Los prebióticos son selectivamente utilizados por las bacterias beneficiosas del intestino del hospedador, lo que promueve su crecimiento y actividad, y también pueden participar en la defensa frente a agentes patógenos y modular la microbiota intestinal (Gibson *et al.*, 2017).

Así, los prebióticos pueden estimular el crecimiento de bacterias beneficiosas como *Lactobacillus* y *Bifidobacterium*, que compiten con *Salmonella* y previenen su colonización en el intestino. Al mejorar la salud intestinal y promover una microbiota equilibrada, los prebióticos pueden fortalecer la respuesta inmunológica de los cerdos, lo que los hace más resistentes a las infecciones por *Salmonella* y otras enfermedades. La administración de prebióticos ha demostrado en algunos estudios reducir la colonización de *Salmonella* en el tracto gastrointestinal de los cerdos (Andrés-Barranco *et al.*, 2015; Tran, Everaert y Bindelle, 2018), lo que disminuye la probabilidad de excreción de la bacteria en las heces. En algunos casos, se han investigado combinaciones de prebióticos con probióticos o ácidos orgánicos para potenciar sus efectos en el control de *Salmonella* (Markowiak y Śliżewska, 2018).

5.5. Aceites esenciales

Los aceites esenciales son compuestos naturales volátiles extraídos a partir de plantas que poseen propiedades antimicrobianas, antiinflamatorias y antioxidantes y que, además, son capaces de potenciar la palatabilidad del pienso y de mejorar la salud intestinal (Omonijo *et al.*, 2018).

Varios estudios han demostrado que ciertos aceites esenciales como el aceite de orégano, el aceite de canela, el aceite de tomillo y el aceite de eucalipto pueden inhibir *in vitro* el crecimiento *Salmonella* (Si *et al.*, 2006; Gómez-García *et al.*, 2020; Gavriil *et al.*, 2021; Mariotti *et al.*, 2022) y otras enterobacterias (Peñalver *et al.*, 2005). Aunque sus mecanismos de acción no están muy claros, al parecer podrían afectar a las bacterias patógenas dañando su membrana celular, inhibiendo la síntesis de proteínas o interfiriendo en su metabolismo (Burt, 2004; Guillín *et al.*, 2023; Rochín-Medina *et al.*, 2023).

En algunos casos se han aplicado en producción animal con resultados prometedores, observándose un mayor efecto bactericida cuando se utilizan en combinación con ácidos orgánicos (Wales, Allen y Davies, 2010).

5.6. Bacteriófagos

Los bacteriófagos son virus que infectan y lisan especies o cepas de bacterias específicas (Hudson *et al.*, 2005). Su uso para el control de *Salmonella* en cerdos es una estrategia que se está investigando como una alternativa a los antibióticos y a otros métodos convencionales de control de enfermedades. Aunque en la UE su uso todavía no está permitido, en la industria alimentaria la aplicación de bacteriófagos ha ido ganando interés para el control de patógenos que se pueden transmitir a través de los alimentos como, por ejemplo, *E. coli*, *Salmonella*, *Listeria* o *Campylobacter* (Jamal *et al.*, 2019), o reducir el crecimiento de otros microorganismos que aceleran su deterioro (Artawinata *et al.*, 2023).

Los bacteriófagos podrían potencialmente eliminar y controlar *Salmonella* en la producción primaria, en alimentos procesados como aditivo alimentario antimicrobiano y en las instalaciones de procesamiento de alimentos como agente biodesinfectante (Petsong y Vongkamjan, 2015). Se ha observado que la aplicación de bacteriófagos en la superficie de la canal puede evitar la contaminación del producto (Hooton, Atterbury y Connerton, 2011).

En animales vivos, los bacteriófagos se administran vía oral a través del agua de bebida o del pienso. Su uso presenta algunas ventajas en comparación con los antibióticos, como la especificidad, es decir, la capacidad de atacar solo a las bacterias objetivo sin afectar a otras bacterias beneficiosas en el intestino del cerdo. Además, se ha observado que pueden contribuir a reducir la resistencia a los antibióticos (Yoichi *et al.*, 2004). En varios estudios se ha observado que algunos bacteriófagos pueden reducir los niveles de colonización y excreción de *Salmonella* en cerdos (Wall *et al.*, 2010; Callaway *et al.*, 2011; Seo *et al.*, 2018) y que la aplicación de un cóctel de bacteriófagos es más efectiva que el uso de un solo bacteriófago para controlar la enfermedad bacteriana en cerdos (Sulakvelidze, Alavidze y Morris, 2001). Entre sus principales limitaciones estaría la necesidad de identificar bacteriófagos específicos para cada cepa de *Salmonella* (Skurnik, Pajunen y Kiljunen, 2007; Loc-Carrillo y Abedon, 2011).

Aunque el uso de bacteriófagos para el control de *Salmonella* es prometedor, se sigue investigando para determinar su eficacia en diferentes situaciones y condiciones de manejo.

5.7. Vacunación

La vacunación podría ser otra estrategia complementaria a las anteriores para el control de la infección por *Salmonella* en ganado porcino. El principal objetivo en este caso sería prevenir la salmonelosis clínica y disminuir la excreción, aumentando al mismo tiempo el umbral de infección en aquellos cerdos susceptibles no infectados (Haesebrouck *et al.*, 2004; Meeusen *et al.*, 2007; Boyen *et al.*, 2008; Argüello *et al.*, 2013c; Wales y Davies, 2017).

La vacunación se podría utilizar como estrategia de control en las diferentes etapas de producción. En primer lugar, la vacunación de cerdas reproductoras antes del parto permitiría, además de inmunizar a las madres, reforzar la inmunidad pasiva de los lechones a través del calostro (Roesler *et al.*, 2006; Wales, Cook y Davies, 2011; Ruggeri *et al.*, 2015). Posteriormente, la vacunación de los lechones en lactación o al momento del destete podría reducir la transmisión de la infección a fases posteriores como la transición y el cebo. Y, por último, la vacunación de los cerdos en la fase de engorde se podría utilizar con el objetivo de

reducir los niveles de excreción de *Salmonella* en los cerdos a su llegada a matadero (Argüello *et al.*, 2013c).

En estudios previos se ha observado que, en general, la vacunación puede ser efectiva para el control de los síntomas clínicos asociados a los serotipos más patógenos para el cerdo, es decir, *S. Choleraesuis* y *S. Typhimurium* (Kramer *et al.*, 1992; Maes *et al.*, 2001; Schwarz *et al.*, 2011; van der Wolf *et al.*, 2021). Sin embargo, los resultados no han sido tan evidentes cuando el propósito ha sido evitar la excreción de *Salmonella* en animales que llegan al matadero. En salud pública, hay más serotipos a controlar y la ausencia o baja protección cruzada entre serotipos supone un problema para su control mediante la vacunación (Wales y Davies, 2017).

Dado que existen más de 2.500 serotipos de *Salmonella* y que todos ellos son potencialmente zoonóticos, los esfuerzos se han centrado principalmente en el desarrollo de vacunas que permitan controlar la excreción de *S. Typhimurium* y su variante monofásica (de la Cruz *et al.*, 2017), ya que son los dos serotipos más notificados asociados al consumo de carne de cerdo (EFSA y ECDC, 2023).

Los efectos de vacunas atenuadas e inactivadas frente a infecciones por *S. Typhimurium* en cerdos se han revisado en varios estudios, en condiciones experimentales y de campo. Se han investigado diversas vacunas, experimentales o disponibles comercialmente, utilizando diferentes protocolos, dosis, vías de administración y grupos de edad. La heterogeneidad de estos estudios podría explicar en parte que los resultados hayan sido variables (de la Cruz *et al.*, 2017; Wales y Davis, 2017), aunque mayoritariamente se haya observado un efecto beneficioso de la vacunación. Smith *et al.* (2018) observaron que la aplicación sistemática de una vacuna viva a las madres tenía un impacto significativo en la reducción de la prevalencia de *S. Typhimurium* en explotaciones de ciclo cerrado. Esta disminución se detectó en todas las etapas de producción, destacando una notable reducción en los cerdos destinados a matadero. Además, se registró una disminución en la contaminación ambiental por *Salmonella*, aunque se indicaba que la erradicación completa del agente no se lograba sin la implementación de medidas de control complementarias. En otro estudio (de la Cruz *et al.*, 2017), se llevó a cabo un exhaustivo análisis mediante técnicas de metaanálisis de numerosas investigaciones sobre vacunación frente a *S. Typhimurium* y *S. Choleraesuis*, concluyendo que la mayoría de los estudios sobre vacunación reportan un efecto beneficioso, aunque variable. Este beneficio se observa independientemente del tipo de vacuna (viva o inactivada) y del protocolo utilizado para la vacunación, la dosis y la edad del individuo. Según este estudio, la vacunación resultó en una reducción global del 28,6% (IC95%=22,4-34,7) en el número de muestras (principalmente heces) con resultados de cultivo positivo.

En algunos países de la UE, la única vacuna comercial disponible para cerdos es una vacuna atenuada frente a *S. Typhimurium* (Salmoporc®, Ceva Santé Animale, Libourne, Francia). Esta vacuna parece mostrar resultados prometedores en explotaciones con clínica de *Salmonella* asociada a *S. Typhimurium* o mST (Davies *et al.*, 2016; Smith *et al.*, 2018), así como en explotaciones con infecciones subclínicas de *S. Typhimurium* (Lindner *et al.*, 2007; de Ridder *et al.*, 2014).

Una limitación de la vacunación es su interferencia con los programas nacionales de control realizados en algunos países (ver más abajo) y que están basados en la caracterización serológica de las explotaciones (Bearson *et al.*, 2017; Wales y Davies, 2017). Para evitarlo, sería necesario el desarrollo de vacunas DIVA que permitieran diferenciar animales infectados de animales vacunados. Aunque se han diseñado y evaluado con éxito, a nivel experimental, una serie de vacunas DIVA frente a *S. Typhimurium* (Selke *et al.*, 2007; Leyman *et al.*, 2011; Bearson *et al.*, 2017), estas todavía no están disponibles a nivel comercial.

Otra desventaja de las vacunas vivas en el marco de los programas de control sería la posible persistencia de cepas vacunales atenuadas hasta el sacrificio, lo que además de suponer un riesgo para la salud pública, puesto que la patogenicidad de cepas vacunales atenuadas en humanos no ha sido investigada, haría necesaria la utilización de pruebas extra para distinguir las cepas de campo de las cepas vacunales atenuadas (de Ridder *et al.*, 2014).

La conclusión general que se puede extraer es que la estrategia de vacunación contra *Salmonella* en ganado porcino debería adoptar un enfoque diferente al utilizado en avicultura, ya que no logra alcanzar los mismos niveles de reducción de prevalencia y no parece que pueda permitir la erradicación de la infección. Por ello, debería considerarse una herramienta complementaria a las estrategias mencionadas anteriormente.

6. Planes Nacionales de Control de *Salmonella* en porcino

La amplia difusión de *Salmonella* en el ganado porcino, su carácter zoonótico, y el riesgo adicional para la salud pública por la presencia de salmonelas resistentes a los antimicrobianos, ha hecho que algunos países se hayan planteado la aplicación de Programas Nacionales de Control (PNC), al igual que se hizo anteriormente en el sector avícola. Sin embargo, a diferencia de lo ocurrido en avicultura, hasta la fecha, son pocos los países de la UE que han instaurado y mantenido PNC contra la salmonelosis porcina. Aunque, en un principio, tras la Regulación EC No. 2160/2003, se tenían que haber iniciado programas de control de *Salmonella* a nivel de explotación en todos los países miembros de la UE, en la mayoría no llegaron a implementarse, probablemente debido a que no se consideraron económicamente rentables (FCC Consortium, 2010).

El primer PNC de *Salmonella* en cerdos en Europa se puso en marcha en Suecia en los años sesenta (Wierup, 2006) tras un brote grave de origen alimentario en 1953 (Lundbeck, Plazikowski y Silverstolpe, 1995). A Suecia le siguieron otros países nórdicos como Noruega, Finlandia y Dinamarca en 1995 (Mousing *et al.*, 1997; Maijala y Peltola, 2005; Jore *et al.*, 2007). Todos ellos excepto el danés, se centraron en la erradicación y se basaron en los análisis bacteriológicos. Dinamarca desarrolló su propio PNC basado tanto en análisis bacteriológicos como serológicos y se centró en el control de *Salmonella*. En todos estos casos, se partía de una prevalencia inicial baja a nivel de explotación y se exigía aplicar medidas estrictas en caso de hallazgo de *Salmonella*. Estas medidas incluían la aplicación de penalizaciones económicas. Se observaron resultados positivos en la reducción global de la prevalencia de *Salmonella* en las canales de cerdos, aunque a un coste muy alto (FCC Consortium, 2010).

Tras el éxito de los planes de acción de los países escandinavos y junto con la aparición de la Regulación EC. No. 2160/2003, surgieron nuevos PNC en otros países europeos: en Alemania y en Reino Unido en 2002 (Osterkorn *et al.*, 2001; BPEX, 2002; Snary *et al.*, 2010), en Irlanda en 2003 (Statutory Instrument No. 165/2002), en Países Bajos en 2005 (Hanssen, Swanenburg y Maassen, 2007) y en Bélgica en 2007 (Méroc *et al.*, 2012). En general, estos programas eran similares al PNC danés, centrándose en el control, pero se basaron fundamentalmente en análisis serológicos de un número relativamente pequeño de cerdos por lote sacrificado (Tabla 4). Como resultado, las explotaciones se categorizaban en tres grupos de riesgo diferentes: riesgo bajo (I), riesgo medio (II) y riesgo alto (III). Los lotes pertenecientes a la categoría III tenían que poner en marcha actividades específicas en la explotación dirigidas a reducir su exposición a *Salmonella* y, en consecuencia, su seroprevalencia de *Salmonella*. Aunque, en general, no se aplicaban penalizaciones, en algunos países se ofrecían incentivos a los ganaderos como, por ejemplo, la certificación mediante sellos de calidad de la carne de cerdo. Algunos de ellos son el *Qualität und Sicherheit* (QS) en Alemania, el *British Quality Assured Pork* (BQAP) en el Reino Unido, el *Bord Bia Quality Assurance Scheme* en Irlanda y el *1KB Nederland Varkens* en Países Bajos.

A pesar de estos esfuerzos, no hay evidencias científicas que demuestren que haya habido un cambio significativo en la reducción de la infección de *Salmonella* en cerdos ni en el número de casos humanos asociados al consumo de cerdos, manteniéndose estable la seroprevalencia global de *Salmonella* en cerdos en la casi totalidad de estos países no escandinavos (Correia-Gomes, Leonard y Graham, 2021). Únicamente Alemania ha notificado recientemente algunos resultados positivos tras más de 20 años desde la implementación de su PNC (Anónimo, 2021). Mientras tanto, el Reino Unido suspendió su programa de vigilancia serológica en 2012 (Anónimo, 2012), al igual que en Bélgica, donde el asesoramiento veterinario sobre el control de la salmonelosis porcina se ha mantenido (Anónimo, 2015).

A continuación, se describen brevemente los diferentes PNC de *Salmonella* en ganado porcino que se han llegado a implementar en algún momento en países de la UE, con algunos detalles de los mismos en Tabla 4.

6.1. Suecia

Como se ha indicado, Suecia fue el primer país en el que se instauró un PNC frente a *Salmonella*. La estrategia de control sueca consiste en prevenir la contaminación por *Salmonella* en cualquier punto de la cadena alimentaria e incluye todos los serotipos de *Salmonella* (Lewerin *et al.*, 2011; Sundström *et al.*, 2014). El objetivo es asegurar que cualquier producto alimentario de origen animal es libre de *Salmonella* (definida como prevalencia inferior al 0,1% en la canal) y que todas las explotaciones son libres de *Salmonella*, siendo todos los serotipos indetectables en la explotación. El programa de control es obligatorio y, además, las explotaciones pueden pertenecer a un programa preventivo de carácter voluntario.

En caso de que una explotación resulte positiva, se prohíbe el movimiento de los animales, se procede a una despoblación parcial del rebaño y a un control del pienso de los animales, se revisa el manejo de los purines y se procede a la limpieza y desinfección. Se

vuelve a examinar para asegurar que *Salmonella* ya no es detectable y existe una compensación del 50-70% para cubrir los gastos del ganadero en función de si pertenece o no al programa de control preventivo voluntario (Sundström *et al.*, 2014).

En matadero, se analizan los linfonodos y las canales, se retiran los productos positivos y se les aplica un tratamiento por calor o se destruyen. Además, se aplican estrictos protocolos de limpieza y desinfección y se toman muestras ambientales para comprobar el estado de las instalaciones. El programa de control incluye la vigilancia de piensos. En caso de que el pienso resulte positivo, se trata con ácidos orgánicos y se limpia y desinfecta la línea de producción.

6.2. Noruega

En Noruega, el plan nacional de vigilancia y control de *Salmonella* se implementó en 1995, con un programa similar al de Suecia y Finlandia (Jore *et al.*, 2007; Heier *et al.*, 2015). El PNC noruego es de carácter obligatorio y consiste en el examen de muestras fecales y linfonodos de los animales y de hisopos de las canales de carne fresca. El número de muestras se calcula para detectar al menos una muestra positiva de *Salmonella* si la prevalencia esperada en la población es de un 0,1%.

La detección de *Salmonella* es de notificación obligatoria independientemente del serotipo, así como la implementación de medidas para eliminar la infección y prevenir la transmisión y contaminación de productos alimentarios. El objetivo es asegurar que los animales productores de alimentos y los alimentos de origen animal sean libres de *Salmonella* con una prevalencia objetivo en las canales inferior al 0,1%.

6.3. Finlandia

En Finlandia, empezaron a aplicarse las primeras medidas para el control de *Salmonella* en los años 60. En 1995 puso en marcha su PNC de *Salmonella* en producción de carne y huevos. Es de carácter obligatorio y cubre todos los serotipos de *Salmonella* (Maijala *et al.*, 2005). Incluye actuaciones en producción primaria, mataderos y plantas de procesamiento de carne, así como en medidas de control de productos y animales importados (MMMEEO, 2000). El objetivo es mantener la prevalencia nacional de *Salmonella* en carne por debajo del 1% y la prevalencia de muestras de *Salmonella* positivas en mataderos o plantas de procesado por debajo del 5%. Los costes del programa los cubre la industria y las autoridades competentes son únicamente responsables de la inspección y supervisión, el estudio de casos sospechosos de *Salmonella* y la notificación oficial de los resultados (Maijala y Peltola, 2002). Se incluye la toma de muestras fecales de verracos para inseminación artificial, en explotaciones núcleo y explotaciones multiplicadoras, así como de casos sospechosos de salmonelosis (Maijala *et al.*, 2005). Además, también se añadió al programa la toma de muestras ambientales de los rebaños sospechosos.

En caso de detectar *Salmonella* en una explotación, matadero o planta de procesado, se aplican una serie de medidas legales que incluyen investigaciones epidemiológicas, restricciones en la venta o compra de animales y en la utilización de productos contaminados por *Salmonella*, así como procedimientos de desinfección y medidas logísticas especiales en el

matadero. Estas restricciones se derogan una vez que se ha confirmado que ya no hay *Salmonella* en la explotación (MMMEEO, 2000; Maijala *et al.*, 2005).

6.4. Dinamarca

En 1993 hubo en Dinamarca un brote de *Salmonella* asociado al consumo de cerdo que provocó más de mil casos humanos. A partir de entonces, se implementó un programa de control de *Salmonella* en todas las etapas de la cadena productiva.

En el caso del pienso, todos los componentes han de ser libres de *Salmonella*. En caso de detectar cualquier serotipo de *Salmonella*, la limpieza y desinfección del equipamiento y las instalaciones es obligatoria. Las inspecciones en las plantas de procesamiento de piensos tienen lugar de 2 a 4 veces al año (Hald *et al.*, 2012). Sin embargo, aproximadamente la mitad de las explotaciones utilizan pienso casero mezclado y estos ingredientes pueden estar contaminados.

En explotaciones núcleo y multiplicadoras se toman muestras de sangre mensuales en cerdas de 4 a 7 meses de edad para serología y se calcula un índice de *Salmonella* para cada lote basado en los resultados serológicos ponderados de los últimos tres meses (1:3:6) (Anónimo, 2019). La notificación del estatus de *Salmonella* es obligatoria para todas las explotaciones que venden cerdos. Si el índice de *Salmonella* excede un determinado umbral (>4,9) se requiere la toma de muestras fecales en los corrales para su investigación. Las explotaciones con índices muy superiores (>10) pagan una penalización por cada cerdo vendido (Anónimo, 2019). Los lotes de cerdas positivos a *S. Typhimurium*, *S. Infantis*, *S. Derby* y *S. Cholerasuis* se consideran positivos los 5 años siguientes puesto que se asume que son serotipos persistentes y durante ese periodo no se toman más muestras (Anónimo, 2019).

Los cerdos que van a matadero están sujetos a análisis serológicos de jugo muscular. En general, se toman entre 60-100 muestras por rebaño y año recogidas mensualmente (excluyendo las explotaciones que sacrifican menos de 200 cerdos al año). Las explotaciones se categorizan en tres niveles diferentes en función de la proporción de muestras seropositivas durante los tres meses previos con una ponderación mayor asignada al mes más reciente (1:1:3) (SEGES, 2020). Para lotes que no han tenido ninguna muestra positiva en los 3 meses previos el tamaño de muestra se reduce a una muestra al mes.

Cuando el nivel de *Salmonella* de una explotación cambia del Nivel 1 (bajo) al 2 (medio) o al 3 (alto), se toman muestras de heces para bacteriología. Se incentiva que los propietarios de explotaciones en los niveles 2 y 3 tomen medidas para la reducción de *Salmonella*. Además, los pagos por el matadero se reducen un 2% y un 4%, respectivamente. Los cerdos que pertenecen al Nivel 3 solo pueden ser sacrificados en determinados mataderos bajo precauciones especiales de higiene. Las canales procedentes de animales de Nivel 3 se analizan bacteriológicamente y si el nivel de contaminación excede el umbral en todas las canales de ese mismo lote se procede a su tratamiento por calor y otras medidas de procesamiento que reduzcan el riesgo.

Todos los mataderos llevan a cabo análisis bacteriológicos rutinarios de las canales. Los mataderos que exceden el nivel de *Salmonella* predeterminado en la monitorización rutinaria

de las canales están obligados a investigar las causas y a reducir la contaminación a un nivel aceptable. Además, se toman de media unas 25 muestras cecales aleatorias para vigilancia bacteriológica de la distribución de los serotipos y las resistencias antimicrobianas. El objetivo del plan actual es conseguir una prevalencia en canales inferior o igual al 1%.

6.5. Alemania

En Alemania, el programa nacional de control y vigilancia de *Salmonella* se inició en 2002 por el Sistema Alemán de Garantía de Calidad para la cadena alimentaria (QS-System; <http://www.q-s.de/en/>) (Merle *et al.*, 2011; QS, 2024). En sus inicios, era un programa de control no gubernamental de carácter voluntario que certificaba a las explotaciones participantes en el programa y a sus productos. A partir del año 2007, el programa pasó a ser obligatorio para toda la industria porcina del país.

En el PNC alemán, se categoriza el riesgo de las explotaciones de cebo en función del porcentaje de muestras seropositivas durante el último año. En cada explotación productora de más de 200 cerdos al año se deben tomar 60 muestras de sangre o de jugo muscular al año, que se analizan en laboratorios acreditados utilizando las pruebas de ELISA aprobadas. Las explotaciones se clasifican en tres categorías de riesgo en función del porcentaje de seropositividad anual (punto de corte %DO ≥ 40): categoría I de riesgo bajo (seroprevalencia $\leq 20\%$), categoría II de riesgo medio (20-40%) y categoría III de riesgo alto ($\geq 40\%$). La clasificación se actualiza trimestralmente en función de los datos de los últimos 12 meses. Las explotaciones que no cumplen con los muestreos pierden temporalmente su certificación QS hasta que se verifique una categorización válida. Las explotaciones de categoría III son objeto de investigaciones bacteriológicas y epidemiológicas y deben de tomar medidas específicas en la explotación para la reducción de *Salmonella* como la optimización de la bioseguridad o la acidificación del pienso o el agua de bebida. Las explotaciones de categoría II deben comprobar anualmente su manejo e higiene mediante una lista de verificación para identificar las debilidades relacionadas con la entrada y diseminación de *Salmonella*. Si se observa un aumento del riesgo, se han de tomar medidas inmediatas para la reducción de *Salmonella*.

En los mataderos, se lleva a cabo un sacrificio logístico que consiste en el sacrificio de los cerdos de categoría I previamente a los de categoría II y III. Además, algunos mataderos penalizan económicamente a los cerdos pertenecientes a explotaciones de categoría III.

6.6. Países Bajos

En los Países Bajos, el programa de control de *Salmonella* comenzó a ser obligatorio en 2005 para todas las explotaciones porcinas productoras de cerdos de cebo. En el PNC neerlandés, cada 4 meses se toman 12 muestras de sangre para análisis de anticuerpos frente a *Salmonella*. Las muestras se analizan mediante una prueba de ELISA. El punto de corte y los grupos de categorización son los mismos que en Alemania. Existen dos sistemas de garantía de calidad, el alemán (QS) y uno propio (1KB) que desde 2013 utilizan este sistema, cubriendo aproximadamente el 95% de las explotaciones porcinas, aunque sus resultados no están disponibles públicamente (van der Wolf, 2017).

Dentro del programa de vigilancia no hay medidas obligatorias a aplicar en explotaciones de Categoría II o III. La presión para mejorar su estatus la ejercen los mataderos alemanes, donde se sacrifica un número importante de cerdos neerlandeses.

6.7. Bélgica

En Bélgica, el plan de acción nacional frente a *Salmonella* (SAP, por sus siglas en inglés) se implementó en 2005 y desde entonces ha sufrido numerosas modificaciones (Anónimo, 2015). Inicialmente se aplicó en explotaciones con más de 30 cerdos de cebo y la evaluación se basaba en la presencia de anticuerpos específicos frente a *Salmonella* en muestras de sangre del programa de control de Aujeszky.

De 2005 a 2013, el veterinario de la explotación debía tomar aleatoriamente 12 muestras de sangre procedentes de animales de diferentes categorías de peso cada 4 meses (Méroc *et al.*, 2012). De 2013 a 2015, el tamaño muestral se redujo a 12 muestras por explotación al año (Peeters, 2019). Desde 2007, las explotaciones se han clasificado en función de su perfil serológico (valores medios del ratio S/P de la explotación de los últimos 3 muestreos). En un inicio, el gobierno belga decidió que únicamente el 10% de las explotaciones de mayor riesgo podían entrar en el programa de vigilancia para mantener un número manejable de explotaciones que tuviesen que implementar medidas de control (Laevens y Mintiens, 2005). Estas explotaciones debían implementar un plan de acción contra *Salmonella* específico. Si la explotación se mantenía como explotación de riesgo después de los 3 muestreos posteriores, se establecía un nuevo plan de acción a través de veterinarios oficiales con recomendaciones no vinculantes dirigidas a los factores de riesgo de infección por *Salmonella*. Estas explotaciones no se enfrentaban a consecuencias legales ni económicas, aunque a partir de 2008 el estatus de *Salmonella* tenía que ser notificado al matadero en el documento de Información de la Cadena Alimentaria. Esto permitía a los mataderos aplicar una serie de medidas, como el sacrificio logístico o por separado, e incluso penalizaciones. La explotación perdía su estatus de alto riesgo en cuanto reducía su ratio S/P medio ($< 0,6$).

A pesar de que el plan fue obligatorio a partir de 2007, no se observó un cambio significativo de la seroprevalencia de la población porcina belga y a partir de 2015 pasó a ser un programa voluntario mantenido únicamente por algunos sellos de calidad.

6.8. Reino Unido

En Reino Unido, se implementó en 2002 un plan de acción de zoonosis (ZAP, por sus siglas en inglés) incluyendo un programa de vigilancia y control de *Salmonella* para garantizar la calidad de los mataderos en Gran Bretaña que se extendió a Irlanda del Norte en 2003 (Hill *et al.*, 2008). El ZAP exigía que se tomaran al menos 15 muestras de jugo muscular al momento del sacrificio procedentes de todas las explotaciones cada 3 meses y se estimaba la seroprevalencia de la explotación. Como en otros programas, se asignaban tres niveles de riesgo: nivel 1 si la seroprevalencia era inferior al 50%, nivel 2 si la seroprevalencia era entre el 50 y el 75% y nivel 3 si la seroprevalencia era igual o superior al 75%. A las explotaciones de nivel 2 y 3 se les exigía adoptar un plan de acción para reducir su seroprevalencia. Las explotaciones de nivel 3 podían perder su estatus de garantía e incluso aceptar precios más bajos por sus productos en caso de mantener ese nivel por más de 11 meses.

En 2008, el ZAP fue sustituido por el Programa Nacional de Control de Zoonosis (ZNCP, por sus siglas en inglés) para *Salmonella* en cerdos. El ZNCP exigía a todos los productores adoptar un plan de acción frente a *Salmonella*. La seroprevalencia se estimaba utilizando la media anual incluyendo los resultados positivos y sospechosos, y reduciendo el punto de corte de la prueba con respecto al usado en el plan anterior (Snary *et al.*, 2010). El programa de análisis serológico se suspendió en 2012 tras 10 años de aplicación del programa sin observar una mejora significativa en la seroprevalencia (Simons *et al.*, 2017).

6.9. Irlanda

En Irlanda, en 2002 se implementó un PNC de *Salmonella* (NSCP, por sus siglas en inglés) con el objetivo de monitorizar y controlar la prevalencia de *Salmonella* en cerdos al sacrificio (Regulación SI No. 165/2002 Abattoirs Act 1966: Veterinary Examination Amendment Regulations). Las explotaciones se clasificaban en tres categorías diferentes en función de la seroprevalencia media ponderada de los últimos 3 muestreos serológicos realizados cada 4 meses (24 muestras). A las explotaciones de categoría 3 se les exigía implementar planes de control de *Salmonella* a nivel de explotación. En caso de que la seroprevalencia fuese mayor al 50% en los 3 muestreos previos, se pretendía que esa explotación perdiese su estatus de garantía de calidad, sin embargo, esta medida no se ha llegado a implementar. Las explotaciones clasificadas como de alto riesgo se separaban y sacrificaban al final del día y las cabezas y vísceras eran descartadas después de su tratamiento con calor.

En 2010, se revisó y modificó el NSCP irlandés (SI No. 521/2009 y 522/2009) y se estableció un nuevo muestreo (6 muestras/mes) estimando la seroprevalencia en función de los resultados de los últimos 3 meses y dando más peso al último mes (ponderación 1:1:3). Las explotaciones con una prevalencia >50% se clasifican como de alto riesgo y se les exige tomar medidas de control. Se mantiene el requisito de sacrificar a los cerdos procedentes de explotaciones de alto riesgo al final del día, pero el requisito de desechar la carne de la cabeza y las vísceras si no se tratan con calor se ha limitado a cerdos procedentes de explotaciones con valores superiores al 70%. La posibilidad de perder el estatus de garantía de calidad se limita a aquellas que exceden de forma continuada el punto de corte del 70% de seroprevalencia. El actual NSCP está en revisión por el programa de Sanidad Animal de Irlanda.

6.10. Estonia

En Estonia, en 2013 se implementó un programa de control de *Salmonella* basado en serotipos (*S. Enteritidis*, *S. Typhimurium*, *S. Hadar*, *S. Infantis*, *S. Virchow*, *S. Choleraesuis*, *S. Derby* y *S. Newport*), implicando tanto a las explotaciones porcinas como a los mataderos y a las plantas de procesado (STE, 2021; VTA, 2019). La autoridad competente se encarga de los muestreos. Cada año se examina un quinto de las explotaciones porcinas. Las explotaciones seleccionadas son las que han resultado positivas a *Salmonella* los años precedentes (en muestreos de explotación o de matadero) además de nuevas explotaciones no analizadas previamente. El número de muestras depende del tamaño de la explotación. En general son muestras fecales en forma de *pool* (cebos) o individuales (reproductoras). El esquema de muestreo asegura que explotaciones con una prevalencia de infección del 20% sean detectadas.

Solo se aplican restricciones en caso de que la explotación sea positiva a alguno de los serotipos de *Salmonella* incluidos en la lista. Algunas de las medidas de intervención aplicadas en las explotaciones positivas a *Salmonella* son las siguientes: separación de los animales positivos y negativos, restricción en el movimiento de animales y personas, limpieza y desinfección, manejo de los purines que destruya *Salmonella* y transporte de los animales positivos a *Salmonella* para sacrificio en condiciones y restricciones especiales. En caso de animales clínicamente enfermos se puede aplicar tratamiento médico si se considera necesario. Las restricciones a la explotación se retiran cuando dos muestras fecales individuales o muestras fecales en forma de *pool* tomadas mensualmente obtienen un resultado negativo. Además, los mataderos estonios normalmente pagan precios más bajos por la carne procedente de explotaciones positivas a *Salmonella*. En caso de que el problema sea recurrente estas empresas pueden rescindir el contrato con el ganadero (Bonardi *et al.*, 2021).

6.11. España

En España no existe un plan específico de control de *Salmonella* en ganado porcino en las explotaciones. Sólo se lleva a cabo la monitorización oficial de canales porcinas siguiendo la normativa europea (Directiva 2003/99/CE sobre la vigilancia de las zoonosis y los agentes zoonóticos) cuyos resultados son notificados a la EFSA y publicados por la agencia.

En 2016, las asociaciones catalanas de producción porcina Innovacc, Fecic, Asfac y Porcat implantaron un sistema voluntario de certificación para explotaciones y mataderos porcinos dentro del Programa de control de *Salmonella* en Porcino (PSP) (Anónimo, 2015). La monitorización del estatus de *Salmonella* se llevaba a cabo mediante serología y auditorías para comprobar el grado de cumplimiento de los requisitos de bioseguridad en la explotación. Sin embargo, no existe información disponible acerca de los resultados obtenidos ni de la continuidad de este programa.

En resumen, y tal como se ha indicado, en la mayoría de los países no escandinavos, los planes de control de *Salmonella* no han tenido el éxito esperado. Estos planes solo han funcionado en países pequeños, con condiciones climáticas y situación de partida más favorable, por lo general censos de animales no muy elevados y con mucha inversión económica. De hecho, investigadores de alguno de estos países han reconocido que probablemente no repetirían la experiencia, dado el alto coste de la misma (Dahl, 2023) Por ello, es necesario explorar posibles alternativas de control que se ajusten mejor a las características de nuestro país y permitan la reducción de los casos de *Salmonella* en personas atribuibles al consumo de carne de cerdo.

Tabla 4. Planes Nacionales de Control implementados en la Unión Europea.

País	Carácter	Objetivo	Monitorización	Nº muestras/ frecuencia	Penalizaciones	Resultado del programa
Suecia	Obligatorio (parte voluntario)	Erradicación	Bacteriología	N N/D Cebo anual, cerdas bianual	Sí	Positivo
Noruega	Obligatorio (parte voluntario)	Erradicación	Bacteriología	Lechones 2-6 meses: <i>pool</i> heces corrales (máx. 20) Si <3 corrales, heces cerdas (máx. 59). Matadero: 3000 NL/año (1-555/ matadero)	Sí	Positivo
Finlandia	Obligatorio (parte voluntario)	Erradicación	Bacteriología	Matadero: Cebo: 3000 NL y canales/año Cerdas: 3000 NL y canales/año	Sí	Positivo
Dinamarca	Obligatorio	Vigilancia y control	Bacteriología y serología	Cerdas: 10 sueros/mes Cerdos matadero: 60-100 JM /lote/ año	Sí	Positivo
Estonia	N/D	Vigilancia y control	Bacteriología	1/5 granjas Cebo: <i>pool</i> muestras fecales Reproductores: muestras fecales individuales Matadero: NL y canales	Sí	N/D
Alemania	Obligatorio	Vigilancia y control	Serología	60 muestras sangre/JM/lote/ año (10-30 muestras si <200 cerdos sacrificados /lote/año)	No	Positivo (tras 20 años)
Reino Unido	Obligatorio (mataderos QA)	Vigilancia y control	Serología	15 sueros/lote/ 3 meses	No	Abandono
Irlanda	Obligatorio	Vigilancia y control	Serología	6 sueros /lote/mes	No	N/D
Países Bajos	Obligatorio (cebo)	Vigilancia y control	Serología	12 sueros o JM /lote/4 meses	No	N/D
Bélgica	Voluntario (desde 2015)	Vigilancia y control	Serología	12 sueros /lote/año	No	Abandono

JM: muestras de jugo muscular; NL: muestras de nódulos linfáticos.

N/D: información no disponible.

JUSTIFICACIÓN Y OBJETIVOS

España ocupa el primer lugar en producción porcina en la UE con un 23% del total de carne producida y más del 27% (34,1 millones de cerdos) del censo comunitario (134,4 millones de cerdos) (Eurostat, 2022). A nivel mundial, España es la tercera potencia productora de carne de cerdo después de China y EE.UU.

La salmonelosis en el ganado porcino sigue siendo hoy en día una de las principales fuentes de infección por *Salmonella* en las personas, principalmente a través del consumo de carne y productos cárnicos derivados del cerdo contaminados por esta bacteria. Por ello se hace necesario el control de esta infección a lo largo de la cadena de producción porcina (explotaciones, mataderos y mercados). Esta situación podría ser particularmente grave en España donde se observan un gran porcentaje de infecciones por *S. Typhimurium* y su variante monofásica, ambos serotipos muy relacionados con el cerdo. Además, España ya fue señalada como uno de los países líderes en salmonelosis porcina en la UE.

Como se ha visto, deberían de tenerse en cuenta todas las etapas del ciclo de producción porcina (madres, lactación, transición, cebo) a la hora de intentar reducir el potencial riesgo de transmisión y mantenimiento de *Salmonella* en las explotaciones. Sin embargo, todavía existen lagunas en el conocimiento sobre la epidemiología de la infección que pueden complicar su control. La transición es una fase productiva escasamente estudiada y con pocos datos que permitan entender su importancia en la dinámica de la salmonelosis porcina. Controlando las infecciones de *Salmonella* en la explotación, el número de cerdos infectados con *Salmonella* que llegarían al matadero debería reducirse, resultando en una disminución del riesgo de contaminación de las canales en el momento del sacrificio.

No existe una medida de control única que permita reducir la salmonelosis de las explotaciones porcinas. Cada vez es más evidente que la complejidad de este problema exige el desarrollo de diferentes medidas que se complementen. En este sentido, el uso de ácidos orgánicos en el pienso o el agua de bebida parece ser una de las estrategias más prometedoras, pues no interfiere con ninguna otra actividad de la explotación y complementa perfectamente a otras medidas que se puedan implantar. Además, tendría efectos positivos a otros niveles (microbiota, índices de conversión, etc.).

Algunos países tomaron la decisión de iniciar PNC frente a la salmonelosis porcina en las explotaciones. España hizo un vago intento a través de las asociaciones de productores catalanas. Sin embargo, la mayoría de estos PNC se han demostrado ineficaces. La falta de eficacia y el alto coste del control de la salmonelosis porcina, especialmente en países con un gran censo porcino (FCC Consortium, 2010; Gavin *et al.*, 2018), sugieren la necesidad de revisarlos. Dado que en la UE la salmonelosis porcina es un problema de salud pública y no un problema de sanidad animal, sería aconsejable plantear nuevos enfoques que pudieran mitigar sobre todo el primero.

En España, un gran número de cerdos infectados asintóticamente con *Salmonella* (EFSA, 2011) llegan diariamente a los mataderos. Estos animales son propensos a excretar grandes cantidades de *Salmonella* (Rostagno, Eicher y Lay, 2010) y se convierten en una importante fuente de contaminación ambiental, que es probablemente el principal origen de la contaminación de las canales (Argüello *et al.*, 2013a; Swart *et al.*, 2016; Marin *et al.*, 2020).

Siendo el principal objetivo de un PNC reducir la incidencia de salmonelosis humana, centrarse en encontrar la forma de minimizar la contaminación por *Salmonella* del matadero podría ser, a corto plazo, más rentable económicamente que intentar controlar la infección dentro de las explotaciones porcinas.

Así, el presente trabajo de tesis se ha centrado en profundizar en el conocimiento de la dinámica de infección por *Salmonella* en cerdos y en proponer alternativas a los actuales PNC. El **objetivo general** era **proporcionar evidencias científicas que pudieran utilizarse para optimizar el control de *Salmonella* en la interfaz granja-matadero**. De este modo, este trabajo es un complemento a estudios previos llevados a cabo por el equipo investigador en la misma línea.

Los **objetivos específicos** fueron los siguientes:

1. Profundizar en la epidemiología de la salmonelosis porcina y conocer la situación sanitaria de los animales que entran a la fase de **transición**. Teniendo en cuenta el nuevo contexto de reducción de antibióticos y óxido de zinc, evaluar la prevalencia de infección de *Salmonella* en ausencia de antibióticos al inicio del periodo de transición en una población de lechones procedentes de explotaciones seropositivas a *Salmonella*. Determinar si la infección por *Salmonella* en las unidades de transición podría alcanzar fases de producción posteriores como las unidades de cebo y, por lo tanto, llegar a contaminar el matadero y las canales.
2. Evaluar los cambios en la **microbiota** intestinal de cerdos de cebo sanos tras utilizar durante un periodo prolongado (toda la fase de cebo) como aditivo en el pienso una fórmula de butirato de sodio protegido, un ácido orgánico utilizado habitualmente como tratamiento para el control de *Salmonella*. Valorar si los efectos observados en la microbiota podrían ser beneficiosos para la salud del animal.
3. Determinar si la serología y otras características de una explotación o de su ambiente (contaminación de *Salmonella* en los corrales, nivel de bioseguridad de la explotación, estación del año, etc.) pueden ser utilizados como **predictores** de excreción de *Salmonella* en el matadero. Predecir el riesgo de excreción de *Salmonella* de un lote determinado de cerdos a su llegada al matadero podría ayudar a prevenir la contaminación posterior de las canales mediante la implementación de estrategias de control a nivel de explotación y matadero.
4. Evaluar la eficacia de la administración en el agua de bebida de la **granja** de un **ácido fórmico esterificado** durante los días previos al sacrificio como estrategia para reducir el número de cerdos excretores de *Salmonella* que llegan al matadero, así como la carga de *Salmonella* en el tracto gastrointestinal de los mismos. Este enfoque podría utilizarse como complemento a otras medidas de control en la interfaz granja-matadero.

5. Evaluar si la adición de un **ácido fórmico esterificado** en el agua de bebida en la sala de espera del **matadero** podría ser útil para reducir la proporción de cerdos excretores de *Salmonella*, de modo que pudiese incluirse como una estrategia de mitigación adicional a nivel de matadero.
6. Con todo ello, proponer una **estrategia global de control** de *Salmonella* diferente y alternativa a las planteadas hasta la actualidad, con un enfoque integrado granja-matadero a partir de la predicción del riesgo de excreción de *Salmonella* en cerdos que llegan a matadero e incluyendo la implementación de medidas tanto a nivel de explotación como de matadero.

Los estudios conducentes a conseguir estos objetivos también ayudaron a actualizar nuestro conocimiento sobre la situación de prevalencia de infección por *Salmonella* en un área con una alta densidad de población porcina.

TRABAJOS PUBLICADOS

PUBLICACIÓN I / PUBLICATION I

***Salmonella* infection in nursery piglets and its role in the spread of salmonellosis to further production periods**

Bernad-Roche, M., Casanova-Higes, A., Marín-Alcalá, C.M, Cebollada-Solanas, A.,
Mainar-Jaime, R.C.

Pathogens 2021, 10(2):123. doi: 10.3390/pathogens10020123.

Article

Salmonella Infection in Nursery Piglets and Its Role in the Spread of Salmonellosis to Further Production Periods

María Bernad-Roche ¹, Alejandro Casanova-Higes ², Clara M. Marín-Alcalá ², Alberto Cebollada-Solanas ^{3,4} and Raúl C. Mainar-Jaime ^{1,*}

- ¹ Departamento de Patología Animal, Facultad de Veterinaria, Instituto Agroalimentario de Aragón-IA2, Universidad de Zaragoza-CITA, 50013 Zaragoza, Spain; mbernadroche@gmail.com
- ² Unidad de Producción y Sanidad Animal, Centro de Investigación y Tecnología Agroalimentaria de Aragón, Instituto Agroalimentario de Aragón-IA2, Universidad de Zaragoza-CITA, 50059 Zaragoza, Spain; casanova.alejandro89@gmail.com (A.C.-H.); cmarin@unizar.es (C.M.M.-A.)
- ³ Grupo de Genética de Micobacterias, Departamento de Microbiología, Medicina Preventiva y Salud Pública, Universidad de Zaragoza, 50009 Zaragoza, Spain; alberto@unizar.es
- ⁴ Unidad de Biocomputación, Instituto Aragonés de Ciencias de la Salud (IACS/IIS Aragón), Centro de Investigación Biomédica de Aragón (CIBA), 50009 Zaragoza, Spain
- * Correspondence: rcmainar@unizar.es; Tel.: +34-976762088



Citation: Bernad-Roche, M.; Casanova-Higes, A.; Marín-Alcalá, C.M.; Cebollada-Solanas, A.; Mainar-Jaime, R.C. *Salmonella* Infection in Nursery Piglets and Its Role in the Spread of Salmonellosis to Further Production Periods. *Pathogens* **2021**, *10*, 123. <https://doi.org/10.3390/pathogens10020123>

Academic Editors: Joana Mourão and Patrícia Antunes

Received: 10 December 2020

Accepted: 21 January 2021

Published: 25 January 2021

Publisher's Note: MDPI stays neutral with regard to jurisdictional claims in published maps and institutional affiliations.



Copyright: © 2021 by the authors. Licensee MDPI, Basel, Switzerland. This article is an open access article distributed under the terms and conditions of the Creative Commons Attribution (CC BY) license (<https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>).

Abstract: Few studies have focused on assessing *Salmonella* infection in the nursery and its role in further pig production periods. Mesenteric lymph nodes, intestinal content, and meat juice from 389 6-week-old male piglets intended for human consumption from five breeding farms and 191 pooled floor fecal samples from gilt development units (GDU) from the same farms were analyzed to estimate and characterize (by pulsed-field gel electrophoresis and antimicrobial resistance analyses) *Salmonella* infection. The prevalence of infection and shedding among piglets was 36.5% and 37.3%, respectively, shedding being significantly associated with infection (Odds Ratio = 12.7; CI 7.3–22.0). *Salmonella* Rissen; *S.* 4,[5],12:i:-; and *S.* Derby were the most common serotypes. A low level of *Salmonella*-specific maternal antibodies at the beginning of the nursery period suggested it was a period of high risk of infection. Resistance to 3rd- and 4th-generation cephalosporins was detected in piglet isolates although the piglets never received antibiotics, indicating they could be vectors of antimicrobial resistance. The same *Salmonella* clones were detected in piglet and GDU isolates, suggesting that infected piglets play a significant role in the infection of gilts and consequently of finishing pigs in the case of production farms. The control of *Salmonella* infection in nursery piglets may decrease the risk of abattoir and carcass contamination.

Keywords: nursery piglets; prevalence; *Salmonella*; swine; shedding; PFGE; zoonoses

1. Introduction

Salmonella infection is quite common in pigs in the European Union [1]. It usually courses asymptotically, but infected pigs may shed the bacterium through their feces, making them a major risk factor for carcass contamination at slaughter [2]. Since the presence of *Salmonella* during the growing–finishing phase is directly related to carcass contamination at abattoirs, main mitigation measures have been usually directed toward this production period [3–6]. However, few studies have focused on the periods previous to this one, such as the nursery, although active *Salmonella* infections have been identified in pig nurseries [7].

The so-called nursery is a period that comprises the time from weaning at 3–4 weeks of age to approximately 10 weeks of age (just before entering the growing unit). This is a critical production phase in which piglets are very susceptible to a variety of enteric infections. A common consequence of weaning is the modification of the piglets' intestinal microbiota, characterized by a significant reduction in the number of lactobacilli [8], mostly

due to sudden changes in their diet, which goes from mostly liquid (sow milk) during lactation to a solid-based diet (prestarter feed) at the beginning of the nursery, and environment [9]. These changes, along with the decay of maternal antibodies [10], the only immune protection at this age, and the usual animal stress linked to the piglet's separation from its dam and its commingling with new piglets, make weaned piglets highly prone to Gram-negative bacterial infections, such as *Escherichia coli* and *Salmonella* spp. [11].

While *E. coli* infection has been widely studied and is confirmed as a prevalent enteric pathogen at this age [12], the prevalence of *Salmonella* infection has been barely studied. However, it is accepted that weaning- or post-weaning-age pigs would be among the most clinically affected had they become infected by *Salmonella* [2]. Both are closely related bacteria that are susceptible to the same class of antibiotics, so the treatments against colibacillosis may be hindering *Salmonella* infections at this age. Indeed, until recently, the use of antimicrobials as prophylactics, mostly aminoglycosides and polymyxins (colistin), was a common practice in intensive pig husbandry systems, particularly during the nursery period [13,14]. In Spain, colistin was commonly administered, for as long as 15 days, as an in-feed antimicrobial for years, due to its high efficacy against Gram-negative bacteria [15].

In a recent study, we observed that *Salmonella* prevalence in suckling piglets from seropositive breeding farms was high, confirming that apparently healthy 4-week-old (wo) piglets may act as carriers of infection at least until weaning [16]. Considering the likely high proportion of *Salmonella*-infected piglets at weaning, it is likely that the nursery will be heavily infected by this pathogen as well. Therefore, it seems logical to think that during the past few years, *Salmonella* infection has been overlooked during the nursery period due to preventive antimicrobial treatments.

The alarming increase in antimicrobial resistance triggered the European health authorities to set up new European Union regulations on the use of colistin in veterinary medicine, and since 2015, colistin has been banned for use as a prophylactic [14]. These new regulations may favor an increasing incidence of salmonellosis in the nursery. However, to the best of the authors' knowledge, no field studies on *Salmonella* prevalence during the nursery period have been carried out so far. Thus, in this study, we first assess the prevalence of *Salmonella* infection at the beginning of the nursery period, i.e., two weeks after weaning, in a piglet population that came from a group of *Salmonella*-seropositive breeding farms. Further, we characterize by pulsed-field gel electrophoresis (PFGE) and antimicrobial susceptibility analyses the *Salmonella* isolates obtained and compare them to those isolated from gilt development units (GDU) from the same herds. Results from this study may help to shed some light on the role that *Salmonella* infection in nursery piglets may play in subsequent production periods, such as growing/finishing, and therefore in abattoir and carcass contamination.

2. Results

2.1. *Salmonella* Isolation, Serotyping, and Serology in Piglets

A total of 389 weaned piglets were sampled from *Salmonella*-seropositive breeding farms (an average of 78 piglets per farm). Piglets were sampled in all seasons (35.7% in winter, 23.4% in spring, 22.4% in summer, and 18.5% in autumn). Table 1 shows the distribution of the sampling by farm and the corresponding prevalence of infection (*Salmonella*-positive in mesenteric lymph nodes) and shedding (*Salmonella*-positive in intestinal content). The prevalence of infection varied significantly between farms, ranging from 17.5% (farm E) to 59.2% (farm D), with an average of 36.5% (95% CI 31.9–41.4). The prevalence of shedding piglets also varied significantly between farms, with a similar mean value (37.3%; 95% CI 32.6–42.2).

Table 1. Results for *Salmonella* isolation * from intestinal content (IC) and mesenteric lymph nodes (MLN) in 6-week-old nursery piglets.

Farm	No. of Piglets	No. of MLN-Positive (%)	No. of IC-Positive (%)	No. of IC- and MLN-Positive (%) **
A	96	39 (40.6)	47 (48.9)	31 (56.4)
B	75	34 (45.3)	26 (34.7)	20 (50.0)
C	89	26 (29.2)	34 (38.2)	22 (57.9)
D	49	29 (59.2)	22 (44.9)	20 (64.5)
E	80	14 (17.5)	16 (20.0)	11 (57.9)
Total	389	142 (36.5)	145 (37.3)	104 (56.8)

* International Organization for Standardization (ISO) 6579:2002/A1:2007. ** Percentage estimated from positive (either IC or MLN) piglets.

A median of 14.4 g (95% CI 13.96–15.00) of MLN was collected. No significant difference was observed between the weight of MLN-positive and MLN-negative samples (median of 15.0 and 14.1 g, respectively; $p = 0.31$).

All *Salmonella* isolates (145 from IC samples and 142 from MLN samples) were serotyped. The distribution of *Salmonella* serotypes by farm and type of sample is shown in Table 2. *Salmonella* Rissen was the most frequent serotype (42.8%) recovered from IC samples, followed by the monophasic variant of *S. Typhimurium* (*S. 4,[5],12:i:-*) (40.0%), and *S. Derby* (4.8%). A similar distribution of serotypes was observed in MLN-positive samples, with *S. 4,[5],12:i:-* (40.8%) and *S. Rissen* (31.0%) being the most prevalent, followed by *S. Brandenburg* (10.6%). *Salmonella 4,[5],12:i:-* was the only serotype present in all farms.

Table 2. Distribution of *Salmonella* serotypes in 6-week-old nursery piglets and in gilt development units (GDU) among the 5 farms.

Farm	Piglet Isolates				No. of Piglets with the Same Serotype in MLN-IC	GDU Isolates	
	IC		MLN			Serotype	No. (%)
	Serotype	No. (%)	Serotype	No. (%)			
A	Rissen	25 (53.2)	Rissen	19 (48.7)	17	Rissen	11 (78.6)
	4,[5],12:i:-	15 (31.9)	4,[5],12:i:-	17 (43.6)	9	Anatum	2 (14.3)
	Derby	4 (8.5)	Brandenburg	1 (2.6)		4,[5],12:i:-	1 (7.1)
	Kapemba	2 (4.3)	Goldcoast	1 (2.6)			
	Typhimurium	1 (2.1)	London	1 (2.6)			
B	Rissen	12 (46.2)	Rissen	8 (23.5)	5	Rissen	4 (66.6)
	4,[5],12:i:-	5 (19.2)	4,[5],12:i:-	8 (23.5)	3	Brandenburg	1 (16.7)
	Goldcoast	5 (19.2)	Goldcoast	3 (8.8)	3	4,[5],12:i:-	1 (16.7)
	Brandenburg	3 (11.5)	Brandenburg	13 (38.2)	3		
	Derby	1 (3.8)	Derby	2 (5.9)	1		
C	Rissen	23 (67.6)	Rissen	13 (50)	12	Rissen	10 (83.3)
	4,[5],12:i:-	7 (20.6)	4,[5],12:i:-	6 (23.1)	2	Derby	2 (16.7)
	Derby	2 (5.9)	Derby	5 (19.2)	1		
	Anatum	1 (2.9)	Anatum	1 (3.8)	1		
	Kedougou	1 (2.9)	Typhimurium	1 (3.8)			
D	4,[5],12:i:-	19 (86.3)	4,[5],12:i:-	18 (62.1)	15	Derby	7 (70.0)
	Goldcoast	1 (4.5)	Goldcoast	9 (31.0)	1	Rissen	3 (30.0)
	Brandenburg	1 (4.5)	Brandenburg	1 (3.4)	1		
	Ohio	1 (4.5)	Ohio	1 (3.4)	1		
E	4,[5],12:i:-	12 (75.0)	4,[5],12:i:-	9 (64.3)	8	Rissen	8 (88.9)
	Rissen	2 (12.5)	Rissen	4 (28.6)	2	4,[5],12:i:-	1 (11.1)
	Anatum	1 (6.3)	Anatum	1 (7.1)	1		
	Agona	1 (6.3)					
Total		145		142	86		51

Salmonella was not detected in 206 (52.9%) of the sampled piglets, while positive results in both MLN and IC samples were obtained for 104 (26.7%) of them. The same serotype was detected in 86 (82.7%) of the animals with positive MLN and IC cultures (Table 2). A significant association between the isolation of *Salmonella* in MLN and IC samples was observed: an MLN-positive piglet had around 12 times higher odds of shedding *Salmonella* than an MLN-negative piglet (OR = 12.7; CI 7.3–22.0; $p < 0.001$) once the season and farm effects were accounted for (Table 3).

Table 3. Association between *Salmonella* shedding and *Salmonella* infection in 6-week-old nursery piglets by mixed logistic regression analysis *.

	No. of Piglets	No. (%) of IC-Positive Piglets	Logistic Regression Parameters		
			OR	95% CI (OR)	<i>p</i>
MLN					
Negative ¹	247	41 (16.6)	1	-	-
Positive	142	104 (73.2)	12.71	7.33–22.05	<0.001
Season					
Winter ¹	139	33 (23.7)	1	-	-
Spring	91	26 (28.6)	1.17	0.55–2.51	0.672
Summer	87	56 (64.4)	2.69	1.31–5.55	0.007
Autumn	72	30 (41.7)	2.53	1.22–5.26	0.013

* Farm used as grouping factor. ¹ Reference category. IC: intestinal content; MLN: mesenteric lymph nodes; OR: odds ratio.

Regarding serological results, the median optical density percentage (OD%) value for the 389 sampled animals was 4.7 (95% CI 3.0–6.0). No significant differences were observed between MLN-negative and MLN-positive piglets (median of 4.8 and 4.7, respectively; $p = 0.5$). No significant differences were observed either in OD% values between IC-negative and IC-positive piglets (median of 5.2 and 4.0, respectively; $p = 0.1$).

2.2. *Salmonella* Isolation, Serotyping, and Serology in Gilt Development Units (GDU)

A total of 191 pooled floor fecal samples from 5 GDU were collected. *Salmonella* was isolated from 51 of them (26.7%; 95% CI 20.9–33.4), but the proportion of positive samples in the growing units varied among farms, ranging from 17.5% to 43.8% (Table 4). The most frequent serotype was *S. Rissen* (70.6%), which was present in all farms (A, B, C, D, and E), followed by *S. Derby* (17.6%; farms C and D) and *S. 4,[5],12:i:-* (5.9%; farms A, B, and E). In all the farms, except farm D, the serotypes found in the GDU were also detected in the nursery piglets (Table 2). Thus, the same serotypes, i.e., *S. 4,[5],12:i:-* and *S. Rissen* in farm A; *S. 4,[5],12:i:-*, *S. Rissen*, and *S. Brandenburg* in farm B; *S. Rissen* and *S. Derby* in farm C; and *S. 4,[5],12:i:-* and *S. Rissen* in farm E, were observed in piglets and floor samples from gilt units (Table 2).

Four hundred and twenty-one gilt serum samples were available from four farms (A, B, C, and E; Table 4). The mean seroprevalence was 24.2% (95% CI 20.4–28.5). Among gilt units, seroprevalence varied slightly (from a minimum of 19.3% in farm E to a maximum of 31.9% in farm A).

Table 4. Results for *Salmonella* isolation * in floor fecal samples from gilt development units and *Salmonella* seroprevalence ** in gilts from the 5 farms.

Farm	No. of Floor Fecal Samples	No. of Positive Floor Fecal Samples (%) *	No. of Serum Samples	No. of Seropositive Samples (%) **
A	32	14 (43.8)	91	29 (31.9)
B	24	6 (25.0)	90	25 (27.8)
C	32	12 (37.5)	90	19 (21.1)
D	57	10 (17.5)	NA	-
E	46	9 (19.6)	150	29 (19.3)
Total	191	51 (26.7)	421	102 (24.2)

* ISO 6579:2002/A1:2007. ** Considering a cutoff value of OD% $\geq 40\%$ (Herdcheck Swine *Salmonella* ELISA test, IDEXX Laboratories, USA); NA: not available.

2.3. Pulsed-Field Gel Electrophoresis (PFGE)

PFGE analysis was performed when the same *Salmonella* serotype was detected in piglets and floor fecal samples from gilt units from the same farm. Thus, a total of 37 *Salmonella* isolates from IC-positive piglets (15 from farm A, 9 from farms B and C, and 4 from farm E) and 17 from the GDU (5 from farm A, 2 from farm B, 6 from farm C, and 4 from farm E) were submitted for PFGE analysis. Isolates of *S. Brandenburg* from the gilt unit of farm B were not available.

PFGE analysis of these 54 *Salmonella* isolates showed 12 different *Xba*I patterns (based on a similarity cutoff of $\geq 90\%$) (Figure 1). Observed PFGE clusters matched well with serotypes and antimicrobial resistance (AMR) profiles. When analyzed by serotype, six main clusters were observed for *S. 4,[5],12:i:-*, four for *S. Rissen*, and two for *S. Derby*.

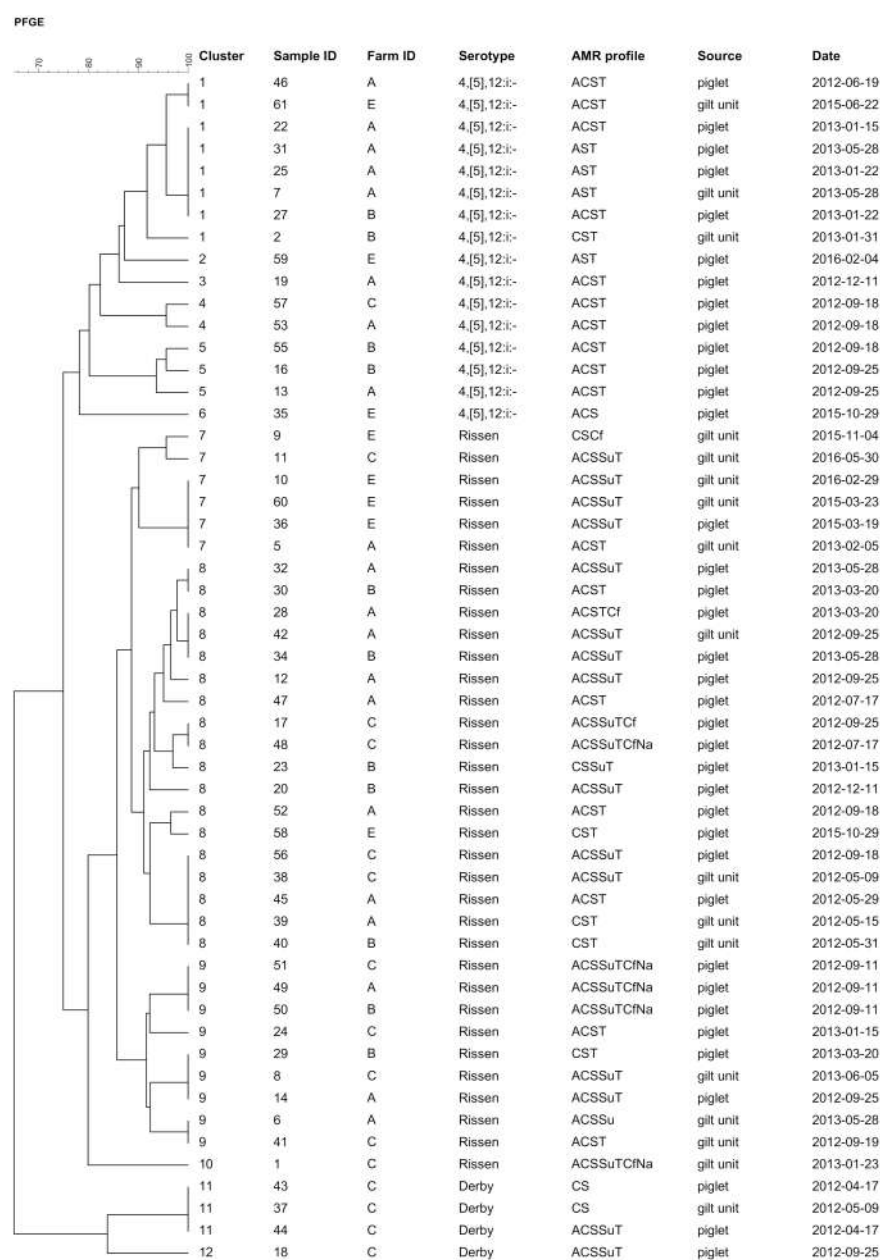


Figure 1. Dendrogram showing the main *Xba*I pulsed-field gel electrophoresis (PFGE) patterns ($\geq 90\%$ homology) for 54 *Salmonella* strains isolated from piglets' intestinal content and GDU from 4 farms (A, B, C, and E). A, aminopenicillins; C, phenicols; S, aminoglycosides; Su, sulfonamides; T, tetracyclines; Na, quinolones; Cf, 3rd- or 4th-generation cephalosporins.

