



Thèse / Thesis

requis pour
l'obtention du Titre

submitted
for the Degree of

Master of Science

**INFLUENCIA DE LA ALIMENTACIÓN
EN LA PRESENCIA DE SALMONELLA
Y COMPOSICIÓN DEL MICROBIOMA
INTESTINAL EN PORCINO EXTENSIVO**

Inés GAITÁN MARQUETA

Zaragoza, Octubre 2015

**Institut Agronomique Méditerranéen de
Mediterranean Agronomic Institut of
Zaragoza**

**Université de Zaragoza
*University of Zaragoza***

**Fondation Espagnole pour le Développement
de la Nutrition Animale
*Spanish Foundation for the Development of Animal Nutrition***

“Influencia de la alimentación en la presencia de *Salmonella* y composición del microbioma intestinal en porcino extensivo”

Instituto de Agrobiotecnología
Departamento de Producción Agraria



instituto de agrobiotecnología
agrobioteknologiako institutua



CSIC

CONSEJO SUPERIOR DE INVESTIGACIONES CIENTÍFICAS



Gobierno
de Navarra

Trabajo Fin de Máster en Nutrición Animal, presentado por:

Inés Gaitán Marqueta
Instituto Agronómico Mediterráneo de Zaragoza (IAMZ)

Directores: Dra. María Jesús Grilló Dolset (Científico Titular del CSIC)
Dra. Victoria Garrido González (Contratada posdoctoral del CSIC)

Pamplona/Iruña, 28 de Septiembre de 2015

Dra. **MARÍA JESÚS GRILLÓ DOLSET**, Científico Titular del Consejo Superior de Investigaciones Científicas (CSIC) y Dra. **VICTORIA GARRIDO GONZÁLEZ**, contratada postdoctoral del CSIC,

INFORMAN:

Que la presente memoria de Tesis Final de Máster “**Influencia de la alimentación en la presencia de *Salmonella* y composición del microbioma intestinal en porcino extensivo**” elaborada por **INÉS GAITÁN MARQUETA** ha sido elaborada bajo su dirección en el Instituto de Agrobiotecnología (CSIC-UPNA-Gobierno de Navarra) y cumple con los requisitos exigidos del Máster en Nutrición Animal del Instituto Agronómico Mediterráneo de Zaragoza (IAMZ).

Y para que así conste, lo firman en Pamplona, a 28 de Septiembre de 2015

Fdo.: María Jesús Grilló Dolset

Fdo.: Victoria Garrido González

AGRADECIMIENTOS

Este trabajo ha sido financiado por la Fundación Caja Navarra, a través del proyecto de investigación titulado *“Los piensos de Navarra como causa de la baja prevalencia de salmonelosis porcina: estudio de secuenciación genómica de la microbiota intestinal”* (referencia 70628).

Agradecemos a todo el personal del matadero Urkaiko de la Asociación Txerrizaleok, especialmente a Josu Garaialde, Inmanol Rekondo y Rosa Larrañaga, así como a los veterinarios Isaías Bautista y Francisco Martín Mendiburu, por toda la información facilitada sobre las explotaciones de la Asociación, la cumplimentación de las encuestas y su inestimable colaboración para la coordinación y programación de los muestreos.

Agradecemos al Dr. Lorenzo Fraile (Universidad de Lérida), por su contribución en los análisis estadísticos; al Dr. Armand Sánchez Bonastre y a la Dra. Olga Francino (Universidad Autónoma de Barcelona) por su contribución a los estudios de Microbioma intestinal. A todos los compañeros y compañeras del laboratorio del IdAB.

RESUMEN

La salmonelosis es la segunda zoonosis más frecuente de la UE y el ganado porcino es, tras las aves, la segunda fuente de infección más importante para el ser humano. Por ello, la salmonelosis porcina constituye un serio problema de Salud Pública que requiere un especial control y vigilancia epidemiológica. Para preservar la salud de los consumidores, la UE recomienda realizar controles exhaustivos en todas las fases de la cadena alimentaria “de la granja a la mesa” con la intención de reducir progresivamente la carga bacteriana hasta llegar a los alimentos. Entre otras medidas, está previsto instaurar restricciones en el comercio internacional de cerdos y sus productos derivados para aquellos países que no cumplan los objetivos fijados de reducción de la prevalencia. Estas restricciones pueden tener importantes repercusiones económicas en nuestro país, puesto que el sector porcino es un pilar fundamental de los recursos ganaderos de España, que es el cuarto productor mundial tras EE.UU., China y Alemania. Asimismo, el porcino extensivo como el Basatxerri de País Vasco y norte de Navarra está cobrando importancia como producción de calidad y, a su vez, como estandarte de desarrollo rural sostenible y del bienestar animal. Sin embargo, se desconoce la situación epidemiológica y sanitaria de la salmonelosis en este tipo de animales. En este estudio, se analizó la presencia de *Salmonella* spp. en el contenido intestinal de una población representativa de cerdos Basatxerri y los factores de riesgo asociados a la misma. Asimismo, para evaluar la posible implicación de los factores alimentarios como fuente de exclusión directa o indirecta de *Salmonella*, se realizó un estudio del microbioma mediante secuenciación masiva del contenido intestinal. Como resultado, se aisló *Salmonella* en el 32,2% de los animales y en el 83,3% de las explotaciones analizadas, observando grandes diferencias de prevalencia entre explotaciones. Las cepas aisladas pertenecían mayoritariamente a la variante monofásica de *S. Typhimurium* (79,3%) y también a *S. Bovismorbificans* (10,3%), mostrando resistencia a al menos uno (89,7%) o a más de dos (86,2%) de los antimicrobianos analizados, siendo estreptomicina y sulfisoxazol los más involucrados. El análisis univariante detectó cuatro factores de riesgo directamente relacionados con la presencia de *Salmonella* en el contenido intestinal, que fueron: el número de animales/explotación; la composición del pienso administrado; el tipo de vegetación ingerida por los animales; y la limpieza y desinfección de los silos. Los tres últimos parámetros mostraron asociación entre sí, por lo que el análisis multivariante se realizó considerando la composición del pienso como el factor asociado más interesante, permitiendo identificar que la administración del Pienso A era un factor de riesgo ($p=0,008$) de salmonelosis en los animales analizados. Para determinar el peso relativo de las otras variables asociadas, sería necesario realizar un estudio complementario adecuado a este objetivo. El estudio del microbioma intestinal reveló claras diferencias entre las poblaciones bacterianas de los animales portadores y no portadores de *Salmonella*, detectando en los primeros un aumento de los *phylum Firmicutes* y *Proteobacterias*, acompañado de un descenso del *phylum Bacteroides*. La comparación de los OTUs indicó la existencia de diferencias en diez familias bacterianas entre los cerdos portadores y no portadores de *Salmonella*, con mayor peso estadístico de las *Mycoplasmataceae*, *Enterobacteriaceae*, *Verrucomicrobiaceae* y *Pseudomonadaceae*. En definitiva, todos los resultados indicaron que la alimentación animal (i.e. composición del pienso y/o la vegetación suplementaria) es un factor de riesgo de primera magnitud en la prevalencia de la salmonelosis porcina en explotaciones extensivas, por lo que puede ser utilizada como herramienta para el control sostenible de esta importante zoonosis desde la granja.

SUMMARY

Salmonellosis is the second most common zoonoses in the EU and pigs are, after birds, the second most important source of infection for humans. Therefore, swine salmonellosis is a serious public health problem that requires special monitoring and surveillance. To preserve consumers' health, the EU recommended thorough checks at all stages of the food chain "from farm to table" with the intention of gradually reduce the bacterial load to reach food. Among other measures, it is planned to establish restrictions on international trade of pigs and their products to those countries that do not meet the objective of reducing prevalence. These restrictions can have major economic impact on our country, since the pig sector is a key pillar of livestock resources of Spain, which is the fourth largest producer after the US, China and Germany. Also, extensive pig like Basatxerri in Basque Country and northern Navarre is gaining importance as quality production and as a standard for sustainable rural development and animal welfare. However, epidemiological and health situation of salmonellosis in these animals is unknown. In this study, the presence of *Salmonella* spp. was analyzed. in the intestinal content of a representative Basatxerri pig population and so the risk factors associated. Moreover, to assess the possible implication of dietary factors as a source of direct or indirect exclusion of *Salmonella*, the microbiome study was performed using massive sequencing of intestinal contents. As a result, *Salmonella* was isolated in 32.2% of the animals and in 83.3% of the analyzed farms, observing large differences in prevalence between farms. The isolates mainly belonged to the monophasic variant of *S. Typhimurium* (79.3%) and *S. Bovismorbificans* (10.3%), showing resistance to at least one (89.7%) or more than two (86,2%) of the antimicrobial analyzed, sulfisoxazole and streptomycin being the most important. Univariate analysis identified four risk factors directly related to the presence of *Salmonella* in the intestinal contents, which were: the number of animals/farm; the feed's composition; the type of vegetation eaten by the animals; and the silos' cleaning and disinfection. The last three parameters showed an association between each other, so the multivariate analysis was performed considering the composition of the feed as the most interesting associated factor, identifying the administration of feed as a risk factor ($p = 0.008$) of salmonellosis. To determine the relative weight of the other associated variables, it would be necessary to conduct a proper follow-up study to this objective. The study of intestinal microbiome revealed clear differences between the bacterial populations of positive and negative animals to *Salmonella*, and it was detected in the first group of animals an increase of the *phylum Firmicutes* and *Proteobacteria*, followed by a decrease of *Bacteroides phylum*. The comparison between the OTUs indicated the existence of differences in ten bacterial families among positive and negative pigs to *Salmonella*, with greater statistical weight *Mycoplasmataceae*, *Enterobacteriaceae*, *Pseudomonadaceae* and *Verrucomicrobiaceae*. To sum up, the results indicated that all animal feed (ie feed composition and / or the additional vegetation consumed) is a risk factor of first importance in the prevalence of swine salmonellosis in extensive farms, which can be used as a tool for sustainable control of this important zoonosis from the farm.

RÉSUMÉ

La salmonellose est la deuxième zoonose plus commune dans l'UE et les porcs sont, après les oiseaux, la deuxième plus importante source d'infection pour l'homme. Par conséquent, la salmonellose porcine est un grave problème de santé publique qui nécessite d'une surveillance particulière. Afin de préserver la santé des consommateurs, l'UE a recommandé des contrôles approfondis à tous les stades de la chaîne alimentaire «de la ferme à la table» avec l'intention de réduire progressivement la charge bactérienne. Entre d'autres mesures, il est prévu d'établir des restrictions sur le commerce international des porcs et de leurs produits aux pays qui ne respectent pas les objectifs de réduction de la prévalence. Ces restrictions peuvent avoir un impact économique majeur sur notre pays, puisque le secteur porcin est un pilier essentiel des ressources de l'élevage de l'Espagne, qui est le quatrième producteur après les Etats-Unis, la Chine et l'Allemagne. En outre, l'élevage extensif de porc comme le Basaxerri du Pays Basque et nord de la Navarre prend de l'importance comme production de qualité et, en même temps, comme un standard pour le développement rural durable et de bien-être animal. Cependant, la situation épidémiologique et sanitaire de la salmonellose chez ces animaux est inconnue. Dans cette étude, la présence de *Salmonella* spp. a été analysée dans le contenu intestinal d'une population représentative de porcs Basaxerri et les facteurs de risque associés. Aussi, afin d'évaluer la possible implication de facteurs alimentaires comme source de l'exclusion directe ou indirecte de *Salmonella*, l'étude sur le microbiome a été réalisée en utilisant le séquençage massif du contenu intestinal. En conséquence, *Salmonella* a été isolé dans 32,2% des animaux et dans 83,3% des fermes analysées, en observant des grandes différences de prévalence entre les fermes. Les isolats appartenaient principalement à la variante monophasique de *S. Typhimurium* (79,3%) et aussi à *S. Bovismorbificans* (10,3%), montrant une résistance à au moins un (89,7%) ou plus de deux (86,2%) des antimicrobiens analysés, sulfisoxazole et streptomycine étant les plus impliqués. L'analyse univariée a identifié quatre facteurs de risque directement liés à la présence de *Salmonella* dans le contenu intestinal, qui étaient: le nombre d'animaux/ferme; la composition de l'alimentation donnée; le type de végétation mangée par les animaux; et le nettoyage et la désinfection des silos. Les trois derniers paramètres ont montré association les uns avec les autres, si l'analyse multivariée a été réalisée compte tenu de la composition de la charge et le facteur associé plus intéressant, permettant l'administration d'identifier pense A était un facteur de risque ($p = 0,008$) de salmonellose chez les animaux testés. Pour déterminer le poids relatif des autres variables connexes, il serait nécessaire de procéder à une étude appropriée à cet objectif. L'étude du microbiome intestinal a révélé de nettes différences entre les populations bactériennes des animaux porteurs et non porteurs de *Salmonella*, montrant dans les premiers une augmentation des *phylum Firmicutes* et *Proteobacteria*, accompagnée par une diminution du *phylum Bacteroides*. En comparant l'OTU a indiqué l'existence de différences dans dix familles bactériennes chez les porteurs et non porteurs porcs de *Salmonella*, avec plus de poids statistique *Mycoplasmataceae*, *Entérobactéries*, *Pseudomonadaceae* et *Verrucomicrobiaceae*. En bref, les résultats ont indiqué que l'alimentation animale (i.e. composition de l'alimentation et/ou la végétation supplémentaire) est un facteur de risque de premier ordre dans la prévalence de la salmonellose porcine en élevages extensifs, qui peut être utilisé comme un outil pour le contrôle durable de cette zoonose importante depuis la ferme.