Salmonella isolates from the GDU were grouped into six different PFGE patterns, and within five of them isolates from piglets from the corresponding farm were included (patterns 1, 7, 8, 9, and 11; Figure 1). Overall, 75.7% of the piglet isolates analyzed were included within these five clusters. At least one genetic relationship between *Salmonella* isolates from piglet fecal samples and floor fecal samples from the corresponding GDU was detected in all four farms.

In the case of isolates from piglets, genetically similar serotypes were detected on several occasions within the same farm and sometimes more than 150 days apart (i.e., *S.* 4,[5],12:i:- and *S.* Rissen in farm A, *S.* Rissen in farm B, and *S.* Rissen and *S.* Derby in farm C).

When looking at pairs of homologous *Salmonella* isolates coming from piglets and GDU, isolates of five of these pairs were collected within a short (<1 month) period of time, namely one *S.* Rissen pair from farm A, one *S.* 4,[5],12:i:- from farm B, one *S.* Rissen and one *S.* Derby from farm C, and one *S.* Rissen from farm E. In another five pairs, the piglet isolates were collected far before (>150 days before) the gilt samples (one *S.* Rissen from farm A, one *S.* 4,[5],12:i:- from farm B, one *S.* Rissen and one *S.* Derby from farm C, and one *S.* Rissen from farm E). In two more (one *S.* Rissen from farm B and one from farm C), the piglet isolates were collected far after gilt samples had been obtained (Figure 1).

2.4. Antimicrobial Resistance

All 54 isolates submitted to PFGE were also tested for AMR against 17 antimicrobial agents, as described below. All but two *S.* Derby displayed multidrug resistance (MDR), both isolated from farm C (Table 5). A total of 11 multi-AMR profiles were detected, the most common being ACST ($n = 17$ 31.5%) and ACSSuT ($n = 15$, 27.8%), both of them mostly associated with *S.* Rissen and detected in all the farms (Figure 1). The most common phenotypic resistance was against florfenicol (92.6%), tetracycline (90.7%), ampicillin (83.3%), and trimethoprim-sulfamethoxazole (42.6%).

Table 5. Antimicrobial resistance (AMR) patterns found in the 54 *Salmonella* isolates from 6-week-old nursery piglets and gilt development units.

AMR Family Pattern *	No. of Strains	Serotypes Involved (No. of Strains)	Farm
ACS	1	4,[5],12:i:-	E
ACSSu	1	Rissen	A
ACSSuT	15	Rissen (13), Derby (2)	A, B, C, E
ACSSuTCf	1	Rissen	C
ACSSuTCfNa	5	Rissen	A, B, C
ACST	17	4,[5],12:i:- (10), Rissen (7)	A, B, C, E
ACSTCf	1	Rissen	A
AST	4	4,[5],12:i:-	A, E
CS	2	Derby	C
CSCf	1	Rissen	E
CSSuT	1	Rissen	B
CST	5	Rissen (4), 4,[5],12:i:- (1)	A, B, E

* A, aminopenicillins; C, phenicols; S, aminoglycosides; Su, sulfonamides; T, tetracyclines; Na, quinolones; Cf, 3rd- or 4th-generation cephalosporins.

Regarding resistance to antimicrobials of critical importance for humans, no AMR against carbapenems (imipenem) or polymyxins (colistin) was detected in any of the isolates analyzed. However, AMR against cephalosporins of 3rd (ceftiofur) and 4th (cefquinome) generations was detected in 13.0% (7/54) and 5.6% (3/54) of the isolates, respectively. All of them were *S.* Rissen.

3. Discussion

To properly assess the true prevalence of *Salmonella* infection in nursery units at a pig farm is quite challenging and expensive, as it requires the killing of a large number of young animals (between 4 and 10 weeks of age) that are usually intended for other purposes,

i.e., either for slaughter at market age (5–6 months old) or as replacement animals. For this study, piglets came from five breeding farms where female weaned piglets were raised as re-stocking gilts for other pig production farms, while male piglets were fattened up to 7–9 kg live weight and then slaughtered for human consumption. These male piglets were weaned when they were 4 wo and fed for two more weeks, until slaughtering. This management allowed us to analyze MLN, IC, and meat juice samples in order to obtain a good assessment of the true *Salmonella* incidence status of these piglets. In addition, these piglets came from *Salmonella*-seropositive breeding herds [16] and had not been treated with antibiotics, as they were to be slaughtered. Thus, this approach could somewhat reflect what may be happening in nursery piglets from *Salmonella*-seropositive production herds.

The overall percentage of *Salmonella*-infected (MLN-positive) piglets was 36.5% (95% CI 31.9–41.4) but was variable across pig farms (from 17.5% to 59.2%). A similar proportion of piglets (37.3%; 95% CI 32.6–42.2) could be considered *Salmonella* shedders as the bacterium was found in their IC (Table 1). Few field studies have been carried out on *Salmonella* prevalence at this stage, and when performed through the sampling of live piglets, results suggested active infection but the recovery levels of fecal *Salmonella* were usually much lower [7,17]. Two major issues would help to understand the differences between this and previous studies. First, we analyzed 25 g of fecal content, the amount required according to the ISO 6579:2002/A1:2007 standard and significantly larger than that collected through swabbing. Second, this study only included piglets from breeding farms with high levels of *Salmonella* seropositivity. A good match was also found between animal infection and shedding at this age, with the odds of shedding *Salmonella* being more than 12 times higher for an MLN-positive piglet compared to an MLN-negative one (Table 3). This relationship was further supported by the detection of the same *Salmonella* serotype on MLN and IC in most (82.7%) of the piglets that had been positive in both types of samples. Shedding the bacterium through feces is the main mechanism of transmission of *Salmonella* and is common when animals are infected for the first time or when infected animals suffer episodes of stress, such as commingling or transport [11]. Given the age of these piglets, they had probably been infected very recently, besides suffering such stress factors as they had been sent to slaughter. In addition, an unknown number of new infections may have also occurred during transport and/or lairage [18,19]. Altogether, this would help to explain the high level of shedding among these piglets. From these results, it can be derived that most of the post-weaning pigs that become infected with *Salmonella* are also asymptomatic, and in contrast to what was expected [2], it appears that when compared to older piglets, they would not be more clinically affected. Thus, salmonellosis may be easily overlooked during the nursery period as well, regardless of the use of antimicrobials. In any case, this high prevalence of infection and shedding was not a surprising result, since similar findings were observed in a previous study on weaned (4-wo) pigs from the same farms [16].

No differences were found regarding serological OD% values between infected and non-infected piglets (median OD% of 4.7 and 4.8, respectively), these values being similar to those found in piglets of the same age in other studies [20]. However, on average, OD% values were much lower than those found in the previous study on 4-wo piglets from the same farms (15.9%; [16]), evidencing the likely significant decay of maternally derived IgGs against *Salmonella* within the two weeks after weaning [7]. It seems that the beginning of the nursery may be a period of high susceptibility to the infection and that measures to prevent exposure to *Salmonella* should be encouraged at this time.

One of the aims of this study was to determine whether *Salmonella* infection from nursery units will be able to reach further production phases, that is, the growing units. For that purpose, floor fecal samples from the GDU, from each of corresponding breeding farms under study, were collected in order to detect *Salmonella*. All the gilt units were *Salmonella* positive, with an overall proportion of positive samples of 26.7% (Table 4). This figure would be within the expected range of *Salmonella*-positive fecal samples for growing/finishing pig units in Spain [1,21] but probably underestimates the true proportion

of positive samples, given the relative low sensitivity of the bacteriological culture when performed on fecal samples from asymptomatic animals [5].

The main serotypes detected in these gilt units were *S. Rissen*, followed by *S. Derby* and *S. 4,[5],12:i:-*. The three of them were also the most common serotypes detected in the piglets, suggesting that these serotypes were circulating between both production periods even when the GDU were located kilometers away from their corresponding nurseries (i.e., farm E). To further confirm this hypothesis, PFGE analysis was performed on *Salmonella* isolates when the same serotype was found in piglets and gilt units from a given farm. PFGE analysis showed that most of the *Salmonella* isolates from piglets were grouped with gilt isolates, indicating a high level of genetic similarity ($\geq 90\%$) between them. Despite the small number of isolates analyzed, this match was found at least once in all four farms where these isolates were recovered and it was detected for the three serotypes, supporting the maintenance of *Salmonella* infection between the nursery and the growing unit and the role that piglets may play in it.

Within a given nursery unit, the same clone of *Salmonella* could be detected for a long period of time (>150 days apart) involving different batches of piglets. Besides, no particular temporal pattern of infection between piglets and gilt units was detected either (a given *Salmonella* isolate could be found at the same time or first in nursery piglets and later in the gilt units, or vice versa). These results suggested that cross-contamination between units within farms and/or a lack of proper pen hygiene are major issues in these farms, highlighting the difficulties of eliminating *Salmonella* from the farm environment despite high internal hygiene and biosecurity standards. These results would also help to explain, in part, the origin of the *Salmonella* infection in the GDU and the further *Salmonella* infection in sow herds [22].

It is worth noting that *S. Derby* appears as one of the most frequent serotypes found in breeding farms ($\sim 30\%$) [23] and is commonly found throughout the pig production pyramid, which would support the hypothesis that this serotype is easily transmitted by the transfer of animals between units or herds [24]. With regard to *S. Rissen* and *S. 4,[5],12:i:-*, both were also reported in the European survey mentioned above and both have experienced a worldwide expansion in the past few decades [25,26]. In a recent report from the Spanish Ministry of Agriculture, Fish and Food, the monophasic variants of *S. Typhimurium* and *S. Rissen* were the most prevalent serotypes found in a national survey carried out on slaughtered pigs in 2019 (35.4% and 23.8%, respectively), followed by *S. Derby* (13.1%) [27]. Both *S. Derby* and *S. 4,[5],12:i:-* are among the main pig-related serotypes associated with human salmonellosis in the EU in the past few years [28–32], while *S. Rissen* is considered a significant cause of foodborne salmonellosis in Asia and southern European countries [26,33]. To the best of the authors' knowledge, there are no reports so far on the main *Salmonella* serotypes associated with contamination of piglet meat or showing possible links between consumption of piglet meat and human salmonellosis. However, considering these results, health authorities should be aware of the potential risk of contamination of piglet carcasses due to the arrival of infected piglets at the abattoir.

Ninety-eight percent of the *Salmonella* isolates displayed multidrug-resistant phenotypes, with most of them showing resistance profiles commonly reported in *Salmonella* (ACSSu, ACSSuT, ACST, etc.). No AMR was found against antibiotic classes considered of critical importance for humans, such as carbapenems and polymyxins [34], but a significant proportion of isolates (12.9%) presented resistance to 3rd-generation cephalosporins and even to cefquinome (5.5%), a 4th-generation cephalosporin. This type of resistance, detected only in *S. Rissen* isolates, was much more prevalent than that reported in pigs for the EU (1.1%) [35]. The worldwide emergence of resistance to extended-spectrum cephalosporins in non-typhoidal *Salmonella* is already a matter of concern [36], particularly when harbored by *Salmonella* serotypes of potential zoonotic character [37]. In this case, most of the resistant isolates (75%) were found in piglets intended for human consumption. Thus, they could be considered potential vectors for the transmission of this resistance to humans, although they never received antibiotics.

In summary, nursery pigs can become subclinically infected and act as active carriers of *Salmonella* in a farm, as the same *Salmonella* clones were observed in piglets and in the GDU. This finding suggests that piglets play a significant role in the infection of finishing pigs in production farms as well. Therefore, *Salmonella* infection in nursery piglets should be considered a potential risk factor for abattoir contamination, and the control of *Salmonella* infection at this stage may help to decrease the risk of carcass contamination. Considering that a significant source of *Salmonella* for nursery pens would be the sows [16], sows would then be a significant source of *Salmonella* infection for gilts and finishing pigs [38,39]. Indeed, a recent risk assessment model adapted specifically for Spain showed that sow prevalence is a strong indicator of slaughter pig prevalence [40]. Our results support theirs. Defining proper strategies that prevent *Salmonella* shedding from sows should be a major goal in any production/breeding pig farm. Factors that could be related to *Salmonella* infection/shedding in sows (i.e., dry/pellet feed, inefficient disinfection protocols, type of floor, etc.) [39,41,42] should then be avoided. The implementation of feed strategies (organic acids, essential oils, prebiotics, etc.) to reduce somehow the level of infection and shedding in the farms [43,44], or even the vaccination of sows [45,46], may also be advisable. These strategies could be implemented directly in nursery piglets as well [47,48]. In addition, minimizing the use of antibiotics in production/breeding farms would appear as another goal to prevent further spread of AMR to fattening pigs and gilts [26] and may reduce *Salmonella* shedding as well [49].

4. Materials and Methods

4.1. Farm Selection

The study was carried out on five multiplier/supplier swine breeding farms (herd size between 700 and 940 sows) from the northeast part of Spain (A, B, C, D, and E), where half of the Spanish pig census is concentrated. Farms A, B, and C belonged to one company and D and E to a different one. All these farms had shown *Salmonella* seroprevalence $\geq 50\%$, and *Salmonella* was detected, on average, in 22% of the sow fecal samples analyzed from them [16]. The farms were chosen due to the farmers' and corresponding veterinarians' willingness to participate in the study. The sampling was carried out in two periods, between January 2012 and May 2013 (farms A, B, and C) and between February 2015 and February 2016 (farms D and E).

These breeding farms keep female weaned piglets as re-stocking gilts for other pig production farms. However, male weaned piglets are usually sent to slaughter for meat, either at weaning age (4 wo) or after a period of two weeks in the nursery (6 wo). The samples analyzed in this study belonged to 6-wo male piglets.

4.2. Collection of Samples

Piglet samplings were obtained at the abattoir. On a given day, whole intestinal packages from a certain number of animals from a given batch from a farm were collected directly at the slaughter line. There was no routine sampling schedule as the number of available piglets and sampling times were dependent upon both piglet availability from any of the five selected farms and abattoir readiness for collaboration that day. The intestinal packages were then submitted to the laboratory for immediate processing. The maximum-possible amount of mesenteric lymph nodes (MLN) and a minimum of 25 g of intestinal content (IC) were collected for bacteriological analysis. A piece of the diaphragm muscle was also collected for serological analysis.

During the period of piglet sampling, and every 3–4 months, floor fecal samples were also collected by farm veterinarians from GDU from the corresponding farms. In addition, serum samples from a representative number of these gilts were available for that period from the official eradication campaign against Aujeszky's disease. Fecal and serum samples were useful in identifying circulating *Salmonella* serotypes during the growing period and assessing the serological status of the growing gilts, respectively.

4.3. Bacteriology

Detection of *Salmonella* isolates in both IC and MLN samples was performed according to the ISO 6579:2002/A1:2007 standard. Briefly, fresh MLN samples were first defatted, weighed, and externally decontaminated by dipping them into absolute alcohol and further flaming them. Afterward, the samples were homogenized in buffered peptone water (BPW; Panreac Química SAU, Castellar del Vallés, Spain) in 1:10 dilution and incubated for 18 ± 2 h at 37 ± 1 °C. Thereafter, three drops (33 µL each) of incubated BPW were inoculated into a modified semisolid Rappaport Vassiliadis medium (MSRV; Oxoid Ltd., Hants, UK), and plates were incubated for 24 ± 3 h at 41.5 ± 1 °C (negative samples were re-incubated for an additional 24 h). Ten microliters of the presumptive *Salmonella* growth (detected by the halo generated in MSRV after 24 or 48 h) was transferred to two selective media (xylosine lysine deoxycholate (XLD) and brilliant green (BG) agars) (Panreac Química SAU, Castellar del Vallés, Spain). One suspected colony per plate from each *Salmonella*-positive MLN and IC sample was confirmed biochemically (triple sugar iron (TSI) agar, urea agar, L-lysine decarboxylation medium, and indole reaction) (Panreac Química SAU, Castellar del Vallés, Spain) and further serotyped (sera obtained from the Statens Serum Institut, Copenhagen, Denmark) at the National Reference Laboratory for Animal Salmonellosis in Madrid, Spain, following the White–Kauffmann–Le Minor scheme [50].

4.4. Pulsed-Field Gel Electrophoresis Analysis

To assess the genetic relationship between the *Salmonella* strains shed by piglets and *Salmonella* contamination in the GDU, PFGE analysis was performed (CHEF-DR® III System, BIO-RAD, Madrid, Spain) on *Salmonella* isolates according to the pulse net protocol [51]. This technique is broadly recognized as a sensitive method for the molecular fingerprinting of *Salmonella* serotypes and is very useful for tracing the spread of this bacterium through the different pig production phases [24].

Only isolates from piglets' fecal samples and floor fecal samples from the gilt unit from the same farm that showed the same serotype were analyzed. If several isolates met this criterion, then a maximum of two piglet isolates and two gilt isolates per batch were analyzed.

PFGE pattern analysis was performed with the BIONUMERICS software (version 6; Applied Maths, Sint-Martens-Latem, Belgium) using Dice's coefficient and the unweighted pair group method with arithmetic averages (UPGMA dendrogram type) with a position tolerance of 1.5% and optimization of 2.0%.

4.5. Antimicrobial Agent Susceptibility

AMR tests were also performed on isolates submitted for PFGE analysis in order to further characterize them. Susceptibility to aminopenicillins (A; ampicillin, amoxicillin-clavulanic acid), phenicols (C; florfenicol), aminoglycosides (S; gentamicin, neomycin), sulphonamides and dihydrofolate reductase inhibitors (Su; trimethoprim-sulfamethoxazole), tetracyclins (T; tetracycline), cephalosporins (Cf; cephalexin, cefalotin, cefoperazone, ceftiofur, cefquinome), polymyxins (Po; colistin), carbapenems (Cm; imipenem), and quinolones (Na; flumequine, enrofloxacin, marbofloxacin) was assessed by the VITEK-2 automated system with VITEK GN96 cards (BioMérieux, Marcy-l'Étoile, France). The minimum inhibitory concentration (MIC) was obtained for each *Salmonella* strain and further classified as resistant, intermediate, or susceptible according to the Clinical and Laboratory Standard Institute recommendations [52]. An isolate displaying phenotypic resistance to at least three antimicrobial classes was considered multidrug resistant [53].

For assessing colistin resistance, MICs were determined by the broth microdilution method according to the ISO 20776-1:2006 standard. An epidemiological cutoff (ECOFF) value of > 2 mg/L was used for considering microbiological resistance according to the recommendations of the European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing [54].

Escherichia coli ATCC 25922 and *E. coli* B13129OT (kindly provided by Dr. González-Zorn's lab) were used as quality negative and positive control strains.

4.6. Serology

For the detection of specific antibodies (IgG) against *Salmonella* spp., meat juice (MJ) from piglets' diaphragm muscle was used. MJ samples were obtained after freezing and further thawing a portion of the muscle. For gilts, blood serum samples were collected. Both piglet MJ and gilt serum samples were kept at -20°C until their use. The Herdcheck Swine *Salmonella* ELISA test (IDEXX Laboratories, Westbrook, ME, USA) was used following the manufacturer's instructions. This test targets the main swine *Salmonella* serogroups (B, C1, and D). For piglets, results were presented as OD% values. In the case of gilts, and given the expected low specificity of the ELISA test used [55,56], a cutoff value of $\text{OD}\% \geq 40$ was deemed to classify a gilt as seropositive.

4.7. Statistical Analysis

Prevalence of *Salmonella* infection and shedding among piglets and their corresponding 95% confidence intervals (95% CI) were estimated. Since the weight of MLN samples may differ among piglets and therefore may influence bacteriological results, the median MLN sample weight was compared between *Salmonella*-positive and *Salmonella*-negative piglets by means of the Mann–Whitney test for independent samples to detect potential bias. The relationship between piglet shedding and infection was assessed by mixed logistic regression after adjusting by season and considering farm as a grouping factor (gllamm module in STATA software). ELISA OD% values between *Salmonella*-infected and non-infected piglets were compared using the Kruskal–Wallis test. The software STATA (STATA/IC 12.1. Stata-Corp. LP, College Station, TX, USA) was used for statistical analyses.

Author Contributions: Conceptualization, R.C.M.-J.; methodology, R.C.M.-J., M.B.-R., and A.C.-H.; formal analysis, R.C.M.-J., M.B.-R., and A.C.-S.; investigation, R.C.M.-J., M.B.-R., and A.C.-H.; writing—original draft preparation, M.B.-R. and R.C.M.-J.; writing—review and editing, M.B.-R., R.C.M.-J., C.M.M.-A., and A.C.-H.; supervision, R.C.M.-J.; and project administration and funding acquisition, R.C.M.-J. and C.M.M.-A. All authors have read and agreed to the published version of the manuscript.

Funding: This work was partially supported by the National Institute for Agricultural and Food Research and Technology (INIA; Ref. RTA2012-24) and by the Ministry of Science and Innovation (Ref. RTI2018-093915-B-I00). A.C.-H. was the recipient of a national fellowship (Ref. INIA-FPI 2014).

Institutional Review Board Statement: Not applicable. Ethical review and approval were waived for this study due to no interventions on live animals were performed. All animals sampled had been previously slaughtered at a commercial abattoir.

Informed Consent Statement: Not applicable.

Data Availability Statement: Data available upon request.

Acknowledgments: We thank pig production companies and their technical staff, farmers, and the abattoir for their collaboration in carrying out the field work.

Conflicts of Interest: The authors declare no conflict of interest.

References

1. European Food Safety Authority (EFSA). Report of the Task Force on Zoonoses Data Collection on the analysis of the baseline survey on the prevalence of *Salmonella* in slaughter pigs in the EU, 2006–2007. Part A: *Salmonella* prevalence estimates. *EFSA J.* **2008**, *135*, 1–111. [[CrossRef](#)]
2. Bonardi, S. *Salmonella* in the pork production chain and its impact on human health in the European Union. *Epidemiol. Infect.* **2017**, *145*, 1513–1526. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
3. Argüello, H.; Álvarez-Ordoñez, A.; Carvajal, A.; Rubio, P.; Prieto, M. Role of slaughtering in *Salmonella* spreading and control in pork production. *J. Food Prot.* **2013**, *76*, 899–911. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]

4. Swart, A.; Simons, R.; Evers, E.; Snary, E.; Swanenburg, M. Modeling of *Salmonella* contamination in the pig slaughterhouse. *Risk Anal.* **2016**, *36*, 498–515. [\[CrossRef\]](#)
5. Alban, L.; Baptista, F.M.; Møgelmoose, V.; Sørensen, L.L.; Christensen, H.; Aabo, S.; Dahl, J. *Salmonella* surveillance and control for finisher pigs and pork in Denmark—A case study. *Food Res. Int.* **2012**, *45*, 656–665. [\[CrossRef\]](#)
6. Méroc, E.; Strubbe, M.; Vangroenweghe, F.; Czaplicki, G.; Vermeersch, K.; Hooyberghs, J.; Van Der Stede, Y. Evaluation of the *Salmonella* surveillance program in Belgian pig farms. *Prev. Vet. Med.* **2012**, *105*, 309–314. [\[CrossRef\]](#)
7. Nair, S.; Farzan, A.; Poljak, Z.; Friendship, R. Identifying Active *Salmonella* Infections in Swine Nurseries Using Serology and Bacterial Culture and Evaluating Associated Risk Factors. *Animals (Basel)* **2020**, *10*, 1517. [\[CrossRef\]](#)
8. Konstantinov, S.R.; Awati, A.A.; Williams, B.A.; Miller, B.G.; Jones, P.; Stokes, C.R.; Akkermans, A.D.; Smidt, H.; De Vos, W.M. Post-natal development of the porcine microbiota composition and activities. *Environ. Microbiol.* **2006**, *8*, 1191–1199. [\[CrossRef\]](#)
9. Gresse, R.; Chaucheyras-Durand, F.; Fleury, M.A.; Van De Wiele, T.; Forano, E.; Blanquet-Diot, S. Gut Microbiota Dysbiosis in Postweaning Piglets: Understanding the Keys to Health. *Trends Microbiol.* **2017**, *25*, 851–873. [\[CrossRef\]](#)
10. Bianchi, A.T.; Moonen-Leusen, H.W.; Van Der Heijden, P.J.; Bokhout, B.A. The use of a double antibody sandwich ELISA and monoclonal antibodies for the assessment of porcine IgM, IgG and IgA concentrations. *Vet. Immunol. Immunopathol.* **1995**, *44*, 309–317. [\[CrossRef\]](#)
11. Callaway, T.R.; Morrow, J.L.; Edrington, T.S.; Genovese, K.J.; Dowd, S.; Carroll, J.; Dailey, J.W.; Harvey, R.B.; Poole, T.L.; Anderson, R.C.; et al. Social stress increases fecal shedding of *Salmonella* Typhimurium by early weaned piglets. *Curr. Issues Intest. Microbiol.* **2006**, *7*, 65–71. [\[PubMed\]](#)
12. Weber, N.R.; Nielsen, J.P.; Hjulsgaard, C.K.; Jorsal, S.E.; Haugegaard, S.; Hansen, C.F.; Pedersen, K.S. Comparison of bacterial culture and qPCR testing of rectal and pen floor samples as diagnostic approaches to detect enterotoxigenic *Escherichia coli* in nursery pigs. *Prev. Vet. Med.* **2017**, *143*, 61–67. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
13. European Medicines Agency: EMA/CVMP/AWP/158821/2014—Concept Paper on Use of Aminoglycosides in Animals in the European Union: Development of Resistance and Impact on Human and Animal Health. July 2014. Available online: https://www.ema.europa.eu/en/documents/scientific-guideline/concept-paper-use-aminoglycosides-animals-european-union-development-resistance-impact-human-animal_en.pdf (accessed on 30 November 2020).
14. European Medicines Agency: EMA/CVMP/CHMP/231573/2016—Updated Advice on the Use of Colistin Products in Animals within the European Union: Development of Resistance and Possible Impact on Human and Animal Health. July 2016. Available online: https://www.ema.europa.eu/en/documents/scientific-guideline/updated-advice-use-colistin-products-animals-within-european-union-development-resistance-possible_en-0.pdf (accessed on 30 November 2020).
15. Quesada, A.; Porrero, M.C.; Téllez, S.; Palomo, G.; García, M.; Domínguez, L. Polymorphism of genes encoding PmrAB in colistin-resistant strains of *Escherichia coli* and *Salmonella enterica* isolated from poultry and swine. *J. Antimicrob. Chemother.* **2015**, *70*, 71–74. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
16. Casanova-Higes, A.; Marín-Alcalá, C.M.; Andrés-Barranco, S.; Cebollada-Solanas, A.; Alvarez, J.; Mainar-Jaime, R.C. Weaned piglets: Another factor to be considered for the control of *Salmonella* infection in breeding pig farms. *Vet. Res.* **2019**, *50*, 45. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
17. Ainslie-García, M.H.; Farzan, A.; Newman, J.E.; Friendship, R.M.; Lillie, B.N. *Salmonella* fecal shedding in pigs from birth to market and its association with the presence of *Salmonella* in palatine tonsils and submandibular lymph nodes at slaughter. *Can. J. Vet. Res.* **2018**, *82*, 249–255.
18. Mannion, C.; Fanning, J.; McLernon, J.; Lendrum, L.; Gutierrez, M.; Duggan, S.; Egan, J. The role of transport, lairage and slaughter processes in the dissemination of *Salmonella* spp. in pigs in Ireland. *Food Res. Int.* **2012**, *45*, 871–879. [\[CrossRef\]](#)
19. Hernández, M.; Gómez-Laguna, J.; Luque, I.; Herrera-León, S.; Maldonado, A.; Reguillo, L.; Astorga, R.J. *Salmonella* prevalence and characterization in a free-range pig processing plant: Tracking in trucks, lairage, slaughter line and quartering. *Int. J. Food Microbiol.* **2013**, *162*, 48–54. [\[CrossRef\]](#)
20. Cevallos-Almeida, M.; Fablet, C.; Houdayer, C.; Dorenlor, V.; Eono, F.; Denis, M.; Kerouanton, A. Longitudinal study describing time to *Salmonella* spp. seroconversion in piglets on three farrow-to-finish farms. *Vet. Rec. Open* **2019**, *6*, e000287. [\[CrossRef\]](#)
21. García-Feliz, C.; Carvajal, A.; Collazos, J.A.; Rubio, P. Herd-level risk factors for faecal shedding of *Salmonella enterica* in Spanish fattening pigs. *Prev. Vet. Med.* **2009**, *91*, 130–136. [\[CrossRef\]](#)
22. Davies, P.R.; Funk, J.A.; Morgan-Morrow, W.E. Fecal shedding of *Salmonella* by gilts before and after introduction to a swine breeding farm. *Swine Health Prod.* **2000**, *8*, 25–29.
23. European Food Safety Authority (EFSA). Analysis of the baseline survey on the prevalence of *Salmonella* in holdings with breeding pigs, in the EU, 2008, Part A: *Salmonella* prevalence estimates. *EFSA J.* **2009**, *7*, 93. [\[CrossRef\]](#)
24. Denis, M.; Houard, E.; Fablet, A.; Rouxel, S.; Salvat, G. Distribution of serotypes and genotypes of *Salmonella enterica* species in French pig production. *Vet. Rec.* **2013**, *173*, 370. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
25. Gosling, R.J.; Mueller-Doblies, D.; Martelli, F.; Nunez-Garcia, J.; Kell, N.; Rabie, A.; Wales, A.D.; Davies, R.H. Observations on the distribution and persistence of monophasic *Salmonella* Typhimurium on infected pig and cattle farms. *Vet. Microbiol.* **2018**, *227*, 90–96. [\[CrossRef\]](#)
26. Campos, J.; Mourão, J.; Peixe, L.; Antunes, P. Non-typhoidal *Salmonella* in the Pig Production Chain: A Comprehensive Analysis of Its Impact on Human Health. *Pathogens* **2019**, *8*, 19. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)

27. Ministerio de Agricultura, Pesca y Alimentación (MAPA). Informe de Resultados 2019. “Programa de Vigilancia de Zoonosis y Resistencias a Antimicrobianos: Diseño del Programa, Toma de Muestras, Aislamiento, Identificación y Caracterización de Microorganismos Sometidos al Programa de Vigilancia, con Especial Referencia al Aislamiento e Identificación de Cepas de *E. coli* Productor de ESBL y/o AmpC y/o Carbapenemasas, 2019”. 2020. Available online: https://www.mapa.gob.es/es/ganaderia/temas/sanidad-animal-higiene-ganadera/2019_informevigilanzazonosisram5_tcm30-551462.pdf (accessed on 5 December 2020).
28. European Food Safety Authority (EFSA); European Centre for Disease Prevention and Control (ECDC). The European Union summary report on trends and sources of zoonoses, zoonotic agents and food-borne outbreaks in 2014. *EFSA J.* **2015**, *13*, 4329. [CrossRef]
29. European Food Safety Authority (EFSA); European Centre for Disease Prevention and Control (ECDC). The European Union summary report on trends and sources of zoonoses, zoonotic agents and food-borne outbreaks in 2015. *EFSA J.* **2016**, *14*, 4634. [CrossRef]
30. European Food Safety Authority (EFSA); European Centre for Disease Prevention and Control (ECDC). The European Union summary report on trends and sources of zoonoses, zoonotic agents and food-borne outbreaks in 2016. *EFSA J.* **2017**, *15*, 5077. [CrossRef]
31. European Food Safety Authority (EFSA); European Centre for Disease Prevention and Control (ECDC). The European Union summary report on trends and sources of zoonoses, zoonotic agents and food-borne outbreaks in 2017. *EFSA J.* **2018**, *16*, 5500. [CrossRef]
32. European Food Safety Authority (EFSA). Scientific report on the European Union One Health 2018 Zoonoses Report. *EFSA J.* **2019**, *17*, 5926. [CrossRef]
33. Pornsukarom, S.; Patchanee, P.; Erdman, M.; Cray, P.F.; Wittum, T.; Lee, J.; Gebreyes, W.A. Comparative Phenotypic and Genotypic Analyses of *Salmonella* Rissen that Originated from Food Animals in Thailand and United States. *Zoonoses Public Health* **2015**, *62*, 151–158. [CrossRef]
34. World Health Organization. Critically Important Antimicrobials for Human Medicine. 6th Revision. 2018. Available online: <https://apps.who.int/iris/bitstream/handle/10665/312266/9789241515528-eng.pdf?ua=1> (accessed on 30 November 2020).
35. European Food Safety Authority (EFSA); European Centre for Disease Prevention and Control (ECDC). The European Union Summary Report on Antimicrobial Resistance in zoonotic and indicator bacteria from humans, animals and food in 2017/2018. *EFSA J.* **2020**, *18*, 6007. [CrossRef]
36. Seiffert, S.N.; Hilty, M.; Perreten, V.; Endimiani, A. Extended-spectrum cephalosporin-resistant Gram-negative organisms in livestock: An emerging problem for human health? *Drug Resist. Updates* **2013**, *16*, 22–45. [CrossRef] [PubMed]
37. Sevilla, E.; Vico, J.P.; Delgado-Blas, J.F.; González-Zorn, B.; Marín, C.M.; Uruén, C.; Martín-Burriel, I.; Bolea, R.; Mainar-Jaime, R.C. Resistance to colistin and production of extended-spectrum β -lactamases and/or AmpC enzymes in *Salmonella* isolates collected from healthy pigs in Northwest Spain in two periods: 2008–2009 and 2018. *Int. J. Food Microbiol.* **2020**, *10*, 108967. [CrossRef] [PubMed]
38. Nollet, N.; Houf, K.; Dewulf, J.; Duchateau, L.; De Zutter, L.; De Kruif, A.; Maes, D. Distribution of *Salmonella* strains in farrow-to-finish pig herds: A longitudinal study. *J. Food Prot.* **2005**, *68*, 2012–2021. [CrossRef]
39. European Food Safety Authority (EFSA). Analysis of the baseline survey of *Salmonella* in holdings with breeding pigs, in the EU, 2008. Part B: Analysis of factors potentially associated with *Salmonella* pen positivity. *EFSA J.* **2011**, *9*, 2329. [CrossRef]
40. Animal and Plant Health Agency (APHA); Biomathematics and Risk Research Workgroup; Martínez, J.M.; McCarthy, C.; Taylor, R.A. Livestock Health and Food Chain Risk Assessment. *EFSA J.* **2020**, *18*, e181111. [CrossRef]
41. Funk, J.; Gebreyes, W.A. Risk factors associated with *Salmonella* prevalence on swine farms. *J. Swine Health Prod.* **2004**, *12*, 246–251.
42. Garrido, V.; Sánchez, S.; San Román, B.; Fraile, L.; Migura-García, L.; Grilló, M.J. *Salmonella* Infection in Mesenteric Lymph Nodes of Breeding Sows. *Foodborne Pathog. Dis.* **2020**, *17*, 411–417. [CrossRef]
43. Berge, A.C.; Wierup, M. Nutritional strategies to combat *Salmonella* in mono-gastric food animal production. *Animal* **2012**, *6*, 557–564. [CrossRef]
44. Tran, T.H.T.; Everaert, N.; Bindelle, J. Review on the effects of potential prebiotics on controlling intestinal enteropathogens *Salmonella* and *Escherichia coli* in pig production. *J. Anim. Physiol. Anim. Nutr.* **2018**, *102*, 17–32. [CrossRef]
45. De La Cruz, M.L.; Conrado, I.; Nault, A.; Perez, A.; Dominguez, L.; Alvarez, J. Vaccination as a control strategy against *Salmonella* infection in pigs: A systematic review and meta-analysis of the literature. *Res. Vet. Sci.* **2017**, *114*, 86–94. [CrossRef] [PubMed]
46. Smith, R.P.; Andres, V.; Martelli, F.; Gosling, B.; Marco-Jimenez, F.; Vaughan, K.; Tchorzewska, M.; Davies, R. Maternal vaccination as a *Salmonella* Typhimurium reduction strategy on pig farms. *J. Appl. Microbiol.* **2018**, *124*, 274–285. [CrossRef] [PubMed]
47. Omonijo, F.A.; Ni, L.; Gong, J.; Wang, Q.; Lahaye, L.; Yang, C. Essential oils as alternatives to antibiotics in swine production. *Anim. Nutr.* **2018**, *4*, 126–136. [CrossRef]
48. Fabà, L.; Litjens, R.; Allaart, J.; Van Den Hil, P.R. Feed additive blends fed to nursery pigs challenged with *Salmonella*. *J. Anim. Sci.* **2020**, *98*, skz382. [CrossRef] [PubMed]
49. Smith, R.P.; Andres, V.; Cheney, T.E.; Martelli, F.; Gosling, R.; Marier, E.; Rabie, A.; Gilson, D.; Davies, R.H. How do pig farms maintain low *Salmonella* prevalence: A case-control study. *Epidemiol. Infect.* **2018**, *146*, 1909–1915. [CrossRef]
50. Issenhuth-Jeanjean, S.; Roggentin, P.; Mikoleit, M.; Guibourdenche, M.; De Pinna, E.; Nair, S.; Fields, P.I.; Weill, F.X. Supplement 2008–2010 (no. 48) to the White-Kauffmann-Le Minor scheme. *Res. Microbiol.* **2014**, *165*, 526–530. [CrossRef]

51. Ribot, E.M.; Fair, M.A.; Gautam, R.; Cameron, D.N.; Hunter, S.B.; Swaminathan, B.; Barrett, T.J. Standardization of pulsed-field gel electrophoresis protocols for the subtyping of *Escherichia coli* O157:H7, *Salmonella*, and *Shigella* for PulseNet. *Foodborne Pathog. Dis.* **2006**, *3*, 59–67. [CrossRef]
52. Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI). *Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing*, 29th ed.; Approved Standard, CLSI Document M100; Clinical and Laboratory Standards Institute: Wayne, PA, USA, 2019.
53. Magiorakos, A.P.; Srinivasan, A.; Carey, R.B.; Carmeli, Y.; Falagas, M.E.; Giske, C.G.; Harbarth, S.; Hindler, J.F.; Kahlmeter, G.; Olsson-Liljequist, B.; et al. Multidrug-resistant, extensively drug-resistant and pandrug-resistant bacteria: An international expert proposal for interim standard definitions for acquired resistance. *Clin. Microbiol. Infect.* **2012**, *18*, 268–281. [CrossRef]
54. European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing (EUCAST). Clinical Breakpoints and Dosing of Antibiotics. Version 10.0. Available online: https://www.eucast.org/clinical_breakpoints/ (accessed on 30 November 2020).
55. Nollet, N.; Maes, D.; Duchateau, L.; Hautekiet, V.; Houf, K.; Van Hoof, J.; De Zuttera, L.; De Kruif, A.; Geers, R. Discrepancies between the isolation of *Salmonella* from mesenteric lymph nodes and the results of serological screening in slaughter pigs. *Vet. Res.* **2005**, *36*, 545–555. [CrossRef]
56. Vico, J.P.; Engel, B.; Buist, W.G.; Mainar-Jaime, R.C. Evaluation of three commercial enzyme-linked immunosorbent assays for the detection of antibodies against *Salmonella* spp. in meat juice from finishing pigs in Spain. *Zoonoses Public Health* **2010**, *57*, 107–114. [CrossRef]

PUBLICACIÓN II / PUBLICATION II

Effects of dietary supplementation with protected sodium butyrate on gut microbiota in growing-finishing pigs

Bernad-Roche, M., Bellés, A., Grasa, L., Casanova-Higes, A., Mainar-Jaime, R.C.

Animals 2021, 11(7):2137. doi: 10.3390/ani11072137.

Article

Effects of Dietary Supplementation with Protected Sodium Butyrate on Gut Microbiota in Growing-Finishing Pigs

María Bernad-Roche ^{1,†} , Andrea Bellés ^{2,†} , Laura Grasa ² , Alejandro Casanova-Higes ¹ 
and Raúl Carlos Mainar-Jaime ^{1,*} 

¹ Departamento de Patología Animal, Facultad de Veterinaria, Instituto Agroalimentario de Aragón-IA2, Universidad de Zaragoza-CITA, 50013 Zaragoza, Spain; mbernadroche@gmail.com (M.B.-R.); acasanova@unizar.es (A.C.-H.)

² Departamento de Farmacología y Fisiología, Facultad de Veterinaria, Instituto Agroalimentario de Aragón-IA2, Universidad de Zaragoza-CITA, 50013 Zaragoza, Spain; a.belles@unizar.es (A.B.); lgralo@unizar.es (L.G.)

* Correspondence: rcmainar@unizar.es; Tel.: +34-976-762-088

† These authors contributed equally to this work.

Simple Summary: The addition of protected sodium butyrate to the diet of fattening pigs during the whole fattening period (≈ 90 days) at a dose of 3 kg per ton of feed, did not modify the overall richness of microbiota composition of the pigs at slaughter, but may have caused some significant changes in specific taxa that could be associated with better gut health parameters. In any case, these results should be taken with caution, as the role of a given *taxon* on the pig's gut health is influenced by numerous variables such as age, diet, environment, treatments, other taxa present, infections, or even the physiological status of the animal.

Abstract: The study assessed changes in the gut microbiota of pigs after dietary supplementation with protected sodium butyrate (PSB) during the growing-fattening period (≈ 90 days). One gram of colon content from 18 pigs (9 from the treatment group -TG- and 9 from the control group -CG-) was collected. Bacterial DNA was extracted and 16S rRNA high-throughput amplicon sequencing used to assess microbiota changes between groups. The groups shared 75.4% of the 4697 operational taxonomic units identified. No differences in alpha diversity were found, but significant differences for some specific taxa were detected between groups. The low-represented phylum *Deinococcus-Thermus*, which is associated with the production of carotenoids with antioxidant, anti-apoptotic, and anti-inflammatory properties, was increased in the TG ($p = 0.032$). *Prevotellaceae*, *Lachnospiraceae*, *Peptostreptococcaceae*, *Peptococcaceae*, and *Terrisporobacter* were increased in the TG. Members of these families have the ability to ferment complex dietary polysaccharides and produce larger amounts of short chain fatty acids. Regarding species, only *Clostridium butyricum* was increased in the TG ($p = 0.048$). *Clostridium butyricum* is well-known as probiotic in humans, but it has also been associated with overall positive gut effects (increased villus height, improved body weight, reduction of diarrhea, etc.) in weanling pigs. Although the use of PSB did not modify the overall richness of microbiota composition of these slaughter pigs, it may have increased specific taxa associated with better gut health parameters.

Keywords: pig; microbiota; intestinal microbiome; sodium butyrate; organic acid



Citation: Bernad-Roche, M.; Bellés, A.; Grasa, L.; Casanova-Higes, A.; Mainar-Jaime, R.C. Effects of Dietary Supplementation with Protected Sodium Butyrate on Gut Microbiota in Growing-Finishing Pigs. *Animals* **2021**, *11*, 2137. <https://doi.org/10.3390/ani11072137>

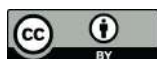
Academic Editors: Claudio Oliviero and Shah Hasan

Received: 26 June 2021

Accepted: 17 July 2021

Published: 19 July 2021

Publisher's Note: MDPI stays neutral with regard to jurisdictional claims in published maps and institutional affiliations.



Copyright: © 2021 by the authors. Licensee MDPI, Basel, Switzerland. This article is an open access article distributed under the terms and conditions of the Creative Commons Attribution (CC BY) license (<https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>).

1. Introduction

The study and implications of gut microbiota on pig health has been the objective of many recent studies, and an overall correlation between microbiota and health has been observed [1–3]. Gut microbiota is involved in many physiological functions, one of the most important being the digestion of nutrients. Commensal bacteria split long carbohydrate chains into short chain fatty acids (SCFA), such as acetic, propionic, and butyric acid, and

these SCFA are used by the epithelium cells to produce energy [4]. In addition, intestinal bacteria may also play an essential role in disease prevention through the maintenance of the appropriate structure of the intestinal wall and by exerting some regulation of the immune function [3]. Thus, the loss of the gut microbial ecosystem diversity has shown to be related to an increase of the risk of gastrointestinal diarrhea and some immune-mediated diseases in post-weaning pigs [5], and even to functional implications on brain development and behavior [6]. Therefore, animal health and welfare could be improved by selection, nutrition, and management processes that take into account the role of the gut microbiota [7].

The intestinal microbiota is a non-static, complex structure that can be easily altered by many factors [8]. Animal factors such as age, health status, diet, breed, or the environment where the animal lives are responsible for changes in the gut microbiota. It also varies in each section of the intestine and, consequently, in the sampling location, being these differences either qualitative or quantitative [9]. Most of the commensal and beneficial bacteria belong to the *Firmicutes* and *Bacteroidetes* phyla, which are the predominant bacteria in healthy pigs (85% to 90% of the population). Other important but less frequent phyla are *Proteobacteria*, which includes the *Enterobacteriaceae* family, *Actinobacteria*, *Spirochaetes*, and *Verrucomicrobia*.

Among the major genera within these two main phyla would be *Clostridium*, *Lactobacillus*, *Lactococcus*, *Streptococcus*, *Blautia*, *Ruminococcus*, *Roseburia*, and *Enterococcus* (*Firmicutes*), and *Bacteroides* and *Prevotella* (*Bacteroidetes*), suggesting a core microbiota for healthy commercial swine [9,10]. Relative increases in the proportion of *Bacteroidetes* (genus *Prevotella*), *Firmicutes* (genera *Veillonella*, *Enterococcus*), *Proteobacteria* (*E. coli*, *Campylobacter* spp.) have been associated with diarrhea in the first weeks of piglets' life [11–15]. In other recent study were the genera *Escherichia* and *Shigella* the core component of diarrheic microbiota, while *Prevotella* was characteristic of non-diarrheic microbiota of piglets [16]. These variable results show the difficulties in understanding the complex microbial relationships occurring within the intestinal tract.

Organic acids (OA) are being used as an alternative to antibiotics in pigs for the control of digestive disorders caused by enteric pathogens such as *Salmonella* or enterotoxigenic *E. coli*. Several effects have been associated with the administration of OA that would promote intestinal health. For instance, OA, such as butyric acid, are the preferred energy substrate for colon cells, promoting their normal proliferation and differentiation [17]. It also stimulates mucus production and intestinal secretions with the subsequent benefit in intestinal health, and acts as a powerful inhibitor of the intestinal inflammation and of the development of tumors [18]. OA seem also to modulate the immune response of the animals [19].

However, medium chain fatty acids, such as lauric acid or sodium heptanoate, and short chain fatty acids, such as formic or butyric acid, may also positively modify microbiota composition [20–22]. There are two major mechanisms by which they influence the intestinal microbiota, namely, (i) by reducing the pH of the intestinal environment; and (ii) by penetrating the pathogenic bacterial cell and altering its physiological homeostasis [23]. A reduction of the intestinal pH leads to the modification of the microbial composition as it selects for commensal acid-resistant microbes, such as lactic acid bacteria. Besides, enteric pathogens are usually sensitive to a low pH, and in some cases (butyric), it helps to down-regulate some invasion genes of *Salmonella*. In addition, OA would enter the pathogenic bacteria cell in their non-dissociated form and decrease the intracellular pH when dissociating, thus disrupting DNA synthesis [24,25]. Altogether reducing the overall proportion of pathogenic bacteria [26].

Most of the studies on the effects of OA on the modification of the intestinal microbiota in swine have been carried out in young pigs, i.e., suckling and/or weaned piglets, and after administration of OA for a limited period of time. However, few studies have focused on older pigs or after long treatments. Thus, the aim of this study was to assess changes in

the gut microbiota of healthy fattening pigs after dietary supplementation with a formula of protected sodium butyrate (PSB) during the whole growing-fattening period.

2. Materials and Methods

2.1. Animals, Treatment and Sample Collection

Selected pigs (a mixed breed of Landrace -25%-, Large White -25%-, and Pietrain -50%-) were raised in a small commercial fattening unit (≈ 100 pigs in 8 pens; 12–14 pigs/pen). During the fattening period, the animals were fed with three different diets (starting, fattening and finishing) free of antibiotics (Table S1). Drinkable water and feed were offered *ad libitum* for all the pigs. Animals were raised following European animal welfare regulations for pig farms (COUNCIL DIRECTIVE 2001/88/EC of 23 October 2001).

A feed additive (GUSTOR BP70, Norel S.A., Madrid, Spain) was administered to animals from 4 randomly selected pens (treatment group -TG-) along the whole period. This feed additive is a form of sodium butyrate (70%), part of which was protected with vegetable fat (hydrogenated palm stearin, 30%) in order to be able to reach the distal part of the intestinal tract, according to manufacturer. The remaining 4 pens were fed with the same diets without the additive (control group -CG-).

Piglets entered into the growing-fattening unit at 10 weeks of age and remained there until slaughter, that is, when they reached an average live weight of 100 ± 10 kg (≈ 6 months old). The treatment began 15 days after pigs entering into the fattening unit and a dose of 3 kg of the protected sodium butyrate (PSB) per ton of feed was used for the whole period, and for each of the three different diets that were administered. At slaughter, intestinal content from the colon of 18 randomly selected pigs (9 from the TG and 9 from the CG) was collected for laboratory analysis.

2.2. Bacterial DNA Extraction

One gram of colon content was collected and immediately frozen at -80°C until processed. Bacterial DNA was extracted from frozen samples using a QIAamp Fast DNA Stool Mini Kit (Qiagen, Hilden, Germany) and following the manufacturer's instructions. Fecal samples were mixed with 1 mL InhibitEX buffer in SK38 tubes and processed by using the Precellys[®] 24 homogenizer for 2×30 s at 6500 rpm and 10 s delay between cycles. Lysis was completed at 95°C for 5 min. Finally, DNA was eluted in 40 μL elution ATE buffer. Once DNA was extracted, DNA concentrations were measured with Qubit[®] 4.0 fluorometer (Invitrogen) and dsDNA HS (high sensitivity) Assay Kit (Invitrogen). DNA purity was assessed by measuring the A260/A280 with NanoDrop[®] ND-1000 Spectrophotometer V3.0.1 (Thermo Scientific, Waltham, MA, USA) and monitored on 1% agarose gels.

2.3. Library Preparation

Depending to the concentration, DNA was diluted to 1 ng/ μL using sterile water. 16S rRNA gene of V3-V4 region was amplified using specific primers (515F-806R) [27] with a barcode. PCR reactions were carried out with Phusion[®] High-Fidelity PCR Master Mix (New England Biolabs). 1X loading buffer (contained SYBR green) was mixed with PCR products and amplicons were detected by electrophoresis on 2% agarose gel. Samples with a bright main band between 400–450 bp were chosen for further experiments. PCR products were mixed in equidensity ratios. Then, the mixture of PCR products was purified with Qiagen Gel Extraction Kit (Qiagen, Hilden, Germany).

2.4. 16S rRNA Gene Sequencing

Sequencing libraries were generated using NEBNex Ultra DNA Library Pre[®] Kit for Illumina, following manufacturer's recommendations and index codes were added. The library quality was assessed on the Qubit[®] 2.0 Fluorometer (Thermo Scientific) and Agilent Bioanalyzer 2100 system. Finally, the library was sequenced on an Illumina MiSeq platform at Novogene (Tianjin, China), and 250 bp paired-end reads were generated. Output data were stored in FASTQ format.

2.5. Bioinformatics and Statistical Analysis

Paired-end reads were assigned to samples based on their unique barcode and truncated by cutting off the barcode and primer sequence. These reads were merged using FLASH [28]. Quality filtering on the raw tags was performed under specific filtering conditions to obtain high-quality clean sequences [29] according to the QIIME 1.7.0 quality-controlled process [30]. The UPARSE software was used to pick up operational taxonomic units (OTUs) at 97% similarity [31]. For each OTU, the representative sequence was assigned to a taxonomic annotation by using the mothur program and SILVA SSU rRNA database [32,33].

Alpha diversity was used to measure within-groups microbial diversity (CG and TG). Simpson, Shannon, ACE, and Chao1 indexes were calculated with QIIME (Version 1.7.0) and displayed with R software (Version 2.15.3). The differences in the alpha diversity indexes between groups were analyzed by *t*-test, Wilcox, and Tukey tests ($p < 0.05$).

In order to estimate the dissimilarities between groups (beta diversity), both weighted and unweighted Unifrac were calculated by QIIME 1.7.0. Analysis of similarities (ANOSIM) and permutational multivariate analysis of variance (Adonis) were conducted using the vegan R package [34]. Differences in the weighted and unweighted Unifrac between the treatment and control groups were analyzed by *t*-test, Wilcox, and Tukey tests ($p < 0.05$).

Statistical analyses were performed to determine those taxa whose abundance varied significantly ($p < 0.05$) among groups. A *t*-test was carried out at various taxon ranks, including phylum, family, genus, and species. In addition, the microbial community differences between TG and CG diets were analyzed by the linear discriminant analysis (LDA) effect size (LEfSe) [35]. LEfSe method was used to identify the most differentially abundant taxa between the two groups, which would help to reveal potential microbial biomarkers.

3. Results

3.1. Sequencing Metrics

After quality control and chimera removal, the minimum and maximum of high-quality sequences in the samples were 101,778 and 191,444, being the average 157,755 sequences. The maximum percentage of chimeric sequences found in the samples was 17.8%, indicating a good performance of the sequencing.

The total number of OTUs identified was 4697, from which 3542 OTUs (75.4%) were shared by the CG and TG groups. Each sample had, on average, 2389 OTUs (range: 1928–2875). The rarefaction curves (not presented) showed asymptotic tendency indicating that sequencing depth was adequate for characterizing the pig gut microbiota in the present study.

3.2. General Description of Bacterial Communities

The gut microbiome dataset from the TG and CG was composed by more than 35 phyla, with four of them comprising almost 95% of all the bacteria (*Firmicutes* -62.0%-, *Bacteroidetes* -25.3%-, *Proteobacteria* -3.7%-, and *Spirochaetes* -3.2%-).

When comparing the abundance of the different taxa between the TG and the CG, a somewhat more abundant bacterium from the *Firmicutes* and *Verrucomicrobia* phyla were found in the TG compared to the CG, while those from the *Bacteroidetes* and *Spirochaetes* phyla were more abundant in the CG. However, no large differences were observed between groups at this level, neither at order and class levels. Major differences were found mostly when comparing families and genera (Figure 1).

The relative differences between the CG and TG for the 35 most common genera are presented in a heat map (Figure 2). There was a visible clustering of pigs according to treatment. The abundance of genera *Clostridium*, *Terrisporobacter*, *Alloprevotella*, and *Prevotella* increased mainly in TG, while it tended to decrease in CG. In contrast, the abundance of genera *Ruminococcus* and *Streptococcus* increased mainly in CG and decreased in TG.

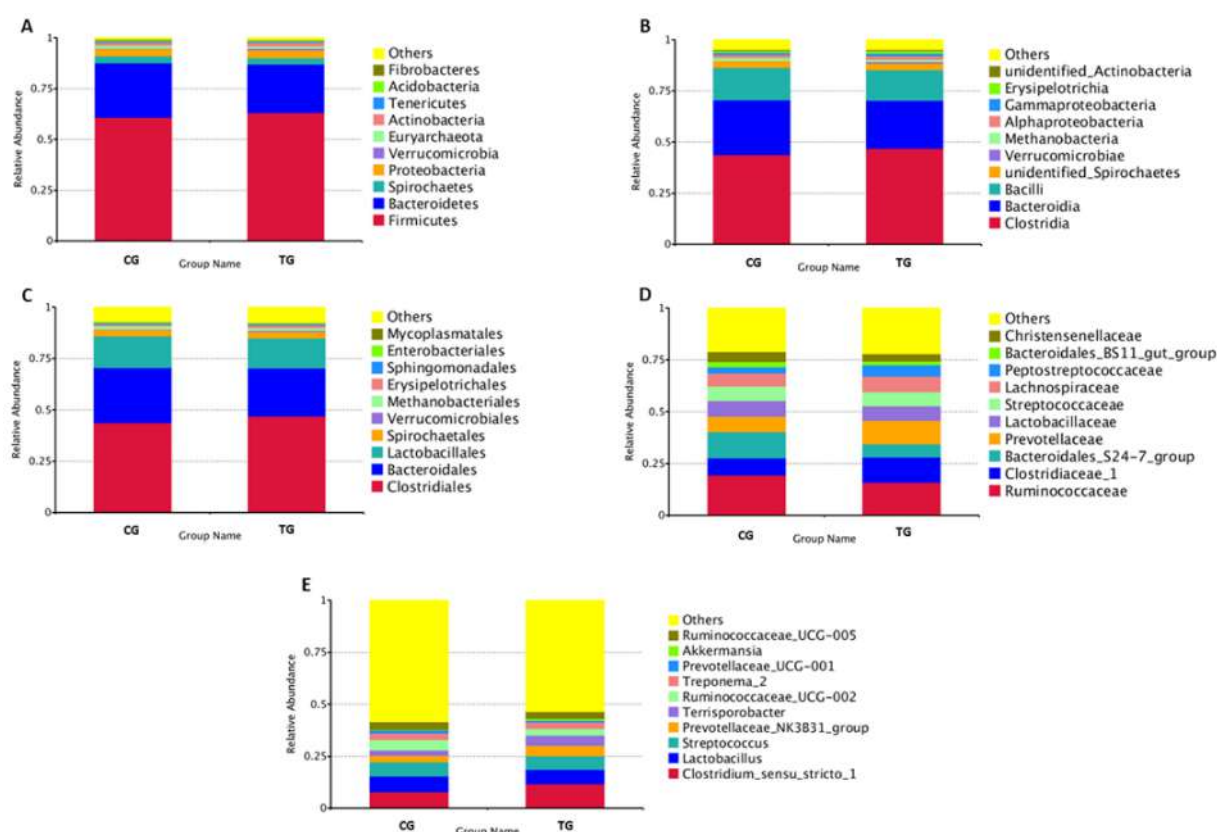


Figure 1. Percent relative abundance of the ten most abundant phyla (A), classes (B), orders (C), families (D), and genera (E) in the control (CG) and treatment (TG) group.

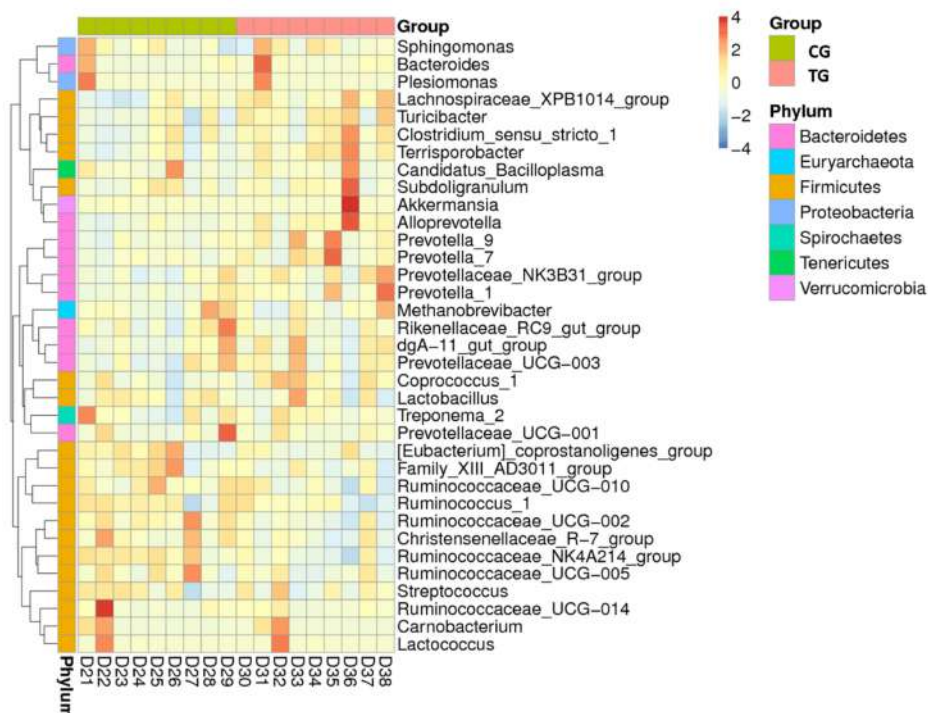


Figure 2. Heat map of relative differences of the 35 most common genera in the fecal samples of pigs fed a normal diet (CG) and a diet supplemented with protected sodium butyrate (TG). A value of -4 represents the disappearance of a particular genus, while a $+4$ value indicates that it increased from the initial value of 0.

3.3. Alpha Diversity

In Table 1 the Shannon, Simpson, ACE, and Chao1 indexes are shown for both groups. A high microbial diversity was observed for both groups as indicated by the Shannon and Simpson indexes, which were not significantly different between groups (Simpson index was close to 1 for both groups, and the Shannon index around 7). Neither significant differences were found in the Chao nor ACE indexes between both groups.

Table 1. Effects of dietary protected sodium butyrate supplementation on the microbial alpha diversity in the colon content of growing-finishing pigs.

Index	Control Group		Treatment Group		p-Value
	Mean	SD *	Mean	SD	
Shannon	7.033	0.313	7.305	0.288	0.07
Simpson	0.968	0.014	0.975	0.0068	0.2
ACE	2549	369.23	2649	277.75	0.5
Chao1	2488	374.39	2582	289.37	0.5

*SD: Standard deviation.

3.4. Beta Diversity

No statistically significant differences in the weighted and unweighted Unifrac analyses between the TG and the CG were found, but both the analysis of similarities (ANOSIM) and the permutational multivariate analysis of variance (Adonis) showed significant community differences between the CG and the TG (ANOSIM: $R = 0.013$, $p = 0.042$; Adonis: $R^2 = 0.11$; $p = 0.04$). In Table 2 are shown the specific taxa that were significantly prevalent within each group when compared to the other according to *t*-test analysis.

Table 2. *t*-test analysis of variation between groups. Differentially abundant taxa from fecal samples between the control (CG) and treatment (TG) group. Only the taxa that were significantly different between groups are listed.

Taxonomic Level	Taxon	CG		TG		p-Value
		Mean	SD	Mean	SD	
Phylum	<i>Deinococcus-Thermus</i>	4.5×10^{-9}	2.8×10^{-7}	8.8×10^{-8}	4.6×10^{-9}	0.032
Family	<i>Ruminococcaceae</i>	0.194	0.023	0.159	0.024	0.006
	<i>Bacteroidales</i> S24-7 group	0.127	0.066	0.064	0.037	0.027
	<i>Prevotellaceae</i>	0.075	0.051	0.114	0.039	0.047
	<i>Lachnospiraceae</i>	0.063	0.012	0.077	0.013	0.035
	<i>Peptostreptococcaceae</i>	0.030	0.014	0.055	0.023	0.015
Genus	<i>Peptococcaceae</i>	0.001	0.3×10^{-3}	0.002	0.4×10^{-3}	0.026
	<i>Terrisporobacter</i>	0.026	0.012	0.049	0.020	0.012
	<i>Ruminococcaceae</i> UCG-002	0.050	0.015	0.032	0.011	0.012
	<i>Alloprevotella</i>	0.006	0.003	0.014	0.009	0.030
	<i>Ruminococcaceae</i>	0.021	0.003	0.015	0.003	0.003
	NK4A214 group					
	<i>Lachnospiraceae</i>	0.012	0.004	0.018	0.004	0.016
	XPB1014 group					
	<i>Turicibacter</i>	0.005	0.002	0.008	0.002	0.033
	<i>Parabacteroides</i>	0.001	0.001	0.003	0.002	0.036
	<i>Eubacterium nodatum</i> group	0.001	0.3×10^{-3}	0.002	0.001	0.027
	<i>Blautia</i>	0.002	0.001	0.003	0.001	0.042
	<i>Oscillospira</i>	0.004	0.001	0.003	0.001	0.016
	<i>Clostridium butyricum</i>	0.003	0.001	0.005	0.003	0.048
Species						

According to the LEfSe analysis, the relative abundance of *Prevotellaceae* and *Peptostreptococcaceae* in the TG was significantly higher than in the CG, while the relative abundance of *Ruminococcaceae* and *Bacteroidales* S-24 group was significantly lower. The LEfSe cladogram as a result of the TG and CG is shown in Figure 3.

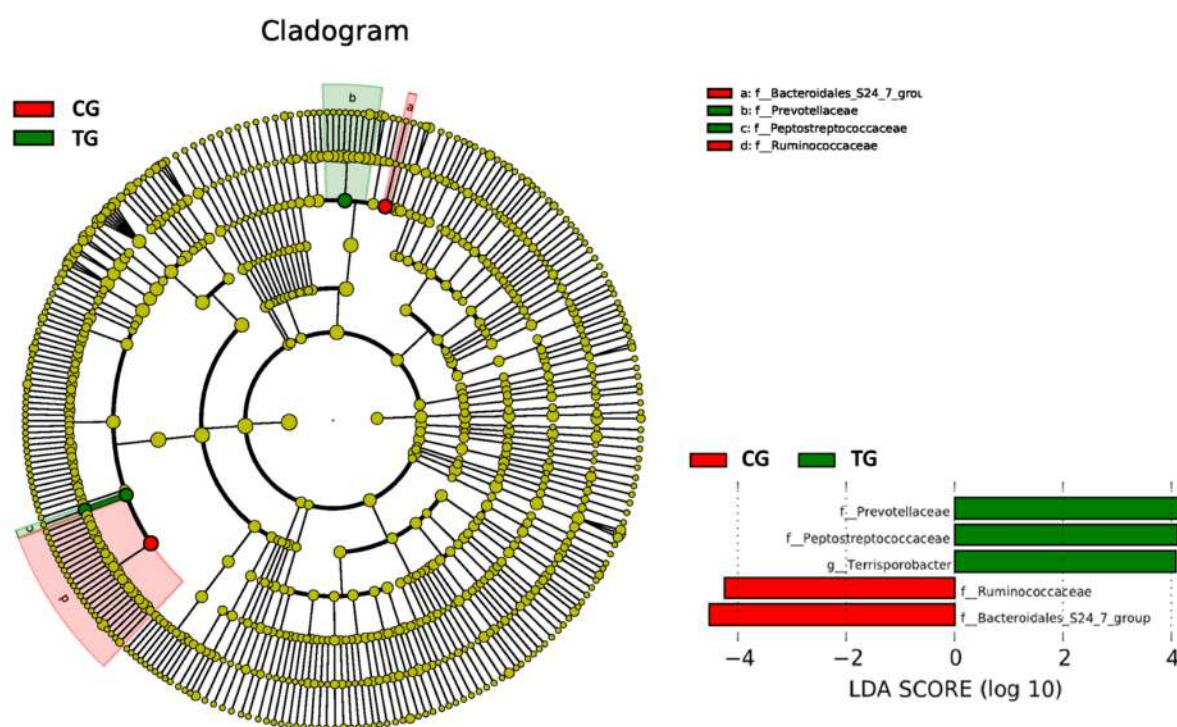


Figure 3. On the left side of the graph, differentially abundant microbial clades according to linear discriminant analysis effect size (LEfSe). On the right side, significant clades and their associated linear discriminant analysis (LDA) score for the control group (CG) and the treatment (TG) group are shown.

4. Discussion

Most studies focused on the impact that the use of PSB may have on the pig gut microbiota have been usually performed on young piglets (mostly from birth to post-weaning) treated for a short period of time [36–39]. There is only a single recent study on the effect of dietary sodium butyrate in a population of growing-finishing pigs, after being treated for a long period (69 days) [40]. However, in contrast to our study, the samples were collected from the caecum. Factors such as animals' age, basal diet, as well as time of treatment or the site of sampling, have a major influence on microbiota composition [1,9,23,41–43]. Thus, this study can be considered unique as it was performed on growing-finishing pigs, the treatment was administered for a long period (>90 days) and samples were collected from the colon.

No significant differences in overall microbial diversity were detected between the CG and the TG. A high diversity was observed in both groups, as indicated by a Simpson index close to 1 and a Shannon index around 7, both being similar for the CG and TG ($p > 0.05$). These alpha diversity indexes suggested a similar evenness of this OTUs distribution. Chao and ACE indexes were also similar for both groups, meaning no differences in microbiota richness between the CG and the TG. Indeed, the CG and the TG shared more than 75% of the OTUs identified. It is interesting to note that the high alpha diversity values observed for both groups in our study were similar to those found in sows [1], suggesting an adult and therefore more stable microbiota composition [44], which would likely preclude finding major overall differences in biodiversity. Although in one previous study it was found a reduction of the microbiota diversity after sodium butyrate supplementation, it may have been related to the use of a reduced dose of two antibiotics, colistin and kidasamycin, along with the organic acid [40], as both antibiotics likely had some impact on specific microbial populations [41].

Therefore, the potential effects of PSB on fattening pigs should be then investigated at lower levels, i.e., specific taxa. The most abundant phyla found in both the CG and the TG were *Firmicutes* and *Bacteroidetes*, followed by *Proteobacteria*, in agreement with the core

microbiota of the swine gut reported in previous studies [9,10]. Beta diversity measures showed a significant microbial community difference between both groups as indicated by results from the ANOSIM and Adonis, but the magnitude of these differences would not be large, as suggested by the corresponding R and R^2 values (ANOSIM: $R = 0.013$, $p = 0.042$; Adonis: $R^2 = 0.11$; $p = 0.04$). However, both the t -test and the LEfSe analyses detected specific taxa that differed from one group to the other. Thus, at the phylum level, we only found an increase of bacteria from the low-represented phylum *Deinococcus-Thermus* in the TG compared to the CG ($p = 0.032$; Table 2). This phylum is composed of the highly radioresistant order *Deinococcales* and the thermophilic order *Thermales*. Bacteria from this phylum are highly resistant to extreme stress through the production of carotenoids [45], which are known to have antioxidant, anti-apoptotic, and anti-inflammatory properties [46]. Thus, increasing numbers of these bacteria might favor a healthier gastrointestinal tract.

At a family level, members of the *Prevotellaceae*, *Lachnospiraceae*, *Peptostreptococcaceae*, *Peptococcaceae*, and *Terrisporobacter* families were increased in the TG (Table 2; Figures 2 and 3). The first one being Gram-negative bacteria belonging to the order *Bacteroidales* while the others were Gram-positive *Clostridiales*. In contrast, *Ruminococcaceae* and the *Bacteroidales* S24-7 group were more abundant in the CG.

Prevotella has been described as the most abundant bacterium in the pig, although its relative abundance tends to decrease from weaning (25–50% of the bacteria) to finishing (10%) [47]. More than twenty species have been described within the genus *Prevotella* in the pig gastrointestinal tract, some of which were clearly more abundant in the pigs from the TG (Figure 2). Previous studies had already observed that members of the family *Prevotellaceae* were promoted when sodium butyrate was supplemented [21], suggesting that the dietary use of butyric acid would enhance their abundance.

Studies on the *Prevotella* genus have found contradictory results with regard to its relationship with pig feed efficiency and growth performance, maturation of mucosal immunity or interactions with other commensal bacteria. In general, *Prevotella* has been associated positively with feed efficiency and growth performance [48,49], likely due to their ability to ferment complex dietary polysaccharides, which would make larger amounts of energy available for the pig [50]. Moreover, *Prevotella* and *Ruminococcus* have been previously described as predominant and exclusive genera associated to two main enterotypes: the enterotype A in which it would predominate *Prevotella* and *Mitsuakella*; and enterotype B, with *Ruminococcus* and *Treponema*. Better growth traits have been found in those pigs with *Prevotella* predominant gut microbiota [48]. Interestingly, in our study, a significant reduction of the abundance of *Ruminococcaceae* was observed in the TG, but was increased in CG, supporting this co-exclusion effect. Since zootechnical parameters could not be measured in this study, the potential positive link between *Prevotella* predominant gut microbiota and favorable pig performance could not be studied.

Prevotella may also contribute to the maturation of mucosa immunity through the production of acetate, which is further used by other microbial species to produce butyrate. These SCFAs would participate in the communication between the microbiota and the gut immune system and help to maintain the anti/pro-inflammatory balance [51]. It appears that a gut environment with higher levels of butyric would favor the presence of this genus. In any case, most of these studies were performed on piglets and cannot be directly extrapolated to fattening pigs like the ones used in our study, as piglets are likely more prone to microbiota changes than older pigs with a more mature microbiota [42].

Lachnospiraceae, *Peptostreptococcaceae*, *Peptococcaceae*, and *Terrisporobacter* are a group of bacteria characterized by producing SCFA after degradation of indigestible plant-derived polysaccharides (i.e., cellulose and hemicellulose components). Within this group, *Lachnospiraceae* may be one of the most studied, with some members of this family showing strong hydrolyzing activities, being butyrate producers and acetate consumers, especially at a mildly acidic pH. Other *Lachnospiraceae* species and strains, however, produce formate, lactate, or H_2 in addition to butyrate [52]. Studies on human microbiota have associated an increase of some of these genera (i.e., *Blautia*, which was also found increased in the

TG in this study) and the production of butyrate with the control of gut inflammatory processes, atherosclerosis, and maturation of the immune system [53]. Members of this family have been also considered opportunistic pathogens associated with human disease, mostly with metabolic disease (i.e., obesity), irritable bowel syndrome [52], or even with high-fat diets [54–56], but these relationships may be irrelevant in a pig production context.

Less studied have been *Peptostreptococcaceae* and *Terrisporobacter*. The former appeared to be more prevalent in healthy than in disease animals. They have been inversely related to dysfunction of the intestinal barrier in rats [57], and positively associated with improved barrier ileal function in moderate protein diets in finishing pigs [58], thus suggesting they help to maintain gut homeostasis. Regarding *Terrisporobacter*, its abundance has been correlated with body weight, triglyceride, and worse serum lipid profile in elder women [59], thus being considered a potential obesity-promoting bacteria that may also affect sows [60], but it is unknown the relevance it may have on slaughter pigs.

Among the species taxon, only *Clostridium butyricum* was significantly increased in the TG (Table 2). It seems that the acidic environment generated by the PSB delivered to the distal part of the intestinal would have favored the presence of this bacterium. The positive effects of *C. butyricum* are well-known, and it has been used as a probiotic in cases of *Clostridioides difficile* infection or inflammatory bowel disease in humans [61,62]. It generates large amounts of butyrate through the fermentation of undigested dietary fibers and, as discussed before, this SCFA is associated with several beneficial effects, such as the improvement of the gastrointestinal barrier function, the modulation of intestinal immune homeostasis, or the reduction of inflammation [5,19].

In studies where *C. butyricum* was included in the diet of weanling piglets, diverse positive effects such as increased villus height and crypt depth, improved body weight, average daily gain and feed conversion rate were observed [38,63–65]. It also reduced the diarrhea rate [38,63–65]. Thus, the significantly higher abundance of this bacterium in the TG would suggest an overall better gut health condition in these slaughter pigs, although extrapolation of results from weanling piglets to adult pigs should be done with caution.

DNA-based studies have allowed detection of other uncultured microorganisms such as the *Bacteroidales* group S24-7 commonly found in homoeothermic animals and that appeared increased in the CG in this study (Table 2 and Figure 3). Although some murine studies have found fluctuations in its abundance in mice with different physiological conditions, its role on health is far from been determined [66]. More studies will be required to understand the role of these gut microorganisms.

5. Conclusions

The addition of PSB during the whole growing and fattening period at a dose of 3 kg per ton of feed did not significantly modify the overall richness of microbiota composition of pigs at slaughter, but significant changes in some specific taxa were detected. According to previous studies, most of the changes observed would be likely associated with better gut health parameters. An increase in the abundance of SCFA-producing strict anaerobes was detected (*Clostridium* and *Prevotella*) that may also help to reduce the presence of enteric pathogens. In any case, it should be noted that the role that a given taxon may have on gut health is likely influenced by the interactions of numerous variables, such as age, diet, environment, treatments, the presence of other taxa, infections or even the physiological status of the animal. Therefore, direct comparisons between studies are difficult.

Supplementary Materials: The following are available online at <https://www.mdpi.com/article/10.3390/ani11072137/s1>, Table S1: Ingredients and nutrient contents of the basal diets.

Author Contributions: Conceptualization, R.C.M.-J.; methodology, L.G., A.B., M.B.-R., R.C.M.-J.; formal analysis, L.G., A.B.; investigation, M.B.-R., R.C.M.-J., A.C.-H.; resources, L.G., A.C.-H., R.C.M.-J.; data curation, L.G., A.B.; writing—original draft preparation, M.B.-R., A.B., R.C.M.-J.; writing—review and editing, A.C.-H., R.C.M.-J.; supervision, R.C.M.-J.; funding acquisition, R.C.M.-J. All authors have read and agreed to the published version of the manuscript.

Funding: This research was funded by the Spanish Ministry of Science and Innovation and the Spanish State Research Agency, reference number RTI2018-093915-B-I00.

Institutional Review Board Statement: Not applicable. Ethical review and approval were waived for this study because no procedures were performed on live animals.

Informed Consent Statement: Not applicable.

Data Availability Statement: Data available upon request.

Acknowledgments: We thank the company Agropiense and its technical staff, the farmer, and the abattoir for their collaboration in carrying out the field work. Also to Diego Aguirre-Ramírez for his help with laboratory work.

Conflicts of Interest: The authors declare no conflict of interest.

References

- Wang, X.; Tsai, T.; Deng, F.; Wei, X.; Chai, J.; Knapp, J.; Apple, J.; Maxwell, C.V.; Lee, J.A.; Li, Y.; et al. Longitudinal investigation of the swine gut microbiome from birth to market reveals stage and growth performance associated bacteria. *Microbiome* **2019**, *7*, 109. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
- Patil, Y.; Gooneratne, R.; Ju, X.H. Interactions between host and gut microbiota in domestic pigs: A review. *Gut Microbes* **2020**, *11*, 310–334. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
- Brestoff, J.R.; Artis, D. Commensal bacteria at the interface of host metabolism and the immune system. *Nat. Immunol.* **2013**, *14*, 676–684. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
- Anguita, M.; Canibe, N.; Pérez, J.F.; Jensen, B.B. Influence of the amount of dietary fiber on the available energy from hindgut fermentation in growing pigs: Use of cannulated pigs and in vitro fermentation. *J. Anim. Sci.* **2006**, *84*, 2766–2778. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
- Fouhse, J.M.; Zijlstra, R.T.; Willing, B.P. The role of gut microbiota in the health and disease of pigs. *Anim. Front.* **2016**, *6*, 30–36. [\[CrossRef\]](#)
- Bienenstock, J.; Kunze, W.; Forsythe, P. Microbiota and the gut-brain axis. *Nutr. Rev.* **2015**, *73*, 28–31. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
- Kraimi, N.; Dawkins, M.; Gebhardt-Henrich, S.G.; Velge, P.; Rychlik, I.; Volf, J.; Creach, P.; Smith, A.; Colles, F.; Lettierier, C. Influence of the microbiota-gut-brain axis on behavior and welfare in farm animals: A review. *Physiol. Behav.* **2019**, *210*, 112658. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
- Palmer, C.; Bik, E.M.; DiGiulio, D.B.; Relman, D.A.; Brown, P.O. Development of the human infant intestinal microbiota. *PLoS Biol.* **2007**, *5*, e177. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
- Holman, D.B.; Brunelle, B.W.; Trachsel, J.; Allen, H.K. Meta-analysis to define a core microbiota in the Swine gut. *mSystems* **2017**, *2*, e00004-17. [\[CrossRef\]](#)
- Xiao, L.; Estellé, J.; Kiilerich, P.; Ramayo-Caldas, Y.; Xia, Z.; Feng, Q.; Liang, S.; Pedersen, A.Ø.; Kjeldsen, N.J.; Liu, C.; et al. A reference gene catalogue of the pig gut microbiome. *Nat. Microbiol.* **2016**, *1*, 16161. [\[CrossRef\]](#)
- Huang, G.; Li, X.; Lu, D.; Liu, S.; Suo, X.; Li, Q.; Li, N. Lysozyme improves gut performance and protects against enterotoxigenic *Escherichia coli* infection in neonatal piglets. *Vet. Res.* **2018**, *49*, 20. [\[CrossRef\]](#)
- Hermann-Bank, M.L.; Skovgaard, K.; Stockmarr, A.; Strube, M.L.; Larsen, N.; Kongsted, H.; Ingerslev, H.C.; Mølbak, L.; Boye, M. Characterization of the bacterial gut microbiota of piglets suffering from new neonatal porcine diarrhoea. *BMC Vet. Res.* **2015**, *11*, 139. [\[CrossRef\]](#)
- Yang, Q.; Huang, X.; Zhao, S.; Sun, W.; Yan, Z.; Wang, P.; Li, S.; Huang, W.; Zhang, S.; Liu, L.; et al. Structure and Function of the Fecal Microbiota in Diarrheic Neonatal Piglets. *Front. Microbiol.* **2017**, *8*, 502. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
- Huang, A.; Cai, R.; Wang, Q.; Shi, L.; Li, C.; Yan, H. Dynamic Change of Gut Microbiota During Porcine Epidemic Diarrhea Virus Infection in Suckling Piglets. *Front. Microbiol.* **2019**, *10*, 322. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
- Bin, P.; Tang, Z.; Liu, S.; Chen, S.; Xia, Y.; Liu, J.; Wu, H.; Zhu, G. Intestinal microbiota mediates Enterotoxigenic *Escherichia coli*-induced diarrhea in piglets. *BMC Vet. Res.* **2018**, *14*, 385. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
- Sun, J.; Du, L.; Li, X.; Zhong, H.; Ding, Y.; Liu, Z.; Ge, L. Identification of the core bacteria in rectums of diarrheic and non-diarrheic piglets. *Sci. Rep.* **2019**, *9*, 18675. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
- Liu, H.; Wang, J.; He, T.; Becker, S.; Zhang, G.; Li, D.; Ma, X. Butyrate: A Double-Edged Sword for Health? *Adv. Nutr.* **2018**, *9*, 21–29. [\[CrossRef\]](#)
- Auffret, A.; Barry, J.L.; Thibault, J.F. Effect of Chemical Treatments of Sugar Beet Fibre on Their Physico-Chemical Properties and on Their in-Vitro Fermentation. *J. Sci. Food Agric.* **1993**, *61*, 195–203. [\[CrossRef\]](#)
- Yang, C.; Zhang, L.; Cao, G.; Feng, J.; Yue, M.; Xu, Y.; Dai, B.; Han, Q.; Guo, X. Effects of dietary supplementation with essential oils and organic acids on the growth performance, immune system, fecal volatile fatty acids, and microflora community in weaned piglets. *J. Anim. Sci.* **2019**, *97*, 133–143. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)

20. Rolinec, M.; Medo, J.; Gábor, M.; Miluchová, M.; Bíro, D.; Šimko, M.; Juráček, M.; Hanušovský, O.; Schubertová, Z.; Gálik, B. The Effect of Coconut Oil Addition to Feed of Pigs on Rectal Microbial Diversity and Bacterial Abundance. *Animals* **2020**, *10*, 1764. [CrossRef] [PubMed]
21. López-Colom, P.; Castillejos, L.; Barba-Vidal, E.; Zhu, Y.; Puyalto, M.; Mallo, J.J.; Martín-Orúe, S.M. Response of gastrointestinal fermentative activity and colonic microbiota to protected sodium butyrate and protected sodium heptanoate in weaned piglets challenged with ETEC F4. *Arch. Anim. Nutr.* **2019**, *73*, 339–359. [CrossRef]
22. Nowak, P.; Kasprówicz-Potocka, M.; Zaworska, A.; Nowak, W.; Stefańska, B.; Sip, A.; Grajek, W.; Grajek, K.; Frankiewicz, A. The Effect of Combined Feed Additives on Growing Pigs' Performance and Digestive Tract Parameters. *Ann. Anim. Sci.* **2019**, *19*, 807–819. [CrossRef]
23. Luise, D.; Correa, F.; Bosi, P.; Trevisi, P. A Review of the Effect of Formic Acid and Its Salts on the Gastrointestinal Microbiota and Performance of Pigs. *Animals* **2020**, *10*, 887. [CrossRef] [PubMed]
24. Van Immerseel, F.; Boyen, F.; Gantois, I.; Timbermont, L.; Bohez, L.; Pasmans, F.; Haesebrouck, F.; Ducatelle, R. Supplementation of coated butyric acid in the feed reduces colonization and shedding of *Salmonella* in poultry. *Poult. Sci.* **2005**, *84*, 1851–1856. [CrossRef]
25. Gantois, I.; Ducatelle, R.; Pasmans, F.; Haesebrouck, F.; Hautefort, I.; Thompson, A.; Hinton, J.C.; Van Immerseel, F. Butyrate specifically down-regulates *Salmonella* pathogenicity island 1 gene expression. *Appl. Environ. Microbiol.* **2006**, *72*, 946–949. [CrossRef] [PubMed]
26. Mroz, Z.; Reese, D.E.; Overland, M.; van Diepen, J.T.; Kogut, J. The effects of potassium diformate and its molecular constituents on the apparent ileal and fecal digestibility and retention of nutrients in growing-finishing pigs. *J. Anim. Sci.* **2002**, *80*, 681–690. [CrossRef] [PubMed]
27. Caporaso, J.G.; Lauber, C.L.; Walters, W.A.; Berg-Lyons, D.; Lozupone, C.A.; Turnbaugh, P.J.; Fierer, N.; Knight, R. Global patterns of 16S rRNA diversity at a depth of millions of sequences per sample. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2011**, *108*, 4516–4522. [CrossRef]
28. Magoč, T.; Salzberg, S.L. FLASH: Fast length adjustment of short reads to improve genome assemblies. *Bioinformatics* **2011**, *27*, 2957–2963. [CrossRef]
29. Bokulich, N.A.; Subramanian, S.; Faith, J.J.; Gevers, D.; Gordon, J.I.; Knight, R.; Mills, D.A.; Caporaso, J.G. Quality-filtering vastly improves diversity estimates from Illumina amplicon sequencing. *Nat. Methods* **2013**, *10*, 57–59. [CrossRef] [PubMed]
30. Caporaso, J.G.; Kuczynski, J.; Stombaugh, J.; Bittinger, K.; Bushman, F.D.; Costello, E.K.; Fierer, N.; Peña, A.G.; Goodrich, J.K.; Gordon, J.I.; et al. QIIME allows analysis of high-throughput community sequencing data. *Nat. Methods* **2010**, *7*, 335–336. [CrossRef] [PubMed]
31. Edgar, R.C. UPARSE: Highly accurate OTU sequences from microbial amplicon reads. *Nat. Methods* **2013**, *10*, 996–998. [CrossRef] [PubMed]
32. Quast, C.; Pruesse, E.; Yilmaz, P.; Gerken, J.; Schweer, T.; Yarza, P.; Peplies, J.; Glöckner, F.O. The SILVA ribosomal RNA gene database project: Improved data processing and web-based tools. *Nucleic Acids Res.* **2013**, *41*, D590–D596. [CrossRef] [PubMed]
33. Wang, Q.; Garrity, G.M.; Tiedje, J.M.; Cole, J.R. Naive Bayesian classifier for rapid assignment of rRNA sequences into the new bacterial taxonomy. *Appl. Environ. Microbiol.* **2007**, *73*, 5261–5267. [CrossRef] [PubMed]
34. Oksanen, J.; Blanchet, F.G.; Friendly, M.; Kindt, R.; Legendre, P.; McGlinn, D.; Minchin, P.R.; O'Hara, R.B.; Simpson, G.L.; Solymos, P.; et al. Vegan: Community Ecology Package. R package version 2.3-0. 2019. Available online: <https://cran.r-project.org/web/packages/vegan/vegan.pdf> (accessed on 15 June 2021).
35. Segata, N.; Izard, J.; Waldron, L.; Gevers, D.; Miropolsky, L.; Garrett, W.S.; Huttenhower, C. Metagenomic biomarker discovery and explanation. *Genome Biol.* **2011**, *12*, R60. [CrossRef]
36. Castillo, M.; Martín-Orúe, S.M.; Roca, M.; Manzanilla, E.G.; Badiola, I.; Perez, J.F.; Gasa, J. The response of gastrointestinal microbiota to avilamycin, butyrate, and plant extracts in early-weaned pigs. *J. Anim. Sci.* **2006**, *84*, 2725–2734. [CrossRef]
37. Xu, J.; Chen, X.; Yu, S.; Su, Y.; Zhu, W. Effects of Early Intervention with Sodium Butyrate on Gut Microbiota and the Expression of Inflammatory Cytokines in Neonatal Piglets. *PLoS ONE* **2016**, *11*, e0162461. [CrossRef]
38. Han, Y.; Tang, C.; Li, Y.; Yu, Y.; Zhan, T.; Zhao, Q.; Zhang, J. Effects of Dietary Supplementation with *Clostridium butyricum* on Growth Performance, Serum Immunity, Intestinal Morphology, and Microbiota as an Antibiotic Alternative in Weaned Piglets. *Animals* **2020**, *10*, 2287. [CrossRef] [PubMed]
39. López-Colom, P.; Castillejos, L.; Rodríguez-Sorrento, A.; Puyalto, M.; Mallo, J.J.; Martín-Orúe, S.M. Impact of in-feed sodium butyrate or sodium heptanoate protected with medium-chain fatty acids on gut health in weaned piglets challenged with *Escherichia coli* F4. *Arch. Anim. Nutr.* **2020**, *74*, 271–295. [CrossRef] [PubMed]
40. Sun, W.; Sun, J.; Li, M.; Xu, Q.; Zhang, X.; Tang, Z.; Chen, J.; Zhen, J.; Sun, Z. The effects of dietary sodium butyrate supplementation on the growth performance, carcass traits and intestinal microbiota of growing-finishing pigs. *J. Appl. Microbiol.* **2020**, *128*, 1613–1623. [CrossRef] [PubMed]
41. Isaacson, R.; Kim, H.B. The intestinal microbiome of the pig. *Anim. Health Res. Rev.* **2012**, *13*, 100–109. [CrossRef] [PubMed]
42. Le Sciellour, M.; Renaudeau, D.; Zemb, O. Longitudinal Analysis of the Microbiota Composition and Enterotypes of Pigs from Post-Weaning to Finishing. *Microorganisms* **2019**, *7*, 622. [CrossRef] [PubMed]
43. Crespo-Piazuelo, D.; Estellé, J.; Revilla, M.; Criado-Mesas, L.; Ramayo-Caldas, Y.; Óvilo, C.; Fernández, A.I.; Ballester, M.; Folch, M. Characterization of bacterial microbiota compositions along the intestinal tract in pigs and their interactions and functions. *Sci. Rep.* **2018**, *8*, 12727. [CrossRef] [PubMed]

44. Zhao, W.; Wang, Y.; Liu, S.; Huang, J.; Zhai, Z.; He, C.; Ding, J.; Wang, J.; Wang, H.; Fan, W.; et al. The dynamic distribution of porcine microbiota across different ages and gastrointestinal tract segments. *PLoS ONE* **2015**, *10*, e0117441. [\[CrossRef\]](#)
45. Tian, B.; Hua, Y. Carotenoid biosynthesis in extremophilic *Deinococcus-Thermus* bacteria. *Trends Microbiol.* **2010**, *18*, 512–520. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
46. Kaulmann, A.; Bohn, T. Carotenoids, inflammation, and oxidative stress—implications of cellular signaling pathways and relation to chronic disease prevention. *Nutr. Res.* **2014**, *34*, 907–929. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
47. Amat, S.; Lantz, H.; Munyaka, P.M.; Willing, B.P. *Prevotella* in Pigs: The Positive and Negative Associations with Production and Health. *Microorganisms* **2020**, *8*, 1584. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
48. Ramayo-Caldas, Y.; Mach, N.; Lepage, P.; Levenez, F.; Denis, C.; Lemonnier, G.; Leplat, J.J.; Billon, Y.; Berri, M.; Doré, J.; et al. Phylogenetic network analysis applied to pig gut microbiota identifies an ecosystem structure linked with growth traits. *ISME J.* **2016**, *10*, 2973–2977. [\[CrossRef\]](#)
49. Yang, H.; Yang, M.; Fang, S.; Huang, X.; He, M.; Ke, S.; Gao, J.; Wu, J.; Zhou, Y.; Fu, H.; et al. Evaluating the profound effect of gut microbiome on host appetite in pigs. *BMC Microbiol.* **2018**, *18*, 215. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
50. Mach, N.; Berri, M.; Estelle, J.; Levenez, F.; Lemonnier, G.; Denis, C.; Leplat, J.J.; Chevalere, C.; Billon, Y.; Dore, J.; et al. Early-life establishment of the swine gut microbiome and impact on host phenotypes. *Environ. Microbiol. Rep.* **2015**, *7*, 554–569. [\[CrossRef\]](#)
51. Ratajczak, W.; Rył, A.; Mizerski, A.; Walczakiewicz, K.; Sipak, O.; Laszczyńska, M. Immunomodulatory potential of gut microbiome-derived short-chain fatty acids (SCFAs). *Acta Biochim. Pol.* **2019**, *66*, 1–12. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
52. Stackebrandt, E. The family *Lachnospiraceae*. In *The Prokaryotes*; Rosenberg, E., DeLong, E.F., Lory, S., Stackebrandt, E., Thompson, F., Eds.; Springer: Berlin, Germany, 2014; pp. 197–201.
53. Vacca, M.; Celano, G.; Calabrese, F.M.; Portincasa, P.; Gobetti, M.; De Angelis, M. The Controversial Role of Human Gut *Lachnospiraceae*. *Microorganisms* **2020**, *8*, 573. [\[CrossRef\]](#)
54. Ley, R.E.; Turnbaugh, P.J.; Klein, S.; Gordon, J.I. Microbial ecology: Human gut microbes associated with obesity. *Nature* **2006**, *444*, 1022–1023. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
55. Salonen, A.; Lahti, L.; Salojärvi, J.; Holtrop, G.; Korpela, K.; Duncan, S.H.; Date, P.; Farquharson, F.; Johnstone, A.M.; Lobley, G.E.; et al. Impact of diet and individual variation on intestinal microbiota composition and fermentation products in obese men. *ISME J.* **2014**, *8*, 2218–2230. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
56. Zeng, H.; Ishaq, S.L.; Zhao, F.Q.; Wright, A.G. Colonic inflammation accompanies an increase of β -catenin signaling and *Lachnospiraceae*/*Streptococcaceae* bacteria in the hind gut of high-fat diet-fed mice. *J. Nutr. Biochem.* **2016**, *35*, 30–36. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
57. Leng, Y.; Yi, M.; Fan, J.; Bai, Y.; Ge, Q.; Yao, G. Effects of acute intra-abdominal hypertension on multiple intestinal barrier functions in rats. *Sci. Rep.* **2016**, *6*, 22814. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
58. Fan, P.; Liu, P.; Song, P.; Chen, X.; Ma, X. Moderate dietary protein restriction alters the composition of gut microbiota and improves ileal barrier function in adult pig model. *Sci. Rep.* **2017**, *7*, 43412. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
59. Lee, S.H.; You, H.S.; Kang, H.-G.; Kang, S.S.; Hyun, S.H. Association between Altered Blood Parameters and Gut Microbiota after Synbiotic Intake in Healthy, Elderly Korean Women. *Nutrients* **2020**, *12*, 3112. [\[CrossRef\]](#)
60. Shang, Q.; Liu, S.; Liu, H.; Mahfuz, S.; Piao, X. Impact of sugar beet pulp and wheat bran on serum biochemical profile, inflammatory responses and gut microbiota in sows during late gestation and lactation. *J. Anim. Sci. Biotechnol.* **2021**, *12*, 54. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
61. Kanai, T.; Mikami, Y.; Hayashi, A. A breakthrough in probiotics: *Clostridium butyricum* regulates gut homeostasis and anti-inflammatory response in inflammatory bowel disease. *J. Gastroenterol.* **2015**, *50*, 928–939. [\[CrossRef\]](#)
62. Chiu, C.W.; Tsai, P.J.; Lee, C.C.; Ko, W.C.; Hung, Y.P. Application of Microbiome Management in Therapy for *Clostridioides difficile* Infections: From Fecal Microbiota Transplantation to Probiotics to Microbiota-Preserving Antimicrobial Agents. *Pathogens* **2021**, *10*, 649. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
63. Wang, K.; Cao, G.; Zhang, H.; Li, Q.; Yang, C. Effects of *Clostridium butyricum* and *Enterococcus faecalis* on growth performance, immune function, intestinal morphology, volatile fatty acids, and intestinal flora in a piglet model. *Food Funct.* **2019**, *10*, 7844–7854. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
64. Casas, G.A.; Blavi, L.; Cross, T.L.; Lee, A.H.; Swanson, K.S.; Stein, H.H. Inclusion of the direct-fed microbial *Clostridium butyricum* in diets for weanling pigs increases growth performance and tends to increase villus height and crypt depth, but does not change intestinal microbial abundance. *J. Anim. Sci.* **2020**, *98*, skz372. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
65. Chen, L.; Li, S.; Zheng, J.; Li, W.; Jiang, X.; Zhao, X.; Li, J.; Che, L.; Lin, Y.; Xu, S.; et al. Effects of dietary *Clostridium butyricum* supplementation on growth performance, intestinal development, and immune response of weaned piglets challenged with lipopolysaccharide. *J. Anim. Sci. Biotechnol.* **2018**, *9*, 62. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
66. Ormerod, K.L.; Wood, D.L.A.; Lachner, N.; Gellatly, S.L.; Daly, J.N.; Parsons, J.D.; Dal'Molin, C.G.; Palfreyman, R.W.; Nielsen, L.K.; Cooper, M.A.; et al. Genomic characterization of the uncultured *Bacteroidales* family S24-7 inhabiting the guts of homeothermic animals. *Microbiome* **2016**, *4*, 36. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)

PUBLICACIÓN III / PUBLICATION III

Building a prediction model for assessing the risk of *Salmonella* shedding at slaughter in fattening pigs

Bernad-Roche, M., Marín-Alcalá, C.M., Cebollada-Solanas, A., de Blas, I.,

Mainar-Jaime, R.C.

Frontiers in Microbiology 2023, 14:1232490. doi: 10.3389/fmicb.2023.1232490



OPEN ACCESS

EDITED BY

Patrick J. Naughton,
Ulster University, United Kingdom

REVIEWED BY

Martine Denis,
de l'Environnement et du Travail
(ANSES), France
Veronica Cibir,
Experimental Zooprophyllactic Institute of the
Venezie (IZSVe), Italy

*CORRESPONDENCE

Raúl Carlos Mainar-Jaime
✉ rcmainar@unizar.es

RECEIVED 31 May 2023

ACCEPTED 25 July 2023

PUBLISHED 23 August 2023

CITATION

Bernad-Roche M, Marín-Alcalá CM,
Cebollada-Solanas A, de Blas I and
Mainar-Jaime RC (2023) Building a predictive
model for assessing the risk of *Salmonella*
shedding at slaughter in fattening pigs.
Front. Microbiol. 14:1232490.
doi: 10.3389/fmicb.2023.1232490

COPYRIGHT

© 2023 Bernad-Roche, Marín-Alcalá,
Cebollada-Solanas, de Blas I and
Mainar-Jaime. This is an open-access article distributed under
the terms of the [Creative Commons Attribution
License \(CC BY\)](https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/). The use, distribution or
reproduction in other forums is permitted,
provided the original author(s) and the
copyright owner(s) are credited and that the
original publication in this journal is cited, in
accordance with accepted academic practice.
No use, distribution or reproduction is
permitted which does not comply with these
terms.

Building a predictive model for assessing the risk of *Salmonella* shedding at slaughter in fattening pigs

María Bernad-Roche¹, Clara María Marín-Alcalá²,
Alberto Cebollada-Solanas³, Ignacio de Blas¹ and
Raúl Carlos Mainar-Jaime^{1*}

¹Departamento de Patología Animal, Facultad de Veterinaria, Instituto Agroalimentario de Aragón-IA2, Universidad de Zaragoza-CITA, Zaragoza, Spain, ²Departamento de Ciencia Animal, Centro de Investigación y Tecnología Agroalimentaria de Aragón, Instituto Agroalimentario de Aragón-IA2, Universidad de Zaragoza-CITA, Zaragoza, Spain, ³Unidad de Biocomputación, Instituto Aragonés de Ciencias de la Salud (IACS/IIS Aragón), Centro de Investigación Biomédica de Aragón (CIBA), Zaragoza, Spain

Salmonellosis continues to be a major cause of foodborne outbreaks worldwide, and pigs are one of the main sources of human infection. *Salmonella* pork contamination is a major concern for abattoirs and is related to the presence of *Salmonella* in pigs' feces at slaughter. Being able to predict the risk of *Salmonella* shedding in pigs arriving at the slaughterhouse could help mitigate abattoir and carcass contamination. For this purpose, 30 batches of 50 pigs each were selected from 30 different fattening units. The pigs were tagged and bled for the detection of antibodies against *Salmonella* approximately one month before slaughter. Pooled floor fecal samples were also collected from 10 pens per unit for *Salmonella* detection, and a questionnaire on biosecurity was administered to each farm. At the abattoir, colon content was collected from each tagged pig for the *Salmonella* shedding assessment. A predictive model for *Salmonella* shedding at slaughter was built with two-third of the pigs by employing random-effects logistic regression analysis, with *Salmonella* shedding as the dependent variable and pig serology and other farm/environmental characteristics as the independent variables. The model included farm as the grouping factor. Data from the remaining one-third of the pigs were used for model validation. Out of 1,500 pigs initially selected, 1,341 were identified at the abattoir and analyzed. *Salmonella* was detected in 13 (43.3%; 95%CI = 27.4–60.8) of the fattening units. The mean batch seroprevalence (cut-off OD% ≥ 40) among the fattening units was 31.7% (95%CI = 21.8–41.0), and a total of 316 pigs (23.6%; 95%CI = 21.4–25.9) shed *Salmonella* at slaughter. The model predicted reasonably well (Area under the curve = 0.76; $P < 0.05$) whether a pig would shed *Salmonella* at slaughter, with estimates of sensitivity and specificity at 71.6% and 73.6%, respectively. Serology, the percentage of *Salmonella*-positive pens on the farm, and the internal biosecurity score were significantly associated ($P < 0.05$) with *Salmonella* shedding at the abattoir, and several scenarios were observed by the model. The study highlighted that although serology may be helpful for identifying batches of pigs at risk of shedding *Salmonella* upon their arrival at the abattoir, it may not be necessary in some scenarios.

KEYWORDS

prediction model, *salmonella* control, abattoir, shedding, swine

1. Introduction

Salmonellosis remains one of the most frequent foodborne zoonoses in the EU, with 60,050 human cases (15.7/100,000 inhabitants) in 2021. In the last year, *S. Enteritidis*, *S. Typhimurium*, and the monophasic variant of *S. Typhimurium* (mST) were among the most reported serovars, with the latter two mainly associated with contaminated pork (EFSA and ECDC, 2022).

In contrast to the fowl industry, to date, few EU countries have established National Control Programs (NCPs) against pig salmonellosis. On-farm *Salmonella* control programs in fattening swine were expected to be initiated in all EU after Regulation EC No. 2160/2003. However, most EU countries did not implement them, likely because they were not considered cost-effective (Anonymous, 2011).

The first comprehensive *Salmonella* NCP for pigs in Europe was established in Sweden in the 60s (Wierup, 2006) after a major food-borne outbreak in 1953 (Lundbeck et al., 1955), which was followed later by Norway, Finland, and Denmark in 1995 (Mousing et al., 1997; Majjala et al., 2005; Lyngstad et al., 2007). All but Denmark's were focused on eradication and had bacteriological analyses as the keystone. Denmark developed its own NCP based on both bacteriological and serological analyses, and its focus was mainly on *Salmonella* control. In all cases, the farm-level prevalence was initially low, and strict measures were enforced when *Salmonella* was found. These measures included the application of economic penalties. Positive results were observed in reducing the overall *Salmonella* prevalence in pig carcasses but at a high cost (Anonymous, 2011).

After the success of the Scandinavian action plans and along with EU regulation, new NCPs followed suit in other European countries: Germany and United Kingdom in 2002 (Osterkorn et al., 2001; BPEX, 2002; Snary et al., 2010), Ireland in 2003 (Statutory Instrument No. 165/2002), the Netherlands in 2005 (Hanssen et al., 2007), and Belgium in 2007 (Méroc et al., 2012). In general, these programs were similar to the Danish NCP, focusing on control, but they were based mostly on serological analysis of a relatively small number of pigs per batch slaughtered. Thus, pig herds were categorized into three different risk groups: low-risk (I), medium-risk (II), and high-risk herds (III). Category III herds had to undertake farm-specific activities aimed at reducing their *Salmonella* exposure and, accordingly, their *Salmonella* seroprevalence. Although no penalties were generally applied, incentives were offered to farmers in some countries, such as to be included in pork quality assurance schemes, particularly, the Qualität und Sicherheit (QS) in Germany, the British Quality Assured Pork (BQAP) in the UK, the Bord Bia Quality Assurance Scheme in Ireland, and the IKB Nederland Varkens in The Netherlands.

Despite these efforts, there is no evidence in the scientific literature of any significant change in swine *Salmonella* infection reduction in pigs or in human cases related to pork consumption, and the overall *Salmonella* seroprevalence remains stable in pigs in many of these non-Scandinavian countries (Correia-Gomes et al., 2021). Only Germany recently reported some positive results after more than 20 years since the implementation of its program (Anonymous, 2021). Meanwhile, the United Kingdom

suspended its serological monitoring in 2012 (Anonymous, 2012), and Belgium, which also suspended its serological monitoring, only has maintained veterinary advice on the control of pig salmonellosis (Anonymous, 2015).

The overall lack of efficacy and the high cost of the on-farm control of pig salmonellosis, especially for countries with large pig census (Anonymous, 2011; Gavin et al., 2018), suggest the need to revisit these NCPs. Since in the EU, pig salmonellosis is by far a public health problem, not a pig health problem, a change in the programs' main objective would be advisable. Asymptomatic *Salmonella*-infected pigs commonly arrive at the abattoir for slaughter [European Food Safety Authority (EFSA), 2011], and they are particularly prone to *Salmonella* shedding (Rostagno et al., 2010). Thus, live pigs, through their feces, are a major source of abattoir environmental *Salmonella* contamination, likely being the main source of carcass contamination and, consequently, pork and related products (Argüello et al., 2013a; Swart et al., 2016; Marin et al., 2020). Thus, the main objective of a NCP aimed at reducing the incidence of human salmonellosis may be to focus on finding ways to minimize *Salmonella* contamination in abattoirs, which in the short term, could be more cost-effective than trying to stop the infection within pig farms. Being able to predict the likelihood that a pig will shed *Salmonella* upon its arrival at the abattoir may be the first step to reaching this objective.

Casanova-Higes et al. (2017) observed that pigs shedding *Salmonella* at slaughter seroconverted earlier during the fattening period than non-shedder pigs. A subsequent study showed that on-farm serology could, to some extent, help predict the probability of a pig shedding *Salmonella* at slaughter, thus allowing for the prompt implementation of on-farm and slaughter interventions to reduce the likelihood of abattoir environmental contamination with *Salmonella* (Mainar-Jaime et al., 2018). However, since these studies were carried out on a small number of pig batches from a single *Salmonella*-positive farm and with no additional information, their results should be confirmed further.

Thus, the main objective of this study was to assess whether serology and other farm and/or environmental characteristics (*Salmonella* pen contamination, farm biosecurity, season, etc.) could be used as predictors of *Salmonella* shedding at the abattoir. By predicting the risk of *Salmonella* shedding for a given batch of pigs upon their arrival at the abattoir, subsequent carcass contamination could be prevented by implementing both on-farm and abattoir control strategies.

2. Materials and methods

2.1. Animal selection and sampling

Between December 2019 and March 2022, 30 batches of 50 pigs each (a total of 1,500 pigs) from 30 different fattening units (average size $\approx$ 1,000 pigs/unit) were chosen for this study. Farms were selected based on farmers' willingness to collaborate and the availability of veterinary services.

The 50 animals from each fattening unit were selected approximately 3–4 weeks before slaughter, as suggested in a previous study (Mainar-Jaime et al., 2018). They were chosen from

different pens along the fattening units (from 1 to 3 pigs/pen) among the first pigs of the unit to be sent for slaughter (the heaviest ones). At that moment, pigs were ear-tagged, and their blood samples were taken for the detection of specific antibodies against *Salmonella*. In addition, pooled floor fecal (FF) samples were collected from 10 pens distributed at different points of the fattening unit (corners, middle areas, and right and left to aisles) for the detection of *Salmonella* on the farm.

The selected pigs were loaded onto a clean and disinfected truck along with other pigs from the same fattening unit (up to approximately 200 pigs/truck); thus, they were not mixed with pigs from other different units. Transport to slaughter usually occurred on Monday mornings, but they were not necessarily the first batches to be slaughtered that day. In general, farms were not more than 2 h away from the abattoir (mean distance farm to abattoir: 33 km; 95%CI = 25.4–40.5). At the abattoir, pigs were kept in a clean pen without mixing them with pigs of other origins. Slaughtering was performed within the first two hours after arrival. All the procedures followed the usual abattoir routine, and no specific changes were made for this study. Tagged animals were identified at the slaughter line, and after evisceration, a minimum of 25 g of intestinal (colon) content (IC) was collected from the gastrointestinal package of each of these pigs for assessing their *Salmonella* shedding status. After collection, all samples were transported directly to the laboratory for immediate processing.

2.2. Farm biosecurity questionnaire

A questionnaire on the different aspects of farm biosecurity was filled in by the veterinarian responsible for each farm included in the study. This questionnaire was based on that available through Biocheck. Gent BV, Belgium (<https://biocheckgent.com/en>). Briefly, it consisted of a risk-based scoring system and retrieved information on external and internal farm biosecurity. Regarding external biosecurity, the factors considered were the purchase of animals, transport of animals, removal of manure and dead animals, feed, water and equipment supply, personnel and visitors, vermin and bird control, and environmental region. Regarding internal biosecurity, the factors considered were disease management, fattening unit management, measures between compartments and the use of equipment, and cleaning and disinfection. For each category, a score between 0 for the worst scenario and 100 for the best biosecurity level was obtained. A final score on the overall farm biosecurity level, which was computed as the average of external and internal biosecurity scores, could then be calculated. These results could be further compared to national score averages.

2.3. Serological analysis

Sera were analyzed by an indirect enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) for the presence of specific antibodies against *Salmonella* (Herdcheck Swine *Salmonella* test, IDEXX Laboratories, Westbrook, ME, USA). This test is designed to detect antibodies to the LPS *Salmonella* B, C1, and D serogroups

(O-antigens 1, 4, 5, 6, 7, and 12), which are the most common serotypes isolated in pigs. Individual results were presented as optical density percentages (OD%) as compared to the control sera. For farm seroprevalence estimates, a high cut-off value (OD% ≥ 40) was used to deem a pig as seropositive. Given the limited test's sensitivity and specificity on field samples (73% and 95%, respectively; Mainar-Jaime et al., 2008), high OD% values allowed for the minimization of the number of false-positive individual results.

2.4. *Salmonella* isolation and identification of the main serotypes

Salmonella identification from FF and IC samples was carried out following the standard ISO 6579-1:2017 method. A colony from each *Salmonella*-positive culture was selected for PCR identification of the two major serotypes of concern in the pig industry, i.e., *S. Typhimurium* and the mST. These two serotypes are the second and third most prevalent in human cases, and a high proportion of them are related to pig sources (EFSA and ECDC, 2022). For that purpose, a duplex PCR that simultaneously amplifies a fragment between the genes *fljB* and *fljA* and the phase-2 flagellar gene (*fljB*) was used (Tennant et al., 2010; Barco et al., 2011).

2.5. Pulsed-field gel electrophoresis

Cross-contamination may occur during transport and lairage (Argüello et al., 2013a). Therefore, to confirm the spread of isolates from the farm to the slaughter, the genetic relationship between the *Salmonella* strains shed by pigs at slaughter (IC samples) and those isolated from farm FF samples was assessed by performing PFGE analysis (Ribot et al., 2006). PFGE analysis was performed on isolates identified as *S. Typhimurium* or mST.

Only isolates from FF samples and IC samples from the same farm that showed the same serotype were analyzed. If several isolates met this criterion, then a maximum of three pig isolates and three FF isolates per farm were analyzed. PFGE pattern analysis was performed using the BIONUMERICS software (version 6; Applied Maths, Sint-Martens-Latem, Belgium) with Dice's coefficient and the unweighted pair group method with arithmetic averages (UPGMA dendrogram type), employing a position tolerance of 2.0% and optimization of 2.0%. Fragments less than 30 kb long were not included in the final analysis as they are produced by plasmid DNA (Kariuki et al., 2000; Peters et al., 2003; Cooke et al., 2008).

2.6. Statistical analyses and *Salmonella* shedding predictive model development

Estimates of on-farm *Salmonella* seroprevalence, pen prevalence, and prevalence of *Salmonella* shedding at slaughter with their corresponding 95% confidence intervals (95%CI) were calculated for the fattening units.

To create the predictive model for *Salmonella* shedding at slaughter, a random-effects logistic regression analysis was conducted, with *Salmonella*-shedding pigs at the abattoir (yes/no) as the dependent variable. Serology (OD% values), internal, external, and total biosecurity, percentage of *Salmonella*-positive pens in the farm (three categories: no positive pens, less than 20% of positive pens, $\geq 30\%$ of positive pens), and other farm and/or environmental characteristics that may be related to *Salmonella* infection, such as the season of sampling (spring, summer, autumn, and winter), the distance (in km) and time (in minutes) of transport from the farm to the abattoir, and the time elapsed between farm and abattoir samplings (in days) were the independent variables. The presence of *S. Typhimurium*/mST in the farm (yes/no) was also included in the model as *Salmonella* shedding, and immune response could be related to these serotypes (Ivanek et al., 2012). Since animals were grouped within farms, the farm was considered a random (grouping) variable to account for the correlation between individual pigs coming from the same farm (i.e., intraclass correlation, ICC). Two-thirds of the study population, which was defined as the total number of pigs for which all required information was obtained, were randomly selected to run the main model. The remaining third of the pigs were used for model validation (reproducibility).

Receiver operating characteristic (ROC) curves were built from potential logistic models, and the area under the curve (AUC) was used as a method for selecting the best predictive model (Greiner et al., 2000). Final estimates of the probability of shedding *Salmonella* were calculated for each pig from the selected logistic regression equation, and different scenarios were identified according to the different levels of the variables included in the model. Furthermore, a cut-off value was selected, based on Pythagoras' theorem-based method, which is a new approach based on the smallest sum of squares of 1-sensitivity and 1-specificity, to assess the diagnostic accuracy of the prediction when sensitivity (Se) and specificity (Sp) were valued equally. The cut-point chosen by this method always selects the one closest to the top-left corner of the ROC curve, regardless of its shape (Froud and Abel, 2014).

Statistical analyses were performed using the STATA software (STATA/IC 12.1. StataCorp. LP, College Station, TX, USA) and MedCalc[®] statistical software version 20.215 (MedCalc Software Ltd, Ostend, Belgium).

3. Results

3.1. Farm biosecurity and *Salmonella* contamination at the farm

The 30 selected farms presented a mean overall biosecurity score of 73.31% (ranging from 51% to 84%) (Figure 1). The mean internal biosecurity score for these farms was 67.80% (min.: 40%, max.: 82%), while their mean external biosecurity score was 78.98% (min.: 62%, max.: 89%).

Salmonella was detected in 13 (43.3%; 95%CI = 27.4–60.8) of the fattening units sampled, with a mean pen prevalence of 36.9% (95%CI = 22.6–51.2) in the *Salmonella*-positive units. *S. Typhimurium* was present in six (46.2%), the mST in eight (61.5%), and other serotypes in only two (15.4%) of the pig units.

Seven (53.8%) of the *Salmonella*-positive units showed $\geq 30\%$ of positive pens.

Salmonella was recovered from 48 out of 300 pooled FF samples (16%; 95%CI = 12.3–20.6) analyzed. Among the positive FF samples, *S. Typhimurium* was isolated in 21 samples (43.7%; 95%CI = 30.7–57.7), and the mST was isolated in 20 samples (41.7%, 95%CI = 28.9–55.7). *Salmonella* isolates belonging to serotypes other than these two were found in only seven FF samples (14.6%; 95%CI = 7.3–27.2).

3.2. *Salmonella* farm seroprevalence

Out of the 1,500 pigs initially ear-tagged at the farm, a total of 1,341 (89.4%) were further identified at slaughter, and IC samples were collected (an average of 44.7 pigs/fattening unit; 95%CI = 42.6–46.8). Serological analyses were performed on these 1,341 pigs. The mean seroprevalence (cut-off value OD% ≥ 40) among the 30 units was 31.7% (95%CI = 21.8–41.0), but it differed significantly among farms, ranging from a minimum of 2.3% to a maximum of 87.0%. Only six of these farms showed seroprevalences below 10%. The distribution of the seroprevalence among pig farms is shown in Figure 2.

3.3. Prevalence of *Salmonella* shedding at the slaughterhouse

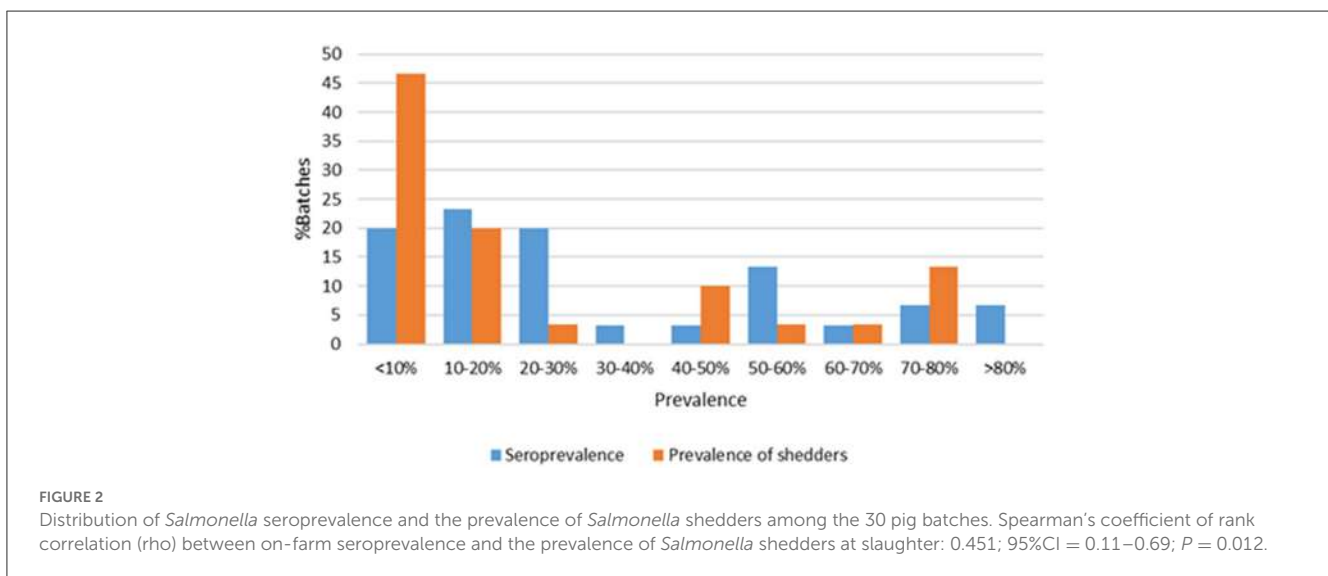
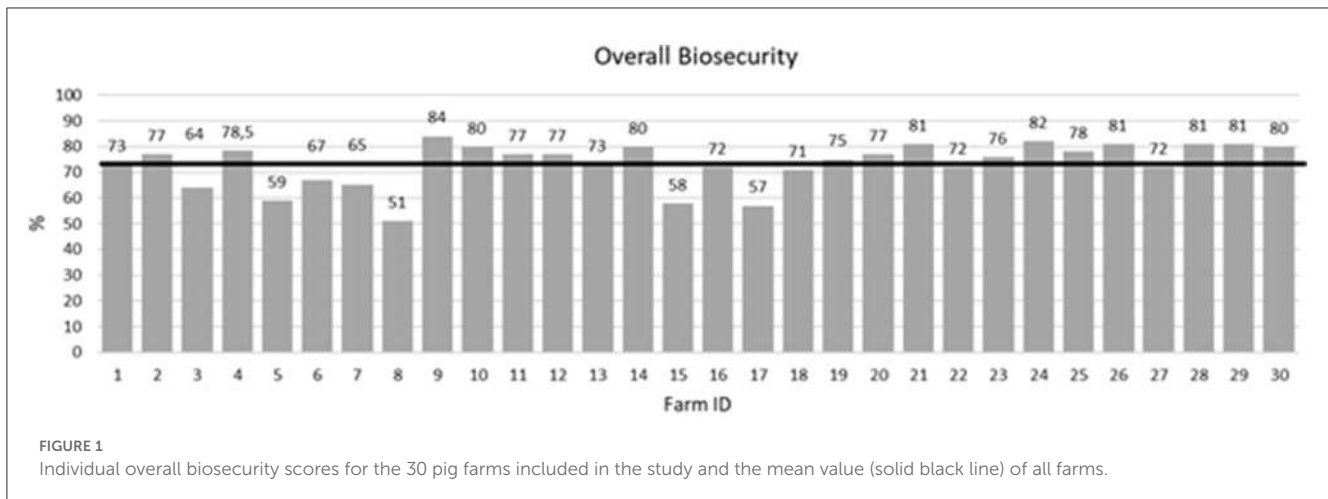
A total of 316 pigs (23.6%; 95%CI = 21.4–25.9) were shedding *Salmonella* at slaughter. The prevalence of shedding differed significantly among farm batches, ranging from 0% to a maximum of 79.4%. All pigs were *Salmonella* negative only in three of these batches. The distribution of *Salmonella* shedding prevalence among pig batches is shown in Figure 2.

The major serotype identified was the mST, which was isolated in 151 pigs (47.8%; 95%CI = 42.3–53.3). *S. Typhimurium* was isolated in 71 pigs (22.5%; 95%CI = 18.2–27.4). Serotypes other than *S. Typhimurium* and the mST were identified in 94 pigs (29.7%; 95%CI = 25.0–35.0).

3.4. PFGE

Since *S. Typhimurium* and the mST were the two major serotypes involved (isolated in $>80\%$ PFF samples and 70% IC samples), PFGE analysis was performed on these *Salmonella* serotypes but only when the same *Salmonella* serotype was detected in both FF and IC samples from the same fattening unit. A total of 20 *Salmonella* isolates from FF samples and 26 isolates from IC samples from nine *Salmonella*-positive units were submitted for PFGE analysis.

PFGE analysis showed 11 different *Xba*I patterns (based on a similarity cut-off of $\geq 90\%$) (Figure 3). The observed PFGE clusters matched well with the serotypes. Four main clusters were observed for *S. Typhimurium* (clusters IV, V, VI, and XI), including only



three farms, and seven for mST (clusters I, II, III, VII, VIII, IX, and X).

Salmonella isolates from FF samples were grouped into four different PFGE patterns (I, V, VI, and XI). Clusters VI and XI were composed only of isolates from FF samples. Within the other two clusters (clusters I and V), isolates from IC samples obtained from pigs from the corresponding fattening unit were also included. Overall, 65.4% of the IC isolates analyzed were included within these two clusters. At least one genetic relationship between *Salmonella* isolates from IC and FF samples was detected in 77.7% of the pig units.

3.5. *Salmonella* shedding prediction model development and validation

Two-thirds (885 animals) of the 1,341 pigs were randomly selected for building the predictive model. The results of the random-effects logistic regression analysis showed three variables related to *Salmonella* shedding at the abattoir, namely, serology

(included as the logarithm of OD% values), the percentage of *Salmonella*-positive pens in the farm (used as a categorical variable based on percentiles: no positive pens; low percentage of positive pens, $\leq 20\%$; and high percentage of positive pens, $> 20\%$), and the internal biosecurity score (also used as a categorical variable based on percentiles: low score, $< 64\%$; medium score, from 64 to 77%; and high score, $> 77\%$) (Table 1). The random-effects logistic regression analysis indicated a significant clustering effect of "Farm" ($ICC = 0.33$; $P < 0.001$).

Individual serology was positively related to *Salmonella* shedding at the abattoir as increasing OD% values increased the odds of shedding ($OR = 1.75$; 95%CI = 1.06–2.87). Pigs from fattening units in which *Salmonella* was isolated from 10 to 20% of the pens had approximately five times higher odds of shedding *Salmonella* at the abattoir than pigs from units where *Salmonella* was not isolated from any pen ($OR = 5.46$; 95%CI = 1.19–24.95). These odds were even higher when *Salmonella* was detected in $\geq 30\%$ of the pens in the unit ($OR = 8.18$; 95%CI = 2.07–32.33; $P < 0.01$). Regarding farm biosecurity, medium and high internal biosecurity scores significantly decreased the odds of a pig shedding *Salmonella* when compared to low biosecurity scores

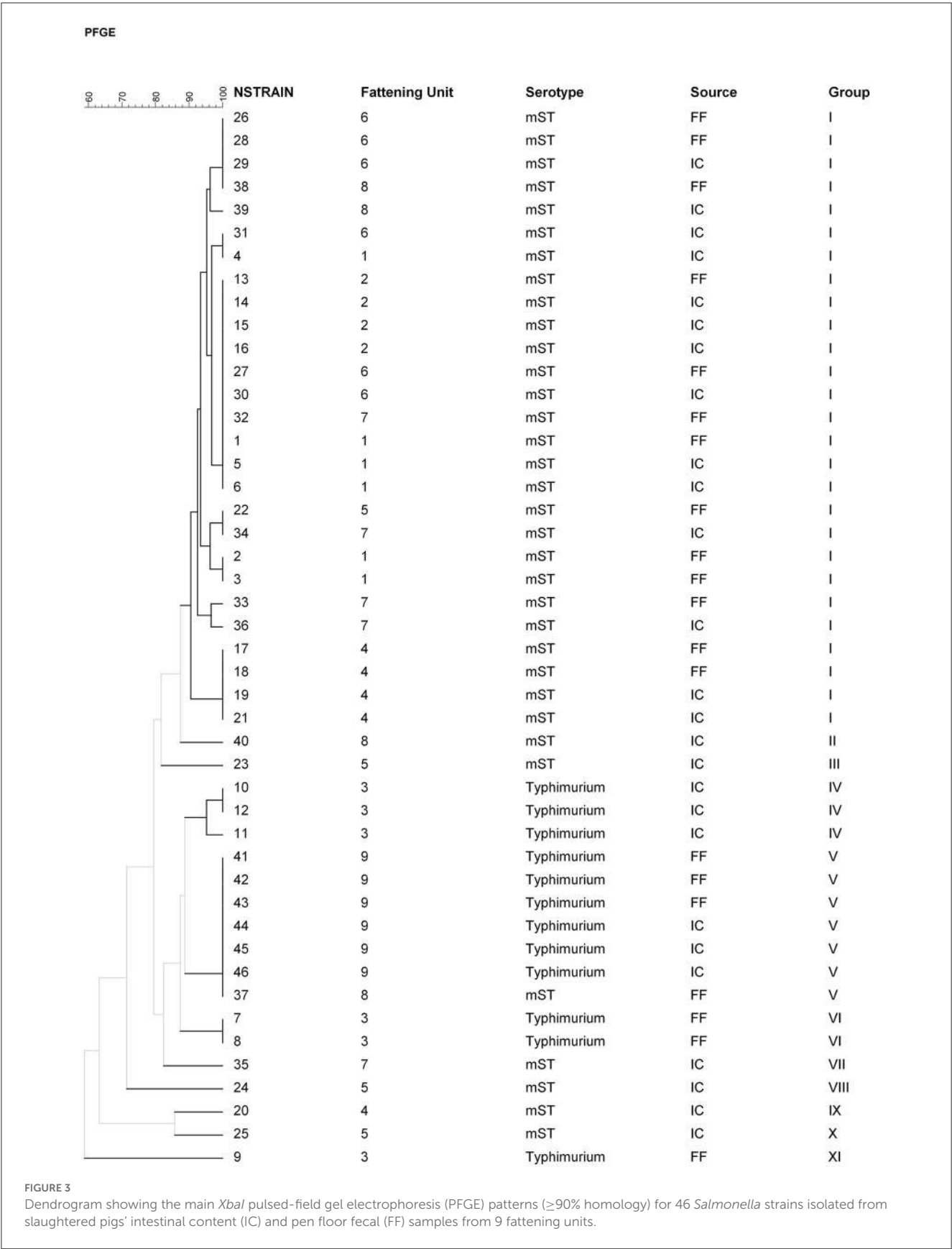
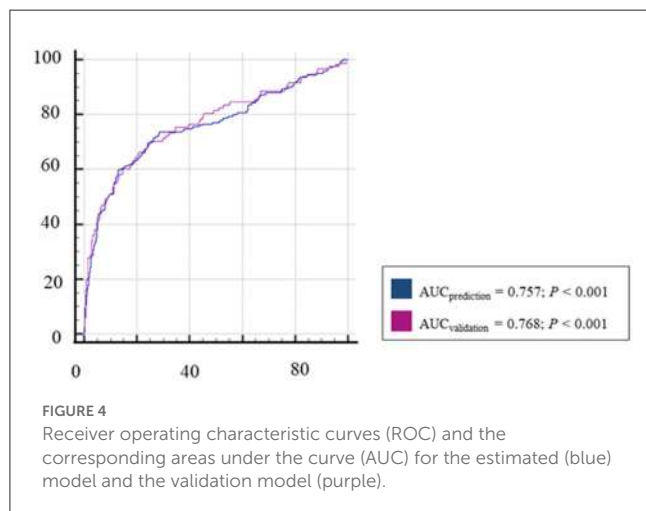


TABLE 1 Results of the random-effects logistic regression analysis* for predicting *Salmonella* shedding at the abattoir.