ÍNDICE

ÍNDICE GENERAL

Resumen.....	iii
Summary.....	vii
Resumé.....	xi
Índice General.....	xv
Índice de Tablas.....	xvi
Índice de Figuras	xvii
Abreviaturas.....	xviii
Introducción.....	3
Revisión bibliográfica.....	
Importancia de la salmonelosis.....	7
El sector porcino en España.....	7
Ganado porcino extensivo de la zona norte de España.....	9
<i>Salmonella</i> spp.....	9
Salmonelosis porcina.....	11
Factores de Riesgo y control de la salmonelosis	11
Nutrición del ganado porcino.....	12
Microbiota intestinal.....	14
Objetivos.....	17
Material y Métodos.....	
Selección y recogida de muestras	21
Aislamiento e identificación de <i>Salmonella</i>	21
Perfiles de resistencia a antimicrobianos	23
Estudio epidemiológico y de factores de riesgo.....	24
Estudio del microbioma intestinal	25
Resultados y Discusión.....	
Prevalencia de <i>Salmonella</i> spp.....	29
Caracterización de las cepas de <i>Salmonella</i> aisladas.....	30
Factores de riesgo de salmonelosis asociado a granjas en extensivo.....	32
Secuenciación masiva del microbioma intestinal.....	34
Conclusiones.....	41
Bibliografía.....	45

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Clasificación taxonómica, nomenclatura y número de serotipos de <i>Salmonella</i> spp. en cada subespecie.....	10
Tabla 2. Clasificación de los agentes antimicrobianos recomendados para la vigilancia y control de las cepas de <i>Salmonella</i> spp. de origen porcino, según la familia a la que pertenecen y el mecanismos de acción antibacteriana.....	23
Tabla 3. Secciones de la encuesta epidemiológica y variables analizadas para determinar los factores de riesgo asociados a la salmonelosis del porcino extensivo de este trabajo.....	25
Tabla 4. Prevalencia de <i>Salmonella</i> spp en heces de cerdos de engorde criados en sistema de producción extensivo.....	29
Tabla 5. Comparación de resultados entre el método ISO 6579 (ISO) y el método molecular (PCR) para la prevalencia de <i>Salmonella</i> spp. en heces de porcino extensivo del norte de España.....	29
Tabla 6. Prevalencia, serotipos y resistencia antimicrobiana (RA) de <i>Salmonella</i> spp. aisladas en muestras de contenido intestinal recogidas en matadero de cerdos Basatxerri y procesadas según ISO 6579 y diagnóstico molecular.....	31
Tabla 7. Factores de riesgo asociados a salmonelosis en porcino extensivo del norte de España, mediante el análisis univariante.....	32
Tabla 8. Características de las variables significativas en el análisis univariante de factores de riesgo asociados a salmonelosis en porcino extensivo Basatxerri.....	33
Tabla 9. Familias y Géneros bacterianos predominantes en muestras de contenido intestinal con presencia o ausencia de <i>Salmonella</i> spp. en porcino extensivo del norte de España.....	36
Tabla 10. OTUs de familias bacterianas que mostraron diferencias significativas en la composición del microbioma intestinal en cerdos extensivo del norte de España procedentes de explotaciones con alta prevalencia (<i>Salmonella</i> positivos) o ausencia (<i>Salmonella</i> negativos) de <i>Salmonella</i> spp.....	37

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Censo porcino por CC.AA en España, noviembre 2014.....	8
Figura 2. Efecto del tamaño de partícula del pienso sobre el pH en la parte distal del estómago.....	13
Figura 3. Distribución geográfica de las explotaciones de porcino de engorde extensivo existentes en el País Vasco y norte de Navarra.....	21
Figura 4. Protocolo para el aislamiento de <i>Salmonella</i> en GLM y heces de animales domésticos mediante la técnica microbiológica ISO 6579:2002/Amd 1:2007.....	22
Figura 5. Técnica de Kirby-Bauer.....	24
Figura 6. Diagrama tridimensional de los PCoA plots del microbioma intestinal de cerdos de engorde criados en producción extensiva del norte de España, con diferente prevalencia de <i>Salmonella</i>	35
Figura 7. Principales <i>phylum</i> bacterianos detectados en el microbioma intestinal de porcino extensivo del Norte de España, en muestras de heces positivas (n=15; izquierda) y negativas (n=20; derecha) a <i>Salmonella</i>	35

ABREVIATURAS

ADN	Ácido Desoxirribonucleico
APPCC	Análisis de Peligros y Puntos de Control Crítico
BPW	Agua de Peptona Tamponada
BGA	Agar Verde Brillante
CC.AA.	Comunidad Autónoma
C.F	Comunidad Foral
GLM	Ganglio Linfático Mesentérico
ISO 6579	UNE-EN ISO 6579:2002/Amd 1:2007
LB	Caldo Luria-Bertani
LA	LB suplementado con agar (15 gramos/litro)
MAGRAMA	Ministerio de Agricultura, Alimentación y Medio Ambiente
MSRV	Medio Semisólido Rappaport-Vassiliadis Modificado
PCR	Reacción en Cadena de la Polimerasa
RA	Resistencia antimicrobiana
SD	Desviación estándar (del inglés, <i>Standard Deviation</i>)
TFM	Trabajo Fin de Máster
OTUs	Unidades Taxonómicas Operacionales “ <i>Operational Taxonomic Units</i> ”
UE	Unión Europea
XLD	Agar Xilosa-Lisina Deoxicolato

INTRODUCCIÓN

Relevancia del trabajo

En este trabajo fin de Master (TFM), se ha analizado cómo influye la diferente alimentación que reciben los cerdos de engorde criados en extensivo de País Vasco y norte de Navarra, junto con el análisis de otros posibles factores de riesgo, en la prevalencia de *Salmonella* spp. en heces y en el tipo de microbioma intestinal. Se trata del primer estudio de salmonelosis porcina realizado en cerdos de caserío (en euskera, *basatxerri*) y el primer estudio sobre microbioma intestinal en porcino extensivo. De hecho, sólo hemos encontrado dos trabajos sobre microbioma intestinal porcino (Bearson *et al.*, 2013; Looft *et al.*, 2012) ambos realizados en ganado intensivo y con objetivos muy diferentes a los nuestros, ya que Bearson *et al.* analizaron la evolución del microbioma en cerdos infectados experimentalmente con *Salmonella* Typhimurium; y Looft *et al.* analizaron el efecto, en condiciones experimentales controladas, de la administración de antibióticos sobre las poblaciones bacterianas del intestino porcino.

Contexto productivo y económico

La producción extensiva de ganado porcino está en línea con las actuales normativas encaminadas a preservar el bienestar animal y permite a los animales realizar un ejercicio físico que redundará en una calidad de la carne y productos derivados del cerdo muy apreciados por el consumidor. Además, el porcino extensivo es un pilar fundamental para las economías locales que favorece el desarrollo rural de zonas agrarias que, de otro modo, quedarían despobladas. Por otra parte, los productos de alta calidad que se producen, son exportados en su mayoría, por lo que representan un estandarte de nuestro país.

Los resultados obtenidos en este TFM están siendo ampliados en un proyecto de investigación del Grupo de Sanidad Animal del IdAB-CSIC orientado a determinar la importancia de la composición del pienso en la prevalencia de salmonelosis y composición del microbioma intestinal del porcino intensivo. Con ello, se ampliará el concepto y utilidad práctica de los resultados de este TFM al sector porcino industrializado, conllevando una gran trascendencia económica puesto que: (i) España es el cuarto mayor productor mundial de porcino (tras EE.UU., China y Alemania); (ii) el porcino está considerado como la segunda fuente de infección, tras los huevos y aves, por *Salmonella* más importante para el ser humano; y (iii) España fue el país con mayor prevalencia de salmonelosis porcina de toda la UE, en el estudio de referencia realizado coordinadamente en 25 Estados Miembros (DOUE, 2008). Puesto que se van a establecer medidas para el control de esta importante zoonosis en el ganado porcino, los resultados de estos estudios son de gran trascendencia para establecer medidas de control sostenible de la salmonelosis porcina en nuestro país y, así, continuar siendo competitivos a nivel internacional.

Relación del TFM con el Master

La identificación de factores de la alimentación relacionados, directa o indirectamente, con la presencia de *Salmonella* y otros géneros bacterianos del tracto gastrointestinal, permitirá establecer pautas de control sostenible de esta importante zoonosis, basadas (al menos parcialmente) en una adecuada alimentación animal, evitando el uso sistemático de antibióticos en el pienso.

REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA

Importancia de la salmonelosis

La salmonelosis es una enfermedad infectocontagiosa que se adquiere por la ingestión de bacterias del género *Salmonella* spp., tras el contacto directo o la contaminación cruzada de alimentos. Son bacterias ubicuitarias, cuyo principal nicho ecológico es la pared intestinal de un amplio rango de hospedadores, liberándose al medio ambiente a través de las heces, donde contaminan agua, terreno y alimentos de origen animal fundamentalmente (CDC, 2012; Hernández *et al.*, 2012). La salmonelosis humana se asocia mayoritariamente con el consumo de huevos y productos derivados del pollo (Hald *et al.*, 2004) y los alimentos de origen porcino están considerados la segunda fuente de infección por *Salmonella* spp. más importante en la UE (EFSA-ECDC, 2014).

En los animales, la salmonelosis tiene importantes repercusiones tanto en la salud y bienestar de los animales como desde el punto de vista económico, debido a la elevada mortalidad, el coste de los tratamientos, la pérdida de peso, el retraso del crecimiento, el retraso en la salida a matadero y la heterogeneidad de las canales. Además, la salmonelosis supone un problema de Salud Pública de primera magnitud, que obliga al control y especial vigilancia epidemiológica. En la Unión Europea (UE), la salmonelosis es la segunda zoonosis más frecuente, tras la campilobacteriosis, habiéndose registrado 91.034 casos humanos en 2012, con una tasa de mortalidad del 0,14%. Esta cifra supone una tendencia decreciente en el número de casos registrados durante la última década, debida esencialmente al éxito de las medidas de control implementadas en los productos avícolas y también a la concienciación del consumidor sobre la importancia de las medidas higiénico-sanitarias frente a las infecciones transmitidas por los alimentos (EFSA-ECDC, 2014).

Tras el éxito de las medidas implantadas en aves, el control de la salmonelosis porcina se ha convertido en una cuestión prioritaria en numerosos países. Con la finalidad de proteger la salud de los consumidores, las autoridades sanitarias de la UE, a través de la Directiva 2003/99/CE sobre la vigilancia de las zoonosis y los agentes zoonóticos (DOUE, 2003) y del Reglamento CE 2160/2003 sobre el control de *Salmonella* y otros agentes zoonóticos transmitidos por los alimentos (DOUE, 2003), establecieron la obligatoriedad de poner en marcha programas específicos para la detección y el control de *Salmonella* mediante un control exhaustivo de todas las fases de la cadena alimentaria (“de la granja a la mesa”). Como se indica en el Anexo I de dicho Reglamento Comunitario, la UE ha fijado objetivos comunitarios de reducción de la salmonelosis porcina que entraron en vigor en Octubre de 2012, estableciendo medidas restrictivas en el comercio internacional de aquellos países que no cumplen con los objetivos de reducción de la prevalencia fijados por la UE (DOUE, 2003). De hecho, muchos países, como Alemania o Reino Unido, ya están aplicando programas de control de *Salmonella* con el objetivo de incrementar la seguridad de la carne de cerdo y otros, como Dinamarca, han conseguido eliminar o reducir a niveles muy bajos esta infección en su ganado porcino. Por lo tanto, si se desea mantener un sector porcino competitivo, tanto en el mercado nacional como en el internacional, la instauración de medidas de control adecuadas para reducir la prevalencia de esta zoonosis debe ser una prioridad.

El sector porcino en España

El sector porcino español es un pilar fundamental de los recursos ganaderos de nuestro país, es el segundo mayor productor europeo de porcino y cuarto del mundo, sólo superado por EEUU, China y Alemania (MAGRAMA, 2015). En 2014, se produjeron 3.598.300 toneladas de carne de cerdo en nuestro país, lo que supone un

16,2% del total de la carne producida por los 28 países de la UE. De ellas, 1.135.933 de toneladas de carne fueron exportadas a otros países de la UE y 375.041 toneladas a países terceros (MAGRAMA, 2015) por lo que somos un país eminentemente exportador de carne de cerdo.

Además, el sector porcino de España ha experimentado un notable desarrollo durante la última década. Según los datos facilitados por el Ministerio de Agricultura, Alimentación y Medio Ambiente (MAGRAMA, 2015), la producción de carne de cerdo en España se incrementó en un 4,7% (MAGRAMA, 2015) respecto al año anterior y las exportaciones de este producto en un 10% respecto a 2013, superando los 1,5 millones de toneladas en el año 2014 (MAGRAMA, 2015). Actualmente, las Comunidades Autónomas (CC.AA.) con mayor censo porcino son Cataluña (con 7.457.218 cabezas, 28,07%, en 2014) seguida de Aragón (6.316.467 cabezas, 23,77%, en el mismo año). La Comunidad Foral (C.F.) de Navarra ocupa la décima posición (546.356 cabezas, 2,05%) (Figura 1) (MAGRAMA, 2015).

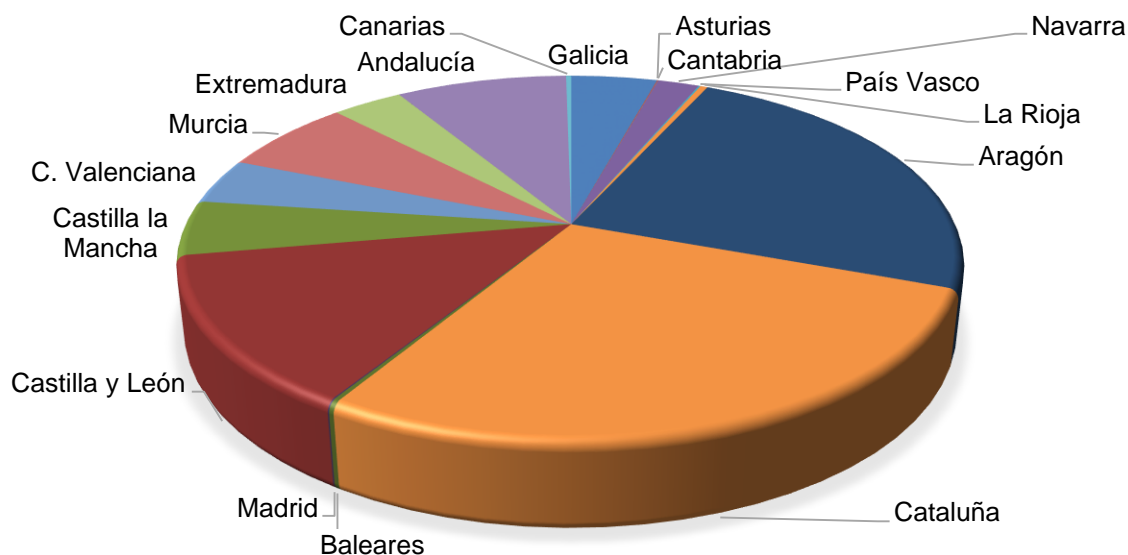


Figura 1. Censo porcino por CC.AA en España, noviembre 2014 (MAGRAMA, 2015).