	Odds ratio (OR)	P-value	95% CI(OR)
Serology (LogOD%)	1.74	0.028	1.06–2.87
% <i>Salmonella</i> -positive pens			
0 ^a	1	-	-
10–20	5.46	0.029	1.19–24.95
≥30	8.18	0.003	2.07–32.33
Internal biosecurity score			
<64% ^a	1	-	-
64–77%	0.25	0.043	0.07–0.96
>77%	0.20	0.050	0.04–0.99
Constant	0.11	0.005	0.03–0.52

*Farm regarded as a grouping (random) variable.

^aReference category. Intraclass correlation coefficient (ICC): 0.33 (95%CI = 0.19–0.50).



(OR = 0.25; 95%CI = 0.07–0.96 and OR = 0.20; 95%CI = 0.04–0.99, respectively).

The prediction model built with these three factors showed a good ability to predict whether an animal will shed *Salmonella* at the abattoir. The AUC (0.76) was significantly different from that for a non-discriminatory model (Figure 4). The best cut-off value for maximizing Se (i.e., its ability to correctly identify an animal that will be shedding *Salmonella* after its arrival to the abattoir) and Sp (i.e., its ability to correctly identify an animal that will not shed *Salmonella* at the abattoir) was 25.9%. The associated diagnostic Se and Sp for that cut-off value were 71.6% and 73.6%, respectively (Table 2).

The model was rerun using data from the one-third left of the pig population ($N = 456$) for validation purposes. The comparison between the predictive and the validation models showed non-significant differences (Table 2 and Figure 4).

Figure 5 shows the predicted probability of shedding *Salmonella* at the abattoir according to serological values (ELISA OD%) after considering the proportion of *Salmonella*-positive

TABLE 2 Prediction parameters for the estimated model and the validation model.

	Estimated model	Validation model
AUC	0.757	0.768
95% CI (AUC)	0.728–0.785	0.727–0.806
Pythagoras cut-off*	25.88	26.47
Sensitivity	71.56	70.41
95% CI (sensitivity)	65.1–77.4	60.3–79.2
Specificity	73.61	74.58
95% CI (specificity)	70.1–76.9	69.7–79.0

AUC, Area under the curve.

*Estimated as the smallest sum of squares of 1-sensitivity and 1-specificity (Froud and Abel, 2014).

pens in the fattening units and their internal biosecurity scores. In two scenarios, serology would not add significant information for considering whether a pig would shed *Salmonella* at the abattoir: in the case of farms with high or medium internal biosecurity with no *Salmonella*-positive pens or in the case of farms with low internal biosecurity with at least one *Salmonella*-positive pen.

4. Discussion

In this study, a total of 1,341 pigs from 30 farms that were willing to participate and were located in Northeast Spain, the largest pig production region in Spain (MAGRAMA, 2021), were selected. Even though pig salmonellosis is considered a public health concern, *Salmonella* contamination was detected in 43.3% of the farms, a figure comparable to that reported in 2003–2004 in a similar study on the entire country (García-Feliz et al., 2007). More concerning, the proportion of pigs shedding *Salmonella* at the abattoir was also high (23.6%), with some pig batches reaching up to 80% and with zoonotic *S. Typhimurium* and the mST being the predominant serotypes. These pigs are likely major sources of carcass contamination (Argüello et al., 2013a; Marin et al., 2020), and finding ways to prevent this shedding should be of utmost importance.

As indicated by the random-effects logistic model, the proportion of pigs shedding *Salmonella* at the abattoir was strongly related to the presence of *Salmonella* in the fattening unit from which pigs came (Table 1). This relationship was supported to some extent by the identification through PFGE analyses of genetic matches between *Salmonella* isolates from pen FF and pig IC samples in most of the analyzed batches (Figure 3), despite the possibility of cross-contamination during transport or lairage (Argüello et al., 2013a). These findings emphasized the role that *Salmonella* farm contamination plays in *Salmonella* shedding at slaughter and suggested that *Salmonella* control should begin at the farm (de Busser et al., 2013).

A thorough biosecurity questionnaire was carried out on all the pig farms to describe their overall biosecurity level. On average, they presented good biosecurity levels. The mean biosecurity score for these farms was 73%, which appears to be somewhat higher than the Spanish national average (68%, from 275

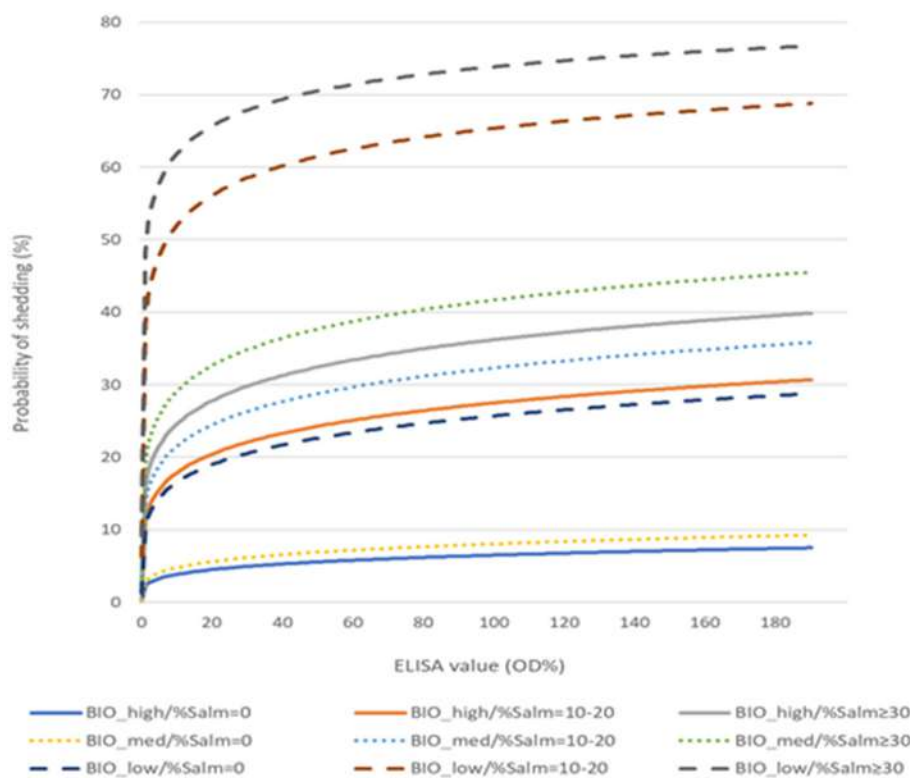


FIGURE 5

Probability of *Salmonella* shedding at the abattoir as a function of serology (ELISA OD% values), farm internal biosecurity (BIO: high, medium, and low), and the percentage of *Salmonella*-positive pens in the farm (%Salm: 0%, 10–20% and $\geq 30\%$).

questionnaires) and even higher than the national average for other big European pig-producer countries such as Germany (64%; 180 questionnaires), The Netherlands (69%; 198 questionnaires), Italy (71%; 353 questionnaires), or Ireland (72%; 486 questionnaires). However, the score was lower than that in Belgium (75%; 10,068 questionnaires) (as checked at biocheck.ugent.be on 31 January 2023). However, despite this good level of overall biosecurity, serological results suggested that *Salmonella* was circulating within most farms, highlighting the difficulties in controlling it at the farm level. On average, 32.9% of the pigs presented high ELISA OD% values ($\geq 40\%$). Based on these results, one-third of the farms would be classified within the high-seroprevalence category ($\geq 40\%$ seroprevalence), and another one-third would be classified within the medium category (between 20% and 40% seroprevalence), according to the main NCPs. Only six farms showed seroprevalence levels below 10%. These results might also explain to some extent the high proportion of pigs shedding *Salmonella* at the abattoir, as a significant positive but weak association was observed in the logistic model between pig serology and *Salmonella* shedding at slaughter (Table 1). Pigs with much higher ELISA OD% values would have somewhat higher odds of shedding *Salmonella* at slaughter (Kranker et al., 2003; Sørensen et al., 2004; Korsak et al., 2006; Mainar-Jaime et al., 2018).

In this study, neither the overall nor the external biosecurity scores were related to the reduction of *Salmonella* shedding at the abattoir (Table 1). Although the biosecurity level of farms is, in general, considered to be beneficial to reducing bacterial

transmission, it appears that biosecurity cannot reduce *Salmonella* prevalence by itself (Alarcón et al., 2021; Youssef et al., 2021). The implementation of efficient on-farm *Salmonella* control measures will depend on farmers' perception of the disease and their motivation to maintain them on an ongoing basis (Fraser et al., 2010; Marier et al., 2016). However, pig salmonellosis is usually asymptomatic, that is, of low concern for farmers and swine production veterinarians.

The predictive model built with these three factors, i.e., serology, farm internal biosecurity, and *Salmonella* pen prevalence, showed an acceptable ability to predict whether an animal will shed *Salmonella* at the abattoir. Thus, according to the model, a pig with a predicted probability of shedding *Salmonella* greater than 26% would have a 71.6% probability of being a true shedder. If the predicted probability was $\leq 26\%$, the animal would have a 73.6% probability of being a true non-shedder. Therefore, estimating the proportion of animals with a model probability higher than 26% in a given batch of pigs intended for slaughter would allow for the assessment of the overall risk of shedding for that batch. Once the potential risk of *Salmonella* shedding has been assessed 3–4 weeks before slaughter, stakeholders could act according to the results obtained. At the farm level, control measures could be implemented to minimize the likelihood of *Salmonella* shedding at slaughter. For instance, the addition of organic acids in food/water could help reduce shedding (de Busser et al., 2009; Argüello et al., 2013b; Lynch et al., 2017; Bernad-Roche et al., results to be published). Additionally, the abattoir, being aware of the risk, could implement

mitigation measures such as logistic slaughter (Swanenburg et al., 2001; Hotes et al., 2011) or even the addition of organic acids to the water at lairage (Bernad-Roche et al., 2022), to attempt to reduce the risk of *Salmonella* shedding. These interventions will only be required on those batches of pigs that present probabilities of *Salmonella* shedding above an established threshold.

It is interesting to note that in farms with high or medium internal biosecurity scores (i.e., scores >64%) and where no *Salmonella*-positive pens were detected, no animals could be considered shedders at slaughter (i.e., with predicted probability >26%), regardless of the ELISA OD% values (Figure 5). Likewise, serology would be unnecessary in the case of farms with low internal biosecurity when at least one pen is positive for *Salmonella*, as all pigs would show high predicted probabilities of shedding the bacterium at slaughter. In this second scenario, the likelihood of a pig becoming infected will be high, since *Salmonella* should be able to circulate easily among pens in farms with low internal biosecurity (Baptista et al., 2010).

These results emphasized the importance of internal biosecurity in the transmission of *Salmonella* within the farm. The internal biosecurity questionnaire included factors such as disease management (i.e., vaccination and treatment protocols and frequency of health status assessment), fattening unit management (i.e., all-in/all-out system and pig mix and density), measures between compartments and the use of equipment (i.e., foot baths, cleaning and disinfection after equipment usage, workflow from younger to older pigs, and sharing equipment with other farms), and cleaning and disinfection (i.e., after every production cycle, protocols, and drying after cleaning and disinfection). Cleaning and disinfection along with feed, water, and bedding are considered by experts some of the most important biosecurity measures to control *Salmonella* in indoor settings (De Lucia and Ostanello, 2020; Galipó et al., 2023). However, more research is required to determine with more certainty the most-effective measures from the human health perspective (Youssef et al., 2021).

In contrast to the two previous scenarios, in the case of any of the other situations (i.e., acceptable internal biosecurity with the presence of *Salmonella*-positive pens or low internal biosecurity and no *Salmonella*-positive pens), serology would add useful information to the decision of whether a pig should be considered of risk for *Salmonella* shedding at the abattoir. As an example, pigs with ELISA values >30% would be associated with abattoir *Salmonella* shedding if they belong to farms with medium internal biosecurity, along with the presence of *Salmonella* in 10–20% of the pens. If they belong to a similar farm but with high internal biosecurity, the pigs of risk would be those showing much higher ELISA values (close to 80%). ELISA values would also help interpret the possible shedding status of a pig from a low internal biosecurity farm when no *Salmonella*-positive pens are detected (Figure 5). Therefore, considering the different scenarios that are possible according to the model, the simplest way to proceed with the estimation of the risk of *Salmonella* shedding at slaughter would be to start with an assessment of the farms' internal biosecurity and the *Salmonella* pen prevalence. Depending on the results, additional serological analyses should be carried out on a representative sample of the pigs from the batch.

Although many studies have shown the lack of reliability of indirect ELISA tests for ascertaining the individual *Salmonella* status of a pig, either infection or shedding (Nollet et al., 2005; Farzan et al., 2007; Gradassi et al., 2015), they could be of relative value when used on groups of pigs (Sørensen et al., 2004; Korsak et al., 2006; Farzan et al., 2007). In this study, a significant but low correlation was observed between the *Salmonella* seroprevalence of a given batch and the proportion of shedding pigs at the abattoir for that batch (Figure 2), when no other factors were taken into account. This simple approach might not be sufficient for accurately predicting *Salmonella* shedding at the abattoir.

It appears that the value of serology for predicting shedding depends on the context in which it is used. Similar to the results of a previous study (Mainar-Jaime et al., 2018), the model in this study indicated that higher individual OD% values were related to higher odds of *Salmonella* shedding at slaughter. This was likely due to the presence of stressful factors such as the transport and waiting (lairage) times that pigs went through, which would favor the shedding among the infected pigs (Duggan et al., 2010; Simons et al., 2016). In addition, other factors, such as the internal biosecurity of the farm and the presence of *Salmonella* in the farm, would also play a significant role in interpreting ELISA values in this context. Thus, these results might help explain, at least in part, the difficulties that many NCPs face in properly assessing the *Salmonella* status of pig farms, as many of them are based exclusively on serological results usually obtained from a small and hardly representative number of animals, without considering other factors (Mainar-Jaime et al., 2018; Correia-Gomes et al., 2021).

5. Conclusion

This study highlighted the importance of the context in which serology is used for pig salmonellosis control. Using it 3–4 weeks prior to sending the pigs to slaughter might be helpful for identifying batches of pigs at risk of shedding *Salmonella* upon their arrival at the abattoir. In some cases, being aware of the farm's internal biosecurity level and performing a bacteriological sampling of a representative number of pens might be sufficient for estimating the risk of *Salmonella* shedding for a given batch of pigs ready for slaughter. In others, serology would be required for a more accurate interpretation of the results, but in both situations, an acceptable level of knowledge about the risk of *Salmonella* shedding for a given batch of slaughter pigs could be achieved. Reducing the likelihood of *Salmonella* shedding at this stage would be an important step for reducing *Salmonella* carcass contamination.

An additional advantage of this approach is that *Salmonella* control would not initially rely on the farmer's work but on the farm's data collection, as farmer's engagement seems to be one of the main obstacles NCPs face, especially when dealing with animal infections of no clinical concern (Fraser et al., 2010; Marier et al., 2016; Alarcón et al., 2021). Moreover, this approach would also allow for a combined farm/abattoir strategy that would likely have cumulative benefits (Swart et al., 2016), as it would make both abattoirs and farmers aware of the risk of the pigs coming to the

slaughter. Thus, a more precise characterization of the *Salmonella* status of pig farms would be obtained from routine sampling, with the collection of proper representative samples, which would also help encourage a good attitude among farmers toward *Salmonella* control in the short/medium term.

Data availability statement

The raw data supporting the conclusions of this article will be made available by the authors, without undue reservation.

Ethics statement

The animal study was approved by Ethical Advisory Commission for Animal Experimentation of the University of Zaragoza (permit no. PI13/20). The study was conducted in accordance with the local legislation and institutional requirements.

Author contributions

RM-J: conceptualization, supervision, project administration, and funding acquisition. RM-J and MB-R: methodology, investigation, and writing-original draft preparation. RM-J, MB-R, IB, and AC-S: formal analysis. MB-R, RM-J, and CM-A: writing-review and editing. All authors have read and agreed to the published version of the manuscript.

References

- Alarcón, L. V., Allepuz, A., and Mateu, E. (2021). Biosecurity in pig farms: a review. *Porcine Health Manag.* 7, 5. doi: 10.1186/s40813-020-00181-z
- Anonymous (2011). FCC Consortium, Final Report. Analysis of the costs and benefits of setting a target for the reduction of *Salmonella* in breeding pigs for European Commission Health and Consumers Directorate-General SANCO/2008/E2/056. Brussels: SANCO/2008/E2/056. Available online at: https://ec.europa.eu/food/sites/food/files/safety/docs/biosafety_food-bornedisease_salmonella_breeding-pigs_salm-cost-benefit.pdf (accessed April 3, 2023).
- Anonymous (2012). UK: New direction for Zoonoses National Control Programme (ZNCP). Available online at: <https://www.pigprogress.net/Health-Diseases/Health/2012/6/UK-New-direction-for-Zoonoses-National-Control-Programme-ZNCP-PP008961W/> (accessed April 3, 2023).
- Anonymous (2015). Koninklijk besluit tot opheffing van het koninklijk en het ministerieel besluit van 27 april 2007 betreffende de bewaking van *Salmonella* bij varkens. In: Voedselketen, F.A.v.d.V.v.d. (Ed.). Available online at: https://etaamb.openjustice.be/fr/arrete-royal-du-27-avril-2007_n2007022865 (accessed June 27, 2023).
- Anonymous (2021). QS Qualität und Sicherheit GmbH. 20 Jahre QS: Salmonellenrisiko Um Über 70% Gesunken. Available online at: <https://www.qs.de/pressemitteilungen/20-jahre-qs-salmonellenrisiko-um-ueber-70-prozent.html> (accessed April 3, 2023).
- Argüello, H., Alvarez-Ordóñez, A., Carvajal, A., Rubio, P., and Prieto, M. (2013a). Role of slaughtering in *Salmonella* spreading and control in pork production. *J. Food Prot.* 76, 899–911. doi: 10.4315/0362-028X.JFP-12-404
- Argüello, H., Carvajal, A., Costillas, S., and Rubio, P. (2013b). Effect of the addition of organic acids in drinking water or feed during part of the finishing period on the prevalence of *Salmonella* in finishing pigs. *Foodborne Pathog. Dis.* 10, 842–9. doi: 10.1089/fpd.2013.1497
- Baptista, F. M., Alban, L., Nielsen, L. R., Domingos, I., Pomba, C., Almeida, V., et al. (2010). Use of herd information for predicting *Salmonella* status in pig herds. *Zoonoses Public Health* 1, 49–59. doi: 10.1111/j.1863-201001354.x
- Barco, L., Lettini, A. A., Ramon, E., Longo, A., Saccardin, C., Pozza, M. C., et al. (2011). A rapid and sensitive method to identify and differentiate *Salmonella* enterica serotype Typhimurium and *Salmonella* enterica serotype 4,[5],12:i:- by combining traditional serotyping and multiplex polymerase chain reaction. *Foodborne Pathog. Dis.* 8, 741–743. doi: 10.1089/fpd.2010.0776
- Bernad-Roche, M., Casanova-Higes, A., Marin-Alcalá, C. M., and Mainar-Jaime, R. C. (2022). *Salmonella* shedding in slaughter pigs and the use of esterified formic acid in the drinking water as a potential abattoir-based mitigation measure. *Animals* 12, 1620. doi: 10.3390/ani12131620
- BPEX (2002). The British Pig Executive. ZAP *Salmonella*—A zoonosis action plan for the British Pig Industry. <https://www.porcat.org/download/ZAP-Salmonella.pdf> (accessed April 3, 2023).
- Casanova-Higes, A., Andrés-Barranco, S., and Mainar-Jaime, R. C. (2017). Influence of On-farm pig *Salmonella* status on *Salmonella* Shedding at Slaughter. *Zoonoses Public Health* 64, 328–336. doi: 10.1111/zph.12301
- Cooke, F. J., Brown, D. J., Fookes, M., Pickard, D., Ivens, A., Wain, J., et al. (2008). Characterization of the genomes of a diverse collection of *Salmonella* enterica serovar Typhimurium definitive phage type 104. *J. Bacteriol.* 190, 8155–62. doi: 10.1128/JB.00636-08
- Correia-Gomes, C., Leonard, F., and Graham, D. (2021). Description of control programmes for *Salmonella* in pigs in Europe. Progress to date? *J. Food Saf.* 41, e12916. doi: 10.1111/jfs.12916
- de Busser, de Zutter, E. V., Dewulf, L., Houf, J., and Maes, K. (2013). *Salmonella* control in live pigs and at slaughter. *Vet. J.* 196, 20–7. doi: 10.1016/j.tvjl.01002
- de Busser, Dewulf, E. V., Nollet, J., Houf, N., Schwarzer, K., de Sadeleer, K., et al. (2009). Effect of organic acids in drinking water during the last 2 weeks prior to

Funding

This work was supported by grant RTI2018-093915-B-I00 funded by MCIN/AEI/10.13039/501100011033 and ERDF A way of making Europe from the European Union.

Acknowledgments

We thank the pig production companies and their technical staff and farmers, as well as the abattoirs, for their support and collaboration in carrying out the fieldwork.

Conflict of interest

The authors declare that the research was conducted in the absence of any commercial or financial relationships that could be construed as a potential conflict of interest.

Publisher's note

All claims expressed in this article are solely those of the authors and do not necessarily represent those of their affiliated organizations, or those of the publisher, the editors and the reviewers. Any product that may be evaluated in this article, or claim that may be made by its manufacturer, is not guaranteed or endorsed by the publisher.

- slaughter on *Salmonella* shedding by slaughter pigs and contamination of carcasses. *Zoonoses Public Health*. 56, 129–36. doi: 10.1111/j.1863-200801172.x
- De Lucia, A., and Ostanello, F. (2020). On-farm risk factors associated with *Salmonella* in pig herds. *Large Animal Rev.* 26, 133–140.
- Duggan, S. J., Mannion, C., Prendergast, D. M., Leonard, N., Fanning, S., Gonzales-Barron, U., et al. (2010). Tracking the *Salmonella* status of pigs and pork from lairage through the slaughter process in the Republic of Ireland. *J. Food Prot.* 73, 2148–60. doi: 10.4315/0362-028x-73.12.2148
- EFSA and ECDC (2022). European food safety authority and European Centre for disease prevention and control. The European Union one health 2021 zoonoses report. *EFSA J.* 20, 7666. doi: 10.2903/j.efsa.2022.7666
- European Food Safety Authority (EFSA). (2011). Analysis of the baseline survey of *Salmonella* in holdings with breeding pigs, in the EU, 2008; Part B: analysis of factors potentially associated with *Salmonella* pen positivity. *EFSA J.* 9, 2329. doi: 10.2903/j.efsa.2011.2329
- Farzan, A., Friendship, R. M., and Dewey, C. E. (2007). Evaluation of enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) tests and culture for determining *Salmonella* status of a pig herd. *Epidemiol. Infect.* 135, 238–44. doi: 10.1017/S0950268806006868
- Fraser, R. W., Williams, N. T., Powell, L. F., and Cook, A. J. (2010). Reducing *Campylobacter* and *Salmonella* infection: two studies of the economic cost and attitude to adoption of on-farm biosecurity measures. *Zoonoses Public Health*. 57, e109–15. doi: 10.1111/j.1863-200901295.x
- Froud, R., and Abel, G. (2014). Using ROC curves to choose minimally important change thresholds when sensitivity and specificity are valued equally: the forgotten lesson of pythagoras, theoretical considerations and an example application of change in health status. *PLoS ONE*. 9, e114468. doi: 10.1371/journal.pone.0114468
- Galipó, E., Zoché-Golob, V., Sassu, E. L., Prigge, C., Sjölund, M., Tobias, T., et al. (2023). Prioritization of pig farm biosecurity for control of *Salmonella* and hepatitis E virus infections: results of a European expert opinion elicitation. *Porcine Health Manag.* 9, 8. doi: 10.1186/s40813-023-00306-0
- García-Feliz, C., Collazos, J. A., Carvajal, A., Vidal, A. B., Aladueña, A., Ramiro, R., et al. (2007). *Salmonella enterica* infections in Spanish swine fattening units. *Zoonoses Public Health* 54, 294–300. doi: 10.1111/j.1863-200701065.x
- Gavin, C., Simons, R. R. L., Berriman, A. D. C., Moorhouse, D., Snary, E. L., Smith, R. P., et al. (2018). A cost-benefit assessment of *Salmonella*-control strategies in pigs reared in the United Kingdom. *Prev Vet Med.* 160, 54–62. doi: 10.1016/j.prevetmed.09022
- Gradassi, M., Caminiti, A., Galletti, G., Santi, A., Paternoster, G., Tamba, M., et al. (2015). Suitability of a *Salmonella* control programme based on serology in slaughter heavy pigs. *Res. Vet. Sci.* 101, 154–60. doi: 10.1016/j.rvsc.06015
- Greiner, M., Pfeiffer, D., and Smith, R. D. (2000). Principles and practical application of the receiver-operating characteristic analysis for diagnostic tests. *Prev. Vet. Med.* 45, 23–41. doi: 10.1016/s0167-5877(00)00115-x
- Hanssen, E. J., Swanenburg, M., and Maassen, C. B. M. (2007). The Dutch *Salmonella* monitoring programme for pigs and some recommendations for control plans in the future. *Proceedings from Safepork 2007, 7th. Sym Epidemiol and Control Foodborne Pathogens in pork*. Verona, Italy, pp. 169–172.
- Hotes, S., Traulsen, I., and Krieter, J. (2011). *Salmonella* control measures with special focus on vaccination and logistic slaughter procedures. *Transbound Emerg. Dis.* 58, 434–44. doi: 10.1111/j.1865-201101226.x
- Ivanek, R., Österberg, J., Gautam, R., and Sternberg Lewerin, S. (2012). *Salmonella* fecal shedding and immune responses are dose- and serotype- dependent in pigs. *PLoS ONE* 7, e34660. doi: 10.1371/journal.pone.0034660
- Kariuki, S., Oundo, J. O., Muyodi, J., Lowe, B., Threlfall, E. J., Hart, C. A., et al. (2000). Genotypes of multidrug-resistant *Salmonella enterica* serotype typhimurium from two regions of Kenya. *FEMS Immunol. Med. Microbiol.* 29, 9–13. doi: 10.1111/j.1574-695X.2000.tb01498.x
- Korsak, N., Degeye, J. N., Etienne, G., Beduin, J. M., China, B., Ghafir, Y., et al. (2006). Use of a serological approach for prediction of *Salmonella* status in an integrated pig production system. *Int. J. Food Microbiol.* 108, 246–54. doi: 10.1016/j.jfoodmicro.09013
- Krunker, S., Alban, L., Boes, J., and Dahl, J. (2003). Longitudinal study of *Salmonella enterica* serotype Typhimurium infection in three Danish farrow-to-finish swine herds. *J. Clin. Microbiol.* 41, 2282–8. doi: 10.1128/JCM.41.6.2282-2288.2003
- Lundbeck, H., Plazikowski, U., and Silverstolpe, L. (1955). The Swedish *Salmonella* outbreak of 1953. *J. Appl. Microbiol.* 18, 535–548.
- Lynch, H., Leonard, F. C., Walia, K., Lawlor, P. G., Duffy, G., Fanning, S., et al. (2017). Investigation of in-feed organic acids as a low cost strategy to combat *Salmonella* in grower pigs. *Prev. Vet. Med.* 139, 50–57. doi: 10.1016/j.prevetmed.02008
- Lyngstad, T. M., Hopp, P., Hofshagen, M., Bergsjø, B., Bruheim, T., Eikenæs, O., et al. (2007). *The Surveillance and Control Programmes for Salmonella in Live Animals, Eggs and Meat in Norway*. Oslo: National Veterinary Institute.
- MAGRAMA (2021). El sector de la carne de cerdo en cifras: Principales indicadores económicos. Available online at: <https://www.mapa.gob.es/es/ganaderia/>
- estadisticas/indicadoressectorporcino2021_tcm30-564427.pdf (accessed April 3, 2023).
- Maijala, R., Ranta, J., Seuna, E., and Peltola, J. (2005). The efficiency of the Finnish *Salmonella* control programme. *Food Control*. 16, 669–675. doi: 10.1016/j.foodcont.06003
- Mainar-Jaime, R. C., Atashparvar, N., Chirino-Trejo, M., and Blasco, J. M. (2008). Accuracy of two commercial enzyme-linked immunosorbent assays for the detection of antibodies to *Salmonella* spp. in slaughter pigs from Canada. *Prev. Vet. Med.* 85, 41–51. doi: 10.1016/j.prevetmed.12015
- Mainar-Jaime, R. C., Casanova-Higes, A., Andrés-Barranco, S., and Vico, J. P. (2018). Looking for new approaches for the use of serology in the context of control programmes against pig salmonellosis. *Zoonoses Public Health*. 65, e222–e228. doi: 10.1111/zph.12432
- Marier, E., Piers Smith, R., Ellis-Iversen, J., Watson, E., Armstrong, D., Hogeveen, H., et al. (2016). Changes in perceptions and motivators that influence the implementation of on-farm *Salmonella* control measures by pig farmers in England. *Prev. Vet. Med.* 133, 22–30. doi: 10.1016/j.prevetmed.09009
- Marin, C., Chinillac, M. C., Cerdà-Cuellar, M., Montoro-Dasi, L., Sevilla-Navarro, S., Ayats, T., et al. (2020). Contamination of pig carcass with *Salmonella enterica* serovar Typhimurium monophasic variant 1,4[5],12:i:- originates mainly in live animals. *Sci. Total Environ.* 703, 134609. doi: 10.1016/j.scitotenv.2019.134609
- Méroc, E., Strubbe, M., Vangroenweghe, F., Czaplicki, G., Vermeersch, K., Hooyberghs, J., et al. (2012). Evaluation of the *Salmonella* surveillance program in Belgian pig farms. *Prev. Vet. Med.* 105, 309–14. doi: 10.1016/j.prevetmed.03006
- Mousing, J., Jensen, P. T., Halgaard, C., Bager, F., Feld, N., Nielsen, B., et al. (1997). Nation-wide *Salmonella enterica* surveillance and control in Danish slaughter swine herds. *Prev. Vet. Med.* 29, 247–61. doi: 10.1016/s0167-5877(96)01082-3
- Nollet, N., Maes, D., Duchateau, L., Hautekiet, V., Houf, K., van Hoof, J., et al. (2005). Discrepancies between the isolation of *Salmonella* from mesenteric lymph nodes and the results of serological screening in slaughter pigs. *Vet. Res.* 36, 545–55. doi: 10.1051/vetres:2005014
- Osterkorn, K., Czerny, C. P., Wittkowski, G., and Huber, M. (2001). Stichprobenplanung für die Etablierung eines serologischen *Salmonellen*-Monitoringprogramms bei Mastschweinen mittels Fleischsaft-ELISA [Sampling plan for the establishment of a serologic *Salmonella* surveillance for slaughter pigs with meat juice ELISA]. *Berl. Munch. Tierarztl. Wochenschr.* 114, 30–4.
- Peters, T. M., Maguire, C., Threlfall, E. J., Fisher, I. S., Gill, N., Gatto, A. J., et al. (2003). Salm-gene project. The Salm-gene project—A European collaboration for DNA fingerprinting for food-related salmonellosis. *Euro. Surveill.* 8, 46–50. doi: 10.2807/esm.08.02.00401-en
- Ribot, E. M., Fair, M. A., Gautam, R., Cameron, D. N., Hunter, S. B., Swaminathan, B., et al. (2006). Standardization of pulsed-field gel electrophoresis protocols for the subtyping of *Escherichia coli* O157:H7, *Salmonella*, and *Shigella* for PulseNet. *Foodborne Pathog. Dis.* 3, 59–67. doi: 10.1089/fpd.359
- Rostagno, M. H., Eicher, S. D., and Lay, D. C. (2010). Does pre-slaughter stress affect pork safety risk? In *Proceedings of the 21st International Pig Veterinary Society (IPVS) Congress*, July 18–21, 2010. Vancouver, Canada. p. 176.
- Simons, R. R., Hill, A. A., Swart, A., Kelly, L., and Snary, E. L. (2016). A transport and lairage model for *Salmonella* transmission between pigs applicable to EU member states. *Risk Anal.* 36, 482–97. doi: 10.1111/risa.12390
- Snary, E. L., Munday, D. K., Arnold, M. E., and Cook, A. J. C. (2010). Zoonoses action plan *Salmonella* monitoring programme: an investigation of the sampling protocol. *J. Food Prot.* 73, 488–494. doi: 10.4315/0362-028X-73.3.488
- Sørensen, L. L., Alban, L., Nielsen, B., and Dahl, J. (2004). The correlation between *Salmonella* serology and isolation of *Salmonella* in Danish pigs at slaughter. *Vet. Microbiol.* 101, 131–41. doi: 10.1016/j.vetmic.02016
- Swanenburg, M., van der Wolf, P. J., Urlings, H. A., Snijders, J. M., and van Knapen, F. (2001). *Salmonella* in slaughter pigs: the effect of logistic slaughter procedures of pigs on the prevalence of *Salmonella* in pork. *Int. J. Food Microbiol.* 70, 231–42. doi: 10.1016/s0168-1605(01)00546-3
- Swart, A. N., Evers, E. G., Simons, R. L., and Swanenburg, M. (2016). Modeling of *Salmonella* Contamination in the Pig Slaughterhouse. *Risk Anal.* 36, 498–515. doi: 10.1111/risa.12514
- Tennant, S. M., Diallo, S., Levy, H., Livio, S., Sow, S. O., Tapia, M., et al. (2010). Identification by PCR of non-typhoidal *Salmonella enterica* serovars associated with invasive infections among febrile patients in Mali. *PLoS Negl. Trop. Dis.* 4, e621. doi: 10.1371/journal.pntd.0000621
- Wierup, M. (2006). *The Swedish Salmonella Control in Primary Production—An overview of its Background, Strategy, and Development: Salmonella Workshop—Control in Poultry From Feed to Farm*. Uppsala: National Veterinary Institutepp. p. 11–14.
- Youssef, D. M., Wieland, B., Knight, G. M., Lines, J., and Naylor, N. R. (2021). The effectiveness of biosecurity interventions in reducing the transmission of bacteria from livestock to humans at the farm level: a systematic literature review. *Zoonoses Public Health*. 68, 549–562. doi: 10.1111/zph.12807

PUBLICACIÓN IV / PUBLICATION IV

***Salmonella* control in fattening pigs through the use of esterified formic acid in drinking water shortly before slaughter**

Bernad-Roche, M., Marín-Alcalá, C.M., Vico, J.P., Mainar-Jaime, R.C.

Animals, 2023, 13(18):2814. doi: 10.3390/ani13182814

Article

Salmonella Control in Fattening Pigs through the Use of Esterified Formic Acid in Drinking Water Shortly before Slaughter

María Bernad-Roche ¹, Clara María Marín-Alcalá ² , Juan Pablo Vico ³ and Raúl Carlos Mainar-Jaime ^{1,*} 

¹ Departamento de Patología Animal, Facultad de Veterinaria, Instituto Agroalimentario de Aragón-IA2, Universidad de Zaragoza-CITA, 50013 Zaragoza, Spain; mbernadroche@gmail.com

² Departamento de Ciencia Animal, Centro de Investigación y Tecnología Agroalimentaria de Aragón, Instituto Agroalimentario de Aragón-IA2, Universidad de Zaragoza-CITA, 50059 Zaragoza, Spain; cmarin@unizar.es

³ IRNASUS-CONICET-Universidad Católica de Córdoba, Facultad de Ciencias Veterinarias, Universidad Católica de Córdoba, Córdoba 5000, Argentina; juanpablo.vico@ucc.edu.ar

* Correspondence: rcmainar@unizar.es; Tel.: +34-976-762-088

Simple Summary: Salmonellosis is a public health concern, and *Salmonella*-shedding pigs at the abattoir are one of the main sources of human infection. In this study, an esterified formic acid was applied as an on-farm treatment at a dose of 10 kg of product per 1000 L of water five days before slaughter. It was found that it could significantly reduce the proportion of *Salmonella*-shedding pigs arriving at the slaughterhouse and the *Salmonella* loads in the guts of the shedder pigs. These promising results suggest that this esterified formic acid could be used in farm drinking water a few days before slaughter as a complementary mitigation strategy for *Salmonella* control.

Abstract: The presence of *Salmonella* in pig feces is a major source of abattoir and carcass contamination, and one of the main sources of human salmonellosis. This study assessed whether using a form of esterified formic acid (30% formic acid) in drinking water (10 kg/1000 L) 5 days before slaughter could be a helpful strategy to mitigate this public health issue. Thus, 240 pigs from three *Salmonella*-positive commercial fattening farms were selected. From each farm, 40 pigs were allocated to a control group (CG) and 40 to a treatment group (TG). At the abattoir, fecal samples from both groups were collected for *Salmonella* detection (ISO 6579-1:2017) and quantification (ISO/TS 6579-2:2012). *Salmonella* was present in 35% (95% IC = 29.24–41.23) of the samples collected. The prevalence was significantly higher in the CG than in the TG (50% vs. 20%; $p < 0.001$). In all farms, the TG showed a lower percentage of shedders than the CG. A random-effects logistic model showed that the odds of shedding *Salmonella* were 5.63 times higher (95% CI = 2.92–10.8) for the CG than for the TG. Thus, the proportion of pigs shedding *Salmonella* that was prevented in the TG due to the use of this form of organic acid was 82.2%. In addition, a *Chi*-squared analysis for trends showed that the higher the *Salmonella* count, the higher the odds of the sample belonging to the CG. These results suggest that adding this type of acid to drinking water 5 days before slaughter could reduce the proportion of *Salmonella*-shedding pigs and the *Salmonella* loads in the guts of shedder pigs.

Keywords: *Salmonella*; pigs; formic acid; water; control; microbial load; slaughter



Citation: Bernad-Roche, M.; Marín-Alcalá, C.M.; Vico, J.P.; Mainar-Jaime, R.C. *Salmonella* Control in Fattening Pigs through the Use of Esterified Formic Acid in Drinking Water Shortly before Slaughter. *Animals* **2023**, *13*, 2814. <https://doi.org/10.3390/ani13182814>

Academic Editor: Temple Grandin

Received: 14 August 2023

Revised: 28 August 2023

Accepted: 4 September 2023

Published: 5 September 2023



Copyright: © 2023 by the authors. Licensee MDPI, Basel, Switzerland. This article is an open access article distributed under the terms and conditions of the Creative Commons Attribution (CC BY) license (<https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>).

1. Introduction

Salmonella infection is a major cause of foodborne outbreaks in the European Union and the second most frequently reported zoonosis in humans [1]. Although most *Salmonella*-infected pigs may not display any symptoms, they act as carriers of the infection, and contaminated pork and product thereof are among the most common sources of human infection [1].

Pork usually becomes contaminated at the abattoir, and the primary source of the contamination of abattoirs is the presence of *Salmonella* in the feces of slaughter pigs [2,3]. The proportion of slaughter pigs showing high loads of *Salmonella* in the cecal content appears to be directly related to the number of contaminated carcasses in the abattoir [4]. Therefore, reducing the number of pigs shedding *Salmonella*, and/or their intestinal loads of these bacteria, at the time they arrive to the abattoir can be foreseen as an important step to reduce overall abattoir environmental contamination and the proportion of contaminated carcasses.

Most shedding pigs become infected when still on the farm; thus, different approaches have been suggested to reduce the transmission of *Salmonella* infection within farms. For instance, enhancing farm biosecurity and improving cleaning and disinfection are considered some of the most important measures to control *Salmonella* in indoor settings [5,6]. However, proper levels of biosecurity will not necessarily reduce farm *Salmonella* prevalence [7–9], likely because its routine implementation and maintenance depend upon the farmers' perception of the problem [10,11], and pig salmonellosis is considered of low concern for pig producers.

Vaccination has also been proposed for on-farm *Salmonella* control, and there are some commercially available vaccines against *Salmonella* infection in pigs [12]. Results from vaccine studies suggest that they may help to somehow reduce *Salmonella* shedding from specific serotypes [13], but cross-protection against different serotypes is unlikely [12]. Since pigs may be infected by many of them [14], vaccination alone may not be enough.

Another general on-farm strategy against *Salmonella* is the administration of organic acids (OAs) through feed or water. However, their efficacy against *Salmonella* has been found to be very variable, with a number of studies showing some positive results [15–24] but others not observing any effect [25–27]. This variability may be attributed to several factors, such as the type, form, dose, and duration of the treatment applied; the pig's age [28]; or even infections occurring during transport or lairage in the slaughterhouse [29].

The efficacy of OAs is based on their presence, in appropriate amounts, along the gastrointestinal tract, particularly in its distal parts (the cecum and large intestine), where *Salmonella* is more commonly found [30–32]. Lowering the pH in both the extra- and intra-cellular environment is the main mechanism by which OAs prevent *Salmonella* viability [33,34]. However, as mentioned before, most fattening pigs usually become infected with *Salmonella* while on the farm and, to a lesser extent, during transport or lairage [35,36]. After infection, pigs may shed large amounts of bacteria for a few days, after which *Salmonella* may remain silent within tonsils and lymph nodes, with no shedding until after a stressful situation occurs, such as the transport to the abattoir or while pigs are held in lairage [37–39]. Since a 12–18 h fasting is usually required before slaughtering, any in-feed treatment may not be effective to control *Salmonella* shedding when pigs arrive at the abattoir, as not enough OA is left within the intestine. In-feed treatments may then help to reduce the level of shedding while pigs are on the farm, but they may not prevent shedding during transport or at the slaughter of pigs already infected on the farm [21].

On the contrary, administering OA through farm water may have the advantage that pigs would have access to OA even during fasting, thus receiving the treatment until the moment that they are loaded onto the truck. Thus, depending upon the duration of the transport, treatment through drinking water could prolong the presence of OA in the gastrointestinal tract almost until the time of slaughter. However, as noted earlier, the effectiveness of OA treatment in this way may also vary depending on various factors. To optimize the effectiveness of OA treatment through water, researchers have investigated different types, forms, and doses of OA. Short- and medium-chain fatty acid glycerides combined with glycerol present an amphipathic structure that makes them soluble in water while maintaining their in vitro and in vivo efficacy against Gram-negative bacteria [40]. In addition, due to their glyceride form, these OAs are odorless and non-corrosive.

A previous study suggested that the esterified form of formic acid could be effective in decreasing the prevalence of pigs shedding *Salmonella* at slaughter when administered in

drinking water during lairage at the abattoir. Although the treatment was applied overnight and for only a few hours before slaughter, a significant reduction in the prevalence of shedders in the TG was observed (16.4%; [41]). This finding suggests that on-farm water treatment for a longer time with this esterified OA could be a useful strategy to decrease the prevalence of *Salmonella* shedding at slaughter. Thus, this research aimed to investigate the efficacy of this OA when administered in drinking water a few days before slaughter as a potential strategy for reducing the number of pigs shedding *Salmonella* at slaughter and the *Salmonella* loads in the gastrointestinal tract of fattening pigs.

2. Materials and Methods

2.1. Experimental Design and Farm Sampling

Three replicates of a field trial were carried out between May and November 2022 on three different commercial pig farms located in the NE of Spain. Each farm was composed of different fattening units (average size of 1000 animals/fattening unit), two of which were selected for this study. One was assigned as the treatment group (TG) and the other as the control group (CG). Within each farm, the selection of the two fattening units to be included was based on the following criteria: (i) animals came from the same sow herd and had a similar age (less than a one-week difference) and (ii) both fattening units were *Salmonella*-positive. Within a farm, the TG was always assigned to the fattening unit with the highest seroprevalence.

To confirm the presence of *Salmonella* in the fattening units and to assess their *Salmonella* status before starting the trial, pooled floor fecal samples (PFFs) from 10 representative pens and 30 individual blood samples from pigs distributed along the fattening unit (1 pig per pen) were collected in each unit approximately one month before slaughter.

2.2. Product Used

A formic acid (30% formic acid) esterified in the form of mono-, di-, and tri-glyceride with glycerol (MOLI-M C1, Molimen SL, Barcelona, Spain) was selected for the treatment group. It was applied at a dose of 10 kg of product per 1000 L of farm drinking water (EMEC AMS PLUS dosing pump, EMEC, Fitchburg, MA, US). This dose of product (10 g/kg) was below the maximum threshold value of 12 g/kg formic acid approved for the use in pigs in the European Union [42]. The treatment began 5 days before slaughter. Pigs fasted for an average of 18 h before being transported to the abattoir, but the treatment in the drinking water supply was continued until the moment that they were loaded onto the truck.

2.3. Slaughter Sampling

Animals from each group (CG and TG) were slaughtered separately, always beginning with the CG on one day and the TG one or two days later. The farms were less than 2 h from the abattoir, and all animals were transported on the day of slaughter. At the slaughter line, individual gastrointestinal tracts were collected from 40 pigs from each group. They were selected among all the pigs sent for slaughter in that batch (around 200 pigs), following a systematic sampling (one every three–four pigs) and avoiding any pig showing intestinal rupture during evisceration. Intestinal (colon) content (IC) samples were further collected and submitted to the laboratory for immediate processing.

2.4. Isolation and Quantification of *Salmonella*

Salmonella isolation from the PFF and IC samples was carried out according to the standard ISO 6579-1:2017 method [43]. The quantification of *Salmonella* was performed on 10 IC samples selected randomly per group and per trial (except for farm 1, where only 9 were analyzed due to 1 being inadvertently forgotten) following the miniaturized Most Probable Number (MPN) enumeration method (ISO/TS 6579-2:2012 [44]). Briefly, in a 4 × 3-well microtiter plate, 2.5 mL of the initial 1:10 buffered peptone water (BPW) suspension used for isolation was transferred to each of the three wells of the first column. Then, 500 µL from each well was transferred and mixed with 2 mL of BPW in the wells

from the second column. Dilutions were performed in the same way in the third and fourth columns making a total of 4 dilutions (1:10, 1:50, 1:250, 1:1250) for each sample to be analyzed. Each sample was analyzed in triplicate. Dilutions were incubated at $37\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 1\text{ }^{\circ}\text{C}$ for $18\text{ h} \pm 2\text{ h}$. Then, 20 μL of each BPW dilution was transferred onto MRSV plates and incubated at $41.5\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 1\text{ }^{\circ}\text{C}$ for $24\text{ h} \pm 3\text{ h}$ for selective enrichment. Negative wells after 24 h were further incubated for up to 48 h. Suspect wells of (at least) the highest dilution(s) were plated out on selective isolation medium XLD at $37\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 1\text{ }^{\circ}\text{C}$ for $24\text{ h} \pm 3\text{ h}$. From each plate, a characteristic colony was biochemically tested (indole reaction, urea and triple sugar iron agar tests, and L-lysine decarboxylation) (Panreac Química SAU, Castellar del Vallés, Spain) for definitive confirmation. The MPN characteristic number was obtained by counting the number of positive wells in the 4 dilution $\times$ 3 repetition system used. Then, MPN was generated using the MPN calculation program version 6 [45]. The results are expressed as MPN per mL or g. The detection limit of the mini-MSRV method is approximately 1 CFU/g.

2.5. Serological Analysis

The Herdcheck Swine *Salmonella* ELISA test (IDEXX Laboratories, Westbrook, ME, USA) was employed according to the manufacturer's guidelines to detect specific antibodies (IgG) directed against *Salmonella*. For seroprevalence estimates, and due to the test's limited sensitivity and specificity on field samples (73% and 95%, respectively; [46]), a cut-off value of OD% ≥ 40 was used to deem a pig seropositive.

2.6. Statistical Analyses

To assess the efficacy of the treatment in each trial, Fischer's exact test was used to compare the prevalence of *Salmonella* shedding at slaughter between the CG and the TG. Further, a random-effects logistic regression analysis, considering the results from all the trials together, was carried out to obtain an overall estimate of the effect of the treatment on the prevalence of *Salmonella* shedding at slaughter. For this purpose, the presence of *Salmonella* in the IC samples was considered as the dependent variable and the treatment as the independent one. The farm was considered as the random (grouping) variable to account for the likely correlation among individuals within the same farm. The Odds Ratio (OR) between the CG and TG and its corresponding 95% confidence interval (95% CI) were estimated, and from these, an estimate of the proportion of pigs that may have been prevented from shedding because of the use of the OA, that is, the attributable fraction (AF), was calculated as $\text{OR}-1/\text{OR}$ [47].

The Most Probable Number results were categorized into four groups: (1) ND, not detected (below the limit of detection); (2) between 0.02 and 20.00 CFU/g; (3) between 21 and 200; and (4) exceeding the limits for counting (∞). A *Chi-square* analysis for linear trends was applied to compare the MPN categories between the CG and TG for all the trials together. These statistical analyses were performed using STATA software (STATA/IC 12.1. Stata-Corp. LP, College Station, TX, USA).

3. Results

3.1. Farm *Salmonella* Status Prior to the Trial

One month before starting the trials, the *Salmonella* status of all the farms was assessed, and the fattening units were selected. In all of the units included in this study, *Salmonella* was detected, with all presenting 10% of pens positive for *Salmonella* (Table 1). With regard to the serological results, the farms' overall seroprevalences (considering the two selected fattening units) were 21.6% in farm 1, 38.3% in farm 2, and 48.3% in farm 3. In two farms (1 and 2), no significant differences in seroprevalence were found between the two selected fattening units. In farm 3, however, in one of the units, the seroprevalence was significantly higher than that of the other one (63.3% vs. 33.3%) (Table 1).

Table 1. Bacteriological and serological results for *Salmonella* prevalence at the farms prior to trial for the control (CG) and treatment (TG) groups.

Farm	Group	No.	Seroprevalence (%)	<i>p</i> -Value	No.	Pen Prevalence (%)	<i>p</i> -Value ¹
1	CG	30	16.67	0.53	10	10	1
	TG	30	26.70		10	10	
2	CG	30	30.00	0.29	10	10	1
	TG	30	46.67		10	10	
3	CG	30	33.33	0.04	10	10	1
	TG	30	63.33		10	10	

¹ Fischer's exact test, two-tailed.

3.2. *Salmonella* Shedding at Slaughter

In farm 1, a high proportion of *Salmonella* shedders was observed in both groups, but this proportion was significantly higher in the CG than in the TG (65% vs. 27.5%, respectively; $p = 0.0015$) (Table 2). The odds of *Salmonella* shedding in the CG were almost 5 times higher than in the TG (OR = 4.9; 95% CI = 1.9–12.7). The MPN results showed higher counts of *Salmonella* in the CG than in the TG. *Salmonella* was not detected in 88.9% (eight out of nine) of the samples from the TG or in 55.6% (five out of nine) of the samples from the CG, while there was one sample exceeding the limits for counting in both groups (Table 3).

Table 2. Bacteriological results for *Salmonella* isolation from fecal samples at slaughter for the control (CG) and treatment (TG) groups.

Farm	Group	N	No. <i>Salmonella</i> -Positive Samples (%)	<i>p</i> -Value ¹
1	CG	40	26 (65.0)	0.0015
	TG	40	11 (27.5)	
2	CG	40	5 (12.5)	0.0547
	TG	40	0 (0.0)	
3	CG	40	29 (72.5)	0.0007
	TG	40	13 (32.5)	
Total	CG	120	60 (50.0)	<0.001
	TG	120	24 (20.0)	

¹ Fisher's exact test, two-tailed.**Table 3.** Prevalence and concentration of *Salmonella* (MPN/g) in fecal samples at slaughter for the control (CG) and treatment (TG) groups using the MPN method.

Farm	Group	N	No. <i>Salmonella</i> -Positive Samples (%)	No. Samples in <i>Salmonella</i> MPN/g Ranges (%)			
				ND ¹	0.02–20	21–200	∞ ²
1	CG	9	4 (44.4)	5 (55.6)	3 (33.3)	0 (0.0)	1 (11.1)
	TG	9	1 (11.1)	8 (88.9)	0 (0.0)	0 (0.0)	1 (11.1)
2	CG	10	1 (10.0)	9 (90.0)	1 (10.0)	0 (0.0)	0 (0.0)
	TG	10	0 (0.0)	10 (100.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)
3	CG	10	6 (60.0)	4 (40.0)	1 (10.0)	2 (20.0)	3 (30.0)
	TG	10	3 (30.0)	7 (70.0)	3 (30.0)	0 (0.0)	0 (0.0)
Total	CG	29	11 (37.9)	18 (62.1)	5 (17.2)	2 (6.9)	4 (13.8)
	TG	29	4 (13.8)	25 (86.2)	3 (10.3)	0 (0.0)	1 (3.4)

¹ ND: not detected, below the limit of detection (<1 CFU/g). ² ∞: exceeding the limit for counting.

In farm 2, an overall low *Salmonella*-shedding prevalence was observed. *Salmonella* was not detected in the TG, while the CG showed few pigs shedding *Salmonella* (0% vs. 12.5%; $p = 0.055$) (Table 2). Regarding the MPN results, in the CG, only one positive *Salmonella* sample was detected, with low counts (3.8 MPN/g). No *Salmonella*-positive samples were detected in the TG (Table 3).

In farm 3, a high *Salmonella*-shedding prevalence was observed in both groups. More shedder pigs were found in the CG than in the TG (72.5% vs. 32.5%, respectively; $p = 0.0007$) (Table 2). The odds of *Salmonella* shedding in the control group were more than 5 times higher than in the TG (OR = 5.5; 95% CI = 2.1–14.3). The MPN results showed higher counts of *Salmonella* in the CG than in the TG. *Salmonella* was not detected in 77.8% (seven out of nine) of the samples from the TG or in 44.4% (four out of nine) of the samples from the CG. There were no samples exceeding the limits for counting in the TG, while there were three samples in the CG.

3.3. Overall Results for the Three Farms

In 84 out of the 240 IC samples collected, *Salmonella* was present (35%; 95% IC = 29.24–41.23), and the prevalence was significantly higher in the CG than in the TG (50% vs. 20%; $p < 0.001$).

An overall significant reduction in the proportion of *Salmonella* shedders was observed in the TG after adjusting for the effect of the farm. The odds of shedding *Salmonella* at slaughter were almost 6 times higher for the CG than for the TG (Table 4). Thus, the proportion of pigs shedding *Salmonella* that had been prevented due to the use of this OA in the TG (the AF) was 82.2%.

Table 4. Results of the random-effects logistic regression analysis * to predict *Salmonella* shedding at the abattoir.

	Coefficient (β)	Std Error (β)	Odds Ratio (OR)	95% CI (OR)	p -Value
Group					
Control			1	-	-
Treatment	1.73	0.33	5.63	2.92–10.8	<0.001
Constant	−1.86	0.84	0.15	0.29–0.80	0.026

* Farm considered as grouping (random) variable. Intraclass correlation coefficient (ICC): 0.36 (95% CI = 0.09–0.76).

From the 58 samples recovered for the MPN analysis, *Salmonella* was detected (>1 CFU/g) in 15 of them (51.7%). Out of these 15, 11 (73.3%) belonged to the CG and 4 (13.8%) to the TG ($p = 0.069$). In addition, 13.8% (4/29) of the samples from the CG and 3.4% (1/29) of the samples from the TG were above the limit of counting. In general, and despite the low number of samples analyzed, a significant linear trend was observed: the higher the MPN count, the higher the odds of the sample belonging to the CG (Table 5).

Table 5. Results for the analysis for linear trends in proportions for the control (CG) and treatment (TG) groups according to Most Probable Number (MPN) results.

MPN Category	CG (%)	TG (%)	OR *	95% CI (OR)	p
Not detected	18 (62.1)	25 (86.2)	1	-	-
0.02–20.00 CFU/g	5 (17.2)	3 (10.3)	2.32	0.47–11.3	0.28
21–∞ CFU/g *	6 (20.7)	1 (3.5)	8.33	0.80–8.62	0.03

Chi-squared for linear trend = 5.11 $p = 0.023$. * MNP categories “21–200 CFU/g” and “∞ CFU/g” were merged for the sake of the calculation (to avoid zeros).

4. Discussion

Three pig farms were selected based on serological and bacteriological evidence indicating that *Salmonella* was present. The mean serological values before the trial for these farms (21.6% in farm 1; 38.3% in farm 2; and 48.3% in farm 3) were within levels that would classify them within a category of risk, according to some national control programs [48–51]. In addition, the bacteriological study of the pens showed that *Salmonella* was present in the three farms, and this factor, along with medium–high levels of seroprevalence, has been directly related to *Salmonella* shedding at slaughter [9]. Thus, under this scenario, a considerable proportion of pigs were expected to shed *Salmonella* at slaughter. Indeed,

35% of the pigs in this study shed *Salmonella*, with this figure being even higher than that found in a previous large-scale study carried out in the same region (23.6%; [9]). Finding fattening pig farms with significant levels of seroprevalence and *Salmonella* in the pens is quite common in Spain [9,52]. Considering the risk that this situation poses for the contamination of carcasses at slaughterhouses [2,3], and the difficulties (and lack of cost-effectiveness) of the strategies in reducing the overall level of *Salmonella* infection at farms [53,54], the search for new and affordable on-farm interventions that mitigate this problem seems unavoidable.

OAs in the form of salts, and in particular formic acid, have been commonly used in livestock production to promote growth, improve feed conversion, and reduce the prevalence of specific bacterial infections [42,55,56]. Their application in esterified form is less known, but in recent years, there has been increasing interest in the potential of esterified acids to reduce the shedding of *Salmonella* in pigs [41,57]. Their enhanced antimicrobial effects against Gram-negative pathogens would arise from their diminished pH sensitivity and increased resistance to enzymatic breakdown compared to other acidic formulations. This would lead to their efficacy being observed throughout the entire gastrointestinal tract [58].

Ref. [41] showed that this esterified form of formic acid was somewhat effective when administered for a short period of time (an average of 14 h); thus, it was expected that using the same dose (10 L/1000 L of drinking water) but increasing the time of exposure (5 days) would improve its effect.

When analyzing the results by farm, a common trend was observed; that is, on all the farms, the TG showed a lower percentage of shedders than the CG, which could be considered an indication of the positive effect of this treatment on the control of *Salmonella* shedding. On two of the farms (1 and 3), the reductions achieved were around 40% when compared to the CG (Table 2), but on farm 2, the differences were not so obvious, with a reduction of just 12.5%. However, the latter was likely a consequence of the low overall proportion of shedders from this farm. Although this farm presented a high seroprevalence when tested prior to the beginning of the trial, different unregistered factors could help to explain this situation, i.e., those associated with lower levels of pig stress.

An analysis of the raw data suggested an overall reduction in shedding of about 30% (20% in the TG vs. 50% in the CG). However, because of the likely differences that could be found among pig farms, a statistical analysis accounting for the grouping effect of the farm was considered. According to the results of the random-effects logistic model, pigs from the CG had 5.63 (95% CI = 2.92–10.8) higher odds of shedding *Salmonella* at slaughter than pigs from the TG. This result indicates that the efficacy of this treatment to reduce the proportion of pigs shedding *Salmonella* may reach up to 82.2%. These figures are much higher than those obtained in the previous study carried out by Bernad-Roche et al. (OR = 2.8; AF = 64.3%), indicating that an increased time of exposure to the OA had a larger beneficial effect.

The amount of *Salmonella* shedding is also another parameter that should be influenced by the treatment, as OA would kill many *salmonellae* in the gut. Therefore, a lower number of them would be expected in animals from the TG. The Most Probable Number (MPN) enumeration method was used to determine whether this OA had some effect on the number of bacteria shed. This method is time-consuming and requires the analysis of the sample to be started before knowing whether it is *Salmonella*-positive. For that reason, only 10 random samples per group were considered (except for farm 1, where only 9 were used).

As expected, and despite the limited number of samples analyzed, the number of negative ones (below the level of detection for the MPN analysis) was higher in the TG than in the CG (86.2% vs. 62.1%, respectively; $p = 0.069$). But also, among the positive samples, the load of *Salmonella* was lower in the TG. Only one sample exceeded the limits for counting (∞), and the other three samples were within the lower MPN category (0.02–20 CFU/g). By contrast, in the CG, most of the positive samples (6 out of 11) had counts above 21 CFU/g. As shown in the analysis for trends, higher MPN counts were more likely to belong to

the CG (Table 5). These results support the effectiveness of this treatment to reduce the load of *Salmonella* in the pig's gut. Since there appears to be a positive association between high cecal *Salmonella* loads in pigs and carcass contamination [4], the use of this esterified form of formic acid should be considered as a potential alternative to decrease the risk of *Salmonella* carcass contamination at slaughter.

In a previous study, it was shown that the risk, for a batch of fattening pigs, of shedding *Salmonella* at slaughter could be predicted before the pigs were sent to slaughter [9]. Therefore, this product could be applied in the drinking water of the farm, five days prior to slaughter, for batches of pigs identified as at risk of shedding *Salmonella*. It could also be included in the drinking water of the abattoir, helping to reduce the probability of shedding even more [41]. However, further studies applying different treatment protocols should be conducted to try to reduce treatment time or product dose in order to minimize the cost associated with this strategy.

5. Conclusions

On *Salmonella*-positive farms, the administration to fattening pigs of this esterified formic acid through water, five days prior to slaughter, decreased the proportion of pigs shedding *Salmonella* at slaughter and the loads of *Salmonella* in the guts of pigs still shedding. Thus, this intervention may likely help to reduce abattoir and carcass contamination. These findings highlight the potential of esterified formic acid as an on-farm strategy for *Salmonella* control in pig production, being a feasible mitigation measure to be applied as a complement to other measures in the farm–slaughterhouse interface.

Author Contributions: Conceptualization, R.C.M.-J.; methodology, R.C.M.-J., M.B.-R. and C.M.M.-A.; formal analysis, R.C.M.-J. and M.B.-R.; investigation, R.C.M.-J., M.B.-R., J.P.V. and C.M.M.-A.; writing—original draft preparation, M.B.-R., R.C.M.-J. and J.P.V.; writing—review and editing, M.B.-R., R.C.M.-J., J.P.V. and C.M.M.-A.; supervision, R.C.M.-J.; project administration and funding acquisition, R.C.M.-J. All authors have read and agreed to the published version of the manuscript.

Funding: This research was supported by grant RTI2018-093915-B-I00 funded by MCIN/AEI/10.13039/501100011033 and “ERDF A way of making Europe” from the European Union.

Institutional Review Board Statement: This study was approved by the Ethical Advisory Commission for Animal Experimentation of the University of Zaragoza (permit no. PI13/20).

Informed Consent Statement: Not applicable.

Data Availability Statement: Data available upon request.

Acknowledgments: We thank the pig production companies and their technical staff, the farmers, and the abattoirs for their support and collaboration in carrying out the fieldwork.

Conflicts of Interest: The authors declare no conflict of interest.

References

1. European Food Safety Authority (EFSA) and European Centre for Disease Prevention and Control (ECDC). The European Union One Health 2021 Zoonoses Report. *EFSA J.* **2022**, *20*, 7666.
2. Argüello, H.; Alvarez-Ordóñez, A.; Carvajal, A.; Rubio, P.; Prieto, M. Role of slaughtering in *Salmonella* spreading and control in pork production. *J. Food Prot.* **2013**, *76*, 899–911. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
3. Swart, A.N.; Evers, E.G.; Simons, R.L.; Swanenburg, M. Modeling of *Salmonella* Contamination in the Pig Slaughterhouse. *Risk Anal.* **2016**, *36*, 498–515. [[CrossRef](#)]
4. Pesciaroli, M.; Cucco, L.; De Luca, S.; Massacci, F.R.; Maresca, C.; Medici, L.; Panicià, M.; Scoccia, E.; Staffolani, M.; Pezzotti, G.; et al. Association between pigs with high caecal *Salmonella* loads and carcass contamination. *Int. J. Food Microbiol.* **2017**, *242*, 82–86. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
5. De Lucia, A.; Ostanello, F. On-farm risk factors associated with *Salmonella* in pig herds. *Large Anim. Rev.* **2020**, *26*, 133–140.
6. Galipó, E.; Zoche-Golob, V.; Sassu, E.L.; Prigge, C.; Sjölund, M.; Tobias, T.; Rzeżutka, A.; Smith, R.P.; Burow, E. Prioritization of pig farm biosecurity for control of *Salmonella* and hepatitis E virus infections: Results of a European expert opinion elicitation. *Porc. Health Manag.* **2023**, *9*, 8. [[CrossRef](#)]
7. Alarcón, L.V.; Allepuz, A.; Mateu, E. Biosecurity in pig farms: A review. *Porc. Health Manag.* **2021**, *7*, 5. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]

8. Youssef, D.M.; Wieland, B.; Knight, G.M.; Lines, J.; Naylor, N.R. The effectiveness of biosecurity interventions in reducing the transmission of bacteria from livestock to humans at the farm level: A systematic literature review. *Zoonoses Public Health* **2021**, *68*, 549–562. [\[CrossRef\]](#)
9. Bernad-Roche, M.; Marín-Alcalá, C.M.; Cebollada-Solanas, A.; de Blas, I.; Mainar-Jaime, R.C. Building a prediction model for assessing the risk of *Salmonella* shedding at slaughter in fattening pigs. *Front. Microbiol.* **2023**, *14*, 1232490. [\[CrossRef\]](#)
10. Fraser, R.W.; Williams, N.T.; Powell, L.F.; Cook, A.J. Reducing *Campylobacter* and *Salmonella* infection: Two studies of the economic cost and attitude to adoption of on-farm biosecurity measures. *Zoonoses Public Health* **2010**, *57*, e109–e115. [\[CrossRef\]](#)
11. Marier, E.; Piers Smith, R.; Ellis-Iversen, J.; Watson, E.; Armstrong, D.; Hogeveen, H.; Cook, A.J.C. Changes in perceptions and motivators that influence the implementation of on-farm *Salmonella* control measures by pig farmers in England. *Prev. Vet. Med.* **2016**, *133*, 22–30. [\[CrossRef\]](#)
12. Bearson, S.M.D. *Salmonella* in Swine: Prevalence, Multidrug Resistance, and Vaccination Strategies. *Annu. Rev. Anim. Biosci.* **2022**, *10*, 373–393. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
13. De La Cruz, M.L.; Conrado, I.; Nault, A.; Perez, A.; Dominguez, L.; Alvarez, J. Vaccination as a control strategy against *Salmonella* infection in pigs: A systematic review and meta-analysis of the literature. *Res. Vet. Sci.* **2017**, *114*, 86–94. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
14. Garrido, V.; Sánchez, S.; San Román, B.; Zabalza-Baranguá, A.; Díaz-Tendero, Y.; de Frutos, C.; Mainar-Jaime, R.C.; Grilló, M.J. Simultaneous infections by different *Salmonella* strains in mesenteric lymph nodes of finishing pigs. *BMC Vet. Res.* **2014**, *10*, 59. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
15. 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. Herd level husbandry factors associated with the serological *Salmonella* prevalence in finishing pig herds in The Netherlands. *Vet. Microbiol.* **2001**, *78*, 205–219. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
16. Papenbrock, S.; Stemme, K.; Amtsberg, G.; Verspohl, J.; Kamphues, J. Investigations on prophylactic effects of coarse feed structure and/or potassium diformate on the microflora in the digestive tract of weaned piglets experimentally infected with *Salmonella* Derby. *J. Anim. Physiol. Anim. Nutr.* **2005**, *89*, 84–87. [\[CrossRef\]](#)
17. Creus, E.; Pérez, J.F.; Peralta, B.; Baucells, F.; Mateu, E. Effect of acidified feed on the prevalence of *Salmonella* in market-age pigs. *Zoonoses Public Health* **2007**, *54*, 314–319. [\[CrossRef\]](#)
18. Boyen, F.; Haesebrouck, F.; Vanparys, A.; Volf, J.; Mahu, M.; Van Immerseel, F.; Rychlik, I.; Dewulf, J.; Ducatelle, R.; Pasmans, F. Coated fatty acids alter virulence properties of *Salmonella* Typhimurium and decrease intestinal colonization of pigs. *Vet. Microbiol.* **2008**, *132*, 319–327. [\[CrossRef\]](#)
19. Taube, V.A.; Neu, M.E.; Hassan, Y.; Verspohl, J.; Beyerbach, M.; Kamphues, J. Effects of dietary additives (potassium diformate/organic acids) as well as influences of grinding intensity (coarse/fine) of diets for weaned piglets experimentally infected with *Salmonella* Derby or *Escherichia coli*. *J. Anim. Physiol. Anim. Nutr.* **2009**, *93*, 350–358. [\[CrossRef\]](#)
20. Visscher, C.F.; Winter, P.; Verspohl, J.; Stratmann-Selke, J.; Upmann, M.; Beyerbach, M.; Kamphues, J. Effects of feed particle size at dietary presence of added organic acids on caecal parameters and the prevalence of *Salmonella* in fattening pigs on farm and at slaughter. *J. Anim. Physiol. Anim. Nutr.* **2009**, *93*, 423–430. [\[CrossRef\]](#)
21. Argüello, H.; Carvajal, A.; Costillas, S.; Rubio, P. Effect of the addition of organic acids in drinking water or feed during part of the finishing period on the prevalence of *Salmonella* in finishing pigs. *Foodborne Pathog. Dis.* **2013**, *10*, 842–849. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
22. Lynch, H.; Leonard, F.C.; Walia, K.; Lawlor, P.G.; Duffy, G.; Fanning, S.; Markey, B.K.; Brady, C.; Gardiner, G.E.; Argüello, H. Investigation of in-feed organic acids as a low cost strategy to combat *Salmonella* in grower pigs. *Prev. Vet. Med.* **2017**, *139*, 50–57. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
23. Walia, K.; Argüello, H.; Lynch, H.; Leonard, F.C.; Grant, J.; Yearsley, D.; Kelly, S.; Duffy, G.; Gardiner, G.E.; Lawlor, P.G. Effect of strategic administration of an encapsulated blend of formic acid, citric acid, and essential oils on *Salmonella* carriage, seroprevalence, and growth of finishing pigs. *Prev. Vet. Med.* **2017**, *137*, 28–35. [\[CrossRef\]](#)
24. Casanova-Higes, A.; Andrés-Barranco, S.; Mainar Jaime, R.C. Use of a new form of protected sodium butyrate to control *Salmonella* infection in fattening pigs. *Span. J. Agric. Res.* **2019**, *16*, e05SC02. [\[CrossRef\]](#)
25. De Busser, E.V.; Dewulf, J.; Nollet, N.; Houf, K.; Schwarzer, K.; De Sadeleer, L.; De Zutter, L.; Maes, D. Effect of organic acids in drinking water during the last 2 weeks prior to slaughter on *Salmonella* shedding by slaughter pigs and contamination of carcasses. *Zoonoses Public Health* **2009**, *56*, 129–136. [\[CrossRef\]](#)
26. Martín-Peláez, S.; Costabile, A.; Hoyles, L.; Rastall, R.A.; Gibson, G.R.; La Ragione, R.M.; Woodward, M.J.; Mateu, E.; Martín-Orúe, S.M. Evaluation of the inclusion of a mixture of organic acids or lactulose into the feed of pigs experimentally challenged with *Salmonella* Typhimurium. *Vet. Microbiol.* **2010**, *142*, 337–345. [\[CrossRef\]](#)
27. De Ridder, L.; Maes, D.; Dewulf, J.; Pasmans, F.; Boyen, F.; Haesebrouck, F.; Méroc, E.; Butaye, P.; Van der Stede, Y. Evaluation of three intervention strategies to reduce the transmission of *Salmonella* Typhimurium in pigs. *Vet. J.* **2013**, *197*, 613–618. [\[CrossRef\]](#)
28. Nguyen, D.H.; Seok, W.J.; Kim, I.H. Organic Acids Mixture as a Dietary Additive for Pigs-A Review. *Animals* **2020**, *10*, 952. [\[CrossRef\]](#)
29. Isaacson, R.E.; Firkins, L.D.; Weigel, R.M.; Zuckermann, F.A.; DiPietro, J.A. Effect of transportation and feed withdrawal on shedding of *Salmonella* Typhimurium among experimentally infected pigs. *Am. J. Vet. Res.* **1999**, *60*, 1155–1158.
30. Darwin, K.H.; Miller, V.L. Molecular basis of the interaction of *Salmonella* with the intestinal mucosa. *Clin. Microbiol. Rev.* **1999**, *12*, 405–428. [\[CrossRef\]](#)

31. Uribe, J.H.; Collado-Romero, M.; Zaldivar-López, S.; Arce, C.; Bautista, R.; Carvajal, A.; Cirera, S.; Claros, M.G.; Garrido, J.J. Transcriptional analysis of porcine intestinal mucosa infected with *Salmonella* Typhimurium revealed a massive inflammatory response and disruption of bile acid absorption in ileum. *Vet. Res.* **2016**, *47*, 11. [CrossRef]
32. Cevallos-Almeida, M.; Martin, L.; Houdayer, C.; Rose, V.; Guionnet, J.M.; Paboeuf, F.; Denis, M.; Kerouanton, A. Experimental infection of pigs by *Salmonella* Derby, S. Typhimurium and monophasic variant of S. Typhimurium: Comparison of colonization and serology. *Vet. Microbiol.* **2019**, *231*, 147–153. [CrossRef] [PubMed]
33. Ricke, S.C. Perspectives on the use of organic acids and short chain fatty acids as antimicrobials. *Poult. Sci.* **2003**, *82*, 632–639. [CrossRef] [PubMed]
34. Hirshfield, I.N.; Terzulli, S.; O’Byrne, C. Weak organic acids: A panoply of effects on bacteria. *Sci. Prog.* **2003**, *86*, 245–269. [CrossRef] [PubMed]
35. Berends, B.R.; Urlings, H.A.; Snijders, J.M.; van Knapen, F. Identification and quantification of risk factors in animal management and transport regarding *Salmonella* spp. in pigs. *Int. J. Food Microbiol.* **1996**, *30*, 37–53. [CrossRef]
36. Stärk, K.D.; Wingstrand, A.; Dahl, J.; Møgelmoose, V.; Lo Fo Wong, D.M. Differences and similarities among experts’ opinions on *Salmonella enterica* dynamics in swine pre-harvest. *Prev. Vet. Med.* **2002**, *53*, 7–20. [CrossRef]
37. Hurd, H.S.; McKean, J.D.; Griffith, R.W.; Wesley, I.V.; Rostagno, M.H. *Salmonella enterica* infections in market swine with and without transport and holding. *Appl. Environ. Microbiol.* **2002**, *68*, 2376–2381. [CrossRef]
38. Mannion, C.; Egan, J.; Lynch, B.P.; Fanning, S.; Leonard, N. An investigation into the efficacy of washing trucks following the transportation of pigs—A *Salmonella* perspective. *Foodborne Pathog. Dis.* **2008**, *5*, 261–271. [CrossRef]
39. Ferrer Savall, J.; Bidot, C.; Leblanc-Maridor, M.; Belloc, C.; Touzeau, S. Modelling *Salmonella* transmission among pigs from farm to slaughterhouse: Interplay between management variability and epidemiological uncertainty. *Int. J. Food Microbiol.* **2016**, *229*, 33–43. [CrossRef]
40. Cantini. Compositions Containing C1 to C7 Organic Acid Monoglycerides and Glycerol, Their Preparation and Use as Antibacterials and Anti-Mould Agents. 2015. Available online: <https://patents.google.com/patent/WO2010106488A2/en> (accessed on 15 July 2023).
41. Bernad-Roche, M.; Casanova-Higes, A.; Marín-Alcalá, C.M.; Mainar-Jaime, R.C. *Salmonella* Shedding in Slaughter Pigs and the Use of Esterified Formic Acid in the Drinking Water as a Potential Abattoir-Based Mitigation Measure. *Animals* **2022**, *12*, 1620. [CrossRef]
42. Luise, D.; Correa, F.; Bosi, P.; Trevisi, P. A Review of the Effect of Formic Acid and Its Salts on the Gastrointestinal Microbiota and Performance of Pigs. *Animals* **2020**, *10*, 887. [CrossRef] [PubMed]
43. ISO 6579-1:2017; Microbiology of the Food Chain—Horizontal Method for the Detection, Enumeration and Serotyping of *Salmonella*—Part 1: Detection of *Salmonella* spp. ISO: Geneva, Switzerland, 2017.
44. ISO/TS 6579-2:2012; Microbiology of Food and Animal Feed—Horizontal Method for the Detection, Enumeration and Serotyping of *Salmonella*—Part 2: Enumeration by a Miniaturized Most Probable Number Technique. ISO: Geneva, Switzerland, 2012.
45. Jarvis, B.; Wilrich, C.; Wilrich, P.T. Reconsideration of the derivation of Most Probable Numbers, their standard deviations, confidence bounds and rarity values. *J. Appl. Microbiol.* **2010**, *109*, 1660–1667; Erratum in *J. Appl. Microbiol.* **2015**, *119*, 905. [CrossRef] [PubMed]
46. Mainar-Jaime, R.C.; Atashparvar, N.; Chirino-Trejo, M.; Blasco, J.M. Accuracy of two commercial enzyme-linked immunosorbent assays for the detection of antibodies to *Salmonella* spp. in slaughter pigs from Canada. *Prev. Vet. Med.* **2008**, *85*, 41–51. [CrossRef]
47. Dohoo, I.R.; Martin, W.; Stryhn, H.E. *Veterinary Epidemiologic Research*; University of Prince Edward Island: Charlottetown, PE, Canada, 2003; p. 127.
48. Anonymous. S.I. No. 165/2002—Abattoirs Act 1988 (Veterinary Examination) (Amendment) Regulations 2002. 2002. Available online: <https://www.irishstatutebook.ie/eli/2002/si/165/made/en/print> (accessed on 21 July 2023).
49. Anonymous. Koninklijk Besluit tot Opheffing van het Koninklijk en het Ministerieel Besluit van 27 April 2007 Betreffende de Bewaking van *Salmonella* bij Varkens. Voedselketen, F.A.v.d.V.v.d., Ed. 2015. Available online: https://etaamb.openjustice.be/nl/koninklijk-besluit-van-27-april-2007_n2007022865 (accessed on 21 July 2023).
50. Van der Wolf, P.J. Monitoring for *Salmonella* in Swine in the Netherlands. Pig333. 2017. Available online: https://www.pig333.com/articles/monitoring-forsalmonella-in-swine-in-the-netherlands_12866/ (accessed on 17 July 2023).
51. QS. Guidelines *Salmonella* Monitoring Pigs. 2023. Available online: https://www.q-s.de/services/files/downloadcenter/h-salmonellenmonitoring/2023/leitfaeden/englisch/Guideline_Salmonella_Monitoring_Pigs01.01.2023.pdf (accessed on 17 July 2023).
52. Teng, K.T.; Martinez Avilés, M.; Ugarte-Ruiz, M.; Barcena, C.; de la Torre, A.; Lopez, G.; Moreno, M.A.; Dominguez, L.; Alvarez, J. Spatial Trends in *Salmonella* Infection in Pigs in Spain. *Front. Vet. Sci.* **2020**, *7*, 345. [CrossRef]
53. Anonymous. FCC Consortium, Final Report. Analysis of the Costs and Benefits of Setting a Target for the Reduction of *Salmonella* in Breeding Pigs for European Commission Health and Consumers Directorate-General SANCO/2008/E2/056. Brussels: SANCO/2008/E2/056. 2011. Available online: https://food.ec.europa.eu/system/files/2016-10/biosafety_food-borne-disease_salmonella_fattening-pigs_slaughtouse-analysis-costs.pdf (accessed on 17 July 2023).
54. Gavin, C.; Simons, R.R.L.; Berriman, A.D.C.; Moorhouse, D.; Snary, E.L.; Smith, R.P.; Hill, A.A. A cost-benefit assessment of *Salmonella*-control strategies in pigs reared in the United Kingdom. *Prev. Vet. Med.* **2018**, *160*, 54–62. [CrossRef] [PubMed]

55. Suiryanrayna, M.V.; Ramana, J.V. A review of the effects of dietary organic acids fed to swine. *J. Anim. Sci. Biotechnol.* **2015**, *6*, 45. [CrossRef] [PubMed]
56. Pearlin, B.V.; Muthuvel, S.; Govidasamy, P.; Villaban, M.; Alagawany, M.; Farag, M.R.; Dhama, K.; Gopi, M. Role of acidifiers in livestock nutrition and health: A review. *J. Anim. Physiol. Anim. Nutr.* **2020**, *104*, 558–569. [CrossRef]
57. Kuterna, L. A Combined Strategy to Reduce *Salmonella* in Pigs. *PigProgress*. 2015. Available online: <https://www.pigprogress.net/health-nutrition/a-combined-strategy-to-reduce-salmonella-in-pigs-2/> (accessed on 18 July 2023).
58. Gomez-Osorio, L.M.; Yepes-Medina, V.; Ballou, A.; Parini, M.; Angel, R. Short and Medium Chain Fatty Acids and Their Derivatives as a Natural Strategy in the Control of Necrotic Enteritis and Microbial Homeostasis in Broiler Chickens. *Front. Vet. Sci.* **2021**, *8*, 773372. [CrossRef]

Disclaimer/Publisher's Note: The statements, opinions and data contained in all publications are solely those of the individual author(s) and contributor(s) and not of MDPI and/or the editor(s). MDPI and/or the editor(s) disclaim responsibility for any injury to people or property resulting from any ideas, methods, instructions or products referred to in the content.

PUBLICACIÓN V / PUBLICATION V

***Salmonella* shedding in slaughter pigs and the use of esterified formic acid in the drinkingwater as a potential abattoir-based mitigation measure**

Bernad-Roche, M., Casanova-Higes, A., Marín-Alcalá, C.M., Mainar-Jaime, R.C.

Animals 2022, 12(13):1620. doi: 10.3390/ani12131620.

Article

Salmonella Shedding in Slaughter Pigs and the Use of Esterified Formic Acid in the Drinking Water as a Potential Abattoir-Based Mitigation Measure

María Bernad-Roche ¹, Alejandro Casanova-Higes ¹ , Clara María Marín-Alcalá ² 
and Raúl Carlos Mainar-Jaime ^{1,*} 

¹ Departamento de Patología Animal, Facultad de Veterinaria, Instituto Agroalimentario de Aragón-IA2, Universidad de Zaragoza-CITA, 50013 Zaragoza, Spain; mbernadroche@gmail.com (M.B.-R.); acasanova@unizar.es (A.C.-H.)

² Departamento de Ciencia Animal, Centro de Investigación y Tecnología Agroalimentaria de Aragón, Instituto Agroalimentario de Aragón-IA2, Universidad de Zaragoza-CITA, 50059 Zaragoza, Spain; cmarin@unizar.es

* Correspondence: rcmainar@unizar.es; Tel.: +34-976-762-088

Simple Summary: *Salmonella* excretion at slaughter is considered a source of carcass contamination and human infections. To assess this potential risk, a survey on *Salmonella* shedding at slaughter in 1068 pigs from 24 farms was carried out. Almost one-third of these farms (27.3%) shed *Salmonella*. The monophasic variant of *Salmonella* Typhimurium, an emerging serotype of zoonotic importance, was the most frequent (46.9%). Antimicrobial resistance in *Salmonella* isolates was common, but resistance against antimicrobials of critical importance for humans was low, with the exception of tigecycline, a new tetracycline-derivative antimicrobial used to treat severe infections caused by extensively drug-resistant bacteria that is not used in food-producing animals. An abattoir-based strategy for the control of *Salmonella* shedding, consisting of the addition of formic acid esterified in the form of glycerides in drinking water while waiting for slaughter, was able to significantly reduce the proportion of pigs shedding *Salmonella*. It appears this strategy can contribute to mitigating the burden of abattoir environmental contamination.



Citation: Bernad-Roche, M.; Casanova-Higes, A.; Marín-Alcalá, C.M.; Mainar-Jaime, R.C. *Salmonella* Shedding in Slaughter Pigs and the Use of Esterified Formic Acid in the Drinking Water as a Potential Abattoir-Based Mitigation Measure. *Animals* **2022**, *12*, 1620. <https://doi.org/10.3390/ani12131620>

Academic Editors: Fathiah Zakham, Tarja Sironen and Pacifique Ndishimye

Received: 10 May 2022

Accepted: 21 June 2022

Published: 23 June 2022

Publisher's Note: MDPI stays neutral with regard to jurisdictional claims in published maps and institutional affiliations.



Copyright: © 2022 by the authors. Licensee MDPI, Basel, Switzerland. This article is an open access article distributed under the terms and conditions of the Creative Commons Attribution (CC BY) license (<https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>).

Abstract: Pigs shedding *Salmonella* at slaughter are considered a source of carcass contamination and human infection. To assess this potential risk, the proportion of *Salmonella* shedders that arrive for slaughter was evaluated in a population of 1068 pigs from 24 farms. Shedding was present in 27.3% of the pigs, and the monophasic variant of *Salmonella* Typhimurium, an emerging zoonotic serotype, was the most prevalent (46.9%). Antimicrobial resistance (AMR) in *Salmonella* isolates was common, but few isolates showed AMR to antimicrobials of critical importance for humans such as third-generation cephalosporins (5%), colistin (0%), or carbapenems (0%). However, AMR to tigecycline was moderately high (15%). The efficacy of an esterified formic acid in the lairage drinking water (3 kg formic acid/1000 L) was also assessed as a potential abattoir-based strategy to reduce *Salmonella* shedding. It was able to reduce the proportion of shedders (60.7% in the control group (CG) vs. 44.3% in the treatment group (TG); $p < 0.01$). After considering clustering and confounding factors, the odds of shedding *Salmonella* in the CG were 2.75 (95% CI = 1.80–4.21) times higher than those of the TG, suggesting a potential efficacy of reduction in shedding as high as 63.6%. This strategy may contribute to mitigating the burden of abattoir environmental contamination.

Keywords: *Salmonella*; shedding; swine; abattoir; formic acid; drinking water

1. Introduction

Despite the efforts carried out by public health and veterinary authorities throughout Europe, salmonellosis continues to be one of the most important foodborne zoonotic diseases in the European Union (EU). In 2020, the three most-reported *Salmonella* serovars

in human cases in the EU were *S. Enteritidis*, *S. Typhimurium*, and the monophasic variant of *S. Typhimurium*, the latter two being significantly related to pig sources [1]. In contrast to poultry and egg production, few European countries have established national control programs against salmonellosis in pig production, and those who tried have failed in improving the overall *Salmonella* status in their pig herds [2].

Salmonella is widespread among pigs [3]. An average of 33.3% of herds tested positive for *Salmonella* in 2008 in the EU according to a baseline study [4]. Since the bacteriological analysis of pig fecal samples lacks sensitivity, these results may be underestimating the true herd prevalence of infection [5]. Thus, in a context where a high proportion of pig herds are infected with *Salmonella*, it is expected that a large number of pigs will arrive to the abattoir already infected, as shown in previous surveys [4,6,7].

Although most *Salmonella*-infected fattening pigs remain asymptomatic while at farms, stressful situations such as the transport to the abattoir or the time at lairage can increase the load of *Salmonella* in feces in those previously infected pigs [8], and also increase the susceptibility to infection of the healthy ones [9]. There is evidence that on-farm *Salmonella* status has a significant influence on *Salmonella* shedding at slaughter [10,11].

Despite this expected high prevalence of *Salmonella* infection in slaughter pigs, no studies have focused on the proportion of pigs shedding *Salmonella* when they arrive for slaughter, although some have assessed the presence of the bacterium in cecal content. A study in Northern Ireland in 2002 identified *Salmonella* spp. in 31.4% of cecal content samples analyzed [12]. More recent studies carried out in the United Kingdom in 2013 and 2019 reported the presence of *Salmonella* in 30.5% and 32% of this type of sample, respectively [13,14]. The presence of *Salmonella* in cecal content would favor the presence of *Salmonella* in the distal part of the intestinal tract (colon), that is, it would favor its shedding, and further high levels of environmental contamination in the lairage area, both increasing the likelihood of carcass contamination [15,16]. Indeed, a positive correlation between high *Salmonella* cecal loads and carcass contamination has been observed [17]. Thus, to keep the proportion of *Salmonella*-contaminated carcasses low, strict slaughter hygiene practices, i.e., thorough cleaning and disinfection of facilities along with careful eviscerations, need to be intensified. In addition, activities aimed at reducing the *Salmonella* burden in the guts (shedding) of fattening pigs once they reach the abattoir should also help to further reduce the proportion of contaminated carcasses.

After transport, pigs usually arrive at the abattoir thirsty, creating the need for drinking water. This condition may be an opportunity for enhancing the ingestion of water treated with esterified organic acids (OAs) before entering the slaughter line. Short and medium chain fatty acids combined with glycerol have enhanced antimicrobial activity against Gram-negative bacteria both in vitro and in vivo [18]. In addition, the esterification of these acids has shown additional advantages as they are less pH-dependent and less susceptible to enzymatic breakdown, allowing them to act along the whole gastrointestinal tract [19]. In addition, due to its glyceride form, the OAs used in this way are odorless and non-corrosive, and their amphipathic structure make them soluble in water without changing their pH, thus avoiding any off-flavors in the water that would prevent the pigs from drinking it. Therefore, they may be of help in reducing the gastrointestinal burden of Gram-negative bacteria such as *Salmonella*, provided the proper dosage is given and enough time is considered for the OAs to take effect.

Thus, two studies with two main objectives were designed. In the first study, the prevalence of *Salmonella* shedding, namely, the proportion of pigs showing *Salmonella* in their feces at slaughter, in a population of pig herds from a region considered to have a high prevalence of pig salmonellosis, was estimated. Furthermore, the patterns of antimicrobial resistance (AMR) against antibiotics of importance for humans of the *Salmonella* strains isolated from these pigs were described. Thus, a picture of the risk potentially faced by abattoirs could be obtained. In the second study, it was assessed whether the addition of an esterified formic acid to the abattoir drinking water during lairage may be useful to reduce

the proportion of pigs shedding *Salmonella*, so that it can be included as an additional abattoir-based *Salmonella* mitigation strategy.

2. Materials and Methods

2.1. Study 1 Prevalence Survey and *Salmonella* Characterization

2.1.1. Herd and Animal Selection and Sample Collection

Between December 2019 and November 2021, a convenience sampling of 24 fattening pig units (1000–2000 pigs/unit) was carried out in the Northeast region of Spain. Farms were selected based on the farmer's willingness to collaborate in a larger project to assess new strategies for the control of pig salmonellosis. From each farm, a total of 50 animals from the first batch of pigs to be sent to slaughter (the heaviest pigs) from a given fattening unit were ear tagged 3–4 weeks before leaving the farm. They were selected from different pens among the fattening units. Once in the abattoir, they were identified in the slaughter line and, after evisceration, the gastrointestinal tract was individually collected and a minimum of 25 g of colon content was taken from each of these pigs for *Salmonella* isolation. Samples were then transported to the laboratory for immediate processing.

Additional information on the biosecurity level of each of these farms was also available as it had been previously obtained through a questionnaire (Biocheck.UGent scoring system; https://biocheckgent.com/sites/default/files/2020-02/Pigs_EN_1.pdf (accessed on 6 June 2022)) that had been filled in by the responsible veterinarians of the farms. Thus, a standardized summary measure of farm biosecurity, that is, "Total biosecurity score", was available for comparison purposes. Detailed information regarding this summary measure can be found elsewhere (<https://biocheckgent.com/en/features> (accessed on 6 June 2022)).

2.1.2. *Salmonella* Isolation, Serotyping and Antimicrobial Susceptibility Testing

Intestinal content (IC) samples obtained from the distal colon of individual pigs at the evisceration line were processed and cultured for *Salmonella* isolation following the standard ISO 6579:2002/Amd 1:2007 method. Briefly, 25 g of IC colon was mixed with 225 mL of buffered peptone water (BPW ISO, Oxoid Ltd., Basingstoke, Hants, UK) and incubated at 37 ± 2 °C for 18 ± 2 h for non-selective pre-enrichment. Following incubation, 100 µL divided into three drops of approximately 33 µL was spotted onto a Modified Semisolid Rappaport-Vassiliadis agar (MSRV, Oxoid Ltd., Basingstoke, Hants, UK) plate and incubated at 41.5 ± 1 °C for 24–48 h for selective enrichment. If migration zones were present on the MSRV plates, a loopful of the edge migration zones was transferred onto xylose lysine desoxycholate (X.L.D. medium, Oxoid Ltd., Basingstoke, Hants, UK) and brilliant green (BGA modified, Oxoid Ltd., Basingstoke, Hants, UK) agar plates for selective culture. Suspected colonies were confirmed phenotypically based on the biochemical reactions using tryptone soya broth (Oxoid Ltd., Basingstoke, Hants, UK), lysine decarboxylase broth (BD Difco™, Detroit, MI, USA), urea broth (BD Difco™, Detroit, MI, USA), and triple sugar iron agar (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA).

A colony from each *Salmonella*-positive culture was then selected for identification of the two major serotypes of concern in the pig industry, namely, *S. Typhimurium* and the monophasic variant of *S. Typhimurium*. For that purpose, a duplex PCR that allows simultaneous amplification of a fragment between the genes *fljB* and *fljA* and the phase-2 flagellar gene (*fljB*) was used [20,21]. The PCR was performed in 1X PCR buffer Taq, 2.5 mM MgCl₂, 0.6 mM dNTPs, and 1 U Taq Biotoools DNA polymerase (final volume of 25 µL). The primers mix contained primers at a concentration of 0.1 µM for FFLIB (5'-CTGGCGACGATCTGTCGATG-3') and RFLIA (5'-GCGGTATACAGTGAATTCAC-3') and at a concentration of 1.0 µM for sense-59 (5'-CAACAACAACCTGCAGCGTGTGCG) and antisense-83 (5'-GCCATATTTCAGCCTCTCGCCCG-3'). The cycling parameters involved denaturation at 95 °C for 2 min, followed by 30 cycles of 95 °C for 30 s, 64 °C for 30 s and 72 °C for 1.5 min for amplification, and a final step of 72 °C for 10 min. PCR products were separated on 2% (*w/v*) agarose gels, stained with GelGreen and visualized using a gel image system (iBright 1500, Invitrogen, Termofischer, Singapore). Thus, each

Salmonella-positive sample was classified as *S. Typhimurium*, the monophasic variant of *S. Typhimurium*, or *Salmonella* serotypes different from these two ("other").

A selection of at least one strain of each *Salmonella* serotype isolated from each sampled pig herd was tested for antimicrobial resistance (AMR) to further characterize them. Antimicrobial agents were chosen among those considered of critical importance for humans following the Commission Implementing Decision (EU) 2020/1729. The minimum inhibitory concentration (MIC) to penicillins (A; ampicillin, amoxicillin-clavulanic acid, piperacillin-tazobactam), aminoglycosides (S; amikacin, gentamicin), sulphonamides and dihydrofolate reductase inhibitors (Su; trimethoprim-sulfamethoxazole), tetracyclines (T; tigecycline), cephalosporins (Cf; 2nd generation: cefuroxime, cefoxitin; 3rd generation: cefotaxime, ceftazidime; 4th generation: cefepime), carbapenems (Cm; ertapenem, imipenem), and quinolones (Na; nalidixic acid, ciprofloxacin) was assessed by the VITEK-2 automated system with the VITEK AST-N243 cards (BioMérieux, Marcy-l'Étoile, France). *Salmonella* strains were further classified as resistant or susceptible according to the recommendations of the European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing [22]. Colistin resistance was also assessed and, in this case, MICs were determined by the broth microdilution method according to the ISO 20776-1:2006 standard. An epidemiological cutoff (ECOFF) value of >2 mg/L was used for considering microbiological resistance according to the recommendations of EUCAST. *Escherichia coli* ATCC 25922 was used as quality control strain. An isolate displaying phenotypic resistance to at least three antimicrobial classes was considered multidrug resistant (MDR) [23].

2.2. Study 2 Assessment of the Efficacy of Esterified Formic Acid in Abattoir Drinking Water

2.2.1. Farm and Animal Selection and Sample Collection

Pig farms that had been identified as *Salmonella*-seropositive through previous routine analyses by the abattoir were chosen for this study. All of them were in the vicinity of the abattoir (average distance of 33.5 km). From each farm, pigs arrived at the abattoir in batches of approximately 200 animals (i.e., the truck load capacity). As they were unloaded, 40 were allocated to a clean lairage pen where a four-trough drinking system connected to a 1000 L water container had been set up for the treated water (treatment group, TG). The remainder of the pigs from the truck were allocated to 3–4 clean regular pens with untreated drinking water (control group, CG). Within a batch, all the pigs were of the same age and similar weight, and had been housed within the same fattening unit. In addition, the cleaning of the lairage pens was carried out in a similar way for all of them. All the pigs arrived at the abattoir during the evening of a given day and remained there until slaughter the next morning, a median time of 14.5 h (minimum 10 h, maximum 17.5 h) of lairage. A proxy of the total water consumed by each TG was estimated from the water left in the container after pigs left the pen.

Collection of samples from the 40 pigs from the TG and from another 40 from the CG was performed after evisceration, as indicated in Section 2.1.1. This number of pigs per group was a trade-off between our research team's capacity to process the samples on the same day of collection and the statistical power to detect a difference of 25 percentage points between the proportion of shedders in the control group (estimate of shedding of 30–35% according to previous studies on infection prevalence) and the treatment group.

Trials were carried out in spring time (3), summer (1), and autumn (3), depending on abattoir availability.

2.2.2. Organic Acids

A formic acid (30% formic acid) esterified in the form of mono-, di- and triglyceride with glycerol (MOLI-M C1, Molimen SL, Barcelona, Spain) was selected for this study. Mono-, di- and triglycerides of fatty acids are within the catalogue of feed materials approved by the European Commission (Commission Regulation (EU) No 68/2013 of 16 January 2013 on the Catalogue of feed materials).

Given the expected short period of time during which pigs would be exposed to the treated water, a higher inclusion dose (10 kg product/1000 L of water) than that usually used at the farm (3.5 kg product/1000 L of water) was considered for this study. This dose was still much below the maximum value of 12 g/kg formic acid approved for the use in pigs in the European Union (EU) [24].

2.2.3. *Salmonella* Isolation

Isolation of *Salmonella* from IC samples was performed as indicated above. No further characterization was carried out.

2.3. Statistical Analyses

For the survey, estimates of prevalence of *Salmonella* shedding at slaughter with its corresponding 95% confidence intervals (95% CI) were calculated overall and for each individual pig herd. Differences among seasons were also assessed.

Overall levels of antimicrobial resistance among the three groups of serotypes considered (*S. Typhimurium*, the monophasic variant of *S. Typhimurium*, and “other”) were compared using the summary measure for antimicrobial resistance used by Poppe et al. [25]. This measure was expressed as the percentage of the average resistance to the 18 antimicrobial agents to which resistance of the isolates was tested, and was calculated as:

$$PR = \frac{(\text{TotResist})/17}{\text{TotIsolates}}$$

where PR means percent resistance; TotResist is the sum of all measures of resistance for a given set of isolates to any of the 18 antimicrobial agents in the test panel; and TotIsolates is the total number of isolates examined. In addition, the proportion of MDR isolates within each serotype group were estimated and compared by chi-squared test.

With regard to the assessment of the efficacy of the esterified formic acid, in a first step, for each trial, the prevalence of *Salmonella* shedding was compared between the CG and the TG by the Fisher’s exact test. Afterward, a random-effects logistic regression analysis considering results from all the trials was performed to obtain an overall estimate of the effect of the treatment on the prevalence of *Salmonella* shedding. In this analysis the presence of *Salmonella* in the colon content was the dependent variable and “Treatment” the independent variable. “Trial” was considered as a random variable to account for correlation between individuals within the same trial (i.e., intra class correlation, ICC), and the qualitative variables “Season” (spring, summer or autumn) and “Time spent at lairage” (with two categories based on the median value; <15 h vs. ≥15 h) were considered as potential confounding factors and forced into the model. The odds of *Salmonella* shedding in the CG were compared to those in the TG through estimation of the Odds Ratio (OR) and its corresponding 95% CI.

From this adjusted OR, an estimate of the attributable fraction, that is, the proportion of shedding pigs in the CG that was due to the absence of treatment or, that is, the proportion of pigs that may have been prevented from shedding through the use of this OA during the lairage, could be estimated as $OR-1/OR$ [26].

In addition, to assess whether the estimated water consumption per pig in the TG was associated with the proportion of *Salmonella* shedders, the mean water consumption per pig in each TG was calculated from the water left in the container. Further, the median of the mean water consumption per pig was obtained and the proportions of *Salmonella* shedders among pigs drinking below and above the median were compared by a chi-squared test. OR and its 95% confidence interval were also estimated.

The software STATA (STATA/IC 12.1. Stata-Corp. LP, College Station, TX, USA) was used for statistical analyses.

3. Results

3.1. Study 1 Prevalence Survey and Salmonella Characterization

3.1.1. Prevalence of Salmonella Shedding

A total of 1068 pigs of the 1200 initially ear tagged at the farm were identified at the slaughterhouse. Therefore, an average 44.5 pigs were analyzed per herd for the presence of *Salmonella* (Table 1). The pigs were slaughtered in two different large-scale abattoirs (292 in slaughter A and 776 in B).

Table 1. Prevalence of *Salmonella* shedding and major serotypes found in slaughter pigs from 24 farms.

Farm ID	N	No. + (%)	Serotypes Involved (No. of Strains)
1	43	0 (0.00)	-
2	46	19 (41.30)	<i>S. Typhimurium</i> (3), mST (16)
3	45	1 (2.22)	other (1)
4	49	9 (18.37)	<i>S. Typhimurium</i> (1), mST (8)
5	46	35 (76.09)	<i>S. Typhimurium</i> (20), mST (5), other (10)
6	48	27 (56.25)	<i>S. Typhimurium</i> (7), mST (18), other (2)
7	25	18 (72.00)	other (18)
8	48	33 (68.75)	<i>S. Typhimurium</i> (11), mST (5), other (17)
9	46	15 (32.61)	<i>S. Typhimurium</i> (1), mST (7), other (7)
10	45	39 (86.67)	<i>S. Typhimurium</i> (4), mST (34), other (1)
11	50	4 (8.00)	mST (2), other (2)
12	51	1 (1.96)	<i>S. Typhimurium</i> (1)
13	44	8 (18.18)	mST (8)
14	48	9 (18.75)	other (9)
15	48	7 (14.58)	mST (7)
16	47	5 (11.36)	other (5)
17	46	4 (8.70)	other (4)
18	39	1 (2.56)	other (1)
19	34	27 (79.41)	mST (25), other (2)
20	46	1 (2.17)	other (1)
21	44	2 (4.55)	<i>S. Typhimurium</i> (1), other (1)
22	44	19 (43.18)	<i>S. Typhimurium</i> (3), mST (2), other (14)
23	44	0 (0.00)	-
24	42	8 (19.05)	<i>S. Typhimurium</i> (3), other (5)
All	1068	292 (27.34)	<i>S. Typhimurium</i> (55), mST (137), other (100)

mST: monophasic variant of *S. Typhimurium*; “other”: serotypes other than *S. Typhimurium* and its monophasic variant.

Twenty-two farms (91.7%; 22 of 24) had at least one *Salmonella*-positive pig. *Salmonella* was recovered from 292 pigs (27.3%; 95% CI = 24.8–30.1). The major serotype identified was the monophasic variant of *S. Typhimurium*, which was isolated in fecal samples from 137 pigs (46.9%; 95% CI = 41.3–52.6) and was detected in 54.5% (12/22) of the pig herds. *Salmonella Typhimurium* was identified only in 55 pigs (18.8%; 95% CI = 14.8–23.7), but well distributed among herds (50%). One hundred isolates belonged to “other” serotypes and were present in 72.7% of the herds. Only seven herds were infected with serotypes other than *S. Typhimurium* or its monophasic variant. Overall, the mean *Salmonella* prevalence in these positive herds was 29.8%. *Salmonella* prevalence was significantly different among seasons ($p < 0.001$), with 44.2% of the positive samples in winter, 28.4% in spring, 14.3% in summer, and 19.8% in autumn.

3.1.2. Antimicrobial Susceptibility Testing

A selection of 80 isolates (20 of *S. Typhimurium*, 28 of the monophasic variant of *S. Typhimurium*, and 32 of “other” serotypes) representing the different serotypes detected in each farm were tested for antimicrobial resistance (AMR) against the 17 antimicrobial agents described above (Table 2).

Table 2. Occurrence of resistance to critically important antimicrobials in *Salmonella* isolates from pigs.

Antimicrobial Class	Antimicrobial Agent *	No. ST (%) <i>n</i> = 20	No. mST (%) <i>n</i> = 28	No. "Other" Serotypes (%) <i>n</i> = 32	Farm ID
Penicillins	AMP	14 (70.0)	26 (92.9)	19 (59.4)	2, 4, 5, 6, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 15, 16, 17, 19, 20, 21, 22, 24
	AMC	0 (0.0)	3 (10.7)	3 (9.4)	11, 13
	TZP	0 (0.0)	2 (7.1)	0 (0.0)	11
	CXM	1 (5.0)	1 (3.6)	3 (9.4)	13, 22
Cephalosporins	FOX	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	-
	CTX	0 (0.0)	1 (3.6)	3 (9.4)	13, 22
	CAZ	0 (0.0)	0 (0.0)	3 (9.4)	22
	FEP	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	-
Carbapenems	ETP	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	-
	IPM	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	-
Polymyxins	CST	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	-
Aminoglycosides	AMK	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	-
	GEN	0 (0.0)	3 (10.7)	2 (6.3)	8, 11, 13
Tetracyclines	TGC	4 (20.0)	4 (14.3)	4 (12.5)	2, 11, 16, 17, 22
Quinolones	NAL	2 (10.0)	7 (25.0)	7 (21.9)	8, 9, 11, 12, 13, 16, 19, 20, 22, 24
	CIP	0 (0.0)	0 (0.0)	1 (3.1)	16
Sulphonamides dihydrofolate reductase inhibitors	SXT	2 (10.0)	3 (10.7)	11 (34.4)	8, 9, 11, 12, 13, 16, 17, 19

ST: *Salmonella* Typhimurium; mST: monophasic variant of *S. Typhimurium*. * Ampicillin (AMP), amoxicillin-clavulanic acid (AMC), piperacillin-tazobactam (TZP), cefuroxime (CXM), ceftazidime (CAZ), cefepime (FEP), ertapenem (ETP), imipenem (IPM), colistin (CST), amikacin (AMK), gentamicin (GEN), tigecycline (TGC), nalidixic acid (NAL), ciprofloxacin (CIP), trimethoprim-sulfamethoxazole (SXT).

Resistance to ampicillin was the most common (73.8%) AMR observed in *Salmonella* isolates, varying from very high levels (59.4%) in "other" serotypes to extremely high (70–92.9%) in *S. Typhimurium* and its monophasic variant. Resistance to trimethoprim-sulfamethoxazole and nalidixic acid was observed at moderate levels ($\approx 20\%$) but was well distributed among herds (36.4% and 45.4%, respectively) and involving all serotypes. Much lower resistance was detected against the aminoglycosides, with no resistance observed against amikacin and only 6.2% of the isolates were resistant to gentamicin.

Resistance to tigecycline was present in 15.0% of the isolates, and distributed among all serotypes. However, resistance was low against cephalosporins of the third generation (5% for cefotaxime, and 3.8% for ceftazidime) and ciprofloxacin (1.2%), and was null against carbapenems (imipenem and ertapenem) or polymyxins (colistin). Although resistance to tigecycline was present in five (22.7%) of the herds, resistance to third-generation cephalosporins was detected in only two (9%) of them, and mostly affected "other" serotypes.

Overall, MDR was observed in 11 (13.8%) of the isolates. Among these isolates, 54.5% were "other" serotypes, 27.3% belonged to the monophasic variant of *S. Typhimurium* and 18.2% to *S. Typhimurium*, although no significant differences were observed between the proportion of MDR isolates among group of serotypes ($p = 0.56$).

In five (45.4%) of these MDR isolates, resistance to tigecycline was present. No combined resistance to both ciprofloxacin and cefotaxime was observed.

Complete susceptibility was detected in 25% of *Salmonella* isolates with the highest proportion in "other" serotypes (37.5%), followed by *S. Typhimurium* (30.0%). Only two (7.1%) isolates of monophasic variant of *S. Typhimurium* were pansusceptible.

Regarding AMR profiles, 12 different patterns were detected, the most common being resistance against aminopenicillins ($n = 24$; 30%), followed by aminopenicillins-quinolones ($n = 8$; 10%) and aminopenicillins-sulfonamides ($n = 6$; 7.5%). ASSuNa, ATCf, ASuTNa, ASSuCf, and ASuNa profiles were detected in 5%, 3.8%, 2.5%, 1.3% and 1.3% of the isolates, respectively.

Percent resistance among isolates of the monophasic variant of *S. typhimurium* was 10.7%, somewhat higher than that for *S. Typhimurium* (6.8%) but similar to that of “other” serotypes (10.3%).

3.2. Study 2 Assessment of the Efficacy of Esterified Formic Acid in Abattoir Drinking Water

A total of seven trials (on seven different pig herds) were performed. Mean prevalence of *Salmonella* shedding was variable among trials, ranging from 18.8% in trial 3 to 90% in trial 2. Results for each group in each trial are shown in Figure 1. In general, *Salmonella* shedding levels were always lower in the TG compared to the CG and, at the trial level, in three of them these differences were statistically significant.

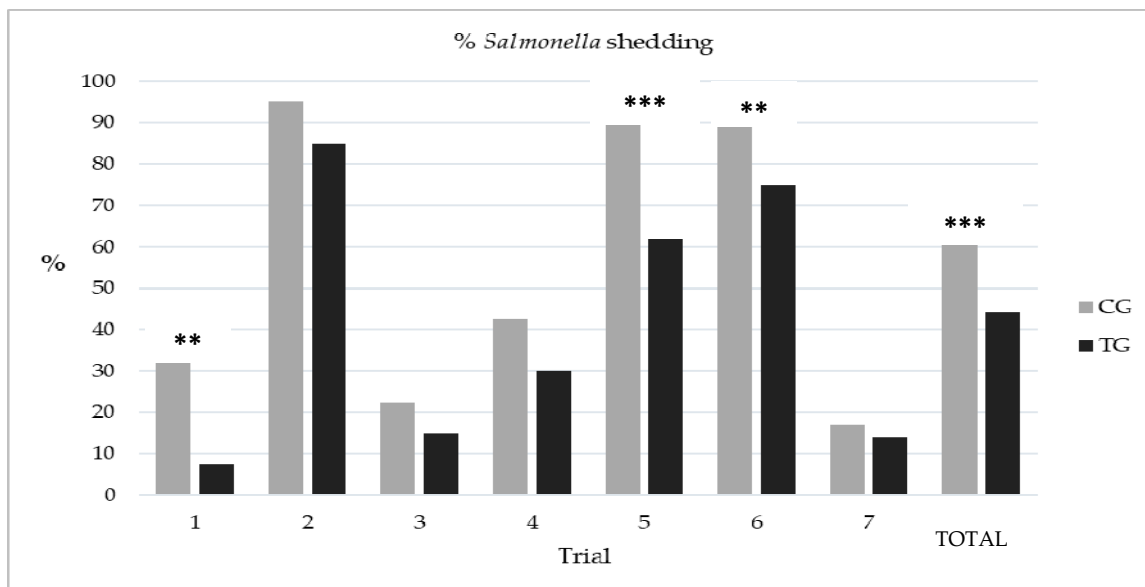


Figure 1. Proportion of *Salmonella* shedding at slaughter in the seven trials and globally. Significant differences between the control (CG) and the treated group (TG) are indicated (** $p < 0.05$; *** $p < 0.01$; Fisher’s exact test).

The proportion of *Salmonella* shedders in those pigs that consumed an amount of treated water below the median (0.9 L/pig) was significantly higher than that when water consumption was above the median. The odds of shedding *Salmonella* in those pigs was up to 4.56 times higher than that in the group that drank ≥ 0.9 L of treated water (Table 3).

Table 3. Number of pigs shedding *Salmonella* and estimated water consumption per pig.

		Estimated Water Consumption Per Pig		Total
		<0.9 L	≥ 0.9 L *	
<i>Salmonella</i> shedding	Yes	96 (76.8)	29 (23.2)	125
	No	66 (42.0)	91 (58.0)	157
		OR = 4.56 (95% CI: 2.70–7.69; $p < 0.0001$)		

* Categories based on the median of the estimated mean water consumption per pig.

Overall, in 60.7% (170/280) of the pigs from the CG, *Salmonella* was found in feces. This percentage decreased to 44.3% (125/282) in the TG ($p < 0.01$). The random-effects logistic regression analysis indicated a significant clustering effect of “Trial” (ICC: 0.302; $p < 0.001$). According to the model, *Salmonella* shedding significantly decreased with the treatment after adjusting by season and lairage time (Table 4). The adjusted odds of shedding *Salmonella* in the CG were 2.75 (95% CI = 1.80–4.21) times higher than those in the

TG. Thus, the estimated proportion of shedders that may have been prevented due to the use of this esterified formic acid in this population may be as high as 63.6%.

Table 4. Results of the random-effects logistic regression analysis to assess the relationship between water treatment with the esterified formic acid and *Salmonella* shedding after adjusting by season and time at lairage.

Variable	N	No. + (%)	β	Logistic Regression Parameters			
				SE (β)	<i>p</i>	OR	95% CI OR
Group							
Treatment ¹	282	125 (44.3)				1	
Control	280	170 (60.7)	1.01	0.21	<0.001	2.75	1.80–4.21
Season							
Spring ¹	240	156 (65)				1	
Summer	80	31 (38.7)	−3.32	2.06	0.107	0.036	0.0006–2.05
Autumn	242	108 (44.6)	−2.45	1.42	0.085	0.086	0.005–1.39
Lairage time							
<15 h	320	171 (53.4)					
≥15 h	242	124 (51.2)	1.94	1.50	0.195	7.01	0.36–132

¹ Reference categories. Trial (random variable): variance 1.422; intra class correlation (ICC): 0.30 (95% CI: 0.12–0.56).

4. Discussion

Pig salmonellosis is mostly a public health issue as pigs may become a major source of infection for humans [1]. Although its transmission by direct contact with infected pigs is possible, the main route of transmission is through the consumption of *Salmonella*-contaminated pork products. Contamination of pork products usually occurs during the processing of the carcass at slaughter. According to the relevant authorities, the proportion of contaminated pig carcasses in Spain in 2019 and 2020, a country with some of the highest levels of pig salmonellosis, was as high as 17.6% and 14.3%, respectively [1,27]. Trying to get a better insight into the reasons why this is occurring thus appears necessary. In addition, most European national control programs aiming at reducing the prevalence of *Salmonella* at the farm level, as a first step to reduce its prevalence at the slaughter level, have failed [2,28]. Therefore, abattoir strategies that may help to mitigate this problem must be sought while more efficient farm control programs are developed.

Previous studies have estimated the proportion of *Salmonella*-infected pigs that reach the abattoir [4,7], but no one has assessed how many of these arrive shedding the bacterium, which would directly relate to abattoir contamination. According to the results from the present study, more than 90% of the herds sent pigs that shed *Salmonella* at slaughter, and 27.3% of the slaughtered pigs showed *Salmonella* in their feces. Although some pigs may have become infected during transport or even during lairage [29], from the abattoirs' point of view, almost one-third of the pigs arriving could be considered a potential source for carcass contamination.

Since the survey was based on a convenience sampling, these results cannot be considered representative of a given pig farm population and were likely subject to selection bias. We checked data available on the farm biosecurity level to assess whether this issue may explain the high levels of shedding found. On average, the farms included in this study presented reasonable levels of biosecurity, that is, a "Total biosecurity score" of 72% (of 100%, which would mean perfect farm biosecurity), ranging from a minimum of 51% to a maximum of 86% (data available upon request). This average was above many national averages (63% for German pig farms; 65% for Italian; 67% for Spanish; 69% for Dutch) and similar to those from Irish or Belgian farms (72% and 74%, respectively) (checked at <https://biocheck.ugent.be/en/worldwide> on 12 April 2022). Although much caution should be considered with such comparisons, as there was no knowledge on the origin and

representativeness of the farms included in the cited web page, this comparison provides a glimpse into the ranking of our farms, and suggests that the high proportion of pigs shedding *Salmonella* observed in this study should not be related to a selection bias associated with farms of low biosecurity levels. Neither should it be attributed to the quality of the abattoirs involved, since both were new modern slaughterhouses with up-to-date robotized meat processing techniques and high levels of hygiene.

These results agree with those of a recent study carried out in another Spanish region, where 71.4% of batches of slaughter pigs (pooled fecal samples) were contaminated upon arrival [30]. In general, these results support the idea that the situation remains stable and no improvement has been observed since the last EFSA baseline study performed more than 10 years ago. Considering the expected prevalence of *Salmonella* infection in the country according to that study ($\approx 30\%$; [4]), and the proportion of shedding pigs observed at slaughter in this one (27%), it appears that a relationship between field infection and shedding at abattoir can be assumed.

The most prevalent serotype detected in feces was the monophasic variant of *S. Typhimurium*, a serotype of high public health importance, and present in 47% of the pigs shedding *Salmonella*; this far exceeded not only *S. Typhimurium* (18.8%), but also the sum of the rest of the “other” serotypes (34%). This represents a significant jump in the prevalence of the monophasic variant of *S. Typhimurium* with respect to previous studies in the same or neighboring areas, when its prevalence was as low as 12% [7,31], and confirms the worldwide upward trend of this serotype [1,30,32–37].

This rise in the prevalence of the monophasic variant of *S. Typhimurium* appears to be related with some evolutionary advantage, in part likely associated with the accumulation of mobile resistance elements, which in turn would have contributed to its monophasic phenotype [38,39]. In fact, the monophasic variant of *S. Typhimurium* has been usually characterized by displaying AMR to ampicillin, streptomycin, sulphonamides, and tetracycline (ASSuT) [7,40–42]. Subsequently, it has also been related to resistance to critical antimicrobials for humans, such as third-generation cephalosporins, fosfomycin, and colistin [43–45], which has raised concerns about the limitation of antimicrobial therapeutic options. In this study, we used a summary measure for AMR, the so-called percentage resistance (PR) [25], to determine whether there were differences in overall AMR against the 17 antimicrobial agents tested among the three groups of serotypes considered. A somewhat higher PR was observed for the monophasic variant of *S. Typhimurium* isolates (10.7%) when compared to *S. Typhimurium* (6.8%), but this was similar to that for all the “other” serotypes together (10.3%). In any case, this level of AMR among the monophasic variant of *S. Typhimurium* isolates seemed not to be associated with a higher proportion of MDR isolates, nor with resistance to antimicrobials of critical importance for humans, since no isolate showed AMR against carbapenems or colistin, and just one showed it to third-generation cephalosporins.

Carbapenems are not used in animals and no resistance against this antimicrobial class has been observed in *Salmonella* isolates from pigs in the EU in recent years [46]. Resistance to colistin has been usually low in Spain, even when this drug was used massively in the pig sector [44,47]. The application of the Spanish Plan against Antibiotic Resistance in 2015, and the subsequent reduction in colistin consumption by more than 95% [48], may have contributed to an overall reduction in the detection of the *mcr-1* gene [49,50], explaining the absence of phenotypic resistance against colistin in these isolates. Regarding AMR to third-generation cephalosporins, this was found in 5% of the *Salmonella* isolates. Although this level was still higher than the European average of 0.5% [51], it appears constant with regard to previous years [47,52], and was circumscribed to only two farms, suggesting its presence may have been triggered by the occasional use of this class of antimicrobials (e.g., ceftiofur) in these farms [52].

In general, the observed levels of resistance against the antimicrobials tested in this group of isolates was similar to that described in the last report from EFSA and ECDC regarding antimicrobial resistance in zoonotic and indicator bacteria from humans, animals,

and food in 2018–19 [51], with the exception of two antibiotics, namely, ciprofloxacin and tigecycline. Resistance to ciprofloxacin, a first-line antimicrobial agent for the treatment of non-typhoidal *Salmonella* in humans, was observed at lower levels (1.2%) than those noticed in pigs in the EU (10.3%; [46]), and at much lower levels than those recently observed in Italy (60.7%; [53]). This type of resistance in *Salmonella* has been related to fluoroquinolone consumption in food-producing animals [54,55]; thus this reduction may be related to a decreasing trend in its use, as the last European Surveillance of Veterinary Antimicrobial Consumption (ESVAC) report on sales of veterinary antimicrobial agents suggests [56].

On the contrary, resistance to tigecycline, a tetracycline-derivative antibiotic used to treat severe infections caused by extensively drug-resistant bacteria [57], was moderately high (15%), well spread (in five different herds), and much higher than that shown in the European data (1.5%; [46]). Resistance to this drug has been recently associated to highly transferable plasmid-mediated genes detected in bacteria from human and animals, including pigs [58,59], which may explain its spread within the swine sector despite the fact that tigecycline is not used in veterinary medicine. Considering that five (41.7%) of the tigecycline-resistant isolates showed MDR, co-selection for resistance to this antimicrobial through exposure to other antimicrobials may also have been possible.

A farm-to-consumption quantitative microbiological risk assessment (QMRA) already suggested that a large proportion of cases of human salmonellosis would derive from slaughter pigs with a high concentration of *Salmonella* in their feces [60], which likely occurs due to the lack of efficient *Salmonella* control measures at the farm level [2]. Therefore, the implementation of control steps at the abattoir to minimize the transfer of *Salmonella* to the surface of pig carcasses appears compulsory, particularly since EU legislation forbids the treatment of carcasses with antimicrobial agents (Regulation EC 853/2004). Strict hygiene measures along with the reduction in *Salmonella* shedders are the only measures foreseen to reduce abattoir contamination, the former being more effective depending upon the reduction that can be reached on the latter.

Thus, the present study also aimed at assessing whether the addition of an esterified formic acid to the lairage drinking water can help to reduce the overall proportion of pigs shedding *Salmonella* while waiting for slaughter. The net amount of formic acid used (3 g/kg) was significantly below the maximum dose of formic acid considered safe for growing pigs (18 g/kg feed; [61]). Using this dose, a significant overall reduction in the number of shedders in the TG was observed when the seven trials were taken together (44% in the TG vs. 60.7% in the CG), with a decreasing trend in all the trials; however, only in three of them was this drop was statistically significant.

When OAs or their salts have been applied at the farm level, their efficacy for the control of pig salmonellosis has been variable. Although some studies have shown a reduction in *Salmonella* excretion [62–65], or seroprevalence [63,66–72], others did not find any effect at all [73–75]. It is well known that the antimicrobial effect of OAs depends upon factors such as the type and combination of OA, the concentration used, the time and period of administration, and the age of the animals. In general, however, long periods of treatment seem to be required before any positive effect is detected [71]. In this study, however, overnight drinking (between 10 and 17 h of exposure to the treated water) was enough to detect a significant beneficial effect. Reasons for this finding may be related to the type of formulation used, that is, formic acid esterified in the form of glycerides. Esterified acids appear to have an increased and thorough antimicrobial activity along the whole intestinal tract compared to the original OAs or their salts [18,19]. In addition, it did not modify the water taste despite the dose considered. Since the main mechanism of action of esterified fatty acids relates to a membrane-destabilizing activity that causes increased cell permeability and lysis after contact with the bacterium [76], it is also possible that its effect could begin within the oral cavity.

The lack of a significant reduction in *Salmonella* shedding in some of the trials may be related to other factors such as the amount of water consumed by the pigs or the length of the lairage time. Although it was not possible to accurately measure individual water

consumption, a proxy of that was estimated based on water left in the container for each treated group. It was found that the chances for shedding *Salmonella* increased significantly when pigs in these groups had drunk less than 0.9 L of treated water (OR = 4.56; 95% CI: 2.70–7.69). Finding strategies that favor the consumption of treated water at lairage (i.e., increasing the number of drinking troughs) may help to increase the efficacy of this strategy.

Similarly, prolonged lairage times appear to favor the risk of *Salmonella* shedding and, therefore, environmental contamination [77]. In this study, all batches of pigs were kept overnight and for a minimum of 10 h to favor the consumption of water, which may also contribute to somewhat neutralizing the positive effect of the treatment applied. Considering the apparent beneficial effect of this esterified formic acid, beginning the water treatment at the farm, a few days before the slaughter, would likely avoid the need for long periods of lairage.

The product tested allowed a raw reduction of around 16% in the proportion of *Salmonella* shedding pigs, compared to a CG without the treatment. This drop may seem small, but it happened in a context of high prevalence of shedding (>60% in the CG) and after a few hours of treatment. Other strategies, such as vaccination, have shown efficacies that were only slightly higher, i.e., 20–30% [78,79]. Interestingly, when other variables were taken into account (clustering and confounding variables), the OR of shedding for the CG vs. the TG was much higher than that when no adjustment was considered (2.75 vs. 1.94). Therefore, the proportion of pigs that may have been prevented from shedding due to the use of this esterified formic acid in the TG, given the conditions of the study, may be as high as 63.6%. Thus, this strategy can potentially contribute to reduce the burden of *Salmonella* contamination in the slaughter premises and therefore be used as a complement within more comprehensive *Salmonella* control programs that include both on-farm and abattoir-based strategies.

5. Conclusions

A high proportion of pigs (18%) still arrives at the abattoir shedding important zoonotic *Salmonella* serotypes (mostly *S. Typhimurium* and its monophasic variant). In addition, in some cases, the salmonellae detected display AMR against antimicrobials of critical importance for humans. Although, in general, the AMR to these classes of antimicrobial was low, the levels of AMR against tigecycline, an antimicrobial not used in food-producing animals, were of concern. These shedding pigs contribute to the abattoir environmental contamination and are a further potential source for human infections. Slaughter strategies such as the use of formic acid esterified in the form of glycerides in the drinking water may help to reduce the burden of environmental contamination through the reduction in the proportion of shedding pigs prior to slaughter, but further research on the efficacy of this product is needed.

Author Contributions: Conceptualization, R.C.M.-J.; methodology, R.C.M.-J., M.B.-R. and A.C.-H.; formal analysis, R.C.M.-J., M.B.-R. and A.C.-H.; investigation, R.C.M.-J., M.B.-R., A.C.-H. and C.M.M.-A.; writing—Original draft preparation, R.C.M.-J. and M.B.-R.; writing—Review and editing, M.B.-R., R.C.M.-J., C.M.M.-A. and A.C.-H.; supervision, R.C.M.-J.; project administration and funding acquisition, R.C.M.-J. and C.M.M.-A. All authors have read and agreed to the published version of the manuscript.