Teniendo en cuenta la importancia del sector porcino en nuestro país y las exigencias europeas en materia de salmonelosis, el control de la salmonelosis en el porcino producido en España debe ser considerado como una prioridad sanitaria y de seguridad alimentaria (ver apartado Control de la salmonelosis porcina).

El sector del ganado porcino extensivo en España sólo tiene una presencia importante en cuatro Comunidades Autónomas. Extremadura abarca el 49% del censo total, Andalucía un 39%, Castilla León 11% y Castilla la Mancha un 1% del censo total (MAGRAMA, 2015).

La producción de porcino en sistemas extensivos es menos numerosa que en intensivo en España, por ello se dispone de menor información disponible al respecto. La producción de porcino intensivo es la que aporta mayor beneficio económico, por ello la que más importancia tiene en nuestro país. Sin embargo, los productos de producción extensiva tienen una alta calidad sensorial y son muy apreciados por el

consumidor tanto nacional como extranjero, contribuyendo así a ser el tercer exportador de porcino de la UE (13%) por detrás de Alemania y Dinamarca (MAGRAMA, 2015). Además, la producción extensiva en nuestro país supone la base de una economía rural sostenible y tiene una alta importancia social.

Ganado porcino extensivo de la zona Norte de España

Txerrizaleok es la Asociación que reúne a ganaderos que crían un tipo de porcino extensivo denominado Basatxerri (del euskera, “cerdo de caserío”) en explotaciones situadas en prados y montes de País Vasco y noroeste de Navarra. Para formar parte de esta asociación, los cerdos deben cumplir unas estrictas características genéticas (i.e. madre raza Landrace x Large White y padre raza Duroc) y de alimentación natural en pastoreo extensivo de clima atlántico de montaña, durante al menos 6 meses (sacrificio a los 8 meses de vida, con aprox. 150-155 Kg peso vivo). El ejercicio físico que realizan diariamente explica el gran desarrollo muscular que llegan a alcanzar estos animales. Asimismo, la castración (que se aplica a la totalidad de los machos sin excepción) favorece el incremento de peso y, a su vez, evita la presencia de hormonas sexuales en la carne, generando una mayor aceptación por parte del consumidor. Como resultado, se producen canales de gran tamaño, con un alto porcentaje de infiltración grasa y cualidades organolépticas diferenciadoras que lo hacen muy atractivo para el consumidor, comercializados con etiqueta de calidad “Eusko Label” Existen un reducido número de explotaciones en País Vasco y zona noroeste de la C.F. de Navarra, que generan una producción muy limitada de cerdo Basatxerri, cuya previsión de producción total para este año 2015 es de unos 6.700 cerdos. Estos animales se alimentan en un régimen extensivo, donde consumen *ad libitum* los recursos del terreno como son hierba, bellotas, castañas, hayucos y otros recursos propios del clima atlántico, variables según la localización de la explotación. Además, se les proporciona pienso de tres fábricas asociadas. Las materias primas utilizadas para la fabricación del pienso granulado son, trigo, maíz, soja, colza, cebada, carbonato cálcico, salvado de trigo, cloruro sódico, fosfato bicálcico, melaza de remolacha y habas, generando un pienso granulado con un tamaño de partícula 2,5 mm y sometido a un tratamiento térmico de 60°C. No se adicionan pre, probióticos ni ácidos orgánicos. Se emplean dos piensos: pienso de inicio (hasta los 2,5 meses) y pienso de engorde (hasta el sacrificio) con 17% y 14% de proteína bruta, respectivamente, proporcionando similar energía metabolizable (EM) 2300 y 2350 kcal/kg de MS (Materia Seca) respectivamente. En ocasiones, el ganadero aporta a estos animales un suplemento alimenticio extra a base de patatas cocidas, pan y otros productos de huerta.

Los sistemas en extensivo han ganado interés en los últimos años en Europa y Norteamérica frente a los sistemas convencionales en intensivo, con la idea de preservar el bienestar animal y que los animales puedan expresar su comportamiento natural. Sin embargo, se desconoce la influencia que este tipo de sistema de producción y el escaso control que se puede ejercer sobre las medidas de bioseguridad en la transmisión de ciertas zoonosis alimentarias, como es la salmonelosis.

***Salmonella* spp.**

Las bacterias del género *Salmonella* spp. pertenecen a la familia *Enterobacteriaceae*, bacilos Gram-negativos, anaerobios facultativos, portadores de flagelos peritricos no

formadores de esporas, fermentan la glucosa con producción de gas, no fermentan la lactosa ni reducen nitratos a nitritos.

Se diferencian 2 especies: *S. enterica* y *S. bongori* (Tindall *et al.*, 2005). A su vez, la especie *S. enterica* se clasifica en 6 subespecies, en las que se han identificado 51 serogrupos (Grimont and Weill, 2007) y hasta 2.610 serotipos diferentes (Tabla 1) (Guibourdenche *et al.*, 2010). De ellas sólo *S. enterica* y especialmente las pertenecientes a la subespecie *enterica*, tienen interés clínico por ser patógenas para el ser humano. El resto de subespecies se encuentran en animales de sangre fría y en el ambiente.

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

Especie	Subespecie ^a	Serogrupo	No. de serotipos
<i>S. bongori</i> (V)		D1, G, H, R, V, Y, 60, 61, 66	23
<i>S. entérica</i>			2587
	<i>entérica</i> (I)	A-C4, D1, D2, E1-E4, F-Z, 51-54, 57, 67	1547
	<i>salamae</i> (II)	B-C2, C4, D1-D3, E1, E2, F-Z, 51-53, 55-60, 65	513
	<i>arizonae</i> (IIIa)	F, G, I-L, O, P, R-Z, 51, 53, 56, 59, 62, 63	100
	<i>diarizonae</i> (IIIb)	C1, C3, C4, F-M, O, P, R-V, X-Z, 51-53, 57-61, 63, 65	341
	<i>houtenae</i> (IV)	C1, F, H-L, P, R-Z, 51, 53, 57	73
	<i>indica</i> (VI)	C1, F, H, K, S, W, Y, Z, 59	13

^a Denominación actual de las especies y subespecies de *Salmonella* (Guibourdenche *et al.*, 2010).

La clasificación de los serotipos de *Salmonella* spp. se realiza siguiendo la fórmula antigénica descrita en el esquema de Kauffman-White, según las características de los antígenos: somáticos de superficie (antígenos O) expresados por el polisacárido O del lipopolisacárido; flagelares (antígenos H) expresados por proteínas flagelares, motilidad y especificidad de antígenos de 1ª y 2ª fase; y capsulares (antígenos Vi) (Grimont and Weill, 2007). De acuerdo con esto, las cepas de *Salmonella* se nombran indicando, primero, la especie, luego, la subespecie y, por último, la fórmula antigénica completa o, si existe, el nombre del serotipo (Grimont and Weill, 2007). Así, por ejemplo, *Salmonella entérica* subespecie *entérica* serotipo 1,4,[5],12:i:1,2 puede denominarse *Salmonella entérica* subespecie *enterica* serotipo Typhimurium. Puesto que estas nomenclaturas resultan muy extensas, a efectos prácticos se utiliza una denominación abreviada que consiste en nombrar *Salmonella* como “S.” (en cursiva y mayúscula) seguida del nombre del serotipo sin cursiva y con la primera letra en mayúsculas (en el ejemplo anterior, S. Typhimurium).

Prácticamente todos los serotipos son considerados potencialmente patógenos para el ser humano, pero con distinto grado de adaptación a los hospedadores (Tabla 1) (EFSA-ECDC, 2014). Así, algunos serotipos (como S. Typhi, S. Paratyphi y S. Sendai) son específicos del hombre, causándole una enfermedad sistémica muy severa,

mientras que otros están adaptados a los animales (como *S. Choleraesuis* al porcino, *S. Dublin* al vacuno, *S. Abortusovis* al ovino y *S. Gallinarum* a las aves de corral) y sólo afectan al hombre ocasionalmente, pudiendo producirle sólo síntomas de enfermedad leve (Nielsen, 2013; Stevens *et al.*, 2009). Los serotipos ubicuitarios no adaptados a ningún hospedador (como *S. Typhimurium*, *S. Enteritidis* y *S. Infantis*, que afectan a un amplio rango de animales y humanos) son los más relevantes como zoonosis (Hald *et al.*, 2004; Hald *et al.*, 2006; Pires *et al.*, 2011). Respectivamente, *S. Enteritidis* afecta más comúnmente a las aves y *S. Typhimurium* al cerdo, representan el 75,6% del total de los serotipos notificados en la UE (EFSA, 2011).

Salmonelosis porcina

En el ganado porcino, las infecciones por *Salmonella* pueden presentarse en dos formas clínicas diferentes, i.e. la forma septicémica y la forma enterocolítica. La primera, causada principalmente por *S. Choleraesuis*, ocurre en cerdos de menos de cinco meses de edad y es rara su presentación en cerdos lactantes. Los animales afectados presentan diarrea profusa y, si no se tratan, pueden tener síntomas de infección sistémica y un alto índice de mortalidad. Los que se recuperan suelen quedar como portadores asintomáticos y continúan eliminando la bacteria través de las heces.

La forma enterocolítica está causada principalmente por *S. Typhimurium* y, generalmente, se presenta entre el destete y los cuatro meses de edad. Se caracteriza por síntomas de gastroenteritis, que puede cursar de forma aguda o crónica, siendo la diarrea el síntoma común. Generalmente, los animales sometidos a tratamiento se recuperan, pudiendo eliminar el microorganismo a través de las heces durante meses (Nollet *et al.*, 2005). Sin embargo, la presentación más frecuente de las infecciones por *Salmonella* en ganado porcino son formas asintomáticas, producidas por una amplia variedad de serotipos de *Salmonella*. Un importante número de animales de engorde presentan infecciones subclínicas en tonsilas, tracto intestinal y ganglios linfáticos mesentéricos (GLM) que eliminan el patógeno de forma intermitente, actuando como importantes reservorios del patógeno (Merialdi *et al.*, 2008; Nollet *et al.*, 2005). Mientras que las formas clínicas son fácilmente detectables, los portadores asintomáticos pueden no ser detectados mediante inspecciones rutinarias, suponiendo un grave riesgo para el ser humano (Mousing *et al.*, 1997).

Un problema añadido a la salmonelosis es la aparición de bacterias con múltiples resistencias a agentes antimicrobianos (RA), puesto que *Salmonella* tiene gran facilidad para adquirir elementos genéticos móviles, transmitirlos a su descendencia y a otras bacterias, y también para fijarlos en su genoma. El uso sistemático de antibióticos en la dieta para el tratamiento de múltiples procesos infecciosos, hace que los animales sean considerados la principal fuente de bacterias con múltiples RA para el ser humano, dificultando la eficacia de los tratamientos en caso de ser necesarios (Tello *et al.*, 2012). Por ello, la reglamentación europea vigente requiere la vigilancia de las RA en todas las cepas de *Salmonella* spp. que se aíslan (DOUE, 2006).

Factores de riesgo y control de la salmonelosis

Existen diversos factores de riesgo, tanto al nivel de la producción primaria como en matadero, cuyo control mediante la aplicación de medidas higiénico-sanitarias, se considera esencial para el control de la salmonelosis porcina “de la granja a la mesa” (EFSA, 2010, 2011). Además del manejo y la higiene, el pienso se ha identificado en numerosos estudios como uno de los principales factores de riesgo asociados a la salmonelosis porcina. La utilización de piensos que no hayan recibido un tratamiento

térmico que asegure la eliminación de *Salmonella* ha sido considerado un riesgo asociado a la transmisión de este patógeno (Creus, 2005). Por ello, la normativa actual exige un estricto control de los procesos de fabricación que eviten la diseminación del patógeno, haciendo hincapié en puntos críticos como son los silos de materia prima y pienso, mezcladoras, granuladoras y enfriadoras (MARM and CESFAC, 2005); el transporte del pienso hasta llegar a la granja; y limpieza y desinfección de silos y comederos en la granja (MARM and CESFAC, 2005).

Además, hay diversas medidas higiénico-sanitarias y de bioseguridad propias de la explotación que se han considerado clave para el control de la infección en los animales, como son la limpieza de pasillos, desinfección de naves, silos y bebederos, control de aguas, roedores y otros vectores, así como restringir el acceso a las explotaciones (Mainar-Jaime and Iguácel, 2011). A pesar de todos estos esfuerzos por controlar la presencia e ingestión del patógeno, *Salmonella* spp. es una bacteria ubicuitaria, por lo que las medidas para su control deben basarse en el conocimiento de la epidemiología de la infección y en el estudio de los factores de riesgo propios de cada sistema productivo. Así, probablemente, las medidas de actuación en las explotaciones al aire libre extensivas deberán ser diferentes a las estipuladas para las granjas cerradas de los sistemas intensivos. De forma complementaria a estas medidas, se han propuesto alternativas que eviten el uso de antibióticos, como el uso de distintos aditivos en las dietas tales como prebióticos y probióticos (Castillo, 2006).

Nutrición del ganado porcino

Las materias primas de origen animal (harinas de carne, harinas de pescado) presentan elevados niveles de *Salmonella* por su mayor humedad que favorece el crecimiento de la bacteria (EFSA, 2008a), y las de origen vegetal pueden clasificarse según su riesgo de contaminación por *Salmonella* (EFSA, 2008a): harinas de oleaginosas (soja, girasol, colza) presentan una contaminación alta por *Salmonella*. Las harinas de soja siguen siendo de los productos más contaminados (EFSA, 2008a). El salvado de trigo y otros subproductos de cereales presentan algo menos de contaminación que los anteriores, y en los cereales el nivel de riesgo es relativamente bajo (EFSA, 2008a). Finalmente las grasas, tanto de origen vegetal como animal, presentan unos niveles de *Salmonella* muy bajos.

Existe la posibilidad de que el pienso se encuentre contaminado por *Salmonella* spp., incluso en piensos que hayan recibido un tratamiento térmico adecuado debido a la contaminación ambiental y a la contaminación por un mal manejo durante el transporte y almacenado del mismo en los silos o en los comederos de la granja (Burns *et al.*, 2015). Siendo por tanto el pienso contaminado un riesgo para la introducción de *Salmonella* en la granja.