Funding: This work was supported by the Ministry of Science and Innovation (Ref. RTI2018-093915-B-I00).

Institutional Review Board Statement: Not applicable. Ethical review and approval were waived for this study due to no interventions on live animals were performed. All animals sampled had been previously slaughtered at a commercial abattoir.

Informed Consent Statement: Not applicable.

Data Availability Statement: Data available upon request.

Acknowledgments: We thank the pig production companies and their technical staff, farmers, and the abattoirs for their collaboration in carrying out the field work.

Conflicts of Interest: The authors declare no conflict of interest.

References

1. European Food Safety Authority (EFSA) and European Centre for Disease Prevention and Control (ECDC). The European Union One Health 2020 Zoonoses Report. *EFSA J.* **2021**, *19*, 6971.
2. Correia-Gomes, C.; Leonard, F.; Graham, D. Description of control programmes for *Salmonella* in pigs in Europe. Progress to date? *J. Food Saf.* **2021**, *41*, e12916. [\[CrossRef\]](#)
3. Bonardi, S. *Salmonella* in the pork production chain and its impact on human health in the European Union. *Epidemiol. Infect.* **2017**, *145*, 1513–1526. [\[CrossRef\]](#)
4. European Food Safety Authority (EFSA) and European Centre for Disease Prevention and Control (ECDC). 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.* **2008**, *135*, 1–111.
5. Hurd, H.S.; McKean, J.D.; Griffith, R.D.; Rostagno, M.H. Estimation of the *Salmonella enterica* prevalence in finishing swine. *Epidemiol. Infect.* **2004**, *132*, 127–135. [\[CrossRef\]](#)
6. European Food Safety Authority (EFSA) and European Centre for Disease Prevention and Control (ECDC). Analysis of the baseline survey on the prevalence of *Salmonella* in holdings with breeding pigs, in the EU, 2008, Part A: *Salmonella* prevalence estimates. *EFSA J.* **2009**, *7*, 93.
7. Vico, J.P.; Rol, I.; Garrido, V.; San Román, B.; Grilló, M.J.; Mainar-Jaime, R.C. Salmonellosis in finishing pigs in Spain: Prevalence, antimicrobial agent susceptibilities, and risk factor analysis. *J. Food Prot.* **2011**, *74*, 1070–1078. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
8. Massacci, F.R.; Morelli, A.; Cucco, L.; Castinel, A.; Ortenzi, R.; Tofani, S.; Pezzotti, G.; Estellé, J.; Paniccià, M.; Magistrali, C.F. Transport to the Slaughterhouse Affects the *Salmonella* Shedding and Modifies the Fecal Microbiota of Finishing Pigs. *Animals* **2020**, *10*, 676. [\[CrossRef\]](#)
9. Hurd, H.S.; McKean, J.D.; Griffith, R.W.; Wesley, I.V.; Rostagno, M.H. *Salmonella enterica* infections in market swine with and without transport and holding. *Appl. Environ. Microbiol.* **2002**, *68*, 2376–2381. [\[CrossRef\]](#)
10. Beloeil, P.A.; Chauvin, C.; Proux, K.; Madec, F.; Fravalo, P.; Alioum, A. Impact of the *Salmonella* status of market-age pigs and the pre-slaughter process on *Salmonella* caecal contamination at slaughter. *Vet. Res.* **2004**, *35*, 513–530. [\[CrossRef\]](#)
11. Casanova-Higes, A.; Andrés-Barranco, S.; Mainar-Jaime, R.C. Influence of On-farm pig *Salmonella* status on *Salmonella* Shedding at Slaughter. *Zoonoses Public Health* **2017**, *64*, 328–336. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
12. McDowell, S.W.; Porter, R.; Madden, R.; Cooper, B.; Neill, S.D. *Salmonella* in slaughter pigs in Northern Ireland: Prevalence and use of statistical modelling to investigate sample and abattoir effects. *Int. J. Food Microbiol.* **2007**, *118*, 116–125. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
13. Powell, L.F.; Cheney, T.E.A.; Williamson, S.; Guy, E.; Smith, R.P.; Davies, R.H. A prevalence study of *Salmonella* spp., *Yersinia* spp., *Toxoplasma gondii* and porcine reproductive and respiratory syndrome virus in UK pigs at slaughter. *Epidemiol. Infect.* **2016**, *44*, 1538–1549. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
14. Martelli, F.; Oastler, C.; Barker, A.; Jackson, G.; Smith, R.P.; Davies, R. Abattoir-based study of *Salmonella* prevalence in pigs at slaughter in Great Britain. *Epidemiol. Infect.* **2021**, *149*, e218. [\[CrossRef\]](#)
15. Rostagno, M.H.; Hurd, H.S.; McKean, J.D.; Ziemer, C.J.; Gailey, J.K.; Leite, R.C. Preslaughter holding environment in pork plants is highly contaminated with *Salmonella enterica*. *Appl. Environ. Microbiol.* **2003**, *69*, 4489–4494. [\[CrossRef\]](#)
16. Scherer, K.; Szabo, I.; Rösler, U.; Appel, B.; Hensel, A.; Nöckler, K. Time course of infection with *Salmonella* Typhimurium and its influence on fecal shedding, distribution in inner organs, and antibody response in fattening pigs. *J. Food Prot.* **2008**, *71*, 699–705. [\[CrossRef\]](#)
17. Pesciaroli, M.; Cucco, L.; De Luca, S.; Massacci, F.R.; Maresca, C.; Medici, L.; Paniccià, M.; Scoccia, E.; Staffolani, M.; Pezzotti, G.; et al. Association between pigs with high caecal *Salmonella* loads and carcass contamination. *Int. J. Food Microbiol.* **2017**, *242*, 82–86. [\[CrossRef\]](#)
18. Cantini. Compositions Containing C1 to C7 Organic Acid Monoglycerides and Glycerol, Their Preparation and Use as Antibacterials and Anti-Mould Agents. 2015. Available online: <https://patents.google.com/patent/WO2010106488A2/en> (accessed on 21 April 2022).
19. Gomez-Osorio, L.M.; Yepes-Medina, V.; Ballou, A.; Parini, M.; Angel, R. Short and Medium Chain Fatty Acids and Their Derivatives as a Natural Strategy in the Control of Necrotic Enteritis and Microbial Homeostasis in Broiler Chickens. *Front. Vet. Sci.* **2021**, *8*, 773372. [\[CrossRef\]](#)
20. Tennant, S.M.; Diallo, S.; Levy, H.; Livio, S.; Sow, S.O.; Tapia, M.; Fields, P.I.; Mikoleit, M.; Tamboura, B.; Kotloff, K.L.; et al. Identification by PCR of non-typhoidal *Salmonella enterica* serovars associated with invasive infections among febrile patients in Mali. *PLoS Negl. Trop. Dis.* **2010**, *4*, e621. [\[CrossRef\]](#)
21. Barco, L.; Lettini, A.A.; Ramon, E.; Longo, A.; Saccardin, C.; Pozza, M.C.; Ricci, A. A rapid and sensitive method to identify and differentiate *Salmonella enterica* serotype Typhimurium and *Salmonella enterica* serotype 4,[5],12:i:- by combining traditional serotyping and multiplex polymerase chain reaction. *Foodborne Pathog. Dis.* **2011**, *8*, 741–743. [\[CrossRef\]](#)
22. European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing (EUCAST). Clinical Breakpoints and Dosing of Antibiotics. Version 12.0. Available online: https://www.eucast.org/clinical_breakpoints/ (accessed on 21 April 2022).

23. Magiorakos, A.P.; Srinivasan, A.; Carey, R.B.; Carmeli, Y.; Falagas, M.E.; Giske, C.G.; Harbarth, S.; Hindler, J.F.; Kahlmeter, G.; Olsson-Liljequist, B.; et al. Multidrug-resistant, extensively drug-resistant and pandrug-resistant bacteria: An international expert proposal for interim standard definitions for acquired resistance. *Clin. Microbiol. Infect.* **2012**, *18*, 268–281. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
24. Luise, D.; Correa, F.; Bosi, P.; Trevisi, P. A Review of the Effect of Formic Acid and Its Salts on the Gastrointestinal Microbiota and Performance of Pigs. *Animals* **2020**, *10*, 887. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
25. Poppe, C.; Ayroud, M.; Ollis, G.; Chirino-Trejo, M.; Smart, N.; Quessy, S.; Michel, P. 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.* **2001**, *7*, 197–212. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
26. Dohoo, I.R.; Martin, W.; Stryhn, H.E. *Veterinary Epidemiologic Research*; University of Prince Edward Island: Charlottetown, PE, Canada, 2003; p. 127.
27. European Food Safety Authority (EFSA) and European Centre for Disease Prevention and Control (ECDC). The European Union One Health 2019 Zoonoses Report. *EFSA J.* **2021**, *19*, 6406.
28. Mainar-Jaime, R.C.; Casanova-Higes, A.; Andrés-Barranco, S.; Vico, J.P. Looking for new approaches for the use of serology in the context of control programmes against pig salmonellosis. *Zoonoses Public Health*. **2018**, *65*, e222–e228. [\[CrossRef\]](#)
29. Boughton, C.; Egan, J.; Kelly, G.; Markey, B.; Leonard, N. Rapid infection of pigs following exposure to environments contaminated with different levels of *Salmonella* Typhimurium. *Foodborne Pathog. Dis.* **2007**, *4*, 33–40. [\[CrossRef\]](#)
30. Marín, C.; Chinillac, M.C.; Cerdà-Cuellar, M.; Montoro-Dasi, L.; Sevilla-Navarro, S.; Ayats, T.; Marco-Jimenez, F.; Vega, S. Contamination of pig carcass with *Salmonella enterica* serovar Typhimurium monophasic variant 1,4[5],12:i:- originates mainly in live animals. *Sci. Total Environ.* **2020**, *703*, 134609. [\[CrossRef\]](#)
31. San Román, B.; Garrido, V.; Sánchez, S.; Martínez-Ballesteros, I.; Garaizar, J.; Mainar-Jaime, R.C.; Migura-Garcia, L.; Grilló, M.J. Relationship between *Salmonella* infection, shedding and serology in fattening pigs in low-moderate prevalence areas. *Zoonoses Public Health* **2018**, *65*, 481–489. [\[CrossRef\]](#)
32. Mueller-Doblies, D.; Speed, K.C.R.; Kidd, S.; Davies, R.H. *Salmonella* Typhimurium in livestock in Great Britain—trends observed over a 32-year period. *Epidemiol. Infect.* **2018**, *146*, 409–422. [\[CrossRef\]](#)
33. Teng, K.T.; Martinez-Avilés, M.; Ugarte-Ruiz, M.; Barcena, C.; de la Torre, A.; Lopez, G.; Moreno, M.A.; Dominguez, L.; Alvarez, J. Spatial Trends in *Salmonella* Infection in Pigs in Spain. *Front. Vet. Sci.* **2020**, *7*, 345. [\[CrossRef\]](#)
34. D’Incau, M.; Salogni, C.; Giovannini, S.; Ruggeri, J.; Scali, F.; Tonni, M.; Formenti, N.; Guarneri, F.; Pasquali, P.; Alborali, G.L. Occurrence of *Salmonella* Typhimurium and its monophasic variant (4, [5],12:i:-) in healthy and clinically ill pigs in northern Italy. *Porcine Health Manag.* **2021**, *7*, 34. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
35. Mandilara, G.; Sideroglou, T.; Chrysostomou, A.; Rentifis, I.; Papadopoulos, T.; Polemis, M.; Tzani, M.; Tryfinopoulou, K.; Mellou, K. The Rising Burden of Salmonellosis Caused by Monophasic *Salmonella* Typhimurium (1,4,[5],12:i:-) in Greece and New Food Vehicles. *Antibiotics* **2021**, *10*, 185. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
36. Deane, A.; Murphy, D.; Leonard, F.C.; Byrne, W.; Clegg, T.; Madigan, G.; Griffin, M.; Egan, J.; Prendergast, D.M. Prevalence of *Salmonella* spp. in slaughter pigs and carcasses in Irish abattoirs and their antimicrobial resistance. *Ir. Vet. J.* **2022**, *75*, 4. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
37. McLure, A.; Shadbolt, C.; Desmarchelier, P.M.; Kirk, M.D.; Glass, K. Source attribution of salmonellosis by time and geography in New South Wales, Australia. *BMC Infect. Dis.* **2022**, *22*, 14. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
38. Ingle, D.J.; Ambrose, R.L.; Baines, S.L.; Duchene, S.; Gonçalves da Silva, A.; Lee, D.Y.J.; Jones, M.; Valcanis, M.; Taiaroa, G.; Ballard, S.A.; et al. Evolutionary dynamics of multidrug resistant *Salmonella enterica* serovar 4,[5],12:i:- in Australia. *Nat. Commun.* **2021**, *12*, 4786. [\[CrossRef\]](#)
39. Win, A.T.; Supa-Amornkul, S.; Orsi, R.H.; Carey, J.H.; Wolfgang, W.J.; Chaturongakul, S. Sequence Analyses and Phenotypic Characterization Revealed Multidrug Resistant Gene Insertions in the Genomic Region Encompassing Phase 2 Flagellin Encoding fljAB Genes in Monophasic Variant *Salmonella enterica* Serovar 4,5,12:i:- Isolates From Various Sources in Thailand. *Front. Microbiol.* **2021**, *12*, 720604.
40. Yang, X.; Wu, Q.; Zhang, J.; Huang, J.; Guo, W.; Cai, S. Prevalence and Characterization of Monophasic *Salmonella* Serovar 1,4,[5],12:i:- of Food Origin in China. *PLoS ONE* **2015**, *10*, e0137967. [\[CrossRef\]](#)
41. Wasyl, D.; Hosiowski, A. Occurrence and characterization of monophasic *Salmonella enterica* serovar Typhimurium (1,4,[5],12:i:-) of non-human origin in Poland. *Foodborne Pathog. Dis.* **2012**, *9*, 1037–1043. [\[CrossRef\]](#)
42. Andrés-Barranco, S.; Vico, J.P.; Marín, C.M.; Herrera-León, S.; Mainar-Jaime, R.C. Characterization of *Salmonella enterica* Serovar Typhimurium Isolates from Pigs and Pig Environment-Related Sources and Evidence of New Circulating Monophasic Strains in Spain. *J. Food Prot.* **2016**, *79*, 407–412. [\[CrossRef\]](#)
43. Wang, Z.; Xu, H.; Tang, Y.; Li, Q.; Jiao, X. A Multidrug-resistant Monophasic *Salmonella* Typhimurium Co-harboring mcr-1, fosA3, blaCTX-M-14 in a Transferable IncHI2 Plasmid from a Healthy Catering Worker in China. *Infect. Drug Resist.* **2020**, *13*, 3569–3574. [\[CrossRef\]](#)
44. Vázquez, X.; García, V.; Fernández, J.; Bances, M.; de Toro, M.; Ladero, V.; Rodicio, R.; Rodicio, M.R. Colistin Resistance in Monophasic Isolates of *Salmonella enterica* ST34 Collected from Meat-Derived Products in Spain, with or without CMY-2 Co-production. *Front. Microbiol.* **2022**, *12*, 735364. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)

45. Qin, X.; Yang, M.; Cai, H.; Liu, Y.; Gorris, L.; Aslam, M.Z.; Jia, K.; Sun, T.; Wang, X.; Dong, Q. Antibiotic Resistance of *Salmonella* Typhimurium Monophasic Variant 1,4,[5],12:i-in China: A Systematic Review and Meta-Analysis. *Antibiotics* **2022**, *11*, 532. [CrossRef] [PubMed]
46. European Food Safety Authority (EFSA) and European Centre for Disease Prevention and Control (ECDC). The European Union Summary Report on Antimicrobial Resistance in zoonotic and indicator bacteria from humans, animals and food in 2019–2020. *EFSA J.* **2022**, *20*, 7209.
47. Sevilla, E.; Vico, J.P.; Delgado-Blas, J.F.; González-Zorn, B.; Marín, C.M.; Uruén, C.; Martín-Burriel, I.; Bolea, R.; Mainar-Jaime, R.C. Resistance to colistin and production of extended-spectrum β -lactamases and/or AmpC enzymes in *Salmonella* isolates collected from healthy pigs in Northwest Spain in two periods: 2008–2009 and 2018. *Int. J. Food Microbiol.* **2021**, *338*, 108967. [CrossRef] [PubMed]
48. Agencia Española de Medicamentos y Productos Sanitarios (AEMPS). Plan Nacional Frente a la Resistencia a los Antibióticos 2019–2021. Available online: http://www.resistenciaantibioticos.es/es/system/files/field/files/pran_2019-2021_0.pdf?file=1&type=node&id=497&force=0 (accessed on 25 April 2022).
49. Wang, Y.; Xu, C.; Zhang, R.; Chen, Y.; Shen, Y.; Hu, F.; Liu, D.; Lu, J.; Guo, Y.; Xia, X.; et al. Changes in colistin resistance and mcr-1 abundance in *Escherichia coli* of animal and human origins following the ban of colistin-positive additives in China: An epidemiological comparative study. *Lancet Infect. Dis.* **2020**, *20*, 1161–1171. [CrossRef]
50. Miguela-Villoldo, P.; Moreno, M.A.; Rodríguez-Lázaro, D.; Gallardo, A.; Hernández, M.; Serrano, T.; Sáez, J.L.; de Frutos, C.; Agüero, M.; Quesada, A.; et al. Longitudinal study of the mcr-1 gene prevalence in Spanish food-producing pigs from 1998 to 2021 and its relationship with the use of polymyxins. *Porcine Health Manag.* **2022**, *8*, 12. [CrossRef]
51. European Food Safety Authority (EFSA) and European Centre for Disease Prevention and Control (ECDC). The European Union summary report on antimicrobial resistance in zoonotic and indicator bacteria from humans, animals and food in 2017. *EFSA J.* **2019**, *17*, 5598.
52. Cameron-Veas, K.; Fraile, L.; Napp, S.; Garrido, V.; Grilló, M.J.; Migura-Garcia, L. Multidrug resistant *Salmonella* enterica isolated from conventional pig farms using antimicrobial agents in preventative medicine programmes. *Vet. J.* **2018**, *234*, 36–42. [CrossRef]
53. Alessiani, A.; Goffredo, E.; Mancini, M.; Occhiochiuso, G.; Faleo, S.; Didonna, A.; Fischetto, R.; Suglia, F.; De Vito, D.; Stallone, A.; et al. Evaluation of Antimicrobial Resistance in *Salmonella* Strains Isolated from Food, Animal and Human Samples between 2017 and 2021 in Southern Italy. *Microorganisms* **2022**, *10*, 812. [CrossRef]
54. European Centre for Disease Prevention and Control (ECDC); European Food Safety Authority (EFSA); European Medicines Agency (EMA). Third Joint Inter-Agency Report on Integrated Analysis of Consumption of Antimicrobial Agents and Occurrence of Antimicrobial Resistance in Bacteria from Humans and Food-Producing Animals in the EU/EEA, JIACRA III 2016–2018. 2021. Available online: https://www.ema.europa.eu/en/documents/report/ema/ecdc/efsa-third-joint-report-integrated-analysis-consumption-antimicrobial-agents-occurrence_en.pdf (accessed on 28 April 2022).
55. Yin, X.; Dudley, E.G.; Pinto, C.N.; M'ikanatha, N.M. Fluoroquinolone sales in food animals and quinolone resistance in non-typhoidal *Salmonella* from retail meats: United States, 2009–2018. *J. Glob. Antimicrob. Resist.* **2022**, *29*, 163–167. [CrossRef]
56. European Medicines Agency (EMA); European Surveillance of Veterinary Antimicrobial Consumption (ESVAC). Sales of Veterinary Antimicrobial Agents in 31 European Countries in 2019 and 2020 (EMA/58183/2021). 2021. Available online: https://www.ema.europa.eu/en/documents/report/sales-veterinary-antimicrobial-agents-31-european-countries-2019-2020-trends-2010-2020-eleventh_en.pdf (accessed on 28 April 2022).
57. Capoor, M.R.; Nair, D.; Posti, J.; Singhal, S.; Deb, M.; Aggarwal, P.; Pillai, P. Minimum inhibitory concentration of carbapenems and tigecycline against *Salmonella* spp. *J. Med. Microbiol.* **2009**, *58*, 337–341. [CrossRef] [PubMed]
58. Sun, C.; Cui, M.; Zhang, S.; Wang, H.; Song, L.; Zhang, C.; Zhao, Q.; Liu, D.; Wang, Y.; Shen, J.; et al. Plasmid-mediated tigecycline-resistant gene tet(X4) in *Escherichia coli* from food-producing animals, China, 2008–2018. *Emerg. Microbes Infect.* **2019**, *8*, 1524–1527. [CrossRef] [PubMed]
59. Sun, J.; Chen, C.; Cui, C.Y.; Zhang, Y.; Liu, X.; Cui, Z.H.; Ma, X.Y.; Feng, Y.; Fang, L.X.; Lian, X.L.; et al. Plasmid-encoded tet(X) genes that confer high-level tigecycline resistance in *Escherichia coli*. *Nat. Microbiol.* **2019**, *4*, 1457–1464. [CrossRef] [PubMed]
60. Snary, E.L.; Swart, A.N.; Simons, R.R.; Domingues, A.R.; Vigre, H.; Evers, E.G.; Hald, T.; Hill, A.A. A Quantitative Microbiological Risk Assessment for *Salmonella* in Pigs for the European Union. *Risk Anal.* **2016**, *36*, 437–449. [CrossRef] [PubMed]
61. Canibe, N.; Højberg, O.; Højsgaard, S.; Jensen, B.B. Feed physical form and formic acid addition to the feed affect the gastrointestinal ecology and growth performance of growing pigs. *J. Anim. Sci.* **2005**, *83*, 1287–1302. [CrossRef]
62. Papenbrock, S.; Stemme, K.; Amtsberg, G.; Verspohl, J.; Kamphues, J. Investigations on prophylactic effects of coarse feed structure and/or potassium diformate on the microflora in the digestive tract of weaned piglets experimentally infected with *Salmonella* Derby. *J. Anim. Physiol. Anim. Nutr.* **2005**, *89*, 84–87. [CrossRef]
63. Creus, E.; Pérez, J.F.; Peralta, B.; Baucells, F.; Mateu, E. Effect of acidified feed on the prevalence of *Salmonella* in market-age pigs. *Zoonoses Public Health* **2007**, *54*, 314–319. [CrossRef]
64. Lynch, H.; Leonard, F.C.; Walia, K.; Lawlor, P.G.; Duffy, G.; Fanning, S.; Markey, B.K.; Brady, C.; Gardiner, G.E.; Argüello, H. Investigation of in-feed organic acids as a low cost strategy to combat *Salmonella* in grower pigs. *Prev. Vet. Med.* **2017**, *139*, 50–57. [CrossRef]

65. Walia, K.; Argüello, H.; Lynch, H.; Leonard, F.C.; Grant, J.; Yearsley, D.; Kelly, S.; Duffy, G.; Gardiner, G.E.; Lawlor, P.G. Effect of strategic administration of an encapsulated blend of formic acid, citric acid, and essential oils on *Salmonella* carriage, seroprevalence, and growth of finishing pigs. *Prev. Vet. Med.* **2017**, *137*, 28–35. [[CrossRef](#)]
66. 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. Herd level husbandry factors associated with the serological *Salmonella* prevalence in finishing pig herds in The Netherlands. *Vet. Microbiol.* **2001**, *78*, 205–219. [[CrossRef](#)]
67. Boyen, F.; Haesebrouck, F.; Vanparys, A.; Volf, J.; Mahu, M.; Van Immerseel, F.; Rychlik, I.; Dewulf, J.; Ducatelle, R.; Pasmans, F. Coated fatty acids alter virulence properties of *Salmonella* Typhimurium and decrease intestinal colonization of pigs. *Vet. Microbiol.* **2008**, *132*, 319–327. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
68. Taube, V.A.; Neu, M.E.; Hassan, Y.; Verspohl, J.; Beyerbach, M.; Kamphues, J. Effects of dietary additives (potassium diformate/organic acids) as well as influences of grinding intensity (coarse/fine) of diets for weaned piglets experimentally infected with *Salmonella* Derby or *Escherichia coli*. *J. Anim. Physiol. Anim. Nutr.* **2009**, *93*, 350–358. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
69. Visscher, C.F.; Winter, P.; Verspohl, J.; Stratmann-Selke, J.; Upmann, M.; Beyerbach, M.; Kamphues, J. Effects of feed particle size at dietary presence of added organic acids on caecal parameters and the prevalence of *Salmonella* in fattening pigs on farm and at slaughter. *J. Anim. Physiol. Anim. Nutr.* **2009**, *93*, 423–430. [[CrossRef](#)]
70. Argüello, H.; Carvajal, A.; Costillas, S.; Rubio, P. Effect of the addition of organic acids in drinking water or feed during part of the finishing period on the prevalence of *Salmonella* in finishing pigs. *Foodborne Pathog. Dis.* **2013**, *10*, 842–849. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
71. Casanova-Higes, A.; Andrés-Barranco, S.; Mainar-Jaime, R.C. Effect of the addition of protected sodium butyrate to the feed on *Salmonella* spp. infection dynamics in fattening pigs. *Anim. Feed Sci. Technol.* **2017**, *231*, 12–18. [[CrossRef](#)]
72. Casanova-Higes, A.; Andrés-Barranco, S.; Mainar Jaime, R.C. Use of a New Form of Protected Sodium Butyrate to Control *Salmonella* Infection in Fattening Pigs. *Span. J. Agric. Res.* **2019**, *16*, e05SC02. [[CrossRef](#)]
73. De Busser, E.V.; Dewulf, J.; Nollet, N.; Houf, K.; Schwarzer, K.; De Sadeleer, L.; De Zutter, L.; Maes, D. Effect of organic acids in drinking water during the last 2 weeks prior to slaughter on *Salmonella* shedding by slaughter pigs and contamination of carcasses. *Zoonoses Public Health*. **2009**, *56*, 129–136. [[CrossRef](#)]
74. Martín-Peláez, S.; Costabile, A.; Hoyles, L.; Rastall, R.A.; Gibson, G.R.; La Ragione, R.M.; Woodward, M.J.; Mateu, E.; Martín-Orúe, S.M. Evaluation of the inclusion of a mixture of organic acids or lactulose into the feed of pigs experimentally challenged with *Salmonella* Typhimurium. *Vet. Microbiol.* **2010**, *142*, 337–345. [[CrossRef](#)]
75. De Ridder, L.; Maes, D.; Dewulf, J.; Pasmans, F.; Boyen, F.; Haesebrouck, F.; Méroc, E.; Butaye, P.; Van der Stede, Y. Evaluation of three intervention strategies to reduce the transmission of *Salmonella* Typhimurium in pigs. *Vet. J.* **2013**, *197*, 613–618. [[CrossRef](#)]
76. Yoon, B.K.; Jackman, J.A.; Valle-González, E.R.; Cho, N.J. Antibacterial Free Fatty Acids and Monoglycerides: Biological Activities, Experimental Testing, and Therapeutic Applications. *Int. J. Mol. Sci.* **2018**, *19*, 1114. [[CrossRef](#)]
77. Bonardi, S.; Alpigiani, I.; Bruini, I.; Barilli, E.; Brindani, F.; Morganti, M.; Cavallini, P.; Bolzoni, L.; Pongolini, S. Detection of *Salmonella enterica* in pigs at slaughter and comparison with human isolates in Italy. *Int. J. Food Microbiol.* **2016**, *218*, 44–50. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
78. De la Cruz, M.L.; Conrado, I.; Nault, A.; Perez, A.; Dominguez, L.; Alvarez, J. Vaccination as a control strategy against *Salmonella* infection in pigs: A systematic review and meta-analysis of the literature. *Res. Vet. Sci.* **2017**, *114*, 86–94. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
79. Cargnel, M.; Maes, D.; Peeters, L.; Dispas, M. Combining quantitative and qualitative approaches to determine viability of a potential *Salmonella* Typhimurium vaccination program in pigs in Belgium. *Prev. Vet. Med.* **2020**, *184*, 105132. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]

DISCUSIÓN GENERAL

La salmonelosis porcina es, fundamentalmente, un problema de salud pública y el cerdo es una de las principales fuentes de infección para las personas (EFSA y ECDC, 2023). Aunque la transmisión de *Salmonella* por contacto directo con los cerdos es posible, suele ser poco habitual, siendo la principal ruta de transmisión el consumo de carne de cerdo y sus productos derivados contaminados con *Salmonella*. Esta contaminación suele ocurrir durante el procesamiento de las canales en el momento del sacrificio en el matadero (Berends *et al.*, 1997; Argüello *et al.*, 2013a).

El origen de la contaminación en el matadero tiene lugar principalmente con la llegada de cerdos infectados que pueden excretar *Salmonella* por las heces (Massacci *et al.*, 2020). En el caso concreto de España, hasta un tercio de los animales que llegan al matadero están infectados por *Salmonella* (EFSA, 2011; Vico *et al.*, 2011). Aunque la excreción de la bacteria ocurre fundamentalmente tras la primera infección del animal (Scherer *et al.*, 2008), lo que suele suceder mayoritariamente en la explotación, situaciones de estrés como pueden ser el transporte al matadero o la estabulación previa al sacrificio pueden actuar como desencadenantes de nuevos periodos de excreción en los animales infectados. Esto permite la eliminación de grandes cantidades de *Salmonella* (10^6 - 10^8 UFC/g de heces) (Pires, Funk y Bolin 2013) en el entorno del matadero (Smid *et al.*, 2014). El nivel de contaminación así generado es difícil de eliminar a pesar de las medidas rutinarias de higiene y desinfección llevadas a cabo. Además, existen ciertos puntos críticos en la cadena de sacrificio que, si no están bien controlados, pueden favorecer la contaminación final de las canales (escaldado, soflamado, desnucado, extracción del cular, evisceración, oreo y enfriamiento) (Swanenburg *et al.*, 2001a).

Parece evidente que el origen de la contaminación de las canales estaría así directamente relacionado con la prevalencia de infección en las explotaciones. En España, la proporción de canales porcinas positivas a *Salmonella* suele ser más alta que la media europea (EFSA y ECDC, 2020-2023). De hecho, tanto los resultados de estudios previos (Mejía *et al.*, 2006; García-Feliz *et al.*, 2007; EFSA, 2011; Vico *et al.*, 2011, Argüello *et al.*, 2012; Teng *et al.*, 2020), como los observados en los trabajos que conforman esta tesis, muestran que la prevalencia de excreción y contaminación de las explotaciones de nuestro país sigue siendo muy alta.

Controlar la infección y transmisión de *Salmonella* en las explotaciones ha demostrado ser difícil debido a las características inherentes a este patógeno (resistencia ambiental, capacidad de infectar a diferentes especies animales, desarrollo de resistencias a los antimicrobianos, etc.) y requiere de un conocimiento profundo de la epidemiología de la infección. Sin embargo, la salmonelosis porcina se ha estudiado mayoritariamente en cerdos de cebo y en cerdos sacrificados (Davies *et al.*, 1997; van der Wolf *et al.*, 1999; Kranker *et al.*, 2003; Rajic *et al.*, 2005; Farzan *et al.*, 2008; Pires, Funk y Bolin, 2013; Nair *et al.*, 2018). La información acerca de lo que ocurre en otras etapas previas de producción (cerdos adultos, maternidad) es mucho más escasa, y prácticamente no existe si nos referimos a la fase transición, un periodo que podría ser determinante para el mantenimiento y la transmisión de *Salmonella* a fases posteriores.

Por ello, en la **Publicación I** el objetivo principal fue determinar la prevalencia de infección de *Salmonella* en lechones al inicio de la transición y caracterizar los aislados para

compararlos con los de las cerdas reproductoras del mismo rebaño. Para este estudio, se seleccionaron lechones macho procedentes de granjas de abuelas seropositivas a *Salmonella* cuyo destino era el sacrificio para consumo humano. Estos lechones, tras el destete (a las 4 semanas de vida) eran alimentados dos semanas más hasta alcanzar un peso de sacrificio de entre 7 y 9 kg. El hecho de que estos animales no hubiesen sido tratados con antibióticos resultaba de especial interés puesto que reflejaba lo que podría acabar ocurriendo al principio de la fase de transición en rebaños de producción seropositivos una vez eliminado el uso de antimicrobianos.

El porcentaje de animales infectados por *Salmonella* (detección en nódulos linfáticos mesentéricos) entre los lechones de transición analizados fue del 36,5%, siendo el porcentaje de lechones excretores muy similar (37,3%). Cabe destacar que, a pesar de ser lechones con un sistema inmunitario todavía en desarrollo y muy posiblemente primo infectados, la infección cursó de forma subclínica. Por lo tanto, la infección podría ser pasada por alto fácilmente durante la fase de transición y estos animales estarían actuando como portadores activos de *Salmonella* en la granja.

Con el fin de demostrar esta hipótesis, se compararon los aislados de *Salmonella* obtenidos de estos lechones con aquellos obtenidos a partir de muestras fecales procedentes del suelo de las naves de las cerdas de reposición. Los principales serotipos aislados en estas naves (*S. Rissen*, *S. Derby* y *S. 4,[5],12:i-*) también fueron los más comunes en los lechones, en algunos casos incluso presentando el mismo perfil de PFGE en ambas naves, sugiriendo que estos serotipos circulaban entre ambos periodos de producción, incluso cuando las naves de las cerdas de reposición se encontraban a kilómetros de distancia de su correspondiente nave de transición. Estos hallazgos confirmarían que los lechones también juegan un rol importante en la infección de los cerdos de cebo en las explotaciones de producción. Por ello, la infección de *Salmonella* en lechones de transición debería considerarse un potencial factor de riesgo de contaminación del matadero. El control de *Salmonella* en esta etapa podría ayudar a disminuir el riesgo de contaminación de las canales (Nair *et al.*, 2020).

Si tenemos en cuenta que una de las principales fuentes de *Salmonella* para los corrales de transición serían las madres (Casanova-Higes *et al.*, 2019), estas también serían el principal origen de la infección por *Salmonella* en las cerdas de reposición y en los cerdos de cebo (Nollet *et al.*, 2005b; EFSA, 2011). En este sentido, un modelo de evaluación de riesgos adaptado específicamente para España mostró que la prevalencia de *Salmonella* en cerdas era un indicador de la prevalencia de *Salmonella* en cerdos de abasto (APHA *et al.*, 2020). Por ello, definir las estrategias adecuadas para prevenir la excreción de *Salmonella* en las madres debería ser uno de los principales objetivos en cualquier estructura de producción porcina.

Entre las estrategias utilizadas para el control de *Salmonella* en ganado porcino, una de las más estudiadas es el uso de ácidos orgánicos (Berge y Wierup, 2012; Suiyranrayna y Ramana, 2015). Dentro de los ácidos orgánicos, el butirato de sodio ha sido ampliamente utilizado como aditivo alimentario y se ha observado que puede tener resultados beneficiosos en la reducción de la infección y excreción de *Salmonella*, además de mejorar los parámetros productivos (Walia *et al.*, 2016; Lynch *et al.*, 2017). Sin embargo, apenas existen estudios que se centren en el impacto que este ácido orgánico puede tener en la microbiota intestinal de los

cerdos que van a matadero ni tampoco sobre los efectos que esos cambios en la microbiota podrían tener en la salud del animal.

Así, en la **Publicación II** se estudió el efecto que tenía sobre la microbiota del colon de cerdos de cebo la administración de una forma de butirato de sodio protegido (GUSTOR BP70, Norel S.A., Madrid, España) durante todo el periodo de cebo (>90 días). Para ello, se comparó la microbiota intestinal de un grupo de 9 animales a los que se administró el ácido en el pienso (GT) con un grupo de animales similar que consumió el mismo pienso sin el ácido (GC).

Aunque no se observó una modificación significativa en la riqueza y diversidad general de la composición microbiana entre los dos grupos, hecho probablemente relacionado con la presencia de una flora microbiana más estable debido a la edad en que se tomaron las muestras (Le Sciellour *et al.* 2019), sí que se detectaron cambios significativos en algunos taxones específicos.

Entre los más destacados estaría el incremento del género *Prevotella* en el GT respecto al GC. En general, este género se ha asociado positivamente con unos mejores índices de conversión y de crecimiento (Ramayo-Caldas *et al.*, 2016; Yang *et al.*, 2018), posiblemente debido a su habilidad para fermentar polisacáridos complejos presentes en la dieta que podrían proporcionar una mayor cantidad de energía disponible para el cerdo (Mach *et al.*, 2015). *Prevotella* también contribuiría a la maduración de la inmunidad de la mucosa a través de la producción de acetato que, posteriormente, podría ser utilizado por otras especies microbianas para producir butirato. Estos ácidos orgánicos de cadena corta participarían en la comunicación entre la microbiota y el sistema inmunitario intestinal y ayudarían a mantener el equilibrio anti y pro inflamatorio (Ratajczak *et al.*, 2019).

A nivel de especie, destacó el incremento significativo de *Clostridium butyricum* en el GT. Los efectos positivos de *C. butyricum* son conocidos e incluso se ha utilizado como probiótico en casos de infección por *Clostridioides difficile* o de enfermedad intestinal inflamatoria en medicina humana (Kanaï, Mikami y Hayashi, 2015; Chiu *et al.*, 2021). *C. butyricum* genera grandes cantidades de butirato a través de la fermentación de fibra alimentaria no digerida y, además, este ácido orgánico de cadena corta se ha asociado con numerosos efectos beneficiosos para la salud como la mejora de la función de la barrera gastrointestinal, la modulación de la homeostasis inmunitaria intestinal o la reducción de la inflamación (Fouhse, Zijlstra y Willing, 2016; Yang *et al.*, 2019). Además, también se ha observado que la invasión de las células epiteliales por *Salmonella* disminuye tras la exposición al butirato puesto que este regula negativamente la expresión de genes de invasión localizados en la isla SPI1 (Gantois *et al.*, 2006). En estudios donde se administró *C. butyricum* en la dieta de lechones destetados se observó un aumento en la altura de las vellosidades y en la profundidad de las criptas intestinales, una mejora en el peso corporal, en la ganancia media diaria y en el índice de conversión, así como una reducción de las diarreas (Chen *et al.*, 2018; Wang *et al.*, 2019; Casas *et al.*, 2020; Han *et al.*, 2020).

Por último, también se observaron incrementos entre los miembros de las familias *Lachnospiraceae*, *Peptostreptococcaceae*, *Peptococcaceae* y *Terrisporobacter*. Se trata de un grupo de bacterias caracterizadas por producir ácidos grasos de cadena corta (butirato, formiato, lactato o H₂) tras la degradación de polisacáridos no digeribles (Stackebrandt, 2014).

En salud humana, algunos de los géneros pertenecientes a estas familias se han relacionado con el control de procesos inflamatorios intestinales, aterosclerosis y maduración del sistema inmunológico (Vacca *et al.*, 2020).

En resumen, aunque la adición de esta forma de butirato de sodio protegido a la dosis de 3 kg/t de pienso durante todo el periodo de cebo no modificó significativamente la riqueza global de la composición de la microbiota de los cerdos en el momento del sacrificio, provocó cambios significativos en la abundancia de algunos taxones que estarían asociados con unos mejores parámetros de salud intestinal.

Determinar el papel que juegan los lechones de transición en la dinámica de infección de *Salmonella* y conocer qué efectos puede tener en la microbiota de los cerdos la adición de un ácido orgánico como el butirato de sodio utilizado frecuentemente contra *Salmonella*, se consideran aspectos de interés para el control de la salmonelosis porcina de los que apenas se disponía información. En cualquier caso, el control de la salmonelosis en las explotaciones porcinas no resulta fácil.

Teniendo en cuenta la alta prevalencia de *Salmonella* en las explotaciones porcinas (EFSA, 2009; Teng *et al.*, 2020), y que el origen de la contaminación de las canales está asociado principalmente con la llegada de animales excretores de *Salmonella* al matadero (Beloeil *et al.*, 2004; Argüello *et al.*, 2013a; Swart *et al.*, 2016), otro de los objetivos de esta tesis fue el desarrollo de un nuevo enfoque más integral para el control de la infección que incluyera actuaciones conjuntas tanto en la explotación como en el matadero. La finalidad en este caso no era tanto reducir la infección en las explotaciones, sino más bien poner el foco en la reducción del riesgo de contaminación de las canales.

Para ello, en primer lugar, se evaluó si era posible predecir la probabilidad de excreción de *Salmonella* de los cerdos que llegan a matadero. Este aspecto podría resultar clave para cualquier programa nacional de control de *Salmonella*, pues la estimación del riesgo de excreción de *Salmonella* de un lote de cerdos 3 ó 4 semanas antes de ir a matadero, permitiría diseñar medidas de control eficaces previas al sacrificio tanto en la granja como en el matadero. Así, el principal objetivo de la **Publicación III** fue identificar un modelo predictivo que permitiera determinar qué factores relacionados con el lote de cerdos a sacrificar y con la explotación de origen podrían ser utilizados como predictores de excreción de *Salmonella* en matadero.

Para este estudio se seleccionaron 30 lotes de 50 cerdos cada uno (un total de 1500 cerdos) procedentes de 30 explotaciones de cebo diferentes (tamaño medio≈1000 cerdos/explotación) localizadas en el noreste de España, la región de mayor producción porcina del país. Para crear el modelo de predicción de la excreción de *Salmonella* en el momento del sacrificio, se realizó un análisis de regresión logística de efectos aleatorios. Inicialmente, el modelo incluyó como variables a estudiar los resultados serológicos individuales de cada cerdo analizado, los valores de bioseguridad (interna, externa y total) de la explotación, el porcentaje de corrales positivos a *Salmonella* en la explotación, así como otras características que pudieran estar relacionadas con la infección (la estación de muestreo, la distancia y el tiempo de transporte de la granja al matadero, el tiempo transcurrido entre los muestreos en granja y en matadero y la presencia de *S. Typhimurium*/mST en la explotación).

El modelo predictivo final se construyó con tres variables, a saber, resultados serológicos, nivel de bioseguridad interna de la explotación y prevalencia corrales positivos a *Salmonella* en la nave. Los resultados confirmaron que la excreción de *Salmonella* en el matadero estaba fuertemente relacionada con la presencia de *Salmonella* en los corrales de la explotación. Esta relación se apoyaba además en la identificación posterior mediante análisis de PFGE de coincidencias genéticas entre los aislados procedentes de muestras fecales del suelo de los corrales y los procedentes de contenido intestinal de los cerdos sacrificados, a pesar de la posibilidad de contaminación cruzada durante el transporte o la espera (Argüello *et al.*, 2013a). Estos hallazgos resaltan el papel que tiene la presencia de *Salmonella* en la granja en la contaminación posterior del matadero y confirman que el control de *Salmonella* debería empezar en la granja (de Busser *et al.*, 2013a).

El nivel de bioseguridad de las explotaciones incluidas en el estudio, aunque variable, fue en general relativamente alto al compararlo con el de explotaciones de otros países. A pesar de ello, los resultados serológicos sugerían que *Salmonella* estaba circulando en la mayoría de ellas, poniendo de relieve las dificultades para su control a nivel de granja. De acuerdo con la serología, y siguiendo los criterios de los principales PNC europeos, un tercio de las explotaciones se clasificaría en la categoría de alta seroprevalencia (seroprevalencia $\geq 40\%$) y otro tercio en la categoría seroprevalencia media (entre el 20 y el 40%). Estos altos niveles de seroprevalencia explicarían, al menos en parte, la alta proporción de cerdos excretores de *Salmonella* al sacrificio, tal como sugería el modelo logístico, que detectó una asociación positiva significativa, aunque moderada, entre la serología de los cerdos y la excreción de *Salmonella* en el momento del sacrificio. Los cerdos con valores mucho más altos de ELISA tendrían una probabilidad algo mayor de excretar *Salmonella* al sacrificio (Kranker *et al.*, 2003; Sørensen *et al.*, 2004; Korsak *et al.*, 2006; Mainar-Jaime *et al.*, 2018).

En general, el modelo mostró una capacidad aceptable a la hora de predecir si un animal excretaría *Salmonella* en el matadero. Así, según el modelo, un cerdo con una probabilidad estimada de excreción de *Salmonella* superior al 26% tendría una probabilidad del 71,6% de excretar *Salmonella*. Si la probabilidad estimada por el modelo fuese $\leq 26\%$, el animal tendría una probabilidad del 73,6% de no excretar la bacteria. Por lo tanto, evaluar la proporción de animales que presentan una probabilidad de excreción superior al 26% en un determinado lote de cerdos a sacrificar permitiría estimar el riesgo global de excreción para ese lote. Una vez determinado ese riesgo tres o cuatro semanas antes del sacrificio, productores y mataderos podrían actuar en consecuencia. Por ejemplo, a nivel de granja, se podrían implementar medidas de control para minimizar la probabilidad de excreción de *Salmonella* en matadero. La adición de ácidos orgánicos en el pienso o en el agua de bebida podría reducir la excreción (de Busser *et al.*, 2009; Argüello *et al.*, 2013b; Lynch *et al.*, 2017) (**Publicación IV**). Asimismo, el matadero, siendo consciente del riesgo, podría implementar medidas de mitigación como el sacrificio logístico (Swanenburg *et al.*, 2001b; Hotes, Traulsen y Krieter, 2011; Argüello *et al.*, 2013a), o incluso la adición de ácidos orgánicos en el agua de bebida de la sala de espera para conseguir reducir el riesgo de excreción de *Salmonella* (**Publicación V**). Estas intervenciones serían necesarias en el caso de que un lote de cerdos presentase una probabilidad global de excreción de *Salmonella* por encima de un determinado umbral previamente establecido.

De los resultados del modelo resulta interesante destacar que en explotaciones con un nivel medio o alto de bioseguridad interna (>64%) y en las que no se detectaba *Salmonella* en los corrales, ningún animal podría considerarse excretor en matadero, independientemente de su resultado serológico. Asimismo, la serología sería innecesaria en el caso de explotaciones con niveles bajos de bioseguridad interna y con al menos un corral positivo a *Salmonella*, puesto que todos los cerdos presentarían una alta probabilidad de excretar la bacteria en el matadero. Es evidente que, en este segundo escenario, la probabilidad de que un cerdo se infectase sería alta, dado que *Salmonella* podría circular fácilmente entre los corrales de explotaciones con una baja bioseguridad interna (Baptista *et al.*, 2010). Estos resultados subrayan la importancia de la bioseguridad interna en la transmisión de *Salmonella* en las explotaciones.

A diferencia de los dos escenarios anteriores, en el caso de cualquiera de las otras situaciones posibles (bioseguridad interna aceptable con presencia de corrales positivos a *Salmonella* o baja bioseguridad interna y ningún corral positivo a *Salmonella*), la serología podría añadir información útil a la hora de definir el riesgo de excreción de *Salmonella* en el matadero. Por ejemplo, cerdos con valores de %DO superiores al 30% se asociarían con excreción de *Salmonella* en el matadero si procediesen de explotaciones con una bioseguridad interna media junto con la presencia de *Salmonella* en el 10-20% de los corrales. Si perteneciesen a una granja similar con un nivel de bioseguridad interna alto, los cerdos de mayor riesgo serían aquellos que mostrasen unos valores de %DO mucho más elevados (cercanos al 80%). Los resultados de ELISA también ayudarían a interpretar el posible riesgo de excreción de cerdos procedentes de una explotación con un nivel bajo de bioseguridad interna cuando no se detectase *Salmonella* en ningún corral. Considerando los diferentes escenarios posibles según el modelo, el modo más sencillo de proceder para estimar el riesgo de excreción de *Salmonella* en el matadero sería empezar con la evaluación de la bioseguridad interna de la explotación y la prevalencia de *Salmonella* en los corrales. En función de los resultados obtenidos, se podrían llevar a cabo análisis serológicos complementarios a partir de una muestra representativa del lote de cerdos.

La correlación positiva observada en este estudio entre valores de ELISA en granja y excreción de *Salmonella* en el matadero probablemente se haya debido al tiempo transcurrido entre el muestreo serológico y el bacteriológico y a la presencia entre ambos de una serie de factores estresantes (transporte y la espera en matadero), que habrían favorecido la excreción en los cerdos infectados (Duggan *et al.*, 2010; Simons *et al.*, 2016). Los otros factores del modelo, la bioseguridad interna de la explotación y la presencia de *Salmonella* en la granja, tal como hemos visto, también tendrían un papel significativo en la interpretación de los valores ELISA en este contexto. Estos resultados podrían explicar, en parte, las dificultades a las que muchos PNC se enfrentan a la hora de determinar adecuadamente el estatus de *Salmonella* de las explotaciones porcinas, puesto que muchos de ellos se basan exclusivamente en los resultados serológicos de una pequeña y poco representativa muestra de animales, sin considerar otros factores (Mainar-Jaime *et al.*, 2018; Correia-Gomes, Leonard y Graham, 2021).

Así, este estudio destaca la importancia del contexto en el que se utiliza la serología para el control de la salmonelosis porcina. Utilizarla 3 ó 4 semanas antes de enviar a los cerdos

al matadero podría ser útil para identificar lotes de cerdos con riesgo de excreción de *Salmonella* a su llegada. En algunos casos, disponer de información sobre el nivel de bioseguridad interna de la explotación de origen y sobre la presencia de *Salmonella* en la explotación podría ser suficiente para estimar el riesgo de excreción de *Salmonella* de un lote de cerdos destinados a sacrificio. En otros casos, la serología sería necesaria para una interpretación más precisa de los resultados. Pero, en ambos casos, se podría alcanzar un nivel aceptable de información sobre el riesgo de excreción de *Salmonella* en el matadero. Reducir la probabilidad de excreción de *Salmonella* en esta etapa supondría un paso importante para reducir la contaminación de las canales con *Salmonella*.

Una ventaja adicional de este enfoque es que el control de *Salmonella* no recaería inicialmente en el trabajo del ganadero, sino en la recogida objetiva de datos sobre la explotación y sus animales. Este hecho resulta de especial interés dado que el compromiso de los ganaderos parece ser uno de los principales obstáculos a los que se enfrentan los Planes Nacionales de Control, especialmente cuando se trata de infecciones animales que no suponen un problema clínico en las granjas (Fraser *et al.*, 2010; Marier *et al.*, 2016; Alarcón *et al.*, 2021). Además, este enfoque permitiría con el tiempo una caracterización más precisa del estatus sanitario de *Salmonella* en las explotaciones porcinas, lo que también ayudarían a fomentar una mejor actitud de los ganaderos para el control de esta infección.

Ante la posibilidad de predecir la excreción de *Salmonella* en el matadero con la suficiente antelación, tanto las explotaciones porcinas como los mataderos podrían plantearse implementar medidas concretas para minimizar la excreción. Como ya se ha comentado anteriormente, una de las medidas de control disponibles es la utilización de ácidos orgánicos ya que su adición en el pienso o en el agua de bebida podría ayudar a reducir la excreción de *Salmonella* (de Busser *et al.*, 2009; Argüello *et al.*, 2013b; Lynch *et al.*, 2017). Para los siguientes dos estudios (**Publicación IV** y **Publicación V**), se seleccionó como ácido orgánico una fórmula de ácido fórmico esterificado (MOLI-M C1, Molimen SL, Barcelona, España). Los ácidos grasos de cadena corta y de cadena media combinados con glicerol poseen una mayor actividad antimicrobiana contra bacterias Gram-negativas tanto *in vitro* como *in vivo* (Cantini, 2015). Además, la esterificación de estos ácidos ha mostrado ventajas adicionales ya que son menos dependientes del pH y menos susceptibles a la descomposición enzimática, lo que les permite actuar a lo largo de todo el tracto gastrointestinal (Gómez-Orsorio *et al.*, 2021). Asimismo, debido a su forma de glicérido, los ácidos orgánicos aplicados de este modo son inodoros y no corrosivos y su estructura anfipática los hace solubles en agua sin modificar el pH, evitando sabores desagradables en el agua de bebida que podrían causar rechazo a los cerdos y evitar su consumo.

Para el trabajo presentado en la **Publicación IV**, se seleccionaron tres explotaciones que presentaran al menos dos unidades de cebo (≈ 1000 animales/unidad) comparables (cerdos de similar edad) y en las que hubiera evidencia bacteriológica y serológica de la circulación de *Salmonella* a partir de muestreos representativos previos realizados 3-4 semanas antes. Igualmente, ambas unidades debían presentar un estatus de *Salmonella* inicial similar en cuanto a niveles de seroprevalencia y presencia de corrales positivos.

En las tres explotaciones se observaron valores de seroprevalencia (a partir de una muestra representativa de 30 animales) medio-altos (entre 21% y 48%) antes del ensayo, lo que permitían clasificar a las explotaciones como de riesgo, de acuerdo con los criterios seguidos por algunos PNC (Anónimo, 2002; Anónimo, 2007; van der Wolf, 2017; Anónimo, 2021). El estudio bacteriológico de los corrales (10 por unidad) mostró que *Salmonella* estaba presente en las tres explotaciones y de forma similar en todas las unidades. La presencia de *Salmonella* en los corrales junto con los niveles medios y altos de seroprevalencia, se relacionan con excreción de *Salmonella* en matadero (**Publicación III**). Por ello, en este escenario, se esperaba que una proporción significativa de cerdos excretaran *Salmonella* al llegar al matadero.

A una de las unidades de cada explotación se le administró el ácido orgánico en el agua de bebida (10 kg/1000L) durante los últimos 5 días de cebo previos al sacrificio (Grupo tratamiento, GT), dejando la otra sin tratamiento (Grupo control, GC). Al llegar al matadero se obtuvieron muestras de contenido fecal de 40 animales de cada grupo para la detección y recuento de *Salmonella* en heces.

Como se esperaba, la proporción media de animales excretores en el matadero procedentes de estas tres explotaciones fue alta (35%). Sin embargo, en todas las explotaciones se observó un porcentaje significativamente inferior de excretores en el GT con respecto al GC, lo que sugería un efecto positivo de este tratamiento en el control de la excreción de *Salmonella*. El análisis conjunto de los resultados de las tres explotaciones mostró que los cerdos del GC tenían 5,63 (IC95%=2,92-10,8) más “probabilidad” de excretar *Salmonella* en el momento del sacrificio que los cerdos del GT, lo que indicaba que la eficacia de este tratamiento para reducir la proporción de cerdos excretores de *Salmonella* en este estudio alcanzó el 82,2%.

El efecto positivo del tratamiento se observó también al evaluar la carga intestinal de *Salmonella* en animales de ambos grupos. De las 58 muestras (29 de cada grupo) utilizadas para este objetivo se detectó *Salmonella* (>1 UFC/g) en 15 de ellas (51%), de las cuales 11 (73,3%) pertenecían al GC y 4 (13,8%) al GT ($P=0,069$). En general, y a pesar del bajo número de muestras analizadas, se observó una tendencia lineal significativa que sugería que cuanto mayor era el recuento de UFC mayor era la probabilidad de que la muestra perteneciera al GC. Estos resultados corroboraban así la eficacia de este tratamiento para reducir la carga de *Salmonella* en el intestino del cerdo y por lo tanto su excreción. Dado que se ha observado una asociación positiva entre alta concentración cecal de *Salmonella* en cerdos y contaminación de las canales (Pesciaroli *et al.*, 2017), y se ha estimado que una gran proporción de casos de salmonelosis humana derivaría de cerdos de abasto con una alta concentración de *Salmonella* en sus heces (Snary *et al.*, 2016), el uso de este ácido fórmico esterificado podría considerarse como una posible opción para disminuir el riesgo de contaminación de *Salmonella* en las canales en el matadero y su posterior transmisión a las personas.

Llegado el momento, si el matadero es consciente del riesgo de excreción de un lote de cerdos determinado, podría implementar medidas de mitigación como el sacrificio logístico (Swanenburg *et al.*, 2001b; Hotes, Traulsen y Krieter, 2011), o incluso la adición de ácidos orgánicos en el agua de bebida de la sala de espera para tratar de reducir el riesgo de

excreción de *Salmonella*. Así, uno de los objetivos de la **Publicación V** fue determinar si la adición de ese mismo ácido fórmico esterificado a la misma dosis en el agua de bebida de la sala de espera del matadero podía ayudar a reducir la proporción global de cerdos excretores de *Salmonella*. Para ello se llevaron a cabo siete réplicas de un mismo ensayo. El ensayo consistió en destinar 40 animales de un camión procedente de una explotación porcina previamente identificada como seropositiva a *Salmonella*, a un corral de estabulación limpio en el que se administraba a través del agua el tratamiento con el ácido orgánico (10 kg/1000L) (GT). El resto de los cerdos del camión se distribuían en 3-4 corrales limpios con agua potable no tratada (GC). Tras el sacrificio y evisceración, se recogían muestras de contenido fecal del colon de 40 cerdos del GT y de otros 40 del GC.

Los niveles de excreción de *Salmonella* fueron siempre inferiores en el GT en comparación con el GC, observando una reducción global significativa del número de excretores en el GT (44%) con respecto al GC (60,7%), aunque solo en tres de los ensayos la disminución fue estadísticamente significativa. La falta de una reducción significativa de la excreción de *Salmonella* en algunos de los ensayos podría estar relacionada con otros factores, como la cantidad de agua consumida por los cerdos o el tiempo de estabulación. Así, se observó que la probabilidad de excretar *Salmonella* aumentaba significativamente cuando los cerdos habían consumido menos de 0,9 L de agua tratada por individuo (OR=4,56; IC95%=2,70-7,69), por lo que sería necesario encontrar estrategias que favorecieran el consumo de agua tratada durante la estabulación (por ejemplo, aumentar el número de bebederos). Los tiempos prolongados de estabulación también podrían haber favorecido el riesgo de excreción de *Salmonella* (Bonardi *et al.*, 2016). El hecho de que en este estudio todos los lotes de cerdos se mantuvieran durante la noche y un mínimo de 10 h para favorecer el consumo de agua podría haber contribuido a neutralizar en cierta medida el efecto positivo del tratamiento aplicado.

En general, para observar efectos positivos de los tratamientos con ácidos se considera que son necesarios periodos de aplicación relativamente largos (Casanova-Higes, Andrés-Barranco y Mainar-Jaime, 2017). A pesar de ello, en este estudio la exposición al agua tratada durante el periodo de espera (entre 10 y 17 horas), generalmente durante la noche, fue suficiente para detectar un efecto beneficioso, lo que podría tener que ver con las propiedades de la esterificación del ácido, que incrementaría la actividad antimicrobiana a lo largo de todo el tracto intestinal en comparación con los ácidos orgánicos originales o sus sales (Cantini, 2015; Gómez-Osorio *et al.*, 2021).

El tratamiento permitió una reducción general en la proporción de cerdos excretores de *Salmonella* del 16% en el GT cuando se comparó con el GC. Esta reducción, que podría parecer pequeña, ocurrió en un contexto de alta prevalencia de excreción (>60% en el GC) y tras pocas horas de tratamiento. Otras estrategias como la vacunación han mostrado una eficacia ligeramente superior, del 20-30% (de la Cruz *et al.*, 2017; Cargnel *et al.*, 2020). Es interesante destacar sin embargo que, cuando el análisis se ajustó con variables de agrupamiento y confusión (granja de origen, estación del año, tiempo de espera en los corrales) la “probabilidad” de excreción para los animales del GC con respecto al GC fue mucho mayor que cuando no se tuvo en cuenta ningún ajuste (OR=2,75 vs. OR=1,94, respectivamente), por lo que la eficacia final del tratamiento fue del 63,6% en este estudio.

Por lo tanto, esta estrategia podría contribuir a reducir el problema de contaminación de *Salmonella* en las instalaciones del matadero y utilizarse como complemento de programas de control de *Salmonella* integrales que incluyan estrategias tanto a nivel de granja como de matadero. En este sentido, cabría esperar que la aplicación de este tipo de ácido en el agua de bebida en la explotación los días previos al sacrificio junto con la aplicación del mismo ácido en el agua de bebida de la sala de espera del matadero pudiera tener un efecto sinérgico, aumentando así su eficacia. Estas intervenciones serían requeridas únicamente en los lotes de cerdos identificados como de riesgo por el modelo presentado en la **Publicación III**.

Teniendo en cuenta los resultados de eficacia para el control de la excreción de *Salmonella* obtenidos tras la utilización de este ácido orgánico, se podría plantear también su uso en otras fases productivas como, por ejemplo, previo a la entrada de las madres en las salas de maternidad. Tal como sugerimos en nuestro estudio, las cerdas son fuente de propagación de la infección en las explotaciones y su control a este nivel podría reducir significativamente los niveles de infección en las fases posteriores de producción (transición, cebo y hembras de reemplazo).

De acuerdo con nuestros hallazgos, se puede inferir que una estrategia basada en la identificación con suficiente antelación a la fecha de sacrificio de lotes de cerdos con riesgo de excretar de *Salmonella*, y en la aplicación de medidas de mitigación mediante el uso de ácidos orgánicos, preferiblemente del tipo utilizado en nuestros estudios, tanto en la granja como en el matadero, podría ayudar a reducir la contaminación por *Salmonella* en las canales porcinas y el riesgo de transmisión a las personas. La utilización de este tipo de ácidos probablemente podría aplicarse a otras etapas de la cadena de producción porcina, contribuyendo de este modo en el control de la infección en las explotaciones. Esta estrategia podría formar la base de un Plan Nacional de Control alternativo a los ya implementados en otros países europeos que hasta ahora no han tenido éxito.

CONCLUSIONES

1. Se observó una elevada prevalencia de infección (36,5%) y de excreción (37,3%) de *Salmonella* al inicio de la fase de transición en lechones destinados a matadero, indicando que los lechones a estas edades pueden infectarse subclínicamente y actuar como portadores activos de *Salmonella* en la explotación. De hecho, se observaron los mismos serotipos de *Salmonella* en lechones de transición y las cerdas de cría, sugiriendo que estos lechones juegan un papel significativo en la transmisión de *Salmonella* a las naves de cebo. Por ello, las estrategias destinadas a reducir la infección por *Salmonella* en lechones deberían contribuir significativamente a reducir el riesgo de contaminación de los cebos.
2. La adición de butirato de sodio protegido (BSP) durante todo el periodo de cebo a una dosis de 3 kg por tonelada de pienso, aunque no modificó significativamente la riqueza bacteriana, incrementó la abundancia de ciertos taxones específicos de la microbiota intestinal de los cerdos. Las familias *Prevotellaceae*, *Lachnospiraceae*, *Peptostreptococcaceae* y *Peptococcaceae*, junto con la especie *Clostridium butyricum* aparecieron aumentadas tras el tratamiento con BSP. En general, estos grupos bacterianos se asociaban con mejores índices productivos y parecían contribuir al control de la inflamación. *Clostridium butyricum* además podría ayudar a reducir la presencia de patógenos entéricos. La mayoría de los cambios observados se asociarían así con unos mejores parámetros de salud intestinal.
3. En la actualidad sigue llegando a los mataderos españoles una gran proporción de cerdos excretando *Salmonella*. Estos animales se consideran el principal origen de la contaminación del matadero y de las canales de cerdo por esta bacteria. Obtener información serológica de una muestra representativa de los cerdos a sacrificar, sobre la presencia de *Salmonella* en una muestra representativa de las cuadras de la nave y sobre el nivel de bioseguridad interna de la explotación, unas semanas antes del sacrificio de los animales, podría servir para predecir de una forma aceptable si un cerdo excretará *Salmonella* al llegar al matadero, lo que permitiría identificar lotes de riesgo.
4. En algunos casos, disponer de información del nivel de bioseguridad interna de la explotación y muestrear un número representativo de corrales podría ser suficiente para estimar el riesgo de excreción de *Salmonella* en el matadero. En otros casos, la serología individual podría ser necesaria para obtener una interpretación más precisa de los resultados. En ambos casos, se utilizan datos objetivos que evitan el sesgo que podría suponer el depender de la información ofrecida por el ganadero.