Actualmente, se están desarrollando estrategias nutricionales para minimizar las infecciones por *Salmonella* en el ganado porcino, basadas en distintas estrategias sobre el control de los piensos como: (i) el tratamiento térmico; (ii) el tamaño de las partículas que lo componen; y (iii) el suplemento con aditivos como ácidos orgánicos, probióticos y prebióticos.

(i) *Tratamiento térmico de los piensos.* Antes de que el pienso llegue a la granja se debe tener la certeza de que ha recibido un tratamiento térmico en fábrica adecuado y suficiente para eliminar toda posible contaminación bacteriana que puede ser diseminada a las explotaciones ganaderas. Por ello, este tratamiento se considera como un punto de control crítico (PCC) dentro del Análisis de Peligros y Puntos de Control Críticos (APPCC) de la fábrica, precisando temperaturas superiores a 80°C

para eliminar el patógeno (Adams, 2000). Los tratamientos térmicos considerados efectivos para reducir la carga microbiana en los piensos son peletizado, acondicionado, extrusión o pasterización (Himathongkham *et al.*, 1996).

(ii) *Tamaño de las partículas del pienso*. Las características físicas de las partículas del pienso determinan el paso y absorción de nutrientes en el tracto digestivo, habiéndose observado que tienen influencia en la multiplicación y colonización de *Salmonella* (Berge and Wierup, 2012). El riesgo de infecciones por *Salmonella* puede reducirse utilizando una molienda grosera, en lugar de una molienda fina, debido al enlentecimiento del vaciado gástrico producido por las partículas más gruesas, permitiendo una adecuada acidificación del estómago (pH=2) capaz de destruir las *Salmonellae* ingeridas (Figura 2) (Burch, 2004). Sin embargo, la utilización de una molienda fina y peletizada proporciona unos mejores resultados productivos (Kjeldsen and Dahl, 1999). Asimismo, se ha demostrado que la alimentación líquida consistente en mezclar el pienso con agua, disminuye el riesgo de infección por *Salmonella*, debido al efecto de los productos fermentados que reducen el pH, dificultando la supervivencia de *Salmonella* (Van der Wolf *et al.*, 2001).

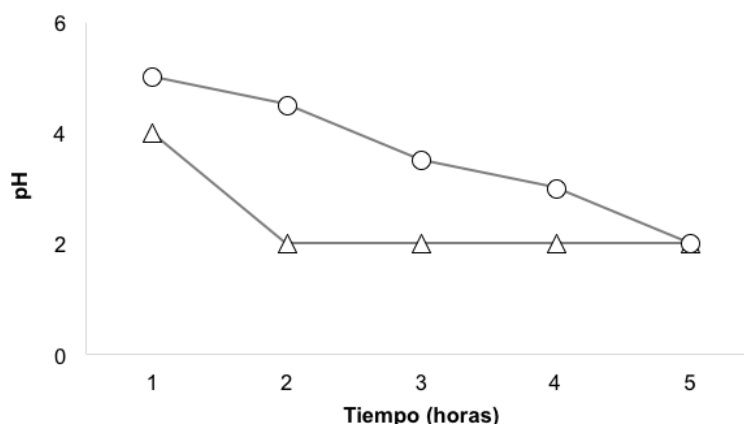


Figura 2. Efecto del tamaño (grueso en círculos; fino en triángulos) de partícula del pienso sobre el pH en la parte distal del estómago (Burch, 2004).

(iii) *Suplemento con aditivos*. La adición de ácidos orgánicos al pienso genera la liberación de iones hidrógeno al medio que lo acidifican (alcanzando niveles de pH de 4,5), lo que dificulta la supervivencia de *Salmonella* que tiene un crecimiento óptimo entre 6,5 y 7,5 (Berge and Wierup, 2012). Entre los ácidos más utilizados están los ácidos fórmico, acético, propiónico, butírico, láctico, sórbico, fumárico, málico, tartárico y cítrico. Estos ácidos se añaden en concentraciones entre 0,5% y 3%, dependiendo de la tasa de inclusión y la capacidad tampón del pienso. Así, por ejemplo, los cereales tienen una baja capacidad tampón para los ácidos y mayor para las proteínas y minerales. A pesar del efecto beneficioso para destruir a *Salmonella* en el estómago, los ácidos deben utilizarse con precaución para que el pienso conserve sus propiedades organolépticas y no cause daños en la mucosa gástrica (Van Immerseel *et al.*, 2006).

Los probióticos son microorganismos vivos que se administran como aditivo alimentario y actúan provocando un efecto beneficioso sobre el animal huésped, mediante la modificación de la población microbiana del tracto intestinal (Berge and Wierup, 2012). Los probióticos más empleados en porcino son *Bacillus* spp.,

Lactobacillus spp., *Lactococcus* spp., *Enterococcus* spp., *Pediococcus* spp., y *Saccharomyces* spp. (EFSA, 2005). Su mecanismo de acción es la exclusión competitiva, de modo que *Salmonella* compite con los agentes probióticos por los puntos de adhesión o bien creando un entorno desfavorable para la supervivencia y multiplicación del patógeno.

Los prebióticos son hidratos de carbono no digestibles que potencian el crecimiento y actividad de determinadas poblaciones microbianas (como *Lactobacillus* y *Bifidobacterium*) en el tracto intestinal y, con ello, modifican de forma selectiva la composición de la flora intestinal, favoreciendo la exclusión de bacterias patógenas para el huésped (Berge and Wierup, 2012). Uno de los tipos de prebióticos más utilizados en ganado porcino son los oligosacáridos entre los que destacan los manano-, fructo- y galacto- oligosacáridos, que actúan alimentando a los probióticos o a las bacterias beneficiosas ya presentes en el tracto intestinal, y les ofrecen una ventaja competitiva para luchar contra microorganismos patógenos y evitar su colonización, tales como *Salmonella*. Los prebióticos y probióticos tienen resultados variables, pero en general proporcionan efectos positivos.

Microbiota intestinal

Las comunidades bacterianas del tracto intestinal son esenciales para el desarrollo del epitelio intestinal y la adecuada absorción de nutrientes, constituyendo una defensa natural contra los patógenos y, con ello, preservar el estado sanitario e inmunológico del individuo (Looft *et al.*, 2012). Las alteraciones de la microbiota intestinal pueden ser debidas a diversos factores como (i) infecciones gastro-entéricas con lesión del epitelio intestinal; (ii) administración de antibióticos; (iii) cambios bruscos en la dieta; o (iv) situaciones de estrés. En pollos, se ha propuesto que el empleo de determinadas materias primas y aditivos en la alimentación puede repercutir directamente en la microbiota intestinal y ser utilizadas como herramienta para controlar infecciones gastrointestinales (Barragán, 2012). Bajo esta premisa, existe mucho optimismo sobre las posibilidades de manipulación de la microbiota a través de la dieta, para reducir la presencia de *Salmonella* en el tracto digestivo y, así, evitar tanto las infecciones entéricas con la consiguiente infección ganglionar como la diseminación del patógeno a través de las heces. Este efecto se basa esencialmente en que la alimentación puede condicionar el entorno gastro-entérico y, con ello, favorecer la exclusión competitiva de *Salmonella* y/o generar un ambiente poco favorable para la supervivencia y desarrollo del patógeno (Bearson *et al.*, 2013).

Durante los últimos años, se han producido grandes avances en los métodos moleculares y herramientas bioinformáticas disponibles para los estudios de los microbiomas, que permiten abordajes más sencillos, rápidos y fiables. El Proyecto Genoma Humano que se inició en 1990 dio un gran impulso a estas técnicas, de forma que hoy en día, un genoma humano puede secuenciarse en 27 horas y cuesta entre cinco mil y ocho mil dólares. A diferencia de los sistemas de secuenciación tradicionales, las plataformas de secuenciación masiva generan en paralelo y de forma masiva, millones de fragmentos de ADN en un único proceso de secuenciación en un tiempo récord y cada vez a menor coste. Existen diversos métodos de secuenciación masiva, entre los que actualmente destaca el Ion Torrent.

OBJETIVOS

El objetivo general del presente Trabajo Fin de Máster fue analizar el efecto de la nutrición en la prevalencia de *Salmonella* spp. en heces y en la composición de la microbiota intestinal de cerdos de engorde criados en el sistema de producción extensiva de la zona norte de España (País Vasco y norte de Navarra).

Para ello, los objetivos específicos fueron:

- Determinar la prevalencia y tipo de cepas circulantes de *Salmonella* spp. en el contenido intestinal de estos animales.
- Determinar el efecto de la nutrición y otros factores de riesgo asociados a la presencia de *Salmonella* spp.
- Analizar mediante secuenciación masiva la composición semicuantitativa del microbioma intestinal en una selección de muestras de los mismos animales.

MATERIAL Y MÉTODOS

Selección y recogida de muestras

Para estudiar la presencia de *Salmonella* en contenido intestinal de cerdos de engorde criados en extensivo, se seleccionaron 12 de las 32 explotaciones existentes en País Vasco y norte de Navarra, según su situación geográfica y el tipo de alimento natural disponible para los animales (Figura 3), entre los meses de Enero y Mayo de 2015. Como resultado, se seleccionaron un total de 9 explotaciones de interior y 3 de las 4 explotaciones marítimas. Todas ellas contaban con suplemento alimenticio de hierba *ad libitum*; algunas disponían de abundantes bellotas, castañas o hayucos; y, además, en dos de ellas, los animales recibían un complemento de pan o patata cocida administrado por el ganadero.



Figura 3. Distribución geográfica de las explotaciones de porcino de engorde extensivo existentes en el País Vasco y Norte de Navarra.

Se obtuvieron muestras de CI de 15 cerdos/explotación (180 muestras en total) seleccionados al azar en la cadena de sacrificio. Para ello, se apartaron los paquetes intestinales y se extrajeron en condiciones asépticas, 30 gramos de CI de cada animal. Las muestras obtenidas en el matadero fueron llevadas al laboratorio bajo refrigeración, para su procesado en la misma jornada laboral, mediante aislamiento microbiológico (25 gr/muestra) y congelación a -80°C (1 gr/muestra), para su eventual estudio genético posterior.

Aislamiento e identificación de *Salmonella*

El aislamiento microbiológico de *Salmonella spp.* se realizó siguiendo las indicaciones de la UE para muestras de heces (DOUE, 2008), siguiendo la Norma ISO 6579:2002/Amd 1:2007 (ISO, 2007) que, brevemente, según se muestra en la Figura 4, consiste en siete etapas consecutivas: 1) preparación de la muestra, mediante

pesado (25 gr/animal) y homogenización en *Buffer Peptone Water* (BPW); 2) pre-enriquecimiento no selectivo en BPW; 3) enriquecimiento semi-selectivo en el medio semisólido Rappaport Vassiliadis modificado (MSRV), a partir de 100 µL recogidos de la superficie del cultivo de BPW; 4) cultivo selectivo en placas de Agar Verde Brillante (BGA) y agar Xilosa Lisina Deoxicolato (XLD), a partir de los crecimientos que formen halo en MSRV; 5) aislamiento de 4 colonias sospechosas/muestra, mediante agotamiento en placas de agar; 6) identificación presuntiva de al menos una de ellas, mediante las pruebas bioquímicas de Ureasa, Indol, Lisina-decarboxilasa y Triple Azúcar Hierro; y 7) confirmación mediante serotipado en el Centro Nacional de Referencia para Salmonelosis Animales (Laboratorio Central de Veterinaria, LCV, Algete, Madrid) siguiendo el esquema de Kauffman-White-Le Minor (Grimont and Weill, 2007).

Además, todas muestras fueron analizadas mediante un método de diagnóstico molecular puesto a punto en el laboratorio de Sanidad Animal del IdAB (el método exacto no se detalla en este trabajo por estar bajo estudio de patentabilidad) basado en la amplificación mediante reacción en cadena de la polimerasa (PCR) de varias regiones genéticas altamente conservadas en *Salmonella* spp. Las muestras identificadas como positivas con este método fueron sometidas a un exhaustivo estudio microbiológico para el aislamiento, identificación y caracterización de las cepas de *Salmonella* involucradas, según la metodología descrita en el párrafo anterior.

Todos los aislados identificados presuntamente como *Salmonella* se conservaron en la colección de cepas del IdAB, mediante congelación en leche descremada estéril al 10% (BD Difco™ Skim Milk, EEUU) y suplementada con un 1% de lactosa (BD Difco™, EEUU). Todos los medios de cultivo y reactivos utilizados fueron adquiridos en Laboratorios Conda S.A., España.



Figura 4. Protocolo para el aislamiento de *Salmonella* en GLM y heces de animales domésticos mediante la técnica microbiológica ISO 6579:2002/Amd 1:2007. Enumeradas del 1 al 7 todas las etapas consecutivas. BPW: Agua de peptona tamponada; MSRV: Medio Semisólido Rappaport-Vassiliadis Modificado; BGA: Agar Verde Brillante; XLD Agar Xilosa-Lisina Deoxicolato; LB: Agar Luria-Bertani.

Se calculó la concordancia utilizando el índice *kappa* (*k*) entre el diagnóstico microbiológico (ISO 6579) y el molecular (PCR) y se interpretó según los criterios de Landis y Koch (Landis and Koch, 1977).

Perfiles de resistencia a antimicrobianos

Las cepas de *Salmonella* obtenidas en este estudio fueron caracterizadas mediante un análisis fenotípico que consistió en antibiogramas realizados mediante el método de difusión en disco ó técnica de Kirby-Bauer (Murray *et al.*, 2003) utilizando los 12 agentes (Tabla 2) recomendados por las autoridades sanitarias de la UE vigilancia epidemiológica armonizada de las salmonelosis animales (DOUE, 2007).

Para realizar los antibiogramas, se prepararon suspensiones bacterianas que contenían aproximadamente $1-2 \times 10^6$ UFC/mL en solución salina tamponada con fosfatos (PBS; pH 6,85), mediante ajuste espectrofotométrico (Spectrophotometer Analytic Jena, Alemania) a 600 nm de longitud de onda y 0,150 unidades de absorbancia. Con ellas, se sembraron 0,5 mL de suspensión en placas de agar Mueller-Hinton (MH; BBLTM Mueller Hinton II Agar, BD, EEUU) que se extendieron por toda la superficie con ayuda de un hisopo estéril (Thermofisher Scientific, España). Tras dejar secar las placas a temperatura ambiente durante 10 minutos, se depositaron los discos de antibióticos (BBLTM Sensi-Disc™, BD, EEUU) distribuidos equidistantes sobre la superficie de agar, ejerciendo una ligera presión con ayuda de una pinza estéril para asegurar el contacto del disco con la placa y, con ello, la correcta difusión del antibiótico.

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

Antimicrobianos		
Agentes	Familia	Mecanismo de acción
Ampicilina Amoxicilina-Clavulánico	Aminopenicilinas	Inhibición de la síntesis de la pared bacteriana
Cefotaxima	Cefalosporinas	
Cloranfenicol	Anfenicoles	
Estreptomicina Gentamicina Tetraciclina	Aminoglucósidos Tetraciclinas	Inhibición de la síntesis proteica
Ácido nalidíxico Ciprofloxacino	Quinolonas Naturales Quinolonas Fluoradas	Alteración del metabolismo o la estructura de los ácidos nucleicos
Sulfisoxazol	Sulfamidas	
Trimetoprim Trimetoprim-Sulfametoxazol	Diaminopirimidinas	Bloqueo de la síntesis de factores metabólicos

Tras la incubación de las placas a 37°C durante 20±2 horas, se midieron los diámetros de los halos de inhibición generados por cada disco y se clasificaron las cepas como susceptibles, intermedias o resistentes (Figura 5), según las recomendaciones del Instituto de Estándares Clínicos y de Laboratorio para cada antibiótico (CLSI, 2006). Como controles de cada experimento se utilizaron las cepas *Escherichia coli* ATCC 25922, *S. Typhimurium* ATCC 14028 y *S. Typhimurium* DT104.

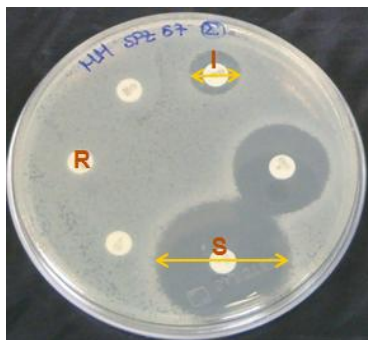


Figura 5. Técnica de Kirby-Bauer. Las flechas indican el diámetro de los halos de inhibición de una cepa susceptible (S), intermedia (I) y resistente (R) a distintos antibióticos.

Estudio epidemiológico y factores de riesgo

Para el estudio de los principales factores de riesgo asociados a la presencia de *Salmonella* en cerdos Basatxerri, se diseñó una encuesta epidemiológica con un total de 73 variables divididas en cinco secciones. Las variables analizadas estaban relacionadas con la localización geográfica de las explotaciones, el clima, la vegetación natural existente, el tipo de pienso, la administración de antibióticos y otras, según se resume en la Tabla 3. Además, se diseñó otra encuesta para analizar algunos parámetros productivos como son el peso entrada al cebadero, peso entrada al matadero, peso canal, ganancia media diaria e índice de conversión. Dichas encuestas fueron cumplimentadas en colaboración con el veterinario de la Asociación Txerrizaleok (D. Imanol Rekondo) y con el responsable de calidad del matadero (Dña. Rosa Larrañaga).

Tras cumplimentar las encuestas de las 12 explotaciones participantes en el estudio, se codificaron las variables, se elaboraron bases de datos en Excel® y se realizaron las comparaciones estadísticas pertinentes. En primer lugar, se valoró si las variables continuas se distribuían de un modo normal o no aplicando un test de Shapiro Wilk y de Levene (homogeneidad de las varianzas). Teniendo en cuenta que la distribución de las variables no se ajustaba a la normalidad, se compararon los resultados mediante tests no paramétricos (test de Wilcoxon) considerando la granja como la unidad experimental. En el caso de variables categóricas, se aplicó un test Chi Cuadrado (χ^2) o el test de Fisher Exacto, para valorar la posible asociación entre las variables considerando también la granja como unidad experimental. Como variable de respuesta a los potenciales factores de riesgo, la prevalencia de salmonelosis en la granja se consideró, según el caso, como variable continua (i.e. porcentaje de animales infectados en la granja; n=180) o como variable categórica, considerando el *cut-off* del 20% de prevalencia (i.e. baja o alta prevalencia en granjas con presencia de *Salmonella* en menos o más del 20% de los cerdos, respectivamente; n=12). A continuación, las variables detectadas como significativas en el análisis univariante se valoró si estaban asociadas entre si aplicando un test Chi Cuadrado o un test de

Fisher exact en el caso de variables categóricas o un análisis de colinealidad en el caso de las variables continuas. Finalmente, se seleccionaron únicamente aquellas variables que no mostraban asociación entre ellas para incluirlas en un análisis multivariante. Así, la prevalencia de salmonelosis en la granja (variable continua) o como variable categórica fueron analizadas mediante análisis multivariantes continuo y logístico, respectivamente. Todas las comparaciones estadísticas se realizaron con el programa estadístico SPSS (IBM, Chicago).

Tabla 3. Secciones de la encuesta epidemiológica y resumen de las variables analizadas para determinar los factores de riesgo asociados a la salmonelosis del porcino extensivo de este trabajo.

Secciones	Variables analizadas
Características de la explotación	Número total de plazas; origen de las madres; número de trabajadores; antigüedad de las instalaciones; tipo de comedero y bebedero; distancia a la explotación porcina más cercana
Medidas de Bioseguridad	Frecuencia de limpieza y desinfección de las instalaciones; acceso de perros/gatos a la explotación; control de roedores y pájaros; ropa y botas de uso exclusivo para cada trabajador
Sanidad	Mortalidad; aspecto de las heces; antibióticos administrados y frecuencia de administración
Alimentación	Tamaño de partícula; forma de suministrar el pienso; alimentación seca o húmeda; principal alimento que reciben del ganadero o del entorno; fábrica de origen del pienso; frecuencia de limpieza y desinfección de los silos y comederos; tratamiento del agua de bebida,
Ganadero	Edad; formación; antigüedad en la actividad

Estudio del microbioma intestinal

A partir de los resultados de prevalencia de *Salmonella* spp., se seleccionaron un total de 35 muestras para analizar los perfiles de microbioma intestinal en animales procedentes de granjas con muy alta prevalencia vs. ausencia del patógeno en heces. En una primera etapa, se seleccionaron 20 muestras de dos explotaciones (n=10) “gold standard” (i.e. animales criados en la misma época del año y procesados en la misma jornada y en idénticas condiciones, cuya única diferencia era la zona geográfica de origen y el tipo de alimentación recibida) en las que *Salmonella* se había aislado en 13 de los 15 animales analizados (n=10) o en ninguno de ellos (n=10).

Para comprobar la reproducibilidad de los perfiles de microbioma obtenidos, se analizaron otras dos explotaciones similares, una negativa (n=10) y otra positiva (n=5). El análisis de microbioma se realizó mediante secuenciación masiva de las regiones hipervariables V1 y V2 del gen 16S RNA, en un equipo PGM Ion Torrent (Life Technologies), en el Servicio Veterinario de Genética Molecular de la Universidad Autónoma de Barcelona (UAB), utilizando las muestras de heces que se habían conservado congeladas (1 gr/muestra) inmediatamente tras su recogida. El análisis bioinformático de las secuencias obtenidas se realizó en el mismo servicio de la UAB,

con el programa QIIME v1.8.0., agrupando las secuencias que mostraban un 97% de identidad en clústeres u OTUs (del inglés, *Operational Taxonomic Units*) y alineación de las secuencias representativas mediante el programa PyNAST, para comparar contra la base de datos prealineada Greengenes 13.8.

Los resultados obtenidos se expresaron como el número relativo de lecturas para cada secuencia y el listado de secuencias para cada muestra individual y se representaron gráficamente como: (i) Chao1, PD whole tree y Shannon para analizar el número de especies diferentes por muestra (Diversidad alfa); (ii) diagrama tridimensional de los *Principal Coordinate Analysis* (PCoA) plots, para analizar las diferencias entre comunidades bacterianas (Diversidad beta) mediante un análisis de distancias filogenéticas UniFrac, utilizando las matrices Weighted y UnWeighted; y (iii) histograma de frecuencias para analizar en cada muestra de contenido intestinal el porcentaje total de OTUs a nivel de los diferentes taxones, i.e. *phylum*, Clase, Orden, Familia, Género y especie bacterianas (Navas-Molina *et al.*, 2013).

Una vez observados los resultados gráficos, se realizaron las comparaciones estadísticas para cada tipo de datos obtenidos. Las comparaciones entre distancias filogenéticas que componían las comunidades bacterianas (Diversidad beta), se realizaron mediante un Análisis de Similitud ANOSIM en el que los valores *R* (comprendidos entre -1 y 1) cercanos a 0 indicaron ausencia de diferencias entre poblaciones, mientras que un valor cercano a 1 indicó que existen diferencias significativas ($p < 0,05$) entre los grupos comparados. Finalmente, para analizar las diferencias del porcentaje de taxones identificados entre grupos, se utilizó el test no paramétrico de Mann-Whitney-U o el de Kruskal-Wallis, con la corrección para análisis múltiple de Benjamini & Hochberg's False Discovery Rate (FDR).

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Prevalencia de *Salmonella* spp.

De los 180 animales analizados, se aisló *Salmonella* spp. en un total de 58 (32,2%) animales pertenecientes a 10 de las 12 (83,3%) explotaciones analizadas, con una prevalencia media individual del 38,7% (Tabla 4). Un 66,7% de las explotaciones presentaron más del 20% de los animales portadores de *Salmonella* spp. en heces (Tabla 4).

Tabla 4. Prevalencia de *Salmonella* spp en heces de cerdos de engorde criados en sistema de producción extensivo.

Parámetros	Aislamiento de <i>Salmonella</i> spp
No. (%) ^a cerdos positivos ^b / total cerdos	58/180 (32,2%; 25,8-39,3)
No. (%) ^a granjas positivas ^b / total granjas	10/12 (83,3%; 55,2-95,3)
No. (%) ^a cerdos positivos ^b / total de cerdos en granjas positivas	58/150 (38,7; 31,2-46,6)
No. (%) granjas con >20% prevalencia/ total granjas	8/12 (66,7%)

^a media e intervalo de confianza al 95% (IC₉₅); ^b cerdos o granjas donde se aisló *Salmonella* spp en la muestra de heces de, al menos, un individuo.

El cultivo con el método ISO 6579 proporcionó resultados de prevalencia (tanto colectiva como individual) estadísticamente similares ($p \geq 0,20$) a los del método molecular, pero sin detectar el patógeno en 11 animales (Tabla 5). Aunque la concordancia entre ambas técnicas diagnósticas fue casi perfecta ($k=0,851$), el método molecular mostró un 19% más de sensibilidad diagnóstica que la ISO 6579, para una especificidad del 100% con ambos métodos diagnósticos (Tabla 5). Existen diversos trabajos científicos que demuestran una mayor sensibilidad de los métodos de diagnóstico molecular (Mainar-Jaime *et al.*, 2013).

Tabla 5. Comparación de resultados entre el método ISO 6579 (ISO) y el método molecular (PCR) para la prevalencia de *Salmonella* spp. en heces de porcino extensivo del norte de España.

	ISO +	ISO -	Total
PCR +	47	11	58
PCR -	0	122	122
Total	47	133	180

El aislamiento del patógeno en las heces de cerdos, es un indicador del estado sanitario a nivel de rebaño, si bien se ha demostrado que no existe correlación entre la excreción de *Salmonella* en heces y la infección en GLM, debido a la ingestión y supervivencia del patógeno en el medio sin atravesar la barrera intestinal (Sánchez-Alarcón, 2015). La ventaja del muestreo de heces es que permiten la recogida de gran número de muestras *in vivo* y seguimientos epidemiológicos longitudinales. Sin embargo, la toma de heces en granja puede conllevar contaminación cruzada, que en

nuestro estudio hemos evitado mediante la toma de muestras del CI en la cadena de sacrificio.

Existen muy pocos trabajos sobre salmonelosis en porcino extensivo, habiéndose descrito un 5,3% de infección en GLM de cerdos ibéricos pertenecientes al 33% de los rebaños analizados (Gomez-Laguna *et al.*, 2011). Esta baja prevalencia puede ser debida al diferente tipo y cantidad de muestra utilizado (i.e. 1 gramo de GLM vs. los 25 gramos de heces utilizados en nuestro estudio). En nuestras condiciones, idénticas a las utilizadas en el estudio europeo de referencia en porcino intensivo, la prevalencia de salmonelosis en porcino extensivo fue muy similar a la reportada por España (EFSA, 2008b) y Aragón (Vico *et al.*, 2011) en intensivo, donde en torno al 30% de los animales mostraron infecciones por *Salmonella*, en condiciones de laboratorio comparables. Sin embargo, el porcino extensivo mostró una prevalencia muy superior a la del porcino de engorde intensivo de la C.F. de Navarra (8,4% de los animales) (Sánchez-Alarcón, 2015).

Caracterización de las cepas de *Salmonella* aisladas

El conocimiento de los serotipos y RA de las cepas de *Salmonella* circulantes es necesario tanto para aplicar tratamientos antibióticos adecuados como para el seguimiento epidemiológico, i.e. identificación del origen de la contaminación y control de la expansión de clones portadores de elementos genéticos móviles con multi-RA. Por ello, las 58 cepas de *Salmonella* aisladas fueron caracterizadas mediante serotipado y perfiles de RA frente a 12 agentes de diferente familia antimicrobiana (Tabla 3). Como resultado, se detectó la presencia de cepas pertenecientes a 6 serotipos de *Salmonella enterica* de 4 serogrupos diferentes (Tabla 6). El serotipo más frecuente fue *S. Typhimurium* variante monofásica 4,5,12:i:- (46/58; 79,3%) seguido por *S. Bovismorbificans* (6/58; 10,3%), ambos pertenecientes al serogrupo B (Tabla 6). Estos serotipos fueron iguales a los identificados en porcino intensivo de España y UE (EFSA, 2008c; Vico *et al.*, 2011) y diferentes a los descritos en cerdo ibérico, i.e. Anatum y Typhimurium (Gomez-Laguna *et al.*, 2011). Seis de las 10 explotaciones positivas presentaron únicamente *S. 4,5,12:i:-* y otras 2 explotaciones presentaron animales portadores tanto de este serotipo como de otros (Tabla 6). Curiosamente, las explotaciones que sólo presentaron el serotipo monofásico, presentaron también un mayor número de animales positivos (entre el 46,7% y el 86,7%) (Tabla 6).