5. Este enfoque permitiría además caracterizar de una manera más precisa el estatus de *Salmonella* de una explotación, lo que fomentaría una actitud positiva entre los ganaderos de cara al control de *Salmonella* en el corto y medio plazo y plantear medidas de bioseguridad e higiene más efectivas.
6. En lotes de cerdos identificados como de riesgo, la administración de ácido fórmico esterificado en el agua de bebida, a una dosis de 10kg/1000L, durante los cinco días previos al sacrificio redujo la proporción de cerdos excretores de *Salmonella* hasta en un 82%. También redujo de forma significativa la carga de *Salmonella* en el intestino de los cerdos que todavía eran excretores al momento del sacrificio. Así, esta intervención podría ayudar a reducir la contaminación por *Salmonella* de las canales y del ambiente del matadero. Estos hallazgos destacan el potencial del ácido fórmico esterificado como una estrategia a nivel de granja para el control de *Salmonella*, siendo una medida de mitigación factible y aplicable como complemento a otras medidas de control en la interfaz granja-matadero.
7. Esta forma de ácido fórmico, aunque en menor medida, también se mostró eficaz para reducir la proporción de animales excretores cuando se administró exclusivamente en el agua de bebida de la sala de espera del matadero durante las horas previas al sacrificio. En este caso, su eficacia se asoció con el volumen de agua ingerido por los animales. Esta estrategia de control en el matadero podría ser complementaria al uso de este mismo ácido en la explotación, lo que probablemente supondría un efecto sinérgico que mejoraría la eficacia final.

CONCLUSIONS

1. The prevalence of *Salmonella* infection (36.5%) and shedding (37.3%) among weaning pigs was high at the beginning of the nursery period, suggesting that nursery pigs can become subclinically infected and act as active carriers of *Salmonella* on the farm. Furthermore, major *Salmonella* serotypes found in piglets were also found in gilts, suggesting a likely transmission from nursery to the growing phase. Consequently, the implementation of on-farm strategies to reduce *Salmonella* infection during the lactation period could help to prevent further infections that could reach the growing stage.
2. The addition of protected sodium butyrate (PSB) during the entire growing and fattening period at a dose of 3 kg per ton of feed did not significantly modify the overall richness of the microbiota composition of pigs at slaughter. However, the abundance of certain specific taxa from the gut microbiota was increased. The *Prevotellaceae*, *Lachnospiraceae*, *Peptostreptococcaceae*, and *Peptococcaceae* families, as well as the species *Clostridium butyricum* were observed to be increased following PSB treatment. In general, these bacterial groups have been associated with enhanced performance parameters and the regulation of inflammation. *Clostridium butyricum* may also contribute to the reduction of enteric pathogens. The majority of the observed changes are likely to be associated with improved gut health parameters.
3. Currently, a considerable proportion of *Salmonella*-shedding pigs are delivered to Spanish abattoirs. These animals are regarded as the primary source of *Salmonella* slaughterhouse and carcass contamination. Obtaining serological information from a representative sample of the pigs to be slaughtered, on the presence of *Salmonella* from a representative sample of the pens, and on the internal biosecurity level of the farm, a few weeks before slaughtering the animals, could be used to predict in an acceptable way whether a pig will shed *Salmonella* on arrival to the slaughterhouse. This would allow the identification of risk pig batches.
4. In some instances, being aware of the farm's internal biosecurity level and performing a bacteriological sampling of a representative number of pens may be sufficient for estimating the risk of *Salmonella* shedding at slaughter. In other cases, however, serological analysis may be required in order to provide a more accurate interpretation of the results. In both cases, the objective data obtained will serve to avoid any potential bias that might arise from relying on the information provided by the farmer.

5. This approach would also allow a more accurate characterization of the *Salmonella* status of a farm, which would also encourage a positive attitude among farmers toward *Salmonella* control in the short/medium term and the implementation of more effective biosecurity and hygiene measures.
6. In batches identified as at risk, the administration of esterified formic acid in the drinking water, at a dose of 10 kg/1000 L during the five days before slaughter reduced the proportion of pigs shedding *Salmonella* by up to 82%. This intervention also reduced significantly the load of *Salmonella* in the gut of pigs that were still shedders at the time of slaughter. Consequently, this intervention could assist in reducing the contamination of the carcasses and the slaughterhouse environment with *Salmonella*. These findings underscore the potential of esterified formic acid as a farm-level strategy for the control of *Salmonella*, as a feasible mitigation measure that can be employed in conjunction with other control measures at the farm-slaughterhouse interface.
7. This form of formic acid, to a lesser extent, was shown to be effective in reducing the proportion of *Salmonella*-shedding animals when administered exclusively in the drinking water at the lairage zone of the abattoir the hours before slaughter. In this case, its efficacy was correlated with the volume of water ingested by the animals. This abattoir-based control strategy could be employed in conjunction with the administration of the same organic acid at the farm level, which would likely result in a synergistic effect that would enhance the overall effectiveness of the intervention.

Agencia Española de Seguridad Alimentaria y Nutrición (AESAN) (2023). *Informe AESAN OA del análisis de datos de 2021 de vigilancia de zoonosis alimentarias*. Disponible en: https://www.aesan.gob.es/AECOSAN/docs/documentos/seguridad_alimentaria/control_oficial/AESAN_V2_INFORME_ANALISIS_DATOS_ZOONOSIS_2021.pdf [Consultado 02-05-2024].

Alarcón, L.V., Allepuz, A. y Mateu, E. (2021). Biosecurity in pig farms: a review. *Porcine Health Management*, 7(1):5. doi: 10.1186/s40813-020-00181-z.

Alban, L. y Stärk, K.D. (2005). Where should the effort be put to reduce the *Salmonella* prevalence in the slaughtered swine carcass effectively? *Preventive Veterinary Medicine*, 68(1):63-79. doi: 10.1016/j.prevetmed.2005.01.001.

Algarni, S., Ricke, S.C., Foley, S.L. y Han, J. (2022). The dynamics of the antimicrobial resistance mobilome of *Salmonella enterica* and related enteric bacteria. *Frontiers in Microbiology*, 13:859854. doi: 10.3389/fmicb.2022.859854.

Álvarez-Ordóñez, A., Begley, M., Prieto, M., Messens, W., López, M., Bernardo, A. y Hill, C. (2011). *Salmonella* spp. survival strategies within the host gastrointestinal tract. *Microbiology*, 157(Pt 12):3268-3281. doi: 10.1099/mic.0.050351-0.

Althouse, C., Patterson, S., Fedorka-Cray, P. e Isaacson, R.E. (2003). Type 1 fimbriae of *Salmonella enterica* serovar Typhimurium bind to enterocytes and contribute to colonization of swine in vivo. *Infection and Immunity*, 71(11):6446-52. doi: 10.1128/IAI.71.11.6446-6452.2003.

Amass, S.F. y Clark, L.K. (1999). Biosecurity considerations for pork production units. *Swine Health and Production*, 7(5):217-228.

Andrés, S., Vico, J.P., Garrido, V., Grilló, M.J., Samper, S., Gavín, P., Herrera-León, S. y Mainar-Jaime, R.C. (2013). Epidemiology of subclinical salmonellosis in wild birds from an area of high prevalence of pig salmonellosis: phenotypic and genetic profiles of *Salmonella* isolates. *Zoonoses and Public Health*, 60(5):355-65. doi: 10.1111/j.1863-2378.2012.01542.x.

Andrés, V.M. y Davies, R.H. (2015). Biosecurity measures to control *Salmonella* and other infectious agents in pig farms: a review. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*, 14(4):317-335. doi: 10.1111/1541-4337.12137.

Andrés-Barranco, S., Vico, J.P., Garrido, V., Samper, S., Herrera-León, S., de Frutos, C. y Mainar-Jaime R.C. (2014). Role of wild bird and rodents in the epidemiology of subclinical salmonellosis in finishing pigs. *Foodborne Pathogens and Disease*, 11(9):689-97. doi: 10.1089/fpd.2014.1755.

Andrés-Barranco, S., Vico, J.P., Grilló, M.J. y Mainar-Jaime R.C. (2015). Reduction of subclinical *Salmonella* infection in fattening pigs after dietary supplementation with a β -galactomannan oligosaccharide. *Journal of Applied Microbiology*, 118(2):284-94. doi: 10.1111/jam.12713.

Animal and Plant Health Agency (APHA), Biomathematics and Risk Researchworkgroup, United Kingdom, Martínez, J.M., McCarthy, C. y Taylor, R.A. (2020). Livestock Health and Food Chain Risk Assessment. *EFSA Journal*, 18(S1):e181111. doi: 10.2903/j.efsa.2020.e181111.

Anónimo (2002). S.I. No. 165/2002 *Abattoirs Act 1988 (Veterinary Examination) (Amendment) Regulations*. Disponible en: <https://www.irishstatutebook.ie/eli/2002/si/165/made/en/print> [Consultado 02-05-2024].

Anónimo (2007). *Koninklijk besluit betreffende de bewaking van Salmonella bij varkens*. Disponible en: https://etaamb.openjustice.be/nl/koninklijk-besluit-van-27-april-2007_n2007022865 [Consultado 02-05-2024].

Anónimo (2012). *UK: New direction for Zoonoses National Control Programme (ZNCP)*. Disponible en: <https://www.pigprogress.net/health-nutrition/uk-new-direction-for-zoonoses-national-control-programme-zncp/> [Consultado 02-05-2024].

Anónimo (2015). *Koninklijk besluit tot opheffing van het koninklijk en het ministerieel besluit van 27 april 2007 betreffende de bewaking van Salmonella bij varkens*. Disponible en: https://etaamb.openjustice.be/nl/koninklijk-besluit-van-29-mei-2015_n2015018197.html [Consultado 02-05-2024].

Anónimo (2015). *Presentado un nuevo Programa de control de Salmonella en porcino*. Disponible en: https://www.3tres3.com/ultima-hora/presentado-un-nuevo-programa-decontrol-de-Salmonella-en-porc_36010/ [Consultado 02-05-2024].

Anónimo (2019). *Annual report on zoonoses in Denmark 2018*. Kongens Lyngby (Dinamarca): National Food Institute, Technical University of Denmark.

Anónimo (2021). *QS Qualität und Sicherheit GmbH. 20 Jahre QS: Salmonellenrisiko Um Über 70% Gesunken*. Disponible en: <https://www.qs.de/pressemeldungen/20-jahre-qs-salmonellenrisiko-um-ueber-70-prozent.html> [Consultado 02-05-2024].

Argüello, H., Carvajal, A., Collazos, J.A., García-Feliz, C. y Rubio, P. (2012). Prevalence and serovars of *Salmonella enterica* on pig carcasses, slaughtered pigs and the environment of four Spanish slaughterhouses. *Food Research International*, 45(2):905-912. doi: 10.1016/j.foodres.2011.04.017.

Argüello, H., Alvarez-Ordóñez, A., Carvajal, A., Rubio, P. y Prieto, M. (2013a). Role of slaughtering in *Salmonella* spreading and control in pork production. *Journal of Food Protection*, 76(5):899-911. doi: 10.4315/0362-028X.JFP-12-404.

Argüello, H., Carvajal, A., Costillas, S. y Rubio, P. (2013b). Effect of the addition of organic acids in drinking water or feed during part of the finishing period on the prevalence of *Salmonella* in finishing pigs. *Foodborne Pathogens and Disease*, 10(10):842-9. doi: 10.1089/fpd.2013.1497.

Argüello, H., Carvajal, A., Naharro, G. y Rubio, P. (2013c). Evaluation of protection conferred by a *Salmonella* Typhimurium inactivated vaccine in *Salmonella*-infected finishing pig farms. *Comparative Immunology, Microbiology and Infectious Diseases*, 36(5):489-98. doi: 10.1016/j.cimid.2013.05.002.

Artawinata, P.C., Lorraine, S. y Waturangi, D.E. (2003). Isolation and characterization of bacteriophages from soil against food spoilage and foodborne pathogenic bacteria. *Scientific Reports*, 13(1):9282. doi: 10.1038/s41598-023-36591-6.

Audia, J.P., Webb, C.C. y Foster, J.W. (2001). Breaking through the acid barrier: an orchestrated response to proton stress by enteric bacteria. *International Journal of Medical Microbiology*, 291(2):97-106. doi: 10.1078/1438-4221-00106.

Bahnson, P.B., Fedorka-Cray, P.J., Ladely, S.R. y Mateus-Pinilla, N.E. (2006). Herd-level risk factors for *Salmonella enterica* subsp. *enterica* in U.S. market pigs. *Preventive Veterinary Medicine*, 76(3-4):249-62. doi: 10.1016/j.prevetmed.2006.05.009.

Baptista, F.M., Alban, L., Nielsen, L.R., Domingos, I., Pomba, C. y Almeida, V. (2010). Use of herd information for predicting *Salmonella* status in pig herds. *Zoonoses and Public Health*, 57(S1):49-59. doi: 10.1111/j.1863-2378.2010.01354.x.

Barba-Vidal, E., Roll, V., Castillejos, L., Guerra-Ordaz, A., Manteca, X., Mallo, J. y Martín-Orúe, S. (2017a). Response to a *Salmonella* Typhimurium challenge in piglets supplemented with protected sodium butyrate or *Bacillus licheniformis*: effects on performance, intestinal health and behavior. *Translational Animal Science*, 1(2):186-200. doi: 10.2527/tas2017.0021.

Barba-Vidal, E., Castillejos, L., Roll, V.F.B., Cifuentes-Orjuela, G., Moreno Muñoz, J.A. y Martín-Orúe, S.M. (2017b). The probiotic combination of *Bifidobacterium longum* subsp. *infantis* CECT 7210 and *Bifidobacterium animalis* subsp. *lactis* BPL6 reduces pathogen loads and improves gut health of weaned piglets orally challenged with *Salmonella* Typhimurium. *Frontiers in Microbiology*, 8:1570. doi: 10.3389/fmicb.2017.01570.

Barber, D.A., Bahnson, P.B., Isaacson, R., Jones, C.J. y Weigel, R.M. (2002). Distribution of *Salmonella* in swine production ecosystems. *Journal of Food Protection*, 65(12):1861-8. doi: 10.4315/0362-028x-65.12.1861.

Barnett, R. (2016). Typhoid fever. *Lancet*, 388(10059):2467. doi: 10.1016/S0140-6736(16)32178-X.

Barco, L., Lettini, A.A., Ramon, E., Longo, A., Saccardin, C., Pozza, M.C. y Ricci, A. (2011). A rapid and sensitive method to identify and differentiate *Salmonella enterica* serotype Typhimurium and *Salmonella enterica* serotype 4,[5],12:i:- by combining traditional serotyping and multiplex polymerase chain reaction. *Foodborne Pathogens and Disease*, 8(6):741-3. doi: 10.1089/fpd.2010.0776.

Bearson, B.L., Bearson, S.M., Kich, J.D. y Lee, I.S. (2014). An *rfaH* mutant of *Salmonella enterica* serovar Typhimurium is attenuated in swine and reduces intestinal colonization, fecal shedding, and disease severity due to virulent *Salmonella* Typhimurium. *Frontiers in Veterinary Science*, 1:9. doi: 10.3389/fvets.2014.00009.

Bearson, B.L., Bearson, S.M., Brunelle, B.W., Bayles, D.O., Lee, I.S. y Kich, J.D. (2017). *Salmonella* DIVA vaccine reduces disease, colonization and shedding due to virulent *S. Typhimurium* infection in swine. *Journal of Medical Microbiology*, 66(5):651-661. doi: 10.1099/jmm.0.000482.

Bearson, S.M.D. (2022). *Salmonella* in swine: prevalence, multidrug resistance, and vaccination strategies. *Annual Review of Animal Biosciences*, 10:373-393. doi: 10.1146/annurev-animal-013120-043304.

Bell, R.L., Jarvis, K.G., Ottesen, A.R., McFarland, M.A. y Brown, E.W. (2016). Recent and emerging innovations in *Salmonella* detection: a food and environmental perspective. *Microbial biotechnology*, 9(3):279-92. doi: 10.1111/1751-7915.12359.

Beloil, P.A., Chauvin, C., Proux, K., Rose, N., Queguiner, S., Eveno, E., Houdayer, C., Rose, V., Fravallo, P. y Madec, F. (2003). Longitudinal serological responses to *Salmonella enterica* of growing pigs in a subclinically infected herd. *Preventive Veterinary Medicine*, 60(3):207-26. doi: 10.1016/s0167-5877(03)00126-0.

Beloil, P.A., Chauvin, C., Proux, K., Madec, F., Fravallo, P. y Alioum, A. (2004). Impact of the *Salmonella* status of market-age pigs and the pre-slaughter process on *Salmonella* caecal contamination at slaughter. *Veterinary Research*, 5(5):513-30. doi: 10.1051/vetres:2004028.

- Beloil, P.A., Chauvin, C., Proux, K., Fablet, C., Madec, F. y Alioum, A. (2007). Risk factors for *Salmonella* seroconversion of fattening pigs in farrow-to-finish herds. *Veterinary Research*, 38(6):835-848. doi: 10.1051/vetres:2007034.
- Berends, B., Urlings, H., Snijders, J. y Van Knapen, F. (1996). Identification and quantification of risk factors in animal management and transport regarding *Salmonella* spp. in pigs. *International Journal of Food Microbiology*, 30(1-2):37-53. doi: 10.1016/0168-1605(96)00990-7.
- Berends, B.R., van Knapen, F., Snijders, J.M. y Mossel, D.A. (1997). Identification and quantification of risk factors regarding *Salmonella* spp. on pork carcasses. *International Journal of Food Microbiology*, 36(2-3):199-206. doi: 10.1016/s0168-1605(97)01267-1.
- Berge, A.C. y Wierup, M. (2012). Nutritional strategies to combat *Salmonella* in mono-gastric food animal production. *Animal*, 6(4):557-64. doi: 10.1017/S1751731111002217.
- Bertelloni, F., Cagnoli, G., Turchi, B. y Ebani, V.V. (2022). Low level of colistin resistance and *mcr* genes presence in *Salmonella* spp.: Evaluation of isolates collected between 2000 and 2020 from animals and environment. *Antibiotics*, 11(2):272. doi: 10.3390/antibiotics11020272.
- Bessire, B.C., Thomas, M., Gehring, K.B., Savell, J.W., Griffin, D.B., Taylor, T.M., Mikel, W.B., Campbell, J.A., Arnold, A.N. y Scaria J. (2018). National survey of *Salmonella* prevalence in lymph nodes of sows and market hogs. *Translational Animal Science*, 2(4):365-371. doi: 10.1093/tas/txy072.
- Betancor, L. y Yim, L. (2012). *Salmonella y Salmonelosis*. Montevideo: Universidad de la República.
- Bianchi, A.T., Moonen-Leusen, H.W., van der Heijden, P.J. y Bokhout, B.A. (1995). The use of a double antibody sandwich ELISA and monoclonal antibodies for the assessment of porcine IgM, IgG and IgA concentrations. *Veterinary Immunology and Immunopathology*, 44(3-4):309-17. doi: 10.1016/0165-2427(94)05307-e.
- Blaha, T. y Kreienbrock, L. (2006). *Auswertung des Ringversuches zur Bestimmung der Konzentration von Salmonellenantikörpern in Fleischsaftproben im Rahmen des QS-Salmonellenmonitorings*. Alemania: Escuela Superior de Veterinaria de Hannover.
- Bonardi, S., Alpigiani, I., Bruini, I., Barilli, E., Brindani, F., Morganti, M., Cavallini, P., Bolzoni, L. y Pongolini, S. (2016). Detection of *Salmonella enterica* in pigs at slaughter and comparison with human isolates in Italy. *International Journal of Food Microbiology*, 218:44-50. doi: 10.1016/j.ijfoodmicro.2015.11.005.
- Bonardi, S. (2017). *Salmonella* in the pork production chain and its impact on human health in the European Union. *Epidemiology and Infection*, 145(8):1513-1526. doi: 10.1017/S095026881700036X.
- Bonardi, S., Blagojevic, B., Belluco, S., Roasto, M., Gomes-Neves, E. y Vågsholm, I. (2021). Food chain information in the European pork industry: Where are we? *Trends in Food Science and Technology*, 118(B):833-839. doi: 10.1016/j.tifs.2021.10.030.
- Bonetti, A., Tugnoli, B., Piva, A. y Grilli, E. (2021). Towards zero zinc oxide: feeding strategies to manage post-weaning diarrhea in piglets. *Animals*, 11(3):642. doi: 10.3390/ani11030642.

- Botteldoorn, N., Heyndrickx, M., Rijpens, N., Grijspeerdt, K. y Herman, L. (2003). *Salmonella* on pig carcasses: positive pigs and cross contamination in the slaughterhouse. *Journal of Applied Microbiology*, 95(5):891-903. doi: 10.1046/j.1365-2672.2003.02042.x.
- Boughton, C., Egan, J., Kelly, G., Markey, B. y Leonard, N. (2007). Rapid infection of pigs following exposure to environments contaminated with different levels of *Salmonella* Typhimurium. *Foodborne Pathogens and Disease*, 4(1):33-40. doi: 10.1089/fpd.2006.58.
- Boyen, F., Pasmans, F., Van Immerseel, F., Morgan, E., Adriaensen, C., Hernalsteens, J.P., Decostere, A., Ducatelle, R. y Haesebrouck, F. (2006). *Salmonella* Typhimurium SPI-1 genes promote intestinal but not tonsillar colonization in pigs. *Microbes and Infection*, 8(14-15):2899-2907. doi: 10.1016/j.micinf.2006.09.008.
- Boyen, F., Haesebrouck, F., Maes, D., Van Immerseel, F., Ducatelle, R. y Pasmans, F. (2008). Nontyphoidal *Salmonella* infections in pigs: a closer look at epidemiology, pathogenesis and control. *Veterinary Microbiology*, 130(1-2):1-19. doi: 10.1016/j.vetmic.2007.12.017.
- Boyen, F., Pasmans, F., Van Immerseel, F., Donne, E., Morgan, E., Ducatelle, R. y Haesebrouck, F. (2009). Porcine *in vitro* and *in vivo* models to assess the virulence of *Salmonella enterica* serovars Typhimurium for pigs. *Laboratory Animals*, 43(1):46-52. doi: 10.1258/la.2007.007084.
- The British Pig Executive (BPEX) (2002). ZAP *Salmonella*—A zoonosis action plan for the British Pig Industry. Disponible en: <https://www.porcat.org/download/ZAP-Salmonella.pdf> [Consultado 02-05-2024].
- Brenner, F.W., Villar, R.G., Angulo, F.J., Tauxe, R. y Swaminathan, B. (2000). *Salmonella* nomenclature. *Journal of Clinical Microbiology*, 38(7):2465-7. doi: 10.1128/JCM.38.7.2465-2467.2000.
- Briggs, C. E. y Fratamico, P.M. (1999). Molecular characterization of an antibiotic resistance gene cluster of *Salmonella* Typhimurium DT104. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 43(4):846-9. doi: 10.1128/AAC.43.4.846.
- Burt, S. (2004). Essential oils: their antibacterial properties and potential applications in foods—a review. *International Journal of Food Microbiology*, 94(3):223-53. doi: 10.1016/j.ijfoodmicro.2004.03.022.
- Callaway, T.R., Morrow, J.L., Edrington, T.S., Genovese, K.J., Dowd, S., Carroll, J., Dailey, J.W., Harvey, R.B., Poole, T.L., Anderson, R.C. y Nisbet, D.J. (2006). Social stress increases fecal shedding of *Salmonella* Typhimurium by early weaned piglets. *Current Issues in Intestinal Microbiology*, 7(2):65-71.
- Callaway T. R., Edrington T. S., Brabban A., Kutter B., Karriker L., Stahl C., Wagstrom E., Anderson R., Poole T. L., Genovese K., Krueger N., Harvey R. y Nisbet D. J. (2011). Evaluation of phage treatment as a strategy to reduce *Salmonella* populations in growing swine. *Foodborne Pathogens and Disease*, 8(2):261-6. doi: 10.1089/fpd.2010.0671.
- Callegari, M., Dalto, D. y da Silva, C. (2015). A review of prevention and control methods of *Salmonella* species in swine production the role of dietary non-nutritional additives. *Asian Journal of Animal and Veterinary Advances*, 10(12):803-829. doi: 10.3923/ajava.2015.803.829.
- Calveyra, J.C., Nogueira, M.G., Kich, J.D., Biesus, L.L., Vizzotto, R., Berno, L., Coldebella, A., Lopes, L., Morés, N., Lima, G.J. y Cardoso, M. (2012). Effect of organic acids and mannanoligosaccharide on

excretion of *Salmonella* Typhimurium in experimentally infected growing pigs. *Research in Veterinary Science*, 93(1):46-47. doi: 10.1016/j.rvsc.2011.08.018.

Campos, J., Mourão, J., Peixe, L. y Antunes, P. (2019). Non-typhoidal *Salmonella* in the pig production chain: a comprehensive analysis of its impact on human health. *Pathogens*, 8(1):19. doi: 10.3390/pathogens8010019.

Cantini, F. (2015). Compositions containing C1 to C7 organic acid monoglycerides and glycerol, their preparation and use as antibacterials and anti-mould agents. Disponible en: <https://patents.google.com/patent/WO2010106488A2/en> [Consultado 02-05-2024].

Cargnel, M., Maes, D., Peeters, L. y Dispas, M. (2020). Combining quantitative and qualitative approaches to determine viability of a potential *Salmonella* Typhimurium vaccination program in pigs in Belgium. *Preventive Veterinary Medicine*, 184:105132. doi: 10.1016/j.prevetmed.2020.105132.

Griffith, R.W., Carlson, S.A. y Krull, A.C. (2019). "Salmonellosis". En: Zimmerman, J.J., Karriker, J.L.A., Ramirez, A., Schwartz, K.J. y Stevenson G.W. (Coord.). *Diseases of Swine*. Estados Unidos: Wiley-Blackwell, pp. 912-925. doi: 10.1002/9781119350927.ch59.

Carramiñana, J.J., Rota, C., Agustín, I. y Herrera A. (2004). High prevalence of multiple resistance to antibiotics in *Salmonella* serovars isolated from a poultry slaughterhouse in Spain. *Veterinary Microbiology*, 104(1-2):133-9. doi: 10.1016/j.vetmic.2004.08.010.

Casanova-Higes, A., Andrés-Barranco, S. y Mainar-Jaime, R.C. (2017). Effect of the addition of protected sodium butyrate to the feed on *Salmonella* spp. infection dynamics in fattening pigs. *Animal Feed Science and Technology*, 231:12-18. doi: 10.1016/j.anifeedsci.2017.06.008.

Casanova, Higes, A., Marín Alcalá, C.M., Ruiz Palacín, M. y Mainar Jaime, R.C. (2018). "The use of organic acids at lairage and its effect on pig *Salmonella* shedding at slaughter". En: *Proceedings 25th International Pig Veterinary Society Congress 2018 International PRRS Symposium*. Chongqing (China), 11-14 junio 2018. p. 162.

Casanova-Higes, A., Marín-Alcalá, C.M., Andrés-Barranco, S., Cebollada-Solanas, A., Alvarez, J. y Mainar-Jaime, R.C. (2019). Weaned piglets: Another factor to be considered for the control of *Salmonella* infection in breeding pig farms. *Veterinary Research*, 50(1):45. doi: 10.1186/s13567-019-0666-7.

Casas, G.A., Blavi, L., Cross, T.L., Lee, A.H., Swanson, K.S. y Stein, H.H. (2020). Inclusion of the direct-fed microbial *Clostridium butyricum* in diets for weanling pigs increases growth performance and tends to increase villus height and crypt depth, but does not change intestinal microbial abundance. *Journal of Animal Science*, 98(1):skz372. doi: 10.1093/jas/skz372.

Casey, P.G., Gardiner, G.E., Casey, G., Bradshaw, B., Lawlor, P.G., Lynch, P.B., Leonard, F.C., Stanton, C., Ross, R.P. y Fitzgerald, G.F. (2007). A five-strain probiotic combination reduces pathogen shedding and alleviates disease signs in pigs challenged with *Salmonella enterica* serovar Typhimurium. *Applied and Environmental Microbiology*, 73(6):1858-63. doi: 10.1128/AEM.01840-06.

Centro Nacional de Epidemiología e Instituto de Salud Carlos III (ISCIII) (2023). Informe epidemiológico sobre la situación de la Salmonelosis en España. Año 2022. Resultados de la Red Nacional de Vigilancia Epidemiológica. Disponible en: <https://www.isciii.es/QueHacemos/Servicios/VigilanciaSaludPublicaRENAVE/EnfermedadesTransmisible>

s/Documents/archivos%20A-Z/Salmonelosis/Vigilancia_Salmonelosis_2022.pdf [Consultado: 02-05-2024].

Chen, L., Li, S., Zheng, J., Li, W., Jiang, X., Zhao, X., Li, J., Che, L., Lin, Y., Xu, S., Feng, B., Fang, Z. Wu, D. (2018). Effects of dietary *Clostridium butyricum* supplementation on growth performance, intestinal development, and immune response of weaned piglets challenged with lipopolysaccharide. *Journal of Animal Science and Biotechnology*, 9:62. doi: 10.1186/s40104-018-0275-8.

Chiu C.H., Su L.H. y Chu C. (2004). *Salmonella* enterica serovar Choleraesuis: epidemiology, pathogenesis, clinical disease and treatment. *Clinical Microbiology Review*, 17(2):311-322. doi: 10.1128/CMR.17.2.311-322.2004.

Chiu, C.W., Tsai, P.J., Lee, C.C., Ko, W.C. y Hung, Y.P. (2021). Application of microbiome management in therapy for *Clostridioides difficile* Infections: from fecal microbiota transplantation to probiotics to microbiota-preserving antimicrobial agents. *Pathogens*, 10(6):649. doi: 10.3390/pathogens10060649.

Cho, J.Z., Zhao, P.Y. y Kim, I.H. (2011). Probiotics as a dietary additive for pigs: a review. *Journal of Animal and Veterinary Advances*, 10(16):2127-2134. doi: 10.3923/javaa.2011.2127.2134.

Cirillo, D.M., Valdivia, R.H., Monack, D.M. y Falkow, S. (1998). Macrophage-dependent induction of the *Salmonella* pathogenicity island 2 type III secretion system and its role in intracellular survival. *Molecular Microbiology*, 30(1):175-188. doi: 10.1046/j.1365-2958.1998.01048.x.

Correia-Gomes, C., Mendonça, D., Vieira-Pinto, M. y Niza-Ribeiro, J. (2013). Risk factors for *Salmonella* spp. in Portuguese breeding pigs using multilevel analysis. *Preventive Veterinary Medicine*, 108(2-3):159-166. doi: 10.1016/j.prevetmed.2012.07.013.

Correia-Gomes, C., Leonard, F. y Graham, D. (2021). Description of control programmes for *Salmonella* in pigs in Europe. Progress to date? *Journal of Food Safety*, 41(5):e12916. doi: 10.1111/jfs.12916.

Creus-Gibert, E., Andrés-Barranco, S. y Mainar-Jaime, R. C. (2014). Actualización en el control de la salmonelosis porcina a través de la alimentación (II). *Avances en Tecnología Porcina*, XI(11):34-45. Disponible en: <http://hdl.handle.net/10532/2759> [Consultado 02-05-2023].

Cuypers, W.L., Jacobs, J., Wong, V., Klemm, E.J., Deborggraeve, S. y van Puyvelde, S. (2018). Fluoroquinolone resistance in *Salmonella*: insights by whole-genome sequencing. *Microbial Genomics*, 4(7):e000195. doi: 10.1099/mgen.0.000195.

Dahl, J., Wingstrand, A., Nielsen, B. y Baggesen, D.L. (1997). Elimination of *Salmonella* Typhimurium infection by the strategic movement of pigs. *The Veterinary Record*, 140(26):679-681. doi: 10.1136/vr.140.26.679.

Dahl, J. (2011). "Association between serological *Salmonella* monitoring in breeding herds and meat-juice prevalence in sow herds with production of finishers". En: *Proceedings 9th International Conference on the Epidemiology and Control of biological, chemical and physical hazards in pigs and pork*. Maastricht (Países Bajos), 19-22 junio 2011, pp. 174-177.

Dahl, J. (2023). "Use of antibiotics and vaccines in herds under the "PurePork" program in Denmark". *The 14th International Symposium on the Epidemiology and Control Biological, Chemical and Physical Hazards in Pigs and Pork (SafePork 2023)*. Nueva Orleans (EE.UU.), 15-17 mayo 2023. doi: 10.31274/safepork.16310.

- Daniels, M.J., Hutchings, M.R. y Greig, A. (2003). The risk of disease transmission to livestock posed by contamination of farm stored feed by wildlife excreta. *Epidemiology and Infection*, 130(3):561-568.
- Davies, P.R., Morrow, W.E., Jones, F.T., Deen, J., Fedorka-Cray, P.J. y Harris, I.T. (1997). Prevalence of *Salmonella* in finishing swine raised in different production systems in North Caroline, USA. *Epidemiology and Infection*, 119(2):237-44. doi: 10.1017/s095026889700784x.
- Davies, P.R., Funk, J.A., Morgan-Morrow, W.E. (2000). Fecal shedding of *Salmonella* by gilts before and after introduction to a swine breeding farm. *Journal of Swine Health and Production*, 8(1):25-29.
- 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. y Teale C.J. (2004). National survey for *Salmonella* in pigs, cattle and sheep at slaughter in Great Britain (1999-2000). *Journal of Applied Microbiology*, 96(4):750-60. doi: 10.1111/j.1365-2672.2004.02192.x.
- Davies, R., Gosling, R., Wales, A. y Smith, R. (2016). Use of an attenuated live *Salmonella* Typhimurium vaccine on three breeding pig units: a longitudinal observational field study. *Comparative Immunology, Microbiology and Infectious Diseases*, 46:7-15. doi: 10.1016/j.cimid.2016.03.005.
- de Busser, E.V., Dewulf, J., Nollet, N., Houf, K., Schwarzer, K., de Sadeleer, L., de Zutter, L. y Maes, D. (2009). Effect of organic acids in drinking water during the last 2 weeks prior to slaughter on *Salmonella* shedding by slaughter pigs and contamination of carcasses. *Zoonoses and Public Health*, 56(3):129-36. doi: 10.1111/j.1863-2378.2008.01172.x.
- de Busser, E.V., Maes, D., Houf, K., Dewulf, J., Imberechts, H., Bertrand, S. y de Zutter, L. (2011). Detection and characterization of *Salmonella* in lairage, on pig carcasses and intestines in five slaughterhouses. *International Journal of Food Microbiology*, 145(1):279-86. doi: 10.1016/j.ijfoodmicro.2011.01.009.
- de Busser, de Zutter, E. V., Dewulf, L., Houf, J. y Maes, K. (2013a). *Salmonella* control in live pigs and at slaughter. *Veterinary Journal*, 196(1):20-7. doi: 10.1016/j.tvjl.2013.01.002.
- de Busser, E.V., Maes, D., Houf, K., Dewulf, J. y De Zutter, L. (2013b). Effect of the enrichment medium on the detection and diversity of *Salmonella* from porcine duodenal content. *Foodborne Pathogens and Disease*, 10(2):182-8. doi: 10.1089/fpd.2012.1268.
- de la Cruz, M.L., Conrado, I., Nault, A., Pérez, A., Domínguez, L. y Álvarez, J. (2017). Vaccination as a control strategy against *Salmonella* infection in pigs: a systematic review and meta-analysis of the literature. *Research in Veterinary Science*, 114:86-94. doi: 10.1016/j.rvsc.2017.03.005.
- de la Torre, E., Zapata, D., Tello, M., Mejía, W., Frías, N., García-Pena, F.J., Mateu, E.M. y 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. *Journal of Clinical Microbiology*, 41(6):2395-400. doi: 10.1128/JCM.41.6.2395-2400.2003.
- de Lange, C.F.M., Pluske, J., Gong, J. y Nyachoti, C.M. (2010). Strategic use of feed ingredients and feed additives to stimulate gut health and development in young pigs. *Livestock Science*, 134(1-3):124-134. doi: 10.1016/j.livsci.2010.06.117.

de Ridder, L., Maes, D., Dewulf, J., Butaye, P., Pasmans, F., Boyen, F., Haesebrouck, F. y van der Stede, Y. (2014). Use of a live attenuated *Salmonella enterica* serovar Typhimurium vaccine on farrow-to finish pig farms. *Veterinary Journal*, 202(2):303-8. doi: 10.1016/j.tvjl.2014.09.012.

Duggan, S.J., Mannion, C., Prendergast, D.M., Leonard, N., Fanning, S., Gonzales-Barron, U., Egan, J., Butler, F. y Duffy, G. (2010). Tracking the *Salmonella* status of pigs and pork from lairage through the slaughter process in the Republic of Ireland. *Journal of Food Protection*, 73(12):2148-60. doi: 10.4315/0362-028x-73.12.2148.

Esaki, H., Morioka, A., Ishihara, K., Kojima, A., Shiroki, S., Tamura, Y. 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. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 53(2):266-70. doi: 10.1093/jac/dkh081.

European Food Safety Authority (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 Journal*, 135:1-111. doi: 10.2903/j.efsa.2008.135r.

European Food Safety Authority (EFSA) (2009). Analysis of the baseline survey on the prevalence of *Salmonella* in holdings with breeding pigs in the EU, 2008-Part A: *Salmonella* prevalence estimates. *EFSA Journal*, 7(12):1377. doi: 10.2903/j.efsa.2009.1377.

European Food Safety Authority (EFSA). (2011). Analysis of the baseline survey of *Salmonella* in holdings with breeding pigs, in the EU, 2008. Part B: Analysis of factors potentially associated with *Salmonella* pen positivity. *EFSA Journal*, 9(7):2329. doi: 10.2903/j.efsa.2011.2329.

European Food Safety Authority (EFSA) y European Centre for Disease Prevention and Control (ECDC) (2020). The European Union One Health 2019 Zoonoses Report. *EFSA Journal*, 19(2):e06406. doi: 10.2903/j.efsa.2021.6406.

European Food Safety Authority (EFSA) y European Centre for Disease Prevention and Control (ECDC) (2021). The European Union One Health 2020 Zoonoses Report. *EFSA Journal*, 19(12): e06971. doi: 10.2903/j.efsa.2021.6971.

European Food Safety Authority (EFSA) y European Centre for Disease Prevention and Control (ECDC) (2022). The European Union One Health 2021 Zoonoses Report. *EFSA Journal*, 20(12):e07666. doi: 10.2903/j.efsa.2022.7666.

European Food Safety Authority (EFSA) y European Centre for Disease Prevention and Control (ECDC) (2023). The European Union One Health 2022 Zoonoses Report. *EFSA Journal*, 21: e8442. doi: 10.2903/j.efsa.2023.8442.

European Medicines Agency (EMA) (2014). EMA/CVMP/AWP/158821/2014 Concept Paper on Use of Aminoglycosides in Animals in the European Union: Development of Resistance and Impact on Human and Animal Health. Disponible en: https://www.ema.europa.eu/en/documents/scientific-guideline/concept-paper-use-aminoglycosides-animals-european-union-development-resistance-and-impact-human-and-animal-health_en.pdf [Consultado 02-05-2024].

European Medicines Agency (EMA) (2016). Overview of comments received on “Updated Advice on the Use of Colistin Products in Animals within the European Union: Development of Resistance and Possible Impact on Human and Animal Health” (EMA/CVMP/CHMP/231573/2016). Disponible en:

https://www.ema.europa.eu/en/documents/comments/overview-comments-received-updated-advice-use-colistin-products-animals-within-european-union-development-resistance-and-possible-impact-human-and-animal-health-ema2315732016_en.pdf [Consultado 02-05-2024].

Eurostat (2022). Pig population – annual data. Disponible en: https://ec.europa.eu/eurostat/databrowser/view/APRO_MT_LSPIG__custom_7574409/bookmark/table?lang=en&bookmarkId=487e2824-fd45-4329-bc17-966af222c470 [Consultado 02-05-2024].

Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación y la Agricultura (FAO) (2015). *Status Report on Antimicrobial Resistance*. Roma: FAO.

Farzan, A., Friendship, R.M. y Dewey, C.E. (2007). Evaluation of enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) tests and culture for determining *Salmonella* status of a pig herd. *Epidemiology and Infection*, 135(2):238-44. doi: 10.1017/S0950268806006868.

Farzan, A., Friendship, R.M., Dewey, C.E., Muckle, A.C., Gray, J.T. y Funk, J. (2008). Distribution of *Salmonella* serovars and phage types on 80 Ontario swine farms in 2004. *Canadian Journal of Veterinary Research*, 72(1):1-6.

Farzan, A. y Friendship, R.M. (2010). A clinical field trial to evaluate the efficacy of vaccination in controlling *Salmonella* infection and the association of *Salmonella*-shedding and weight gain in pigs. *Canadian Journal of Veterinary Research*, 74(4):258-63.

FCC Consortium (2010). *Analysis of the Costs and Benefits of Setting a Target for the Reduction of Salmonella in Breeding Pigs for European Commission Health and Consumers Directorate-General Final Report SANCO/2008/E2/056*. Disponible en: https://food.ec.europa.eu/system/files/2016-10/biosafety_food-borne-disease_salmonella_fattening-pigs_slaughtouse-analysis-costs.pdf [Consultado 02-05-2024].

Fedorka-Cray, P.J., Whipp, S.C., Isaacson, R.E., Nord, N. y Lager K. (1994). Transmission of *Salmonella* Typhimurium to swine. *Veterinary Microbiology*, 41(4):333-44. doi: 10.1016/0378-1135(94)90029-9.

Fedorka-Cray, P.J., Kelley, L.C., Stabel, T.J., Gray, J.T. y Laufer, J.A. (1995). Alternate routes of invasion may affect pathogenesis of *Salmonella* Typhimurium in swine. *Infection and Immunity*, 63(7):2658-64. doi: 10.1128/iai.63.7.2658-2664.1995.

Fedorka-Cray, P.J., Hogg, A., Gray, J.T., Lorenzen, K., Velasquez, J. y von Behren, P. (1997). Feed and feed trucks as sources of *Salmonella* contamination in swine. *Journal of Swine Health and Production*, 5(5):189-193.

Ferrari, R.G., Panzenhagen, P.H.N. y Conte-Junior, C.A. (2017). Phenotypic and genotypic eligible methods for *Salmonella* Typhimurium source tracking. *Frontiers in Microbiology*, 8:2587. doi: 10.3389/fmicb.2017.02587.

Foster, N., Lovell, M., Marston, K., Hulme, S., Frost, A., Bland, P. y Barrow, P. (2003). Rapid protection of gnotobiotic pigs against experimental salmonellosis following induction of polymorphonuclear leukocytes by avirulent *Salmonella enterica*. *Infection and Immunity*, 71(4):2182-91. doi: 10.1128/IAI.71.4.2182-2191.2003.

Fouhse, J.M., Zijlstra, R.T. y Willing, B.P. (2016). The role of gut microbiota in the health and disease of pigs. *Animal Frontiers*, 6(3):30-36. doi: 10.2527/af.2016-0031,

Fraile, L. (2016). *Aplicación práctica de antibióticos en producción porcina: Actualización de conceptos básicos, pros y contras*. Disponible en: https://www.3tres3.com/articulos/aplicacion-practica-de-antibioticos-en-produccionporcina_36910/ [Consultado 02-05-2024].

Franco, A., Leekitcharoenphon, P., Feltrin, F., Alba, P., Cordaro, G., Iurescia, M., Tolli, R., d'Incau, M., Staffolani, M., di Giannatale, E.; Hendriksen, R.S. y Battisti, A. (2015). Emergence of a clonal lineage of multidrug-resistant ESBL-producing *Salmonella* Infantis transmitted from broilers and broiler meat to humans in Italy between 2011 and 2014. *PLoS One*, 10(12):e0144802. doi: 10.1371/journal.pone.0144802.

Fraser, R.W., Williams, N.T., Powell, L.F. y Cook, A.J. (2010). Reducing *Campylobacter* and *Salmonella* infection: two studies of the economic cost and attitude to adoption of on-farm biosecurity measures. *Zoonoses and Public Health*, 57(7-8):e109-15. doi: 10.1111/j.1863-2378.2009.01295.x.

Funk, J.A., Davies, P.R. y Nichols, M.A. (2000). The effect of fecal sample weight on detection of *Salmonella enterica* in swine feces. *Journal of Veterinary Diagnostic Investigation*, 12(5):412-8. doi: 10.1177/104063870001200504.

Funk, J., Davies, P. y Nichols, M. (2001). Longitudinal study of *Salmonella enterica* in growing pigs reared in multiple-site swine production systems. *Veterinary Microbiology*, 83(1):45-60. doi: 10.1016/s0378-1135(01)00404-7.

Funk, J.A., Harris, I.T. y Davies, P.R. (2005). Comparison of fecal culture and Danish Mix-ELISA for determination of *Salmonella enterica* subsp. *enterica* prevalence in growing swine. *Veterinary Microbiology*, 107(1-2):115-26. doi: 10.1016/j.vetmic.2005.01.006.

Gantois, I., Ducatelle, R., Pasmans, F., Haesebrouck, F., Hautefort, I., Thompson, A., Hinton, J.C. y van Immerseel, F. (2006). Butyrate specifically down-regulates *Salmonella* pathogenicity island 1 gene expression. *Applied and Environmental Microbiology*, 72(1):946-9. doi: 10.1128/AEM.72.1.946-949.2006.

García-Feliz, C., Collazos, J.A., Carvajal, A., Vidal, A.B., Aladueña, A., Ramiro, R., de la Fuente, M., Echeita, M.A. y Rubio, P. (2007). *Salmonella enterica* infections in Spanish swine fattening units. *Zoonoses and Public Health*, 54(8):294-300. doi: 10.1111/j.1863-200701065.x.

García-Feliz, C., Carvajal, A., Collazos, J.A., Rubio, P. (2009). Herd-level risk factors for faecal shedding of *Salmonella enterica* in Spanish fattening pigs. *Preventive Veterinary Medicine*, 91(2-4):130-136. doi: 10.1016/j.prevetmed.2009.05.011.

Gargano, V., Gambino, D., Migliore, S., Vitale, M., Sciortino, S., Costa, A. y Vicari, D. (2021). Can human handling increase the presence of multidrug resistance (MDR) in *Salmonella* spp. isolated from food sources? *Microorganisms*, 9(10):2018. doi: 10.3390/microorganisms9102018.

Gavin, C., Simons, R.R.L., Berriman, A.D.C., Moorhouse, D., Snary, E.L., Smith, R.P. y Hill, A.A. (2018). A cost-benefit assessment of *Salmonella*-control strategies in pigs reared in the United Kingdom. *Preventive Veterinary Medicine*, 160:54-62. doi: 10.1016/j.prevetmed.2018.09.022.

Gavriil, A., Zilelidou, E., Papadopoulos, A.E., Siderakou, D., Kasiotis, K.M., Haroutounian, S.A., Gardeli, C., Giannenas, I. y Skandamis, P.N. (2021). Evaluation of antimicrobial activities of plant aqueous extracts against *Salmonella* Typhimurium and their application to improve safety of pork meat. *Scientific Reports*, 11(1):21971. doi: 10.1038/s41598-021-01251-0.

Gebreyes, W.A., Davies, P.R., Morrow, W.E.M., Funk, J.A. y Altier, C. (2000). Antimicrobial resistance of *Salmonella* isolates from swine. *Journal of Clinical Microbiology*, 38(12):4633-6. doi: 10.1128/JCM.38.12.4633-4636.2000.

Gebreyes, W.A. y Thakur, S. (2005). Multidrug-resistant *Salmonella enterica* serovar Muenchen from pigs and humans and potential interserovar transfer of antimicrobial resistance. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 49(2):503-11. doi: 10.1128/AAC.49.2.503-511.2005.

Gebreyes, W.A., Thakur, S. y Morrow W.E. (2006). Comparison of prevalence, antimicrobial resistance, and occurrence of multidrug-resistant *Salmonella* in antimicrobial-free and conventional pig production. *Journal of Food Protection*, 69(4):743-8. doi: 10.4315/0362-028x-69.4.743.

Gibson, G.R. y Roberfroid, M.B. (1995). Dietary modulation of the human colonic microbiota: introducing the concept of prebiotics. *Journal of Nutrition*, 125(6):1401-12. doi: 10.1093/jn/125.6.1401.

Gibson, G. R., Hutkins, R., Sanders, M. E., Prescott, S. L., Reimer, R. A., Salminen, S. J., Scott, K., Stanton, C., Swanson, K.S., Cani, P.D., Verbeke, K. y Reid, G. (2017). Expert consensus document: the International Scientific Association for Probiotics and Prebiotics (ISAPP) consensus statement on the definition and scope of prebiotics. *Nature Reviews Gastroenterology and Hepatology*, 14(8):491-502. doi: 10.1038/nrgastro.2017.75.

Gil-Molino, M., Risco Pérez, D., Gonçalves Blanco, P., Fernandez Llario, P., Quesada Molina, A., García Sánchez, A., Cuesta Gerveno, J.M., Gómez Gordo, L., Martín Cano, F.E., Pérez Martínez, R., Varela Fernández, E. y Rey Pérez, J. (2019). Outbreaks of antimicrobial resistant *Salmonella* Choleraesuis in wild boars piglets from central-western Spain. *Transboundary and Emerging Diseases*, 66(1):225-233. doi: 10.1111/tbed.13003.

Gil-Molino, M., García, A., Zurita, S.G., Martín-Cano, F.E., García-Jiménez, W., Risco, D., Rey, J., Fernández-Llario, P. y Quesada, A. (2020). Spread of antimicrobial resistance by *Salmonella enterica* serovar Choleraesuis between close domestic and wild environments. *Antibiotics*, 9(11):750. doi: 10.3390/antibiotics9110750.

Gómez-García, M., Argüello, H., Puente, H., Mencía-Ares, Ó., González, S., Miranda, R., Rubio, P. y Carvajal, A. (2020). In-depth *in vitro* evaluation of the activity and mechanisms of action of organic acids and essential oils against swine enteropathogenic bacteria. *Frontiers in Veterinary Sciences*, 7:572947. doi: 10.3389/fvets.2020.572947.

Gómez-Osorio, L.M., Yepes-Medina, V., Ballou, A., Parini, M. y Angel, R. (2021). Short and medium chain fatty acids and their derivatives as a natural strategy in the control of necrotic enteritis and microbial homeostasis in broiler chickens. *Frontiers in Veterinary Sciences*, 8:773372. doi: 10.3389/fvets.2021.773372.

Gotter, V., Klein, G., Koesters, S., Kreienbrock, L., Blaha, T. y Campe, A. (2012). Main risk factors for *Salmonella*-infections in pigs in north-western Germany. *Preventive Veterinary Medicine*, 106(3-4):301-7. doi: 10.1016/j.prevetmed.2012.03.016.

Gray, J.T. y Fedorka-Cray, P.J. (1996). "Salmonellosis in swine: a review of significant areas affecting the carrier state". En: *Proceedings of the 1st International Symposium on Ecology of Salmonella in Pork Production*. Ames (Estados Unidos), 1996. pp. 80-103. doi: 10.31274/safepork-180809-160.

Gresse, R., Chaucheyras-Durand, F., Fleury, M.A., van de Wiele, T., Forano, E. y Blanquet-Diot, S. (2017). Gut microbiota dysbiosis in postweaning piglets: understanding the keys to health. *Trends in Microbiology*, 25(10):851-873. doi: 10.1016/j.tim.2017.05.004.

Grimont, P.A. y Weill, F.X. (2007). *Antigenic formulae of the Salmonella serovars*. (9ª Ed.). París (Francia): World Health Organization Collaborating Centre for Reference and Research on *Salmonella*, Instituto Pasteur, pp. 1-166. Disponible en: https://www.pasteur.fr/sites/default/files/veng_0.pdf [Consultado 02-05-2024].

Guerra, B., Laconcha, I., Soto, S.M., González-Hevia, M.A. y Mendoza, M.C. (2000). Molecular characterisation of emergent multiresistant *Salmonella enterica* serotype [4,5,12:i:-] organisms causing human salmonellosis. *FEMS Microbiology Letters*, 190(2):341-7. doi: 10.1111/j.1574-6968.2000.tb09309.x.

Guillín, Y., Cáceres, M., Stashenko, E.E., Hidalgo, W. y Ortiz, C. (2023). Untargeted metabolomics for unraveling the metabolic changes in planktonic and sessile cells of *Salmonella enteritidis* ATCC 13076 after treatment with *Lippia origanoides* essential oil. *Antibiotics*, 12(5):899. doi: 10.3390/antibiotics12050899.

Haesebrouck, F., Pasmans, F., Chiers, K., Maes, D., Ducatelle, R. y Decostere, A. (2004). Efficacy of vaccines against bacterial diseases in swine: what can we expect? *Veterinary Microbiology*, 100(3-4):255-68. doi: 10.1016/j.vetmic.2004.03.002.

Hald, T., Wingstrand, A., Pires, S.M., Vieira, A., Domingues, A.R., Lundsby, K. y Andersen, V.D. (2012). *Assessment of the human-health impact of Salmonella in animal feed*. Copenhague (Dinamarca): DTU Food. Disponible en: https://backend.orbit.dtu.dk/ws/portalfiles/portal/84060316/Report_Assessment_of_the_human_health_impact_of_Salmonella_in_animal_feed.pdf [Consultado 02-05-2024].

Hallstrom, K. y McCormick, B.A. (2011). *Salmonella* interaction with and passage through the intestinal mucosa: through the lens of the organism. *Frontiers in Microbiology*, 2:88. doi: 10.3389/fmicb.2011.00088.

Hampton, M.D., Threlfall, E.J., Frost, J.A., Ward, L.R. y Rowe B. (1995). *Salmonella* Typhimurium DT193: differentiation of an epidemic phage type by antibiogram, plasmid profile, plasmid fingerprint and *Salmonella* plasmid virulence (*spv*) gene probe. *Journal of Applied Bacteriology*, 78(4):402-8. doi: 10.1111/j.1365-2672.1995.tb03425.x.

Han, Y., Tang, C., Li, Y., Yu, Y., Zhan, T., Zhao, Q. y Zhang, J. (2020). Effects of dietary supplementation with *Clostridium butyricum* on growth performance, serum immunity, intestinal morphology, and microbiota as an antibiotic alternative in weaned piglets. *Animals*, 10(12):2287. doi: 10.3390/ani10122287.

Hanssen, E.J., Swanenburg, M. y Maassen, C.B.M. (2007). "The Dutch *Salmonella* monitoring programme for pigs and some recommendations for control plans in the future". En: *Proceedings 7th Symposium on the epidemiology and control of foodborne pathogens in pork (Safepork)*. Verona (Italia), 9-11 mayo 2007, pp. 169-172.

Heier, B.T., Norström, M., Bergsjø, B., Sæbø, K.S., Kalberg, S., Linaker, M.L. y Hofshagen, M. (2015). *The surveillance programme for Salmonella in live animals, eggs and meat in Norway 2014*. Oslo (Noruega): Norwegian Veterinary Institute.

Hein, K.G. y Allrich, R.D. (1992). Influence of exogenous adrenocorticotrophic hormone on estrus behaviour in cattle. *Journal of Animal Science*, 70(1):243–247. doi: 10.2527/1992.701243x.

Helmy, Y.A., Taha-Abdelaziz, K., Hawwas, H.A.E., Ghosh, S., AlKafaas, S.S., Moawad, M.M.M., Saied, E.M., Kassem, I.I. y Mawad, A.M.M. (2023). Antimicrobial resistance and recent alternatives to antibiotics for the control of bacterial pathogens with an emphasis on foodborne pathogens. *Antibiotics*, 12(2):274. doi: 10.3390/antibiotics12020274.

Hernández, M., Gómez-Laguna, J., Luque, I., Herrera-León, S., Maldonado, A., Reguillo, L. y Astorgam, R.J. (2013). *Salmonella* prevalence and characterization in a free-range pig processing plant: tracking in trucks, lairage, slaughter line and quartering. *International Journal of Food Microbiology*, 162(1):48-54. doi: 10.1016/j.ijfoodmicro.2012.12.026.

Hill, A. A., Snary, E.L., Arnold, M.E., Alban, L. y Cook, A.J.C. (2008). Dynamics of *Salmonella* transmission on a British pig grower-finisher farm: A stochastic model. *Epidemiology and Infection*, 136(3):320–333. doi: 10.1017/S0950268807008485.

Hill, C., Guarner, F., Reid, G., Gibson, G.R., Merenstein, D.J., Pot, B., Morelli, L., Canani, R.B., Flint, H.J., Salminen, S., Calder, P.C. y Sanders, M.E. (2014). Expert consensus document. The International Scientific Association for Probiotics and Prebiotics consensus statement on the scope and appropriate use of the term probiotic. *Nature Reviews Gastroenterology and Hepatology*, 11(8):506-514. doi: 10.1038/nrgastro.2014.66.

Hiller, A., Schultze-Althoff, G., Klein, G. y Heres, L. (2011). “Meat Juice serology underestimates prevalence of *Salmonella* in pig herds”. In: *Proceedings 9th International Conference on the Epidemiology and Control of Biological, Chemical and Physical Hazards in Pigs and Pork*. Maastricht (Países Bajos), 19-22 junio 2011, pp. 269-272. doi: 10.31274/safepork-180809-640.

Hollmann, I., Lingens, J.B., Wilke, V., Homann, C., Teich, K., Buch, J., Chuppava, B. y Visscher, C. (2022). Epidemiological study on *Salmonella* prevalence in sow herds using direct and indirect detection methods. *Microorganisms*, 10(8):1532. doi: 10.3390/microorganisms10081532.

Hooton, S.P., Atterbury, R.J. y Connerton, I.F. (2011). Application of a bacteriophage cocktail to reduce *Salmonella* Typhimurium U288 contamination on pig skin. *International Journal of Food Microbiology*, 151(2):157-63. doi: 10.1016/j.ijfoodmicro.2011.08.015.

Hotes, S., Traulsen, I. y Krieter, J. (2011). *Salmonella* control measures with special focus on vaccination and logistic slaughter procedures. *Transboundary and Emerging Diseases*, 58(5):434-44. doi: 10.1111/j.1865-201101226.x.

Hudson, J.A., Billington, C., Carey-Smith, G. y Greening, G. (2005). Bacteriophages as biocontrol agents in food. *Journal of Food Protection*, 68(2):426-37. doi: 10.4315/0362-028x-68.2.426.

Hurd, H.S., Stabel, T.J. y Carlson, S. (1999). “Sensitivity of various fecal sample collections techniques for detection of *Salmonella* Typhimurium in finish hogs”. En: *Proceedings 3rd International Symposium on the Epidemiology and Control of Salmonella in Pork*. Washington (Estados Unidos), 5-7 agosto 1999, pp. 63-64.

Hurd, H.S., Gailey, J.K., McKean, J.D. y Rostagno, M.H. (2001). Rapid infection in market-weight swine following exposure to a *Salmonella* Typhimurium-contaminated environment. *American Journal of Veterinary Research*, 62(8):1194-7. doi: 10.2460/ajvr.2001.62.1194.

Hurd, H., McKean, J., Griffith, R., Wesley, I. y Rostagno, M. (2002). *Salmonella enterica* infections in market swine with and without transport and holding. *Applied and Environmental Microbiology*, 68(5):2376-81. doi: 10.1128/AEM.68.5.2376-2381.2002.

Issenhuth-Jeanjean, S., Roggentin, P., Mikoleit, M., Guibourdenche, M., De Pinna, E., Nair, S., Fields, P.I. y Weill, F.X. (2014). Supplement 2008–2010 (no. 48) to the White–Kauffmann–Le Minor scheme. *Research in Microbiology*, 165(7):526-30. doi: 10.1016/j.resmic.2014.07.004.

Jajere, S.M. (2019). A review of *Salmonella enterica* with particular focus on the pathogenicity and virulence factors, host specificity and antimicrobial resistance including multidrug resistance. *Veterinary World*, 12(4):504-521. doi: 10.14202/vetworld.2019.504-521.

Jamal, M., Bukhari, S.M.A.U.S., Andleeb, S., Ali, M., Raza, S., Nawaz, M.A., Hussain, T., Rahman, S.U. y Shah, S.S.A. (2019). Bacteriophages: an overview of the control strategies against multiple bacterial infections in different fields. *Journal of Basic Microbiology*, 59(2):123-133. doi: 10.1002/jobm.201800412.

Jiang, H.X., Song, L., Liu, J., Zhang, X.H., Ren, Y.N., Zhang, W.H., Zhang, J.Y., Liu, Y.H., Webber, M.A., Ogbolu, D.O., Zeng, Z.L. y Piddock, L.J. (2014). Multiple transmissible genes encoding fluoroquinolone and third-generation cephalosporin resistance co-located in non-typhoidal *Salmonella* isolated from food-producing animals in China. *International Journal of Antimicrobial Agents*, 43(3):242-7. doi: 10.1016/j.ijantimicag.2013.12.005.

Kanai, T., Mikami, Y. y Hayashi, A. (2015). A breakthrough in probiotics: *Clostridium butyricum* regulates gut homeostasis and anti-inflammatory response in inflammatory bowel disease. *Journal of Gastroenterology*, 50(9):928-39. doi: 10.1007/s00535-015-1084-x.

Konstantinov, S.R., Awati, A.A., Williams, B.A., Miller, B.G., Jones, P., Stokes, C.R., Akkermans, A.D., Smidt, H. y de Vos, W.M. (2006). Post-natal development of the porcine microbiota composition and activities. *Environmental Microbiology*, 8(7):1191-9. doi: 10.1111/j.1462-2920.2006.01009.x.

Korsak, N., Degeye, J.N., Etienne, G., Beduin, J.M., China, B., Ghafir, Y. y Daube, G. (2006). Use of a serological approach for prediction of *Salmonella* status in an integrated pig production system. *International Journal of Food Microbiology*, 108(2):246-54. doi: 10.1016/j.ijfoodmicro.2005.09.013.

Kramer, T.T., Roof, M.B. y Matheson, R.R. (1992). Safety and efficacy of an attenuated strain of *Salmonella* Choleraesuis for vaccination of swine. *American Journal of Veterinary Research*, 53(4):444-448.

Kranker, S., Alban, L., Boes, J. y Dahl, J. (2003). Longitudinal study of *Salmonella enterica* serotype Typhimurium infection in three Danish farrow-to-finish swine herds. *Journal of Clinical Microbiology*, 41(6):2282-8. doi: 10.1128/JCM.41.6.2282-2288.2003.

Laanen, M., Persoons, D., Ribbens, S., de Jong, E., Callens, B., Strubbe, M., Maes, D. y Dewulf, J. (2013). Relationship between biosecurity and production/antimicrobial treatment characteristics in pig herds. *Veterinary Journal*, 198(2):508-12. doi: 10.1016/j.tvjl.2013.08.029.

Laevens, H. y Mintiens, K. (2005). *De associatie tussen Salmonella serologie en de isolatie van Salmonella bij slachtvarkens op Belgische varkensbedrijven*. Amberes (Bélgica): Coördinatiecentrum voor Diergeneeskundige Diagnostiek (CODA-CERVA).

Lafoz del Río, L., Vela-Bello, A., Gómez, A. y López, M. (2020). *Salmonellosis en transición. Caso clínico*. Disponible en: <https://www.archivo-anaporc.com/2020/01/17/salmonellosis-en-transici%C3%B3n/> [Consultado 02-05-2024].

Lee, L.A., Puh, N.D., Maloney, E.K., Bean, N.H. y Tauxe R.V. (1994). Increase in antimicrobial-resistant *Salmonella* infections in the United States, 1989–1990. *Journal of Infectious Diseases*, 170(1):128-34. doi: 10.1093/infdis/170.1.128.

Leekitcharoenphon, P., Sørensen, G., Löfström, C., Battisti, A., Szabo, I., Wasyl, D., Slowey, R., Zhao, S., Brisabois, A., Kornschöber, C., Kärssin, A., Szilárd, J., Černý, T., Svendsen, C.A., Pedersen, K., Aarestrup, F.M. y Hendriksen, R.S. (2019). Cross-border transmission of *Salmonella* Choleraesuis var. Kunzendorf in European pigs and wild boar: infection, genetics, and evolution. *Frontiers in Microbiology*, 10:179. doi: 10.3389/fmicb.2019.00179.

Leverstein-van Hall M.A., Blok H.E.M., Donders A.R.T., Paauw A., Fluit A.C. y Verhoef J. (2003). Multidrug resistance among *Enterobacteriaceae* is strongly associated with the presence of integrons and is independent of species or isolate origin. *Journal of Infectious Diseases*, 187(2):251-9. doi: 10.1086/345880.

Lewerin, S. S., Skog, L., Frössling, J. y Wahlström, H. (2011). Geographical distribution of *Salmonella* infected pig, cattle and sheep herds in Sweden 1993-2010. *Acta Veterinaria Scandinavica*, 53(1):1-8. doi: 10.1186/1751-0147-53-51.

Leyman, B., Boyen, F., van Parys, A., Verbrugghe, E., Haesebrouck, F. y Pasmans, F. (2011). *Salmonella* Typhimurium LPS mutations for use in vaccines allowing differentiation of infected and vaccinated pigs. *Vaccine*, 29(20):3679-85. doi: 10.1016/j.vaccine.2011.03.004.

Li, J. (2017). Current status and prospects for in-feed antibiotics in the different stages of pork production - a review. *Asian-Australasian Journal of Animal Science*, 30(12):1667-1673. doi: 10.5713/ajas.17.0418.

Liao, S.F. y Nyachoti, M. (2017). Using probiotics to improve swine gut health and nutrient utilization. *Animal Nutrition*, 3(4):331-343. doi: 10.1016/j.aninu.2017.06.007.

Lindner, T., Springer, S. y Selbitz, H.J. (2007). "The use of a *Salmonella* Typhimurium live vaccine to control *Salmonella* Typhimurium in fattening pigs in field and effects on serological surveillance". En: *Proceedings 7th International Symposium on the Epidemiology and Control of Foodborne Pathogens in Pork*. Verona (Italia), 9-11 mayo 2007, pp. 237-239. doi: 10.31274/safepork-180809-123.

Liu, Y., Espinosa, C.D., Abelilla, J.J., Casas, G.A., Lagos, L.V., Lee, S.A., Kwon, W.B., Mathai, J.K., Navarro, D.M. y Jaworski, N.W. (2018). Non-antibiotic feed additives in diets for pigs: a review. *Animal Nutrition*, 4(2):113-125. doi: 10.1016/j.aninu.2018.01.007.

Loc-Carrillo, C. y Abedon, S.T. Pros and cons of phage therapy. *Bacteriophage*, 1(2):111-114. doi: 10.4161/bact.1.2.14590.

Long, L., You, L., Wang, D., Wang, M., Wang, J., Bai, G., Li, J., Wei, X. y Li, S. (2022). Highly prevalent MDR, frequently carrying virulence genes and antimicrobial resistance genes in *Salmonella enterica* serovar 4,[5],12:i:- isolates from Guizhou Province, China. *PLoS One*. 17(5):e0266443. doi: 10.1371/journal.pone.0266443.

Lundbeck, H., Plazikowski, U. y Silverstolpe, L. (1955). The Swedish *Salmonella* outbreak of 1953. *Journal of Applied Microbiology*, 18(3):535-548. doi: 10.1111/j.1365-2672.1955.tb02112.x.

Luo, Q., Wu, Y., Bao, D., Xu, L., Chen, H., Yue, M., Draz, M.S., Kong, Y. y Ruan, Z. (2023). Genomic epidemiology of *mcr* carrying multidrug-resistant ST34 *Salmonella enterica* serovar Typhimurium in a One Health context: The evolution of a global menace. *Science of the Total Environment*, 896:165203. doi: 10.1016/j.scitotenv.2023.165203.

Lynch, H., Leonard, F.C., Walia, K., Lawlor, P.G., Duffy, G., Fanning, S., Markey, B.K., Brady, C., Gardiner, G.E. y Argüello, H. (2017). Investigation of in-feed organic acids as a low cost strategy to combat *Salmonella* in grower pigs. *Preventive Veterinary Medicine*, 139(A):50-57. doi: 10.1016/j.prevetmed.02008.

Lynch, H., Walia, K., Leonard, F.C., Lawlor, P.G., Manzanilla, E.G., Grant, J., Dufy, G., Gardiner, G.E., Cormican, M., King, J., Markey, B.K., Fanning, A.S. y Argüello, H. (2018). *Salmonella* in breeding pigs: shedding pattern, transmission of infection and the role of environmental contamination in Irish commercial farrow-to-finish herds. *Zoonoses and Public Health*, 65(1):e196–e206. doi: 10.1111/zph.12428.

Jore, S., Lyngstad, T.M., Hofshagen, M., Bergsjø, B., Bruheim, T., Falck, M., Eikenæs, O. y Øvsthus, B. (2007). The surveillance and control programmes for *Salmonella* in live animals, eggs and meat in Norway. En: Brun, E., Hellberg, H., Mørk, T. y Jordsmyr, H.M. (Coord.). *Surveillance and control programmes for terrestrial and aquatic animals in Norway. Annual report 2006*. Oslo (Noruega): National Veterinary Institute, pp. 21-28.

Mach, N., Berri, M., Estelle, J., Levenez, F., Lemonnier, G., Denis, C., Leplat, J.J., Chevaleyre, C., Billon, Y., Doré, J., Rogel-Gaillard, C. y Lepage, P. (2015). Early-life establishment of the swine gut microbiome and impact on host phenotypes. *Environmental Microbiology Reports*, 7(3):554-69. doi: 10.1111/1758-2229.12285.

Maes, D., Gibson, K., Trigo, E., Saszak, A., Grass, J., Carlson, A. y Blaha, T. (2001). Evaluation of cross-protection afforded by a *Salmonella* Choleraesuis vaccine against *Salmonella* infections in pigs under field conditions. *Berliner und Munchener Tierarztliche Wochenschrift*, 114(9-10):339-341.

Magossi, G., Cernicchiaro, N., Dritz, S., Houser, T., Woodworth, J., Jones, C. y Trinetta, V. (2019). Evaluation of *Salmonella* presence in selected United States feed mills. *Microbiology Open*, 8(5):e00711. doi: 10.1002/mbo3.711.

Marier, E., Smith, R.P., Ellis-Iversen, J., Watson, E., Armstrong, D., Hogeveen, H. y Cook, A.J. (2016). Changes in perceptions and motivators that influence the implementation of on-farm *Salmonella* control measures by pig farmers in England. *Preventive Veterinary Medicine*, 133:22-30. doi: 10.1016/j.prevetmed.2016.09.009.

Maijala, R. y Peltola, J. (2002). "Finnish *Salmonella* Control Program—Efficiency and Viability in Food Safety Promotion". *10th EAAE Congress Exploring Diversity in the European AgriFood System*. Zaragoza (España), 28-31 agosto 2002. Disponible en: <http://ageconsearch.umn.edu/bitstream/24793/1/cp02ma17.pdf> [Consultado: 08-05-2024].

Maijala, R., Ranta, J., Seuna, E. y Peltola, J. (2005). The efficiency of the Finnish *Salmonella* control programme. *Food Control*, 16(8):669-675. doi: 10.1016/j.foodcont.06003.

Mainar-Jaime, R.C., Casanova-Higes, A., Andrés-Barranco, S. y Vico, J.P. (2018). Looking for new approaches for the use of serology in the context of control programmes against pig salmonellosis. *Zoonoses and Public Health*, 65(1):e222–e228. doi: 10.1111/zph.12432.

Mainar-Jaime, R.C. e Iguácel-Soteras, F. (Coords). (2011). *Bases para el control de la salmonelosis en las explotaciones porcinas. Informaciones Técnicas del Departamento de Agricultura, Ganadería y Medio Ambiente del Gobierno de Aragón*. Zaragoza: Talleres Editoriales COMETA.

Majowicz, S.E., Musto, J., Scallan, E., Angulo, F.J., Kirk, M., O'Brien, S.J., Jones, T.F., Fazil, A. y Hoekstra, R.M., International Collaboration on Enteric Disease 'Burden of Illness' Studies (2010). The global burden of nontyphoidal *Salmonella* gastroenteritis. *Clinical Infectious Diseases*, 50(6):882-9. doi: 10.1086/650733.

Marin, C., Chinillac, M. C., Cerdà-Cuellar, M., Montoro-Dasi, L., Sevilla-Navarro, S., Ayats, T., *et al.* (2020). Contamination of pig carcass with *Salmonella enterica* serovar Typhimurium monophasic variant 1,4[5],12:i:- originates mainly in live animals. *Science of the Total Environment*, 703, 134609. doi: 10.1016/j.scitotenv.2019.134609.

Mariotti, M., Lombardini, G., Rizzo, S., Scarafile, D., Modesto, M., Truzzi, E., Benvenuti, S., Elmi, A., Bertocchi, M., Fiorentini, L., Gambi, L., Scozzoli, M. y Mattarelli, P. (2022). Potential applications of essential oils for environmental sanitization and antimicrobial treatment of intensive livestock infections. *Microorganisms*, 10(4):822. doi: 10.3390/microorganisms10040822.

Markowiak, P. y Śliżewska, K. (2018). The role of probiotics, prebiotics and synbiotics in animal nutrition. *Gut Pathogens*, 10:21. doi: 10.1186/s13099-018-0250-0.

Martelli, F., Lambert, M., Butt, P., Cheney, T., Tatone, F.A., Callaby, R., Rabie, A., Gosling, R.J., Fordon, S., Crocker, G., Davies, R.H. y Smith, R.P. (2017). Evaluation of an enhanced cleaning and disinfection protocol in *Salmonella* contaminated pig holdings in the United Kingdom. *PLoS One*, 12(6):e0178897. doi: 10.1371/journal.pone.0178897.

Martín-Peláez, S., Costabile, A., Hoyles, L., Rastall, R.A., Gibson, G.R., la Ragione, R.M., Woodward, M.J., Mateu, E. y Martín-Orúe, S.M. (2010). Evaluation of the inclusion of a mixture of organic acids or lactulose into the feed of pigs experimentally challenged with *Salmonella* Typhimurium. *Veterinary Microbiology*, 142(3-4):337-345. doi: 10.1016/j.vetmic.2009.09.061.

Massacci, F.R., Morelli, A., Cucco, L., Castinel, A., Ortenzi, R., Tofani, S., Pezzotti, G., Estellé, J., Paniccià, M. y Magistrali, C.F. (2020). Transport to the slaughterhouse affects the *Salmonella* shedding and modifies the fecal microbiota of finishing pigs. *Animals*, 10(4):676. doi: 10.3390/ani10040676.

Mateu, E.M., Martin, M., Darwich, L., Mejía, W., Frías, N. y García Peña, F.J. (2002). Antimicrobial susceptibility of *Salmonella* strains isolated from swine in Catalonia, Spain. *The Veterinary Record*, 150(5):147-50. doi: 10.1136/vr.150.5.147.

Meeusen, E.N., Walker, J., Peters, A., Pastoret, P.P. y Jungersen, G. (2007). Current status of veterinary vaccines. *Clinical Microbiology Reviews*, 20(3):489-510. doi: 10.1128/CMR.00005-07.

Mejía, W., Casal, J., Zapata, D., Sánchez, G.J., Martín, M. y Mateu, E. (2006). Epidemiology of *Salmonella* infections in pig units and antimicrobial susceptibility profiles of the strains of *Salmonella* species isolated. *Veterinary Records*, 159(9):271-6. doi: 10.1136/vr.159.9.271.

- Meneguzzi, M., Pissetti, C., Rebelatto, R., Trachsel, J., Kuchiishi, S.S., Reis, A.T., Guedes, R.M.C., Leão, J.A., Reichen, C. y Kich, J.D. (2021). Re-emergence of salmonellosis in hog farms: outbreak and bacteriological characterization. *Microorganisms*, 9(5):947. doi: 10.3390/microorganisms9050947.
- Merchant, H.A., McConnell, E.L., Liu, F., Ramaswamy, C., Kulkarni, R.P., Basit, A.W. y Murdan, S. (2011). Assessment of gastrointestinal pH, fluid and lymphoid tissue in the guinea pig, rabbit and pig, and implications for their use in drug development. *European Journal of Pharmaceutical Sciences*, 42(1-2):3-10. doi: 10.1016/j.ejps.2010.09.019.
- Merle, R., Kösters, S., May, T., Portschi, U., Blaha, T. y Kreienbrock, L. (2011). Serological *Salmonella* monitoring in German pig herds: Results of the years 2003-2008. *Preventive Veterinary Medicine*, 99(2-4):229–233. doi: 10.1016/j.prevetmed.2011.02.007.
- Méroc, E., Strubbe, M., Vangroenweghe, F., Czaplicki, G., Vermeersch, K., Hooyberghs, J. y van der Stede Y. (2012). Evaluation of the *Salmonella* surveillance program in Belgian pig farms. *Preventive Veterinary Medicine*, 105:309-14. doi: 10.1016/j.prevetmed.03006.
- Methner, U., Rammler, N., Fehlhaber, K. y Rösler, U. (2011). *Salmonella* status of pigs at slaughter—Bacteriological and serological analysis. *International Journal of Food Microbiology*, 151(1):15-20. doi: 10.1016/j.ijfoodmicro.2011.07.028.
- Mikkelsen, L.L., Naughton, P.J., Hedemann, M.S. y 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. *Applied Environmental Microbiology*, 70(6):3485-92. doi: 10.1128/AEM.70.6.3485-3492.2004.
- MMMEEO. (2000). *Zoonoses in Finland in 1995-1999*. Helsinki (Finlandia): Ministry of Agriculture and Forestry.
- Molla, B., Sterman, A., Mathews, J., Artuso-Ponte, V., Abley, M., Farmer, W., Rajala-Schultz, P., Morrow, W.E. y Gebreyes, W.A. (2010). *Salmonella enterica* in commercial swine feed and subsequent isolation of phenotypically and genotypically related strains from fecal samples. *Applied Environmental Microbiology*, 76(21):7188-93. doi: 10.1128/AEM.01169-10.
- Mousing, J., Jensen, P.T., Halgaard, C., Bager, F., Feld, N., Nielsen, B., Nielsen, J.P. y Bech-Nielsen, S. (1997). Nation-wide *Salmonella enterica* surveillance and control in Danish slaughter swine herds. *Preventive Veterinary Medicine*, 29(4):247-61. doi: 10.1016/s0167-5877(96)01082-3.
- Mthembu, T.P., Zishiri, O.T. y El Zowalaty, M.E. (2021). Genomic characterization of antimicrobial resistance in food chain and livestock-associated *Salmonella* species. *Animals*, 11(3):872. doi: 10.3390/ani11030872.
- Nair, S., Farzan, A., O’Sullivan, T.L. y Friendship, R.M. (2018). Time course of *Salmonella* shedding and antibody response in naturally infected pigs during grower-finisher stage. *Canadian Journal of Veterinary Research*, 82(2):139-145.
- Nair, S., Farzan, A., Poljak, Z. y Friendship, R. (2020). Identifying active *Salmonella* infections in swine nurseries using serology and bacterial culture and evaluating associated risk factors. *Animals*, 10(9):1517. doi: 10.3390/ani10091517.

Nielsen, B., Baggesen, D., Bager, F., Haugegaard, J. y 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 examination. *Veterinary Microbiology*, 47(3-4):205-18. doi: 10.1016/0378-1135(95)00113-1.

Nollet, N., Maes, D., Duchateau, L., Hautekiet, V., Houf, K., Van Hoof, J., De Zuttera, L., De Kruif, A. y Geers, R. (2005a). Discrepancies between the isolation of *Salmonella* from mesenteric lymph nodes and the results of serological screening in slaughter pigs. *Veterinary Research*, 36(4):545-55. doi: 10.1051/vetres:2005014.

Nollet, N., Houf, K., Dewulf, J., de Kruif, A., de Zutter, L. y Maes, D. (2005b). *Salmonella* in sows: a longitudinal study in farrow-to-finish pig herds. *Veterinary Research*, 36(4):645-56. doi: 10.1051/vetres:2005022.

Nollet, N., Houf, K., Dewulf, J., Duchateau, L., de Zutter, L., de Kruif, A. y Maes, D. (2005c). Distribution of *Salmonella* strains in farrow-to-finish pig herds: A longitudinal study. *Journal of Food Protection*, 68(10):2012-21. doi: 10.4315/0362-028x-68.10.2012.

O'Connor, A.M., Denagamage, T., Sargeant, J.M., Rajic, A. y McKean, J. (2008). Feeding management practices and feed characteristics associated with *Salmonella* prevalence in live and slaughtered market-weight finisher swine: a systematic review and summation of evidence from 1950 to 2005. *Preventive Veterinary Medicine*, 87(3-4):213-28. doi: 10.1016/j.prevetmed.2008.06.017.

Ojha, S. y Kostrzynska, M. (2007). Approaches for reducing *Salmonella* in pork production. *Journal of Food Protection*, 70(11):2676-94. doi: 10.4315/0362-028x-70.11.2676.

Oliveira, C., Carvalho, L. y Garcia, T. (2006). Experimental airborne transmission of *Salmonella* Agona and *Salmonella* Typhimurium in weaned pigs. *Epidemiology and Infection*, 134(1):199-209. doi: 10.1017/S0950268805004668.

Omonijo, F.A., Ni, L., Gong, J., Wang, Q., Lahaye, L. y Yang, C. (2018). Essential oils as alternatives to antibiotics in swine production. *Animal Nutrition*, 4(2):126-136. doi: 10.1016/j.aninu.2017.09.001.

Osterkorn, K., Czerny, C.P., Wittkowski, G. y Huber, M. (2001). Sampling plan for the establishment of a serologic *Salmonella* surveillance for slaughter pigs with meat juice ELISA. *Berliner und Munchener Tierarztliche Wochenschrift*, 114(1-2), 30-4.

Papenbrock, S., Stemme, K., Amtsberg, G., Verspohl, J. y Kamphues, J. (2005). Investigations on prophylactic effects of coarse feed structure and/or potassium diformate on the microflora in the digestive tract of weaned piglets experimentally infected with *Salmonella* Derby. *Journal of Animal Physiology and Animal Nutrition*, 89(3-6):84-87. doi: 10.1111/j.1439-0396.2005.00537.x.

Parada, J., Carranza, A.I., Pichel, M., Tamiozzo, P.J., Pelliza, B.R. y Ambrogi, A. (2013). *Salmonella* transmission from the gilt to her offspring. *Livestock Science*, 157(2-3):605-611. doi: 10.1016/j.livsci.2013.09.010.

Parada, J., Carranza, A., Alvarez, J., Pichel, M., Tamiozzo, P., Busso, J. y Ambrogi, A. (2017). Spatial distribution and risk factors associated with *Salmonella enterica* in pigs. *Epidemiology and Infection*, 145(3):568-574. doi: 10.1017/S0950268816002612.

Patil, A., Kumar, S., Verma, A. y Baghel, R. (2015). Probiotics as feed additives in weaned pigs: a review. *Livestock Research International*, 3(2):31-39.

Pedersen, K., Sørensen, G., Löfström, C., Leekitcharoenphon, P., Nielsen, B., Wingstrand, A., Aarestrup, F.M., Hendriksen, R.S. y Baggesen, D.L. (2015). Reappearance of *Salmonella* serovar Choleraesuis var. Kunzendorf in Danish pig herds. *Veterinary Microbiology*, 176(3-4):282-91. doi: 10.1016/j.vetmic.2015.01.004.

Peeters, L. (2019). *On-farm control measures against Salmonella Typhimurium infections in pigs: focus on vaccination with an attenuated vaccine and the application of a probiotic feed additive*. Tesis doctoral. Universidad de Gante.

Penmetchsa, T.V., White, B.A., Maddox, C.W., Firkins, L.D. y Weigel, R.D. (2009). Molecular epidemiologic investigation of the role of gilts in the introduction and transmission of *Salmonella* in swine production systems. *Journal of Swine Health and Production*, 17(2):81-89.

Peñalver, P., Huerta, B., Borge, C., Astorga, R., Romero, R. y Perea, A. (2005). Antimicrobial activity of five essential oils against origin strains of the *Enterobacteriaceae* family. *Acta Pathologica, Microbiologica et Immunologica Scandinavica*, 113(1):1-6. doi: 10.1111/j.1600-0463.2005.apm1130101.x.

Pesciaroli, M., Cucco, L., de Luca, S., Massacci, F.R., Maresca, C., Medici, L., Panicià, M., Scoccia, E., Staffolani, M., Pezzotti, G. y Magistrali, C.F. (2017). Association between pigs with high caecal *Salmonella* loads and carcass contamination. *International Journal of Food Microbiology*, 242:82-86. doi: 10.1016/j.ijfoodmicro.2016.11.021.

Petsong, K. y Vongkamjan, K. (2015). "Applications of *Salmonella* bacteriophages in the food production chain". En Méndez-Vilas, A. (Coord.). *The battle against microbial pathogens: basic science, technological advances and educational programs*. España: Formatex, pp. 275-283.

Pietsch, M., Simon, S., Meinen, A., Trost, E., Banerji, S., Pfeifer, Y. y Flieger, A. (2021). Third generation cephalosporin resistance in clinical non-typhoidal *Salmonella enterica* in Germany and emergence of blaCTX-M-harboring *pESI* plasmids. *Microbial Genomics*, 7(10):000698. doi: 10.1099/mgen.0.000698.

Pires, A.F., Funk, J.A. y Bolin, C.A. (2013). Longitudinal study of *Salmonella* shedding in naturally infected finishing pigs. *Epidemiology and Infection*, 141(9):1928-36. doi: 10.1017/S0950268812002464.

Porrero, M.C., García, M., Teshager, I., Herrero, I., Cubillo, I., Dominguez, L. y Moreno, M.A. (2002). "Surveillance of pentaresistant ACSSuT *Salmonella enterica* in healthy pigs in Spain". En: *Proceedings of the International Symposium of Salmonella and Salmonellosis*. St. Brieuc (Francia), 29-31 mayo 2002.

Proux, K., Cariolet, R., Fravallo, P., Houdayer, C., Karenflech, A. y Madec, F. (2001). Contamination of pigs by nose-to-nose contact or airborne transmission of *Salmonella* Typhimurium. *Veterinary Research*, 32(6):591-600. doi: 10.1051/vetres:2001148.

QS (2024). *Guideline Salmonella Monitoring Pigs*. Disponible en: https://www.qs.de/services/files/downloadcenter/h-salmonellenmonitoring/2024/leitfaden/englisch/Guideline_Salmonella_Monitoring_Pigs_01.01.2024.pdf [Consultado 08-05-2024].

- Quesada, A., Porrero, M.C., Téllez, S., Palomo, G., García, M. y Domínguez, L. (2015). Polymorphism of genes encoding *PmrAB* in colistin-resistant strains of *Escherichia coli* and *Salmonella enterica* isolated from poultry and swine. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 70(1):71-4. doi: 10.1093/jac/dku320.
- Rajic, A., Keenlside, J., McFall, M.E., Deckert, A.E., Muckle, A.C., O'Connor, B.P., Manninen, K., Dewey, C.E. y McEwen, S.A. (2005). Longitudinal study of *Salmonella* species in 90 Alberta swine finishing farms. *Veterinary Microbiology*, 105(1):47-56. doi: 10.1016/j.vetmic.2004.10.005.
- Ramayo-Caldas, Y., Mach, N., Lepage, P., Levenez, F., Denis, C., Lemonnier, G., Leplat, J.J., Billon, Y., Berri, M., Doré, J., Rogel-Gaillard, C. y Estellé, J. (2016). Phylogenetic network analysis applied to pig gut microbiota identifies an ecosystem structure linked with growth traits. *ISME Journal*, 10(12):2973-2977. doi: 10.1038/ismej.2016.77.
- Randall, L.P., Cooles, S.W., Osborn, M.K., Piddock, L.J. y 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. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 53(2):208-16. doi: 10.1093/jac/dkh070.
- Ratajczak, W., Rył, A., Mizerski, A., Walczakiewicz, K., Sipak, O. y Laszczyńska, M. (2019). Immunomodulatory potential of gut microbiome-derived short-chain fatty acids (SCFAs). *Acta Biochimica Polonica*, 66(1):1-12. doi: 10.18388/abp.2018_2648.
- Rebelo, A., Almeida, A., Peixe, L., Antunes, P. y Novais, C. (2023). Unraveling the role of metals and organic acids in bacterial antimicrobial resistance in the food chain. *Antibiotics*, 12(9):1474. doi: 10.3390/antibiotics12091474.
- Rochín-Medina, J.J., Mendoza-López, I.A., Castro-Del Campo, N., Bastidas-Bastidas, P.J. y Ramírez, K. (2023). Activity of plant essential oils against clinically and environmentally isolated *Salmonella enterica* serotypes: *in vitro* assays and molecular docking. *Letters of Applied Microbiology*, 76(4):ovad045. doi: 10.1093/lambio/ovad045.
- Reed, W.M., Olander, H.J. y Thacker H.L. (1986). Studies on the pathogenesis of *Salmonella* Typhimurium and *Salmonella* Choleraesuis var kanzendorf infection in weanling pigs. *American Journal of Veterinary Research*, 47(1):75-83.
- Rodriguez, A., Pangloli, P., Richards, H.A., Mount, J.R. y Draughon, F.A. (2006). Prevalence of *Salmonella* in Diverse Environmental Farm Samples. *Journal of Food Protection*, 69(11):2576-80. doi: 10.4315/0362-028x-69.11.2576.
- Roesler, U., Vonaltrock, A., Heller, P., Bremerich, S., Arnold, T., Lehmann, J., Waldmann, K.H., Truyen, U. y Hensel, A. (2005). Effects of fluoroquinolone treatment acidified feed, and improved hygiene measures on the occurrence of *Salmonella* Typhimurium DT104 in an integrated pig breeding herd. *Journal of Veterinary Medicine B Infectious Diseases and Veterinary Public Health*, 52(2):69-74. doi: 10.1111/j.1439-0450.2005.00825.x.
- Roesler, U., Heller, P., Waldmann, K.H., Truyen, U. y Hensel, A. (2006). Immunization of sows in an integrated pig-breeding herd using a homologous inactivated *Salmonella* vaccine decreases the prevalence of *Salmonella* Typhimurium infection in the offspring. *Journal of Veterinary Medicine B Infectious Diseases and Veterinary Public Health*, 53(5):224-8. doi: 10.1111/j.1439-0450.2006.00951.x.

- Rooke, J.A. y Bland, I.M. (2002). The acquisition of passive immunity in the new-born piglet. *Livestock Production Science*, 78(1):13-23. doi: 10.1016/S0301-6226(02)00182-3,
- Rossi, R., Pastorelli, G., Cannata, S. y Corino, C. (2010). Recent advances in the use of fatty acids as supplements in pig diets: a review. *Animal Feed Science and Technology*, 162(1-2):1-11. doi: 10.1016/j.anifeedsci.2010.08.013.
- Rostagno, M.H., Hurd, H.S. y McKean, J.D. (2009). Split marketing as a risk factor for *Salmonella enterica* infection in swine. *Foodborne Pathogens and Disease*, 6(7):865-9. doi: 10.1089/fpd.2009.0309.
- Rostagno, M.H., Eicher, S.D. y Lay, D.C. (2010). "Does pre-slaughter stress affect pork safety risk?" En: *Proceedings of the 21st International Pig Veterinary Society (IPVS) Congress*. Vancouver (Canadá), 18-21 julio 2010, p. 176.
- Rostagno, M.H. y Callaway, T.R. (2012). Pre-harvest risk factors for *Salmonella enterica* in pork production. *Food Research International*, 45(2):634-640. doi: 10.1016/j.foodres.2011.04.041.
- Rowe, T. A., Leonard, F. C., Kelly, G. y Quinn, J. (2003). *Salmonella* serotypes present on a sample of Irish pig farms. *Veterinary Record*, 153(15):453-456. doi: 10.1136/vr.153.15.453.
- Ruggeri, J., Pesciaroli, M., Foresti, F., Giacomini, E., Lazzaro, M., Ossiprandi, M.C., Corradi, A., Lombardi, G., Pasquali, P. y Alborali, G.L. (2015). Inactivated *Salmonella enterica* serovar Typhimurium monophasic variant (S. Typhimurium 1,4,[5],12:i-) in sows is effective to control infection in piglets under field condition. *Veterinary Microbiology*, 180(1-2):82-89. doi: 10.1016/j.vetmic.2015.07.029.
- Ruiz, M., Rodriguez, J.C., Escribano, I. y Royo, G. (2004). Available options in the management of non Typhi *Salmonella*. *Expert Opinion on Pharmacotherapy*, 5(8):1737-43. doi: 10.1517/14656566.5.8.1737.
- Salmon, D.E. (1885). The Virus of Hog Cholera. *Public Health Papers and Reports*, 11:73-7.
- Salmonella* Subcommittee of the Nomenclature Committee of the International Society for Microbiology (1934). The Genus *Salmonella* Lignières, 1900. *Journal of Hygiene*, 34(3):333-350. doi: 10.1017/s0022172400034677.
- Sánchez-Rodríguez, J.A., Navas, L., Vinuesa, F.M., Castells, C., Martínez, M.A., López, A., Lindez, C. y Cabrera-Vique, C. (2018). New insights on the risk factors associated with the presence of *Salmonella* on pig carcasses. Lessons from small slaughterhouses. *Food Control* 87:46-52. doi: 10.1016/j.foodcont.2017.12.016.
- Sangvatanakul, P. (2007). Prevalence of *Salmonella* in piglets and in the fattening period in Chiang Mai, Thailand. Tesis de Máster. Universidad de Chiang Mai y Universidad Libre de Berlín.
- Sansonetti, P.J. (2004). War and peace at mucosal surfaces. *Nature Reviews Immunology*, 4(12):953-64. doi: 10.1038/nri1499.
- Savic, B., Zdravkovic, N., Radanovic, O., Jezdimirovic, N., Kureljusic, B. y Stevancevic, O. (2021). A *Salmonella enterica* subspecies *enterica* serovar Choleraesuis outbreak in weaned piglets in Serbia: clinical signs, pathologic changes, and microbiologic features. *Journal of Veterinary Diagnostic Investigation*, 33(5):993-996. doi: 10.1177/10406387211025507.

Schauser, K., Olsen, J.E. y Larsson, L.I. (2004). Immunocytochemical studies of *Salmonella* Typhimurium invasion of porcine jejunal epithelial cells. *Journal of Medical Microbiology*, 53(7):691-695. doi: 10.1099/jmm.0.45582-0.

Scherer, K., Szabó, I., Rösler, U., Appel, B., Hensel, A. y Nöckler, K. (2008). Time course of infection with *Salmonella* Typhimurium and its influence on fecal shedding, distribution in inner organs, and antibody response in fattening pigs. *Journal of Food Protection*, 71(4):699-705. doi: 10.4315/0362-028x-71.4.699.

Schut, C.H., Farzan, A., Ainslie-Garcia, M.H., Friendship, R.M. y Lillie, B.N. (2019). Antibody responses to *Salmonella* in pigs from weaning up to marketing and presence of *Salmonella* at slaughter. *Foodborne Pathogens and Disease*, 16(3):187-194. doi: 10.1089/fpd.2018.2454.

Schwartz, K.J. (1999). "Salmonellosis". En: Straw, B.E., d'Allaire, S., Mengeling, W.L. y Taylor, D.J. (Coord.). *Diseases of Swine*. Oxford (Reino Unido): Blackwell, pp. 535-551.

Schwarz, P., Kich, J.D., Kolb, J. y Cardoso, M. (2011). Use of an avirulent live *Salmonella* Choleraesuis vaccine to reduce the prevalence of *Salmonella* carrier pigs at slaughter. *Veterinary Records*, 169(21):553. doi: 10.1136/vr.d5510.

SEGES (2020). *Health status management*. Disponible en: <http://spfsus.dk/en>. [Consultado: 08-05-2024].

Selke, M., Meens, J., Springer, S., Frank, R. y Gerlach, G.F. (2007). Immunization of pigs to prevent disease in humans: construction and protective efficacy of a *Salmonella enterica* serovar Typhimurium live negative-marker vaccine. *Infection and Immunity*, 75(5):2476-83. doi: 10.1128/IAI.01908-06.

Seo, B.J., Song, E.T., Lee, K., Kim, J.W., Jeong, C.G., Moon, S.H., Son, J.S., Kang, S.H., Cho, H.S., Jung, B.Y. y Kim, W.I. (2018). Evaluation of the broad-spectrum lytic capability of bacteriophage cocktails against various *Salmonella* serovars and their effects on weaned pigs infected with *Salmonella* Typhimurium. *Journal of Veterinary Medical Science*, 80(6):851-860. doi: 10.1292/jvms.17-0501.

Sevilla, E., Vico, J.P., Delgado-Blas, J.F., González-Zorn, B., Marín, C.M., Uruén, C., Martín-Burriel, I., Bolea, R. y Mainar-Jaime, R.C. (2021). Resistance to colistin and production of extended-spectrum β -lactamases and/or AmpC enzymes in *Salmonella* isolates collected from healthy pigs in Northwest Spain in two periods: 2008-2009 and 2018. *International Journal of Food Microbiology*, 338:108967. doi: 10.1016/j.ijfoodmicro.2020.108967.

Shi, J., Zhang, G., Wu, H., Ross, C., Blecha, F. y Ganz, T. (1999). Porcine epithelial β -defensin 1 is expressed in the dorsal tongue at antimicrobial concentrations. *Infection and Immunity*, 67(6):3121-7. doi: 10.1128/IAI.67.6.3121-3127.1999.

Si, W., Gong, J., Chanas, C., Cui, S., Yu, H., Caballero, C. y Friendship, R.M. (2006). *In vitro* assessment of antimicrobial activity of carvacrol, thymol and cinnamaldehyde towards *Salmonella* serotype Typhimurium DT104: effects of pig diets and emulsification in hydrocolloids. *Journal of Applied Microbiology*, 101(6):1282-1291. doi: 10.1111/j.1365-2672.2006.03045.x.

Simons, R.R., Hill, A.A., Swart, A., Kelly, L. y Snary, E.L. (2016). A transport and lairage model for *Salmonella* transmission between pigs applicable to EU member states. *Risk Analysis*, 36(3):482-97. doi: 10.1111/risa.12390.

Simons, R., Berriman, A., Hill, A., Gavin, C. y Smith, R. (2017). "A cost-benefit assessment of *Salmonella*-control strategies in pig herds within the United Kingdom". En: *Proceedings of the 12th International*

Symposium on the Epidemiology and Control of Biological, Chemical and Physical Hazards in Pigs and Pork (SafePork). Foz do Iguaçu (Brasil), 21-24 agosto 2017, pp. 197-200. doi: 10.31274/safepork-180809-356.

Smid, J.H., van Hoek, A.H., Aarts, H.J., Havelaar, A.H., Heres, L., de Jonge, R. y Pielaat, A. (2014). Quantifying the sources of *Salmonella* on dressed carcasses of pigs based on serovar distribution. *Meat Science*, 96(4):1425-31. doi: 10.1016/j.meatsci.2013.12.002.

Smith, J.L. (2003). The role of gastric acid in preventing foodborne disease and how bacteria overcome acid conditions. *Journal of Food Protection*, 66(7):1292-303. doi: 10.4315/0362-028x-66.7.1292.

Smith, R.P., Andres, V., Martelli, F., Gosling, B., Marco-Jimenez, F., Vaughan, K., Tchorzewska, M. y Davies, R. (2018). Maternal vaccination as a *Salmonella* Typhimurium reduction strategy on pig farms. *Journal of Applied Microbiology*, 124(1):274-285. doi: 10.1111/jam.13609.

Smith, R.P., May, H.E., Burow, E., Meester, M., Tobias, T.J., Sassu, E.L., Pavoni, E., di Bartolo, I., Prigge, C., Wasyl, D., Zmudzki, J., Viltrop, A., Nurmoja, I., Zoche-Golob, V., Alborali, G.L., Romantini, R., Dors, A., Krumova-Valcheva, G., Koláčková, I., Aprea, G. y Daskalov, H. (2023). Assessing pig farm biosecurity measures for the control of *Salmonella* on European farms. *Epidemiology and Infection*, 151:e130. doi: 10.1017/S0950268823001115.

Snary, E.L., Munday, D.K., Arnold, M.E. y Cook, A.J.C. (2010). Zoonoses action plan *Salmonella* monitoring programme: an investigation of the sampling protocol. *Journal of Food Protection*, 73(3):488-494. doi: 10.4315/0362-028X-73.3.488.

Snary, E.L., Swart, A.N., Simons, R.R., Domingues, A.R., Vigre, H., Evers, E.G., Hald, T. y Hill, A.A. (2016). A quantitative microbiological risk assessment for *Salmonella* in Pigs for the European Union. *Risk Analysis*, 36(3):437-49. doi: 10.1111/risa.12586.

Sørensen, L.L., Alban, L., Nielsen, B. y Dahl, J. (2004). The correlation between *Salmonella* serology and isolation of *Salmonella* in Danish pigs at slaughter. *Veterinary Microbiology*, 101(2):131-41. doi: 10.1016/j.vetmic.2004.02.016.

Soumet, C., Ermel, G., Rose, N., Rose, V., Drouin, P., Salvat, G. y Colin, P. (1999). Evaluation of a multiplex PCR assay for simultaneous identification of *Salmonella* sp., *Salmonella* Enteritidis and *Salmonella* Typhimurium from environmental swabs of poultry houses. *Letters of Applied Microbiology*, 28(2):113-7. doi: 10.1046/j.1365-2672.1999.00488.x.

Schroeter, A., Hoog, B. y Helmuth, R. (2004). Resistance of *Salmonella* isolates in Germany. *Journal of Veterinary Medicine B Infectious Diseases and Veterinary Public Health*, 51(8-9):389-92. doi: 10.1111/j.1439-0450.2004.00795.x.

Skurnik, M., Pajunen, M. y Kiljunen, S. (2007). Biotechnological challenges of phage therapy. *Biotechnology Letters*, 29(7):995-1003. doi: 10.1007/s10529-007-9346-1.

Stackebrandt, E. (2014). "The family *Lachnospiraceae*". En: Rosenberg, E., DeLong, E.F., Lory, S., Stackebrandt, E., Thompson, F. (Coord.). *The Prokaryotes*. Springer: Berlín (Alemania): Springer, pp. 197-201.

STE (2021). Regulation No. 39 “Salmonellooside tõrje eeskiri” for the control/eradication of salmonellosis of Minister of Agriculture of Estonia (STE), Riigi Teataja (RT) I, 24.05.2013. Disponible en: <https://www.riigiteataja.ee/akt/104112020050>. [Consultado 24-05-2024].

Suiryanrayna, M.V. y Ramana. J.V. (2015). A review of the effects of dietary organic acids fed to swine. *Journal of Animal Science and Biotechnology*, 6:45. doi: 10.1186/s40104-015-0042-z.

Sulakvelidze, A., Alavidze, Z. y Morris, J.G. (2001). Bacteriophage therapy. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 45(3):649-659. doi: 10.1128/AAC.45.3.649-659.2001.

Sundström, K., Wahlström, H., Ivarsson, S. y Lewerin, S.S. (2014). Economic effects of introducing alternative *Salmonella* control strategies in Sweden. *PLoS One*, 9(5):1–10. doi: 10.1371/journal.pone.0096446.

Swanenburg, M., Berends, B.R., Urlings, H.A., Snijders, J.M. y van Knapen, F. (2001a). Epidemiological investigations into the sources of *Salmonella* contamination of pork. *Berliner und Munchener Tierärztliche Wochenschrift*, 114(9-10):356-359.

Swanenburg, M., van der Wolf, P.J., Urlings, H.A., Snijders, J.M. y van Knapen, F. (2001b). *Salmonella* in slaughter pigs: the effect of logistic slaughter procedures of pigs on the prevalence of *Salmonella* in pork. *International Journal of Food Microbiology*, 70(3):231-42. doi: 10.1016/s0168-1605(01)00546-3.

Swart, A.N., Evers, E.G., Simons, R.L. y Swanenburg, M. (2016). Modeling of *Salmonella* Contamination in the Pig Slaughterhouse. *Risk Analysis*, 36(3):498-515. doi: 10.1111/risa.12514.

Teng, K.T., Martinez Avilés, M., Ugarte-Ruiz, M., Barcena, C., de la Torre, A., Lopez, G., Moreno, M.A., Dominguez, L. y Alvarez, J. (2020). Spatial Trends in *Salmonella* Infection in Pigs in Spain. *Frontiers in Veterinary Science*, 7:345. doi: 10.3389/fvets.2020.00345.

Tennant, S.M., Diallo, S., Levy, H., Livio, S., Sow, S.O., Tapia, M., Fields, P.I., Mikoleit, M., Tamboura, B., Kotloff, K.L., Nataro, J.P., Galen, J.E. y Levine, M.M. (2010). Identification by PCR of non-typhoidal *Salmonella enterica* serovars associated with invasive infections among febrile patients in Mali. *PLoS Neglected Tropical Diseases*, 4(3):e621. doi: 10.1371/journal.pntd.0000621.

Tran, T.H.T., Everaert, N. y Bindelle, J. (2018). Review on the effects of potential prebiotics on controlling intestinal enteropathogens *Salmonella* and *Escherichia coli* in pig production. *Journal of Animal Physiology and Animal Nutrition*, 102(1):17-32. doi: 10.1111/jpn.12666.

Travers, K. y Barza, M. (2002). Morbidity of infections caused by antimicrobial resistant bacteria. *Clinical Infectious Diseases*, 34(S3):S131-4. doi: 10.1086/340251.

Tugnoli, B., Giovagnoni, G., Piva, A. y Grilli, E. (2020). From acidifiers to intestinal health enhancers: how organic acids can improve growth efficiency of pigs. *Animals*, 10(1):134. doi: 10.3390/ani10010134.

Uzzau, S., Brown, D.J., Wallis, T., Rubino, S., Leori, G., Bernard, S., Casadesús, J., Platt, D.J. y Olsen, J.E. (2000). Host adapted serotypes of *Salmonella enterica*. *Epidemiology and Infection*, 125(2):229-55. doi: 10.1017/s0950268899004379.

Vacca, M., Celano, G., Calabrese, F.M., Portincasa, P., Gobbetti, M. y de Angelis, M. (2020). The controversial role of human gut *Lachnospiraceae*. *Microorganisms*, 8(4):573. doi: 10.3390/microorganisms8040573.

van der Wolf, P.J., Bongers, J.H., Elbers, A.R., Franssen, F.M., Hunneman, W.A., van Exsel, A.C. y 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. *Veterinary Microbiology*, 67(4):263-75. doi: 10.1016/s0378-1135(99)00054-1.

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. y Tielen, M.J. (2001). A longitudinal study of *Salmonella enterica* infections in high-and low-seroprevalence finishing swine herds in The Netherlands. *The Veterinary Quarterly*, 23(3):116-121. doi: 10.1080/01652176.2001.9695096.

van der Wolf, P.J. (2017). *Monitoring for Salmonella in Swine in the Netherlands*. Disponible en: https://www.pig333.com/articles/monitoring-forsalmonella-in-swine-in-the-netherlands_12866/ [Consultado 08-05-2024].

van der Wolf, P., Meijerink, M., Libbrecht, E., Tacken, G., Gijsen, E., Lillie-Jaschniski, K. y Schüller, V. (2021). *Salmonella* Typhimurium environmental reduction in a farrow-to-finish pig herd using a live attenuated *Salmonella* Typhimurium vaccine. *Porcine Health Management*, 7(1):43. doi: 10.1186/s40813-021-00222-1.

van Immerseel, F., Boyen, F., Gantois, I., Timbermont, L., Bohez, L., Pasmans, F., Haesebrouck, F. y Ducatelle, R. (2005). Supplementation of coated butyric acid in the feed reduces colonization and shedding of *Salmonella* in poultry. *Poultry Science*, 84(12):1851-6. doi: 10.1093/ps/84.12.1851.

van Parys, A., Boyen, F., Volf, J., Verbrugghe, E., Leyman, B., Rychlik, I., Haesebrouck, F. y Pasmans, F. (2010). *Salmonella* Typhimurium resides largely as an extracellular pathogen in porcine tonsils, independently of biofilm-associated genes *csgA*, *csgD*, and *adrA*. *Veterinary Microbiology*, 144(1-2):93-9. doi: 10.1016/j.vetmic.2009.12.021.

van Parys, A., Boyen, F., Leyman, B., Verbrugghe, E., Maes, D., Haesebrouck, F. y Pasmans, F. (2013). Induction of seroconversion and persistence of *Salmonella* Typhimurium in pigs are strain dependent. *Comparative Immunology Microbiology and Infectious Diseases*, 36(5):465-71. doi: 10.1016/j.cimid.2013.03.007.

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. y Angulo, F.J. (2005). Antimicrobial-resistant nontyphoidal *Salmonella* is associated with excess bloodstream infections and hospitalizations. *Journal of Infectious Diseases*, 191(4):554-61. doi: 10.1086/427263.

Verbrugghe, E., Boyen, F., Van Parys, A., Van Deun, K., Croubels, S., Thompson, A., Shearer, N., Leyman, B., Haesebrouck, F. y Pasmans, F. (2011). Stress induced *Salmonella* Typhimurium recrudescence in pigs coincides with cortisol induced increased intracellular proliferation in macrophages. *Veterinary Research*, 42(1):118. doi: 10.1186/1297-9716-42-118.

Vico, J.P., Engel, B., Buist, W.G. y Mainar-Jaime, R.C. (2010). Evaluation of three commercial enzymelinked immunosorbent assays for the detection of antibodies against *Salmonella* spp. in meat juice from finishing pigs in Spain. *Zoonoses and Public Health*, 57 Suppl 1:107-14. doi: 10.1111/j.1863-2378.2010.01364.x.

Vico, J.P., Rol, I., Garrido, V., San Román, B., Grilló, M.J. y Mainar-Jaime, R.C. (2011). Salmonellosis in finishing pigs in Spain: prevalence, antimicrobial agent susceptibilities, and risk factor analysis. *Journal of Food Protection*, 74(7):1070-8. doi: 10.4315/0362-028X.JFP-10-515.

Vico, J.P. y Mainar-Jaime, R.C. (2011). The use of meat juice or blood serum for the diagnosis of *Salmonella* infection in pigs and its possible implications on *Salmonella* control programs. *Journal of Veterinary Diagnostic Investigation*, 23(3):528-31. doi: 10.1177/1040638711403432.

Vico, J.P., Lorenzutti, A.M., Zogbi, A.P., Aleu, G., Sánchez, I.C., Caffer, M.I., Rosmini y M.R., Mainar-Jaime, R.C. (2020). Prevalence, associated risk factors, and antimicrobial resistance profiles of non-typhoidal *Salmonella* in large scale swine production in Córdoba, Argentina. *Research in Veterinary Science*, 130:161-169. doi: 10.1016/j.rvsc.2020.03.003.

Vieira-Pinto, M., Tenreiro, R. y Martins, C. (2006). Unveiling contamination sources and dissemination routes of *Salmonella* sp. in pigs at a Portuguese slaughterhouse through macrorestriction profiling by pulsed-field gel electrophoresis. *International Journal of Food Microbiology*, 110(1):77-84. doi: 10.1016/j.ijfoodmicro.2006.01.046.

VTA (Veterinaar-ja Toiduamet/Veterinary and Food Board of Estonia) (2019). Salmonelloosi kontrollprogramm aastateks 2020-2021 (Estonian Salmonellosis control program for years 2020-2021), pp. 1-26.

Wales, A.D., McLaren, I.M., Bedford, S., Carrique-Mas, J.J., Cook, A.J. y Davies, R.H. (2009). Longitudinal survey of the occurrence of *Salmonella* in pigs and the environment of nucleus breeder and multiplier pig herds in England. *Veterinary Record*, 165(22):648-57. doi: 10.1136/vr.165.22.648.

Wales, A.D., Allen, V.M. y Davies, R.H. (2010). Chemical treatment of animal feed and water for the control of *Salmonella*. *Foodborne Pathogens and Disease*, 7(1):3-15. doi: 10.1089/fpd.2009.0373.

Wales, A.D., Cook, A.J. y Davies, R.H. (2011). Producing *Salmonella*-free pigs: a review focusing on interventions at weaning. *The Veterinary Record*, 168(10):267-76. doi: 10.1136/vr.d1125.

Wales, A.D. y Davies, R.H. (2017). *Salmonella* vaccination in pigs: a review. *Zoonoses and Public Health*, 64(1):1-13. doi: 10.1111/zph.12256.

Walia, K., Argüello, H., Lynch, H., Leonard, F.C., Grant, J., Yearsley, D., Kelly, S., Duffy, G., Gardiner, G.E. y Lawlor, P.G. (2016). Effect of feeding sodium butyrate in the late finishing period on *Salmonella* carriage, seroprevalence, and growth of finishing pigs. *Preventive Veterinary Medicine*, 131:79-86. doi: 10.1016/j.prevetmed.2016.07.009.

Walia, K., Argüello, H., Lynch, H., Leonard, F.C., Grant, J., Yearsley, D., Kelly, S., Duffy, G., Gardiner, G.E. y Lawlor, P.G. (2017). Effect of strategic administration of an encapsulated blend of formic acid, citric acid, and essential oils on *Salmonella* carriage, seroprevalence, and growth of finishing pigs. *Preventive Veterinary Medicine*, 137(A):28-35. doi: 10.1016/j.prevetmed.2016.12.007.

Wall, P.G., Morgan, D., Lamden, K., Ryan, M., Griffin, M., Threlfall, E.J., Ward, L.R. y Rowe, B. (1994). A case control study of infection with an epidemic strain of multiresistant *Salmonella* Typhimurium DT104 in England and Wales. *Communicable Disease Report CDR Review*, 4(11):R130-5.

Wall, S.K., Zhang, J., Rostagno, M.H. y Ebner, P.D. (2010). Phage therapy to reduce preprocessing *Salmonella* infections in market-weight swine. *Applied and Environmental Microbiology*, 76(1):48-53. doi: 10.1128/AEM.00785-09.

Walsh, M.C., Rostagno, M.H., Gardiner, G.E., Sutton, A.L., Richert, B.T. y Radcliffe, J.S. (2012). Controlling *Salmonella* infection in weanling pigs through water delivery of direct-fed microbials or organic acids.

Part I: effects on growth performance, microbial populations, and immune status. *Journal of Animal Science*, 90(1):261-71. doi: 10.2527/jas.2010-3598.

Wang, K., Cao, G., Zhang, H., Li, Q. y Yang, C. (2019). Effects of *Clostridium butyricum* and *Enterococcus faecalis* on growth performance, immune function, intestinal morphology, volatile fatty acids, and intestinal flora in a piglet model. *Food and Function*, 10(12):7844-7854. doi: 10.1039/c9fo01650c.

Wattiau, P., Boland, C. y Bertrand, S. (2011). Methodologies for *Salmonella enterica* subsp. *enterica* subtyping: gold standards and alternatives. *Applied and Environmental Microbiology*, 77(22):7877-85. doi: 10.1128/AEM.05527-11.

Weber, N.R., Nielsen, J.P., Hjulsgaard, C.K., Jorsal, S.E., Haugegaard, S., Hansen, C.F. y Pedersen, K.S. (2017). Comparison of bacterial culture and qPCR testing of rectal and pen floor samples as diagnostic approaches to detect enterotoxigenic *Escherichia coli* in nursery pigs. *Preventive Veterinary Medicine*, 143:61-67. doi: 10.1016/j.prevetmed.2017.05.009.

White, D.G., Zhao, S., McDermott, P.F., Ayers, S., Friedman, S., Sherwood, J., Breider-Foley, M. y Nolan L.K. (2003). Characterization of integron mediated antimicrobial resistance in *Salmonella* isolated from diseased swine. *Canadian Journal of Veterinary Research*, 67(1):39-47.

Wierup, M. (2006). "The Swedish *Salmonella* control in primary production-an overview of its background, strategy, and development". En: *Proceedings of the Med Vet Net Workshop on Salmonella control in poultry from feed to farm*. Uppsala (Suecia), 13-17 marzo 2006, pp. 11-14.

Wilcock, B.P. y Schwartz, K. (1992). Salmonellosis. En: Leman, A.D., Straw, B.E., Mengeling W.E., d'Allaire, S. y Taylor, D.J. (Coord.). *Diseases of Swine* (7ª ed.). Ames (Estados Unidos): Iowa State University Press, pp. 570-583.

Wilhelm, E., Hilbert, F., Paulsen, P., Smulders, F. y Rossmanith, W. (2007). *Salmonella* diagnosis in pig production: methodological problems in monitoring the prevalence in pigs and pork. *Journal of Food Protection*, 70(5):1246-8. doi: 10.4315/0362-028x-70.5.1246.

Wilhelm, B., Rajić, A., Parker, S., Waddell, L., Sanchez, J., Fazil, A., Wilkins, W. y McEwen, S.A. (2012). Assessment of the efficacy and quality of evidence for five on-farm interventions for *Salmonella* reduction in grow-finish swine: a systematic review and meta-analysis. *Preventive Veterinary Medicine*, 107(1-2):1-20. doi: 10.1016/j.prevetmed.2012.07.011.

Wilhelm, B.J., Young, I., Cahill, S., Desmarchelier, P., Nakagawa, R. y Rajić, A. (2017). Interventions to reduce non-typhoidal *Salmonella* in pigs during transport to slaughter and lairage: Systematic review, meta-analysis, and research synthesis-based infection models in support of assessment of effectiveness. *Preventive Veterinary Medicine*, 145:133-144. doi: 10.1016/j.prevetmed.2017.07.001.

Wilkins, W., Rajić, A., Parker, S., Waddell, L., Sanchez, J., Sargeant, J. y Waldner, C. (2010). Examining heterogeneity in the diagnostic accuracy of culture and PCR for *Salmonella* spp. in swine: A systematic review/meta-regression approach. *Zoonoses and Public Health*, 57(S1):121-34. doi: 10.1111/j.1863-2378.2010.01366.x.

Wood, R.L., Pospischil, A. y Rose, R. (1989). Distribution of persistent *Salmonella* Typhimurium infection in internal organs of swine. *American Journal of Veterinary Research*, 50(7):1015-1021.

Yang, H., Yang, M., Fang, S., Huang, X., He, M., Ke, S., Gao, J., Wu, J., Zhou, Y., Fu, H., Chen, C. y Huang, L. (2018). Evaluating the profound effect of gut microbiome on host appetite in pigs. *BMC Microbiology*, 18(1):215. doi: 10.1186/s12866-018-1364-8.

Yang, C., Zhang, L., Cao, G., Feng, J., Yue, M., Xu, Y., Dai, B., Han, Q. y Guo, X. (2019). Effects of dietary supplementation with essential oils and organic acids on the growth performance, immune system, fecal volatile fatty acids, and microflora community in weaned piglets. *Journal of Animal Science*, 97(1):133-143. doi: 10.1093/jas/sky426.

Yin, X., Dudley, E.G., Pinto, C.N. y M'ikanatha, N.M. (2022). Fluoroquinolone sales in food animals and quinolone resistance in non-typhoidal *Salmonella* from retail meats: United States, 2009-2018. *Journal of Global Antimicrobial Resistance*, 29:163-167. doi: 10.1016/j.jgar.2022.03.005.

Yoichi, M., Morita, M., Mizoguchi, K., Fischer, C.R., Unno, H. y Tanji, Y. (2004). The criterion for selecting effective phage for *Escherichia coli* O157: H7 control. *Biochemical Engineering Journal*, 19(3):221-227. doi: 10.1016/j.bej.2004.02.001.

Zamora-Sanabria, R. y Alvarado, A.M. (2017). "Preharvest *Salmonella* Risk Contamination and the Control Strategies". En: Mares, M. (Coord.). *Current Topics in Salmonella and Salmonellosis*. Rijeca (Croacia): IntechOpen, pp. 193-213.

Zimmermann, J.A., Fusari, M.L., Rossler, E., Blajman, J.E., Romero-Scharpen, A., Astesana, D.M., Olivero, C.R., Berisvil, A.P., Signorini, M.L., Zbrun, M.V., Frizzo, L.S. y Soto, L.P. (2016). Effects of probiotics in swines growth performance: a meta-analysis of randomised controlled trials. *Animal Feed Science and Technology*, 219:280-293. doi: 10.1016/j.anifeedsci.2016.06.021.

APÉNDICES

Características de las revistas científicas

En este apéndice se muestran el Factor de Impacto y el cuartil (Q, por sus siglas inglés) en el que se sitúan, dentro de cada área temática, las distintas revistas en las que se han publicado los artículos de esta Tesis Doctoral. El Factor de Impacto hace referencia al del año de publicación o al último disponible. Todos los parámetros se han obtenido del Journal Citation Reports® disponible en la página web de ISI Web of Knowledge.

- **Publicación I:** publicado en 2021
 - Revista: Pathogens
 - Área temática: Microbiología (Q2)
 - Factor de impacto: 3.7
 - Número de citas: 10
 - Contribución de la doctoranda: metodología, análisis formal, investigación, redacción-preparación del borrador original, redacción-revisión y edición.
- **Publicación II:** publicado en 2021
 - Revista: Animals
 - Área temática: Veterinaria (Q1) / Agricultura y Ciencia Animal (Q1)
 - Factor de impacto: 3.0
 - Número de citas: 19
 - Contribución de la doctoranda: metodología, investigación, redacción-preparación del borrador original.
- **Publicación III:** publicado en 2023
 - Revista: Frontiers in Microbiology
 - Área temática: Microbiología (Q1) / Microbiología médica (Q1)
 - Factor de impacto: 5.2
 - Número de citas: 1
 - Contribuciones de la doctoranda: metodología, investigación, redacción-preparación del borrador original, análisis formal, redacción-revisión y edición.
- **Publicación IV:** publicado en 2023
 - Revista: Animals
 - Área temática: Veterinaria (Q1) / Agricultura y Ciencia Animal (Q1)
 - Factor de impacto: 3.0
 - Número de citas: 0
 - Contribuciones de la doctoranda: metodología, análisis formal, investigación, redacción-preparación del borrador original, redacción-revisión y edición.
- **Publicación V:** publicado en 2022
 - Revista: Animals
 - Área temática: Veterinaria (Q1) / Agricultura y Ciencia Animal (Q1)
 - Factor de impacto: 3.0
 - Número de citas: 6
 - Contribuciones de la doctoranda: metodología, análisis formal, investigación, redacción-preparación del borrador original, redacción-revisión y edición.

Otras contribuciones científicas de la doctoranda

Publicaciones no incluidas en el Journal of Citation Reports (ISI)

1. Bernad-Roche, M., Mainar-Jaime, R.C. y Casanova-Higes, A. (2022). *Salmonelosis porcina: la infección en lechones, ¿el eslabón olvidado para su control?* Disponible en: <https://porcinews.com/porcisapiens/salmonelosis-porcina-infeccion-lechones-eslabon-olvidado-control/> [Consultado 28-05-2023].

Realización de estancias de investigación

Durante el desarrollo de la Tesis Doctoral, la Doctoranda llevó a cabo una estancia de investigación en el Pig Development Department del Animal & Grassland Center de TEAGASC, la Autoridad Irlandesa para el Desarrollo Agroalimentario en su sede en Fermoy, Irlanda. La duración de las estancias fue de tres meses y medio (del 9 de enero al 21 de abril de 2023) y el tutor responsable en el centro de acogida fue el Dr. Edgar Garcia Manzanilla.

Impartición de seminarios

1. “La salmonelosis porcina como problema de salud pública: un nuevo reto para el sector”. Aula Porcina, Facultad de Veterinaria, Universidad de Zaragoza, 2 mayo 2023.

Contribuciones a congresos internacionales

1. Bernad-Roche, M., Marín-Alcalá C.M., de Blas I., Cebollada-Solanas A. y Mainar-Jaime R.C. (2023). “Can on-farm serology predict the risk of *Salmonella* shedding at slaughter in fattening pigs?” *14th International Symposium on the Epidemiology and Control of Biological, Chemical and Physical Hazards in Pigs and Pork (Safepork 2023)*. Nueva Orleans (EEUU), 15-17 mayo 2023. Comunicación oral.
2. Bernad-Roche, M., López-Lanau, S., Marín-Alcalá, C.M. y Mainar-Jaime, R.C. (2022). “Estimating the risk of *Salmonella* shedding at slaughter in fattening pigs”. *International Symposium of Salmonella and Salmonellosis (IS 2022)*. Saint-Malo (Francia), 20-22 junio 2022. Comunicación oral.
3. Bernad-Roche, M., Casanova-Higes, A., Marín-Alcalá, C.M. y Mainar-Jaime, R.C. (2022). “Effect of the addition of organic acids in drinking water during lairage on *Salmonella* shedding in pigs at the time of slaughter”. *International Symposium of Salmonella and Salmonellosis (IS 2022)*. Saint-Malo (Francia), 20-22 junio 2022. Póster científico.
4. Bernad-Roche, M. y Mainar-Jaime, R.C. “Desarrollo de herramientas predictivas para el control integral de la salmonelosis en ganado porcino de engorde en la interfaz granja matadero” (2021). *UPPA-UNIZAR cross-border doctorials 2021*. Pau (Francia). 18-20 octubre 2021. Comunicación oral y póster científico.

5. Bernad-Roche, M., Casanova-Higes, A., Marín-Alcalá, C.M., Cebollada-Solanas, A. y Mainar-Jaime, R.C. (2020). “*Salmonella* infection in nursery pigs: a matter of concern?” *Conference of Research Workers in Animal Diseases (CRWAD 2020)*. Chicago (EEUU), 5-8 diciembre 2020. Comunicación oral.

Contribuciones a congresos nacionales

1. Bernad-Roche, M., Marín-Alcalá C.M., de Blas, I., Cebollada-Solanas, A. y Mainar-Jaime, R.C. (2024). “Predecir la excreción de *Salmonella* en cerdos: una herramienta para reducir el riesgo de infección humana”. *XIII Congreso de la Asociación de Veterinarios de Porcino de Aragón (AVPA 2024)*. Zaragoza, 22-23 mayo 2024. Póster científico. Segundo premio.
2. Bernad-Roche, M., Marín-Alcalá, C.M., de Blas, I., Cebollada-Solanas, A. y Mainar-Jaime, R.C. (2023). “Predicting the risk of *Salmonella* shedding at slaughter in fattening pigs”. *I Congreso de Estudiantes de Doctorado Iberus Connect (CEDIC 2023)*. Zaragoza, 28 abril, 2023. Comunicación oral.
3. Bernad-Roche, M., Bellés, A., Grasa, L., Casanova-Higes, A. y Mainar-Jaime R.C. (2021). “Cambios en la microbiota intestinal de cerdos de cebo tras la administración de butirato de sodio encapsulado en el pienso”. *VII Congreso de la Asociación Nacional de Veterinarios de Porcino (ANAVEPOR 2021)*. Valladolid, 24-25 noviembre 2021. Póster científico.
4. Bernad-Roche, M., Casanova-Higes, A., Marín-Alcalá, C.M., Cebollada-Solanas A. y Mainar-Jaime, R.C. “Infección de *Salmonella* en lechones al inicio de la transición”. *VII Congreso de la Asociación Nacional de Veterinarios de Porcino (ANAVEPOR 2021)*. Valladolid, 24-25 noviembre 2021. Póster científico.

Participación en contratos/convenios de investigación con empresas y/o administraciones públicas

1. Contrato N3: Comprehensive control of salmonellosis in fattening pigs: development of new strategies in the farm-slaughterhouse interface (RTI2018-093915-B-I00)
Entidades participantes: Universidad de Zaragoza
Duración: del 21/11/19 al 30/09/2022
Responsable: Raúl C. Mainar Jaime
2. Grupo de Desarrollo de Investigación “Zoonosis bacterianas: brucelosis-salmonelosis (ZooBac).
Entidades participantes: Unizar-CITA
Duración: del 21/11/19 al 30/09/2022
Responsable: Pilar M. Muñoz

Experiencia docente universitaria

Colaboración en la asignatura complementaria “Investigación en Salmonelosis” durante los cursos 2019-2020, 2020-2021, 2021-2022 y 2022-2023.

Colaboración en la asignatura “Enfermedades Emergentes con impacto en Salud Pública” del “Máster universitario en salud global: integración de la salud ambiental, humana y animal” durante el curso 2020-2021.