Los antibiogramas indicaron que la mayoría (52/58; 89,7%) de las cepas analizadas poseían RA frente a al menos uno de los antimicrobianos testados, siendo estreptomicina (51/58; 87,9%) y sulfisoxazol (44/58; 75,7%) los antibióticos que con más frecuencia generaron RA, seguido de la ampicilina (31/58; 53,4%) y tetraciclina (24/58; 41,4%) (Tabla 6). En otros estudios realizados en porcino ibérico, la estreptomicina y la tetraciclina fueron también los antibióticos frente a los que se generaron mayor número de cepas con RA (Gomez-Laguna *et al.*, 2011). Con respecto a los perfiles de multi-RA, el 86,2% (50/58) de las cepas aisladas mostraron RA a, al menos, 2 antibióticos de familias diferentes. En concreto, se encontraron 11 perfiles multi-RA diferentes, siendo los más frecuente ASSuT (15/58, 25,8%), SSu (11/58, 18,9%) y ASSu (8/58, 13,8%), perteneciendo todos ellos al serotipo *S. 4,5,12:i:-* (Tabla 6).

En el estudio de la UE el porcentaje de cepas que presentó RA fue del 59% (EFSA-ECDC, 2012), similares a los obtenidos en el estudio de la C.F. de Navarra (Sánchez-Alarcón, 2015), y mucho menores que los detectados en nuestro estudio. El serotipo Typhimurium variante monofásica con multi-RA ASSuT, pone de manifiesto la necesidad de controlar los clones epidémicos para evitar su diseminación en las

granjas de porcino extensivo. La aparición de RA en porcino está asociada al uso indiscriminado de antibióticos en el pasado, tanto en animales como en humanos. En la actualidad se está concienciando a veterinarios y ganaderos del sector en este tema para evitar agravar este problema y buscar alternativas al uso de antibióticos (Gupta *et al.*, 2003; Riano *et al.*, 2006; Rodríguez *et al.*, 2009).

Tabla 6. Prevalencia, serotipos y resistencia antimicrobiana (RA) de *Salmonella spp.* aisladas en muestras de contenido intestinal recogidas en matadero de cerdos Basatxerri y procesadas según ISO 6579 y diagnóstico molecular.

No. (%) de muestras positivas/ total	Serotipo (No. de cepas)	Serogrupo	Perfil de RA ^a (No. de cepas)
13/15 (86,7%)	4,5,12:i:- (13)	B	SSu (5); ASSuT (4); ASSu (2); ACSSuT (2)
8/15 (53,3)	4,5,12:i:- (8)	B	ACS (3); CS (2); ACSSu (1); AS (1); ACSSuT (1)
7/15 (46,7%)	4,5,12:i:- (7)	B	SSu (4); ASSuT (3)
7/15 (46,7%)	4,5,12:i:- (7)	B	ASSu (4); ASSuT (2); SSu (1)
6/15 (40%)	4,5,12:i:- (5); <i>diarizonae</i> (1)	B Z	ASSuT (3); SSu (1); A (1) Susceptible (1)
5/15 (33,3%)	Bovismorbificans (4); Altona (1)	C2-C3 C2-C3	ACSSuT (2); CSSuT (2); S (1)
4/15 (26,7%)	Bovismorbificans (2); Meleagridis (2);	E1 C2-C3	CSSuT (2); Susceptible (2)
4/15 (26,7%)	4,5,12:i:- (2); Amsterdam (1); Altona (1)	B E1 C2-C3	ASSuT (2); Susceptible (2)
3/15 (20%)	4,5,12:i:- (3)	B	ASSu (2); Susceptible (1)
1/15 (6,7%)	4,5,12:i:- (1)	B	ASSuT (1)
0/15 (0%)	N.A.	N.A.	N.A.
0/15 (0%)	N.A.	N.A.	N.A.
58/180 (32,2%)	6 serotipos (58)	4 serogrupos	11 perfiles de RA

N.A.: no aplica; ^a Familias de antimicrobianos A: Aminopenicilinas; C: Anfénicoles; S: Aminoglucósidos; Su: Sulfamidas; T: Tetraciclinas.

Factores de riesgo de salmonelosis asociados a granjas en extensivo

Tras cumplimentar las encuestas en las granjas y en matadero, se procedió a codificar las variables y depurar los datos. Las preguntas que no fueron respondidas o para las que todas las granjas dieron la misma respuesta fueron eliminadas del análisis estadístico. Así, además de las 15 variables comunes a todas las granjas, no se detectaron diferencias significativas entre los cinco parámetros productivos (media \pm SD) analizados: peso entrada al cebadero (29,3 kg, \pm 3,9), peso entrada al matadero (154,3 kg \pm 8,7), peso canal (118 kg \pm 6,6), ganancia media diaria (773,6 \pm 54,3) e índice de conversión (3,76 \pm 0,238). Como resultado, se analizaron un total de 52 variables. Con la finalidad de obtener resultados más robustos, se consideraron significativos únicamente los factores de riesgo que mostraron valores de $p \leq 0,05$.

En el análisis univariante se identificaron cuatro variables (Tabla 7) relacionadas con la presencia de *Salmonella* spp. en heces, presentando mayor riesgo los animales pertenecientes a explotaciones: (i) de mayor tamaño (> 100 cerdos); (ii) que utilizaron el Pienso A vs. los Piensos B y C; (iii) con vegetación exclusivamente a base de hierba vs. aquellas en las además había castañas, bellotas y hayucos a disposición de los animales; y (iv) donde no se podía hacer limpieza y desinfección de los silos.

Tabla 7. Factores de riesgo asociados a salmonelosis en porcino extensivo del norte de España, vs. mediante análisis uni- y multi-variantes.

Factor de riesgo	Análisis estadístico (valores de p)			
	univariante		multivariante	
	Continuo	Logístico	Continuo	Logístico
i) Explotaciones grandes (>100 animales)	0,02	0,06	0,11	0,99
ii) Alimentación con Pienso A	0,13	0,02	0,29	0,008
iii) Alimentación extra sólo con hierba	0,38	0,02	N.A.	N.A.
iv) Imposibilidad de limpieza y desinfección de los silos	0,04	0,02	N.A.	N.A.

N.A.: no aplica por tratarse de variables asociadas estadísticamente al factor ii).

El número de granjas analizadas (i.e. 12 de las 32 existentes) fue adecuado para determinar la prevalencia de salmonelosis, sin embargo, este aspecto junto con el alto número de variables a analizar, determinó la necesidad de utilizar modelos multivariantes altamente exigentes que permitieran obtener resultados fiables (i.e. con una baja probabilidad de error tipo alfa). Para ello, el análisis multivariante se realizó únicamente con aquellas variables que habían mostrado valores de p altamente significativos en el modelo univariante, a expensas de no haber detectado otras variables que podrían haber sido significativas (por elevado error tipo beta).

El análisis de asociación con estas cuatro variables indicó que tres de ellas estaban asociadas entre sí ($p < 0,05$), que fueron: (ii) la composición del pienso; (iii) tipo de alimento vegetal extra disponible; y (iv) la limpieza y desinfección de los silos. Como puede apreciarse en la Tabla 8, esta asociación se debió a que, por un lado, las explotaciones con mayor prevalencia de *Salmonella* utilizaban el Pienso A (con soja y pulpa de remolacha) y, a su vez, los animales disponían de hierba como único

alimento extra, además de contar con silos anticuados que no permitían una adecuada limpieza y desinfección de los mismos; y, por otro lado, las explotaciones en las que no se aisló *Salmonella* utilizaban Piensos B o C (con habas y harina de semilla de soja), los animales disponían de bellotas, castañas y hayucos como suplemento extra, y los silos permitían hacer tratamientos higiénicos, si bien no existían programas definidos en cuanto a la frecuencia de limpieza y desinfección de los mismos. Por ello, se consideró que la alimentación (pienso y vegetación extra) disponible para los animales era un parámetro más consistente que la posibilidad de hacer limpieza y desinfección de los silos, para ser considerado en el análisis multivariante.

Para resolver esta asociación, el análisis multivariante se realizó introduciendo en el modelo la “composición del pienso” (Pienso A vs. B/C) como variable asociada más interesante y el “tamaño de la explotación” (>100 vs. ≤100 animales/explotación) como variable independiente. Como resultado, el modelo logístico indicó una fuerte significación estadística ($p=0,008$) de la administración del Pienso A como factor de riesgo de salmonelosis en los animales analizados (Tabla 7).

Tabla 8. Características de las variables significativas en el análisis univariante de factores de riesgo asociados a salmonelosis en porcino extensivo Basatxerri.

Código de explotación	Prevalencia de <i>Salmonella</i> en contenido intestinal	Variables significativas			
		No. de plazas	Composición del pienso	Alimento extra disponible	Limpieza/desinfección de silos
1.6 ^a	86,7%	140	A	Hierba	Poco/ No
2.8	53,3%	130	B	Bellota	Poco/ No
3.4 ^a	46,7%	160	A	Hierba	Poco/ No
4.12	46,7%	140	A	Hierba	Poco/ No
5.9	40%	110	A	Bellota	Poco/ No
6.11	33,3%	140	A	Hierba	Poco/ No
7.5	26,7%	80	A	Hierba	Poco/ No
8.10	26,7%	120	A	Hierba	Poco/ No
9.1	20%	140	B	Castaña y Hayuco	Frecuente/ Sí
10.2	6,7%	100	B	Bellota	Frecuente/ Sí
11.3 ^b	0%	100	B	Bellota	Frecuente/ Sí
12.7 ^b	0%	100	C	Castaña y Hayuco	Poco/ No

Muestras seleccionadas para el estudio del microbioma intestinal: ^acon aislamiento; o ^bausencia de *Salmonella* spp.

Al seleccionar uno a uno cualquiera de los otros dos parámetros asociados, se obtuvieron resultados equivalentes a los del parámetro (ii). Sin embargo, la existencia de asociación estadística y la escasa variabilidad existente entre los dos parámetros no permitió valorar el peso relativo de ambos parámetros no incluidos en el modelo. Este resultado sugiere que sería muy interesante realizar el muestreo de explotaciones que tengan suficiente variabilidad en los parámetros identificados en este trabajo como asociados para, con ello, dilucidar el peso relativo que tienen estos factores de riesgo separadamente y/o detectar otros no identificados por la alta exigencia del modelo, si es que realmente existen.

El efecto de los tres factores de riesgo asociados entre sí, con respecto a la salmonelosis puede explicarse desde dos puntos de vista: una mayor ingesta del patógeno y/o la composición del pienso (Funk and Gebreyes, 2004). Así, por un lado, el riesgo asociado al consumo de Pienso A podría ser debido a un tratamiento térmico defectuoso o insuficiente del granulado; o a la existencia de contaminaciones cruzadas durante el procesado, almacenamiento o transporte del pienso, que favorecen una mayor ingesta del patógeno. Además, la contaminación del pienso puede proceder de los silos donde no se realiza una adecuada limpieza y desinfección, especialmente por estar expuesto a roedores, pájaros, insectos y otros vectores de vida libre incontrolables en explotaciones extensivas, lo que favorece la transmisión del patógeno (Andres-Barranco *et al.*, 2014).

Por otro lado, y no menos importante, el origen del pienso podría determinar la calidad de los ingredientes (materia prima y/o aditivos) utilizados en la formulación y la estructura física del pienso. Este aspecto, asociado o no a la calidad nutricional de la vegetación del entorno, podría condicionar la composición de las poblaciones bacterianas en el tracto digestivo de los cerdos de extensivo. De esta manera, los cerdos de extensivo alimentados con productos más nutritivos pueden desarrollar una microbiota capaz de impedir la presencia de *Salmonella* spp. en el intestino, mediante la creación de un microambiente adecuado (e.g. acidificación del tracto digestivo) y/o la proliferación de otras poblaciones bacterianas que promueven la exclusión competitiva del patógeno. Para abordar esta hipótesis, en la última parte del trabajo, analizamos el perfil del microbioma intestinal en poblaciones de cerdos representativas de distintos tipos de alimentación y con distinta prevalencia de *Salmonella* en el contenido intestinal (explotaciones 1.6, 12.7, 11.3 y 3.4; Tabla 8).

Secuenciación masiva del microbioma

La secuenciación masiva del contenido intestinal y análisis bioinformático indicó que la población “*gold standard*” portadora del patógeno (n=10) poseía mayor ($p<0,05$) número de especies bacterianas por muestra (diversidad alfa) que la población libre del patógeno (resultados no mostrados). Resultados similares se obtuvieron con las 35 muestras seleccionadas para el estudio a una profundidad de lectura de 43.418 secuencias para cada una de las muestras (*depth*), observando un número medio de especies de 4.255 en las muestras positivas y de 3.938 en las negativas a *Salmonella*.

El análisis de la diversidad beta mostró un agrupamiento significativo (UnWeighted UniFrac ANOSIM valor $R=0,05$; $p=0,001$) de las muestras positivas entre sí y las negativas entre sí, mostrando microbiomas bien definidos y diferentes para cada población en el diagrama tridimensional de PCoA (Figura 6A). A continuación, para confirmar este resultado, se analizaron otras 10 muestras negativas y 5 muestras positivas (explotaciones 11.3 y 3.4, respectivamente; Tabla 8). Los resultados obtenidos en este segundo análisis fueron prácticamente idénticos a los obtenidos en la población “*gold standard*”, lo que refuerza los resultados (Figura 6B). La matriz Weighted UniFrac no se consideró informativa puesto que considera no sólo la presencia/ausencia sino también la abundancia de OTUs, lo que disminuye la correlación.

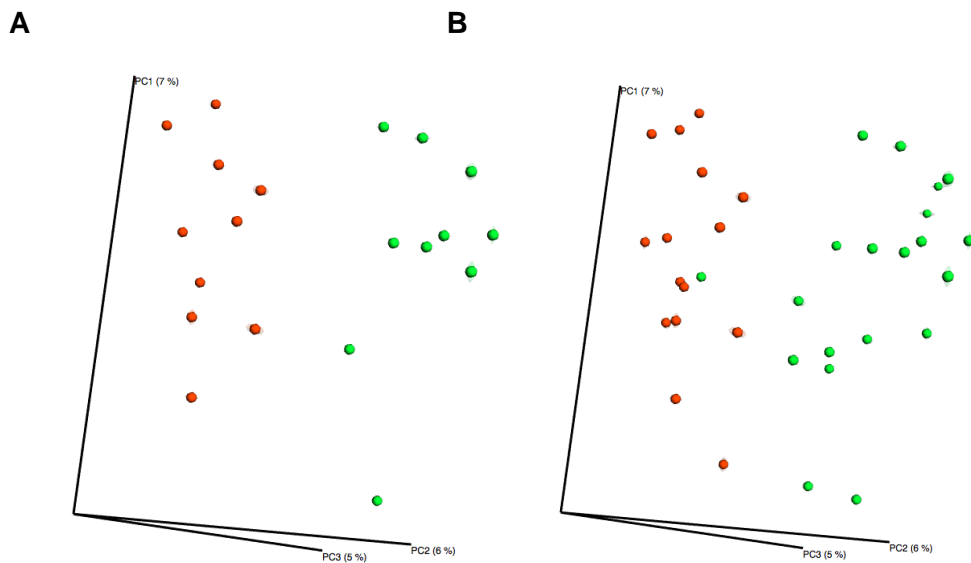


Figura 6. Diagrama tridimensional de los PCoA plots del microbioma intestinal de cerdos de engorde criados en producción extensiva del norte de España, con diferente prevalencia de *Salmonella*. Los símbolos muestran las distancias filogenéticas UnWeighted UniFrac: en rojo, muestras positivas de explotaciones con alta prevalencia; en verde, muestras negativas de explotaciones donde no se aisló *Salmonella* en ninguno de los animales analizados. Panel A: población “gold standard” (n=20); Panel B: población total sometida a estudio (n=35).

El análisis bioinformático del porcentaje de taxones diferentes hallados en los 35 animales analizados, detectó un total de 21 *phylum* bacterianos, siendo predominantes *Firmicutes* (50,3%) y *Bacteroidetes* (38,4%) seguidos de *Proteobacterias* (5,2%) y *Espiroquetas* (2,4%) (resultados no mostrados). Estos resultados fueron similares a los descritos por Bearson y colaboradores en lechones infectados experimentalmente con *S. Typhimurium* (Bearson *et al.*, 2013). Al analizar separadamente las poblaciones positivas y negativas a *Salmonella*, se observó un desplazamiento significativo de la microbiota en las muestras positivas a *Salmonella* spp., aumentando la proporción de *Firmicutes* y *Proteobacterias* asociado a un descenso de *Bacteroidetes* (Figura 7).

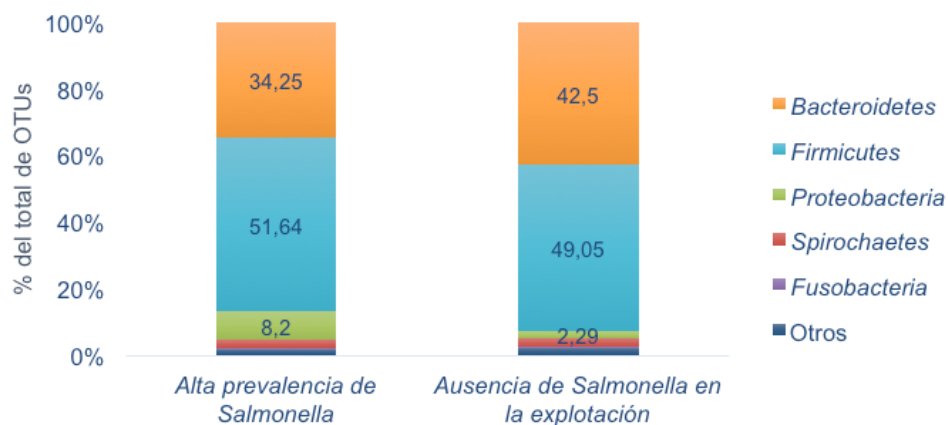


Figura 7. Principales *phylum* bacterianos detectados en el microbioma intestinal de porcino extensivo del Norte de España, en muestras de heces positivas (n=15; izquierda) y negativas (n=20; derecha) a *Salmonella* spp.

Considerando globalmente todas las muestras analizadas, se detectaron 147 familias y 321 géneros bacterianos diferentes. Las familias predominantes fueron *Clostridiaceae* (13,2%) y *Ruminococaceae* (11,5%) ambos del *phylum Firmicutes*, seguidas de *Prevotellaceae* (10,4%) y *Paraprevotellaceae* (9,5%) pertenecientes al *phylum Bacteroidetes*. La predominancia de estas familias ha sido descrita previamente en lechones (Bearson *et al.*, 2013). Se ha descrito que la familia *Ruminococaceae* es más abundante en portadores asintomáticos con baja excreción de *Salmonella* (Bearson *et al.*, 2013), favoreciendo este ambiente que *Salmonella* atraviese la barrera entérica y se establezca asintomáticamente (Nava and Stappenbeck, 2011). A nivel de género, los mayoritarios fueron *Prevotella* (10,3%), *Clostridiaceae*/SMB53 (7,3%) y 02d06 (5%) en el conjunto global de las muestras analizadas. Puesto que esta información no diferencia las poblaciones con y sin aislamiento de *Salmonella* spp., no se muestra mayor detalle de estos resultados por no contribuir sustancialmente a nuestro estudio.

Cuando se consideraron separadamente las poblaciones con y sin aislamiento de *Salmonella* spp, se detectó mayor abundancia de las familias *Prevotellaceae* y *Clostridiaceae* en los animales libres del patógeno (Tabla 9). Por otro lado, los que mostraban *Salmonella* spp. en heces contenían una mayor proporción de los géneros *Acinetobacter* y *Solibacillus* acompañada de un descenso de *Prevotella* y *Clostridiaceae*/02d06 (Tabla 9). El género *Prevotella* se caracteriza por fermentar la glucosa y la maltosa, producir ácidos acético y succínico (Murray *et al.*, 2003), que podrían estar involucrado en una bajada del pH que podría impedir el desarrollo de *Salmonella* spp. en el intestino de los cerdos. *Sucinivibrio* no ha sido aislado en nuestro trabajo, siendo uno de los géneros más abundantes en un trabajo previo realizado con muestras de lechones sometidos a condiciones experimentales de granja y negativos a *Salmonella* (Bearson *et al.*, 2013).

Tabla 9. Familias y Géneros bacterianos predominantes en muestras de contenido intestinal con presencia o ausencia de *Salmonella* spp. en porcino extensivo del norte de España.

Phylum	Familia/Géneros	% Bacterias vs. total bacterias detectadas en cerdos con aislamiento de <i>Salmonella</i>	
		positivo	negativo
<i>Bacteroidetes</i>	<i>Prevotellaceae/Prevotella</i>	8,3%	12,4%
	<i>Bacteroidaceae/Parabacteroides</i>	1,9%	0,7%
<i>Firmicutes</i>	<i>Clostridiaceae</i> /SMB53	7,3%	7,3%
	<i>Clostridiaceae</i> /02d06	3,6%	6,4%
	<i>Bacillaceae/Solibacillus</i>	2,8%	0,8%
	<i>Erysipelotrichaceae/Turicibacter</i>	2,5%	2,7%
	<i>Erysipelotrichaceae</i> /p-75-a5	2,4%	1,3%
	<i>Bacillaceae/Bacillus</i>	2,4%	2,8%
	<i>Lactobacillaceae/Lactobacillus</i>	1,9%	0,7%
	<i>Streptococcaceae/Streptococcus</i>	0,9%	1,1%
<i>Proteobacteria</i>	<i>Moraxellaceae/Acinetobacter</i>	3,1%	0%
<i>Spirochaetes</i>	<i>Spirochaetaceae/Treponema</i>	1,8%	1,9%
<i>Fusobacteria</i>	<i>Fusobacteriaceae/Fusobacterium</i>	0,7%	0,7%

2

Las comparaciones estadísticas de los OTUs identificados en el microbioma intestinal, indicaron la existencia de diferencias ($p < 0,05$ en el test de Mann-Whitney-U con la corrección FDR) en diez familias bacterianas, entre la microbiota de animales procedentes de explotaciones con alta y nula prevalencia de *Salmonella* spp., con mayor peso estadístico ($p < 0,05$ en el test de Bonferroni) de las *Mycoplasmataceae*, *Enterobacteriaceae*, *Verrucomicrobiaceae* y *Pseudomonadaceae* (Tabla 10). Entre estas cuatro familias, las tres últimas presentaron mayor porcentaje de bacterias en los animales que presentaban *Salmonella* spp. en el contenido intestinal, mientras que los no infectados presentaban una mayor proporción de *Mycoplasmataceae* (Tabla 10).

Tabla 10. OTUs de familias bacterianas que mostraron diferencias significativas en la composición del microbioma intestinal en cerdos extensivo del norte de España procedentes de explotaciones con alta prevalencia (*Salmonella* positivos) o ausencia (*Salmonella* negativos) de *Salmonella* spp.

OTUs ^a	Porcentaje de familias bacterianas encontradas en explotaciones con prevalencia de <i>Salmonella</i>		Test estadísticos (valores <i>p</i>)		
	Alta	Nula	Mann-Whitney-U	Valor FDR ajustado	Bonferroni
<i>p__Tenericutes;c__Mollicutes;o__Mycoplasmatales;f__Mycoplasmataceae</i>	0%	0,04%	7,75E-05	0,004	0,007
<i>p__Proteobacteria;c__Gammaproteobacteria;o__Enterobacteriales;f__Enterobacteriaceae</i>	4,06%	0,10%	1,10E-04	0,004	0,010
<i>p__Verrucomicrobia;c__Verrucomicrobiae;o__Verrucomicrobiales;f__Verrucomicrobiaceae</i>	0,18%	0,02%	1,59E-04	0,004	0,014
<i>p__Proteobacteria;c__Gammaproteobacteria;o__Pseudomonadales;f__Pseudomonadaceae</i>	0,60%	0,01%	1,96E-04	0,004	0,017
<i>p__Firmicutes;c__Clostridia;o__Clostridiales;f__Ruminococcaceae</i>	13,66%	9,98%	1,73E-03	0,026	0,150
<i>p__Proteobacteria;c__Betaproteobacteria;o__Burkholderiales;f__Comamonadaceae</i>	0,55%	0%	1,85E-03	0,026	0,161
<i>p__Proteobacteria;c__Gammaproteobacteria;o__Pseudomonadales;f__Moraxellaceae</i>	4,24%	0,10%	2,08E-03	0,026	0,181
<i>p__TM7;c__TM7-3;o__CW040;f__F16</i>	0,10%	0,04%	4,14E-03	0,041	0,360
<i>p__Bacteroidetes;c__Flavobacteriia;o__Flavobacteriales;f__[Weeksellaceae]</i>	0,02%	0%	4,23E-03	0,041	0,368
<i>p__Firmicutes;c__Clostridia;o__Clostridiales;f__[Mogibacteriaceae]</i>	1,14%	0,76%	5,66E-03	0,049	0,493

^a p: *Phylum*; c: Clase; O: orden; F: Familia

En definitiva, los resultados obtenidos en este estudio indicaron que la dieta recibida condiciona el tipo de microbioma intestinal de los cerdos de producción extensiva del norte de España y, a su vez, es un factor decisivo en la presencia de *Salmonella* spp. en el contenido intestinal de estos animales. Son necesarios nuevos estudios que permitan determinar el peso relativo que tiene el tipo de pienso vs. al que tiene la vegetación autóctona accesible para los animales de vida libre, puesto que las poblaciones de cerdos analizadas mostraron una asociación estadística de ambas variables, habiéndose utilizado el Pienso A (elaborado con soja como fuente de proteína y pulpa de remolacha como aporte de fibra muy poco lignificada y fácilmente fermentable) combinado con vegetación a base de hierba vs. los Piensos B/C (elaborados con habas y harina de semilla de colza como fuente proteica, puesto que el déficit en aminoácidos azufrados de las habas es corregido con la harina de semilla de colza rica en estos) combinados con bellotas, castañas y hayucos. Asimismo, este primer estudio en porcino extensivo sugiere que la composición de los piensos administrados a cerdos de engorde intensivo podrían influir de forma decisiva en la composición de su microbioma intestinal y, con ello, en la prevalencia de salmonelosis porcina. En esta línea, el grupo de Sanidad Animal del IdAB-CSIC está llevando a cabo un estudio de este tipo con piensos elaborados exclusivamente con materias primas consideradas tradicionalmente de buena calidad (cebada, trigo y maíz) vs. otros piensos que contienen gran número de otras materias primas (como soja, sorgo, mandioca, pulpa o melaza de remolacha) que, por su naturaleza, podrían desequilibrar el microbioma intestinal porcino y, con ello, favorecer la presencia de *Salmonella* en el contenido intestinal.

CONCLUSIONES

1. La prevalencia general de *Salmonella* spp. en el contenido intestinal del porcino extensivo del norte de España fue elevada, situándose a los niveles descritos para el porcino de engorde en sistemas intensivos de las principales CC.AA. de nuestro país. Las cepas circulantes en estos animales son mayoritariamente la variante monofásica de *S. Typhimurium* (emergente en casos humanos en Europa) con resistencia múltiple a antibióticos de las familias ASSuT, indicando todo ello la necesidad de vigilancia epidemiológica para prevenir problemas de Salud Pública.

2. Los factores de riesgo asociados a la salmonelosis del porcino extensivo de este estudio están estrechamente ligados a la nutrición, de forma que los animales alimentados con bellotas, castañas y hayucos junto con un pienso que contenía habas y harina de semillas de colza mostraron menor prevalencia de *Salmonella* en heces que los alimentados con pienso a base de soja y pulpa de remolacha y acceso a vegetación únicamente de hierba. La asociación estadística observada entre estos factores de riesgo no permite determinar con precisión el peso relativo de cada uno de ellos individualmente, por lo que deberían ser analizados en un estudio posterior, específicamente diseñado y, con ello, determinar el tipo de pienso más adecuado para reducir la prevalencia de esta importante zoonosis de forma sostenible adecuada a cada entorno natural.

3. Los tipos de alimentación detectados en este estudio como factores de riesgo de salmonelosis se correspondieron con perfiles del microbioma intestinal porcino claramente diferenciados entre animales con alta vs. nula presencia del patógeno en el contenido intestinal. Las diferencias estadísticas de los OTUs del microbioma intestinal identificaron una mayor presencia de bacterias de las familias *Enterobacteriaceae*, *Verrucomicrobiaceae* y *Pseudomonadaceae* en los animales con mayor presencia de *Salmonella* spp. en el contenido intestinal. Estas poblaciones microbianas podrían condicionar una mayor supervivencia del patógeno en el intestino o, por el contrario, su exclusión competitiva del entorno intestinal, aspectos que deberían ser dilucidados en estudios posteriores.

BIBLIOGRAFÍA

- Adams, C.A., 2000. Virtues of Cleanliness. Total Nutrition Feeding Animals for Health and Growth, 37-45.
- Andres-Barranco, S., Vico, J.P., Garrido, V., Samper, S., Herrera-Leon, S., de Frutos, C., Mainar-Jaime, R.C., 2014. Role of wild bird and rodents in the epidemiology of subclinical salmonellosis in finishing pigs. Foodborne pathogens and disease 11, 689-697.
- Barragán, J.I., 2012. El uso de alternativas a los promotores de crecimiento en la producción avícola. http://www.wpsa-aeca.es/aeca_imgs_docs/18_07_37_Barragan.pdf.
- Bearson, S.M., Allen, H.K., Bearson, B.L., Looft, T., Brunelle, B.W., Kich, J.D., Tuggle, C.K., Bayles, D.O., Alt, D., Levine, U.Y., Stanton, T.B., 2013. Profiling the gastrointestinal microbiota in response to *Salmonella*: low versus high *Salmonella* shedding in the natural porcine host. Infection, genetics and evolution: Journal of Molecular Epidemiology and Evolutionary Genetics in Infectious Diseases 16, 330-340.
- Berge, A.C., Wierup, M., 2012. Nutritional strategies to combat *Salmonella* in mono-gastric food animal production. The Animal Consortium (2012) 6, 557-564.
- Burch, D., 2004. *Salmonella* Control-via the Stomach. Pig International 34, 14-16.
- Burns, A.M., Lawlor, P.G., Gardiner, G.E., McCabe, E.M., Walsh, D., Mohammed, M., Grant, J., Duffy, G., 2015. *Salmonella* occurrence and *Enterobacteriaceae* counts in pig feed ingredients and compound feed from feed mills in Ireland. Prev Vet Med 121, 231-239.
- Castillo, M.S., 2006. Development of gut microbiota in the pig: modulation of bacterial communities by different feeding strategies. PhD Thesis, Departament de Ciència Animal i dels Aliments, Universitat Autònoma de Barcelona.
- CDC 2012. Infectious with *Salmonella* 1,4,[5], 12:i:- linked to exposure to feeder rodents - United States, August 2011 - February 2012. In Morbidity Mortality Weekly Report, 277.
- CLSI, 2006. Performance standards for antimicrobial disk susceptibility tests; Approved Standard, Vol 26. Wayne, Pa, USA. .
- Creus, E., 2005. *Salmonella* en la alimentación animal (II). Control microbiológico de materias primas y piensos. Albéitar, 87.
- DOUE 2003. Regulation (EC) No 2160/2003 of the European Parliament and of the council on the control of *Salmonella* and other species food-borne zoonotic agents. Official Journal of the European Union (Brussels, Belgium).
- DOUE 2006. Commission Decision of 29 September 2006 concerning a financial contribution from the Community towards a baseline survey on the prevalence of *Salmonella* in slaughter pigs to be carried out in the Member States. 2006/668/EC. Official Journal of the European Union.
- DOUE 2007. Commission Decision of 12 June 2007 on a Harmonised monitoring of antimicrobial resistance in *Salmonella* in poultry and pigs. 2007/407/EC. Official Journal of the European Union (Brussels, Belgium).
- DOUE, 2008. Commission Decision of 20 December 2007 concerning a financial contribution from the Community towards a survey on the prevalence of *Salmonella* spp. and Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* in herds of breeding pigs to be carried out in the Member States. 2008/55/EC. Official Journal of the European Union.
- EFSA, 2005. European Food Safety Authority. Opinion of the scientific committee on a request from EFSA related to generic approach to the safety assessment by EFSA of microorganisms used in food/feed and the production of food/feed additives. Part A. EFSA Journal 226, 1-12.
- EFSA, 2008a. Microbiological risk assessment in feedingstuffs for food-producing animals. Scientific Opinion of the Panel on Biological Hazards. The EFSA Journal 720, 1-84.

- EFSA, 2008b. 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.
- EFSA, 2008c. Scientific Report on the analysis of the baseline survey on the prevalence of *Salmonella* in slaughter pigs, in the EU, 2006-2007. Part B: factors associated with *Salmonella* infection in lymph nodes, *Salmonella* surface contamination of carcasses, and the distribution of *Salmonella* serovars. EFSA Journal 206, 1-111.
- EFSA, 2010. Scientific opinion on a quantitative microbiological risk assessment of *Salmonella* in slaughter and breeding pigs. EFSA Journal 8, 1547.
- 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, 2329.
- EFSA-ECDC, 2012. European Union Summary Report Antimicrobial resistance in zoonotic and indicator bacteria from humans, animals and food in the European Union in 2010. EFSA Journal 10, 233.
- EFSA-ECDC, 2014. The European Union Summary Report on Trends and Sources of Zoonoses, Zoonotic Agents and Food-borne Outbreaks in 2012. EFSA Journal 10, 312.
- Funk, J., Gebreyes, W.A., 2004. Risk factors associated with *Salmonella* prevalence on swine farms. J Swine Health Prod 12, 246-251.
- Gomez-Laguna, J., Hernandez, M., Creus, E., Echeita, A., Otal, J., Herrera-Leon, S., Astorga, R.J., 2011. Prevalence and antimicrobial susceptibility of *Salmonella* infections in free-range pigs. The Veterinary Journal 190, 176-178.
- Grimont, P.A., Weill, F.X. 2007. Antigenic *formulae* of the *Salmonella* serovars, WHO., I.P.a., ed. (Institute Pasteur and World Health Organization. Collaboration Centre for Reference Research on *Salmonella*).
- Guibourdenche, M., Roggentin, P., Mikoleit, M., Fields, P.I., Bockemuhl, J., Grimont, P.A., Weill, F.X., 2010. Supplement 2003-2007 (No. 47) to the White-Kauffmann-Le Minor scheme. Research in microbiology 161, 26-29.
- Gupta, A., Fontana, J., Crowe, C., Bolstorff, B., Stout, A., Van Duyne, S., Hoekstra, M.P., Whichard, J.M., Barrett, T.J., Angulo, F.J., 2003. Emergence of multidrug-resistant *Salmonella enterica* serotype Newport infections resistant to expanded-spectrum cephalosporins in the United States. The Journal of infectious diseases 188, 1707-1716.
- Hald, T., Vose, D., Wegener, H.C., Koupeev, T., 2004. A Bayesian approach to quantify the contribution of animal-food sources to human salmonellosis. Risk Analysis 24, 255-269.
- Hald, T., Wingstrand, A., Brondsted, T., Lo Fo Wong, D.M., 2006. Human health impact of *Salmonella* contamination in imported soybean products: a semiquantitative risk assessment. Foodborne pathogens and disease 3, 422-431.
- Hernández, E., Rodríguez, J., Herrera-León, S., García, I., de Castro, V., Muniozguren, N., 2012. *Salmonella* Paratyphi B var Java infections associated with exposure to turtles in Bizkaia, Spain, September 2010 to October 2011. EuroSurveillance 17.
- Himathongkham, S., Pereira, M.G., Riemann, H., 1996. Heat destruction of *Salmonella* in poultry feed: effect of time, temperature, and moisture. Avian diseases 40, 72-77.
- ISO, 2007. International Organisation for Standardisation. ISO 6579:2002/DAM 1:2007. Microbiology of Food and Animal Feeding Stuffs. Horizontal Method for the Detection of *Salmonella* spp. Annex D: Detection of *Salmonella* spp. in Animal Faeces and in Samples from the Primary Production Stage. Geneve, Switzerland.
- Kjeldsen, N., Dahl, J., 1999. The effect of feeding non heat-treated, non pelleted feed compared to feeding pelleted, heat-treated feed on the *Salmonella* prevalence of

- finishing pigs. Proceedings of the third International Symposium on the Epidemiology and Control of Salmonella in Pork, ISECSP.
- Landis, J.R., Koch, G.G., 1977. The measurement of observer agreement for categorical data. *Biometrics* 33, 159-174.
- Looft, T., Johnson, T.A., Allen, H.K., Bayles, D.O., Alt, D.P., Stedtfield, R.D., Sul, W.J., Stedtfield, T.M., Chai, B., Cole, J.R., Hashsham, S.A., Tiedje, J.M., Stanton, T.B., 2012. In-feed antibiotic effects on the swine intestinal microbiome. *PNAS* 109, 1691-1696.
- MAGRAMA, 2015. El sector de la carne de cerdo en cifras. Principales indicadores económicos en 2014. In: Subdirección General de Productos Ganaderos. Ministerio de Agricultura, Alimentación y Medio Ambiente.
- Mainar-Jaime, R.C., Andres, S., Vico, J.P., San Roman, B., Garrido, V., Grillo, M.J., 2013. Sensitivity of the ISO 6579:2002/Amd 1:2007 standard method for detection of *Salmonella* spp. on mesenteric lymph nodes from slaughter pigs. *Journal of clinical microbiology* 51, 89-94.
- Mainar-Jaime, R.C., Iguácel, F., 2011. Bases para el control de la salmonelosis en las explotaciones porcinas. *Informaciones Técnicas*. Gobierno de Aragón.
- MARM, CESFAC, 2005. Guía de aplicación de sistema de Análisis de Peligros y de Puntos Críticos de Control en la industria de fabricación de piensos. Ministerio de Medio Ambiente y Medio Rural y Marino; Confederación Española de Fabricantes de alimentos compuestos para animales
- Merialdi, G., Barigazzi, G., Bonilauri, P., Tittarelli, C., Bonci, M., D'Incau, M., Dottori, M., 2008. Longitudinal study of *Salmonella* infection in Italian farrow-to-finish swine herds. *Zoonoses and public health* 55, 222-226.
- Mousing, J., Jensen, P.T., Halgaard, C., Bager, F., Feld, N., Nielsen, B., Nielsen, J.P., Bech-Nielsen, S., 1997. Nation-wide *Salmonella enterica* surveillance and control in Danish slaughter swine herds. *Prev Vet Med* 29, 247-261.
- Murray, P.R., Baron, E.J., Jorgensen, J.H., Phaller, M.A., Tenover, R.H., 2003. *Manual of Clinical Microbiology*, 8th Edition. ASM, Press, Washington, D.C, 1212 p.
- Nava, G.M., Stappenbeck, T.S., 2011. Diversity of the autochthonous colonic microbiota. *Gut microbes* 2, 99-104.
- Navas-Molina, J.A., Peralta-Sánchez, J.M., González, A., McMurdie, P.J., Vázquez-Baeza, Y., Xu, Z., Ursell, L.K., Lauber, C., Zhou, H., Song, S.J., Huntley, J., Ackermann, G.L., Berg-Lyons, D., Holmes, S., Caporaso, J.G., Knight, R., 2013. Advancing our understanding of the human microbiome using QIIME. *Methods in Enzymology* 531, 371-444.
- Nielsen, L.R., 2013. Review of pathogenesis and diagnostic methods of immediate relevance for epidemiology and control of *Salmonella* Dublin in cattle. *Veterinary microbiology* 162, 1-9.
- Nollet, N., Houf, K., Dewulf, J., De Kruif, A., De Zutter, L., Maes, D., 2005. Salmonella in sows: a longitudinal study in farrow-to-finish pig herds. *Vet Res* 36, 645-656.
- Pires, S.M., de Knecht, L., Hald, T., 2011. Estimation of the relative contribution of different food and animal sources to human *Salmonella* infections in the European Union. Scientific/Technical Report submitted to EFSA. *EFSA Journal*.
- Riano, I., Moreno, M.A., Teshager, T., Saenz, Y., Dominguez, L., Torres, C., 2006. Detection and characterization of extended-spectrum beta-lactamases in *Salmonella enterica* strains of healthy food animals in Spain. *The Journal of antimicrobial chemotherapy* 58, 844-847.
- Rodríguez, I., Barownick, W., Helmuth, R., Mendoza, M.C., Rodicio, M.R., Schroeter, A., Guerra, B., 2009. Extended-spectrum beta-lactamases and AmpC beta-lactamases in ceftiofur-

- resistant *Salmonella enterica* isolates from food and livestock obtained in Germany during 2003-07. The Journal of antimicrobial chemotherapy 64, 301-309.
- Sánchez-Alarcón, S.R., 2015. Situación epidemiológica y sanitaria de la salmonelosis porcina en la C.F de Navarra y contribución al conocimiento de la patogénesis. PhD Thesis, Departamento de Producción Agraria, Instituto de Agrobiotecnología, Universidad Pública de Navarra.
- Stevens, M.P., Humphrey, T.J., Maskell, D.J., 2009. Molecular insights into farm animal and zoonotic *Salmonella* infections. Philosophical transactions of the Royal Society of London. Series B, Biological sciences 364, 2709-2723.
- Tello, A., Austin, B., Telfer, T.C., 2012. Selective pressure of antibiotic pollution on bacteria of importance to public health. Environmental health perspectives 120, 1100-1106.
- Tindall, B.J., Grimont, P.A., Garrity, G.M., Euzéby, J.P., 2005. Nomenclature and taxonomy of the genus *Salmonella*. International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology 55, 521-524.
- Van der Wolf, P.J., Van Schie, F.W., Elbers, A.R., Engel, B., Van der Heijden, H.M., Hunneman, W.A., Tielen, M.J., 2001. Epidemiology: Administration of acidified drinking water to finishing pigs in order to prevent *Salmonella* infections. Veterinary Quarterly 23, 121-125.
- Van Immerseel, F., Russell, J.B., Flythe, M.D., Gantois, I., Timbermont, L., Pasmans, F., Haesebrouck, F., Ducatelle, R., 2006. The use of organic acids to combat *Salmonella* in poultry: a mechanistic explanation of the efficacy. Avian Pathology 35, 182-188.
- Vico, J.P., Rol, I., Garrido, V., San Roman, B., Grillo, M.J., Mainar-Jaime, R.C., 2011. Salmonellosis in finishing pigs in Spain: prevalence, antimicrobial agent susceptibilities, and risk factor analysis. Journal of food protection 74, 1070-1078.

