

UNIVERSITAT AUTONÒMA DE BARCELONA

**Mesures d'intervenció per al control de *Salmonella* en la
cadena de producció porcina**

MEMÒRIA PRESENTADA PER EVA CREUS GIBERT

PER ACCEDIR AL GRAU DE DOCTOR DINS DEL
PROGRAMA DE DOCTORAT DE PRODUCCIÓ ANIMAL DEL
DEPARTAMENT DE CIÈNCIA ANIMAL I DELS ALIMENTS

BELLATERRA, ABRIL DE 2007



FACULTAT DE VETERINÀRIA DE BARCELONA

ENRIC MATEU DE ANTONIO, professor titular del Departament de Sanitat i d'Anatomia Animals i **JOSÉ FRANCISCO PÉREZ HERNÁNDEZ**, professor titular del Departament de Ciència Animal i dels Aliments de la Facultat de Veterinària de la Universitat Autònoma de Barcelona,

declaren:

Que la memòria titulada “**Mesures d'intervenció per al control de *Salmonella* en la cadena de producció porcina**”, presentada per Eva Creus Gibert per optar al grau de Doctor en Veterinària, ha estat realitzada sota la seva direcció i, considerant-la acabada, autoritzen la seva presentació per tal que sigui jutjada per la comissió corresponent.

I perquè consti als efectes oportuns, signen el present certificat a Bellaterra, a 16 d'Abril de 2007.

Dr. Enric Mateu de Antonio

Dr. José Francisco Pérez Hernández

El present treball forma part d'un conveni entre la Universitat Autònoma de Barcelona i l'empresa grup Baucells Alimentació per al desenvolupament de projectes I+D dins de la convocatòria del CDTI. També s'ha realitzat gràcies a la concessió d'una beca predoctoral de Formació de Personal Investigador de la Universitat Autònoma de Barcelona.

Agraïments

I què dir de tota la gent que m'ha acompanyat en aquesta aventura. Sens dubte, escriure aquestes línies ha estat el millor moment de la meva tesi.

En primer lloc voldria donar les gràcies als meus directors, perquè ells van fer possible l'inici d'aquesta etapa de la meva vida: l'Enric i en Francisco, o en Francisco i l'Enric. El que de debò els hi agraeixo són totes les oportunitats que m'han donat al llarg d'aquest temps per a poder realitzar-me no només com a doctora, sinó com a persona. Per deixar-me prendre decisions, estar al peu del canó i sobretot, per “voltar i veure món”. Què hi ha de millor que treballar amb gent que confia tant en tu. Francisco, de parte de tu becaria con el récord de haber hecho más kilómetros durante su doctorado, gracias por todo y por más, por estar allí, por escuchar. Enric, què faria jo sense els teus consells, has fet que “no correués massa” en tants moments. De veritat, sense tu no hagués estat possible que aquesta aventura amb la salmonella tingués continuïtat.

Una peça clau en la realització d'aquesta tesi ha estat el bon ambient que durant aquests anys m'ha envoltat a la universitat. Per començar, amb tota la família de nutrició. Al “gran jefe”, Josep, i a totes les altres “jefas”, Ana Cris, Mariola, Roser i Susana. A la nostra Olgita. I ara vénen tota la tira de becaris. Molts ja no hi son (Joaquín, Dani, Edgar, Ceci, Marisol i la que em va animar a aventurar-me per d'altres continents, la Núria), d'altres fa més temps que estan amb mi (Martona, Gabri, Francesc, Sandra, Joseanne, Arantzilla, Juan Carlos, José, Walkiria, Muzaffer, Freddy) i els nous fitxatges (Leo, Rafael, Rosa). A tots, dir-vos que m'ha encantat compartir la meva aventura amb vosaltres. I deixo per al final la Montse i l'Alba, perquè els hi vull dir que l'“evitalo” les estima moltíssim, moltíssim amb “m”. Gràcies per aguantar les meves taladrades!

I ara veniu vosaltres, els infecciosos. Perquè el fet de realitzar la feina a cavall de dos departaments té de positiu que a més d'acumular kilòmetres per al rècord de becària viatgera, coneixes a moltíssima gent i d'entre ells, a persones molt especials, com són la Bibiana i la Teresa. Nenes, com vam triomfar als escorxadors!. Què hagués fet sense la vostra ajuda durant els mostreigs i les interminables hores al laboratori. I també sense les meves dues “super-laborantes”, la Carme i la Mònica. Donar les gràcies també a

l'Anna i la Montse, per deixar-me sempre un raconet al laboratori pels meus ELISAs, i a en Gaby, la Chiara i l'Ivan, que sempre s'han portat molt bé amb mi. I a la Marga, per aguantar amb paciència la meva contínua pregunta de si sabia on era l'Enric. I encara que ja estigui al seu país, una abraçada per a en Willian, que no sap prou tot el què va significar la seva ajuda a l'inici de la tesi. I als infecciosos "muntanyerus" els hi he reservat aquest petit racó, perquè amb ells comparteixo aquesta estranya passió per cansar-se caminant i suant a la muntanya. Jordi, Anna, Alberto, Albert i Maribel, gràcies per tants bons moments.

I en el camí que separa el meu despatx al tercer pis, dels laboratoris d'infeccioses al segon, tot pujant per les escales de la banda de l'hospital, hi ha uns quants despatxos que sempre han estat oberts per a mi. Primer de tot, donar les gràcies a les noies de bioquímica clínica: la Yolanda, la Raquel i molt especialment a la meva biokimikera particular, la Mercè. Gràcies guapíssima per compartir tantes hores, tantes converses. Com m'encanta entrar al vostre laboratori i després passar a veure en Jaume, l'"exòtico" de la facultat i també la Rosa. I treure el cap per patologia, a saludar l'Esther (ànimus nena), en Grego, l'Encarna i què dir de la Pancha (la meva Panxita), com m'estimo aquesta xilena.

Però si aquest mateix camí el fas per l'altra banda, hi trobes a tota la gent de producció i sobretot, vull donar les gràcies als meus antics companys de despatx. Amb ells vaig compartir moltes hores i també uns quants "mates". Aina, Luciano, Glaubert, Vincent. Ei Feliu, que no m'oblido pas de tu.

I el que de veritat ha fet possible aquesta tesi i d'on he tret l'experiència més preuada, ha estat tota l'ajuda incondicional que he rebut de fora de la universitat, del "món real". Sóc conscient que molts d'ells no llegiran mai aquestes línies, però confio en haver-los transmès els meus agraïments en aquell moment. Començant per la gent de la fàbrica de pinsos de Tona (gràcies per les calçotades!), i molt especialment, a les noies del laboratori, la Laura, la Carme, la Montse, la Fina i l'Assumpta. A tots els veterinaris (aquí la pesada de les enquestes!), sobretot a en Joan Wennberg, la Montse Armadans i a la persona que va fer fàcil el que per a mi semblava impossible, enviar els porcs a

l'escorxador a la meua manera, en Jaume Tellez (ei, que no eren manies meves eh?). I una peça clau en l'inici de tot aquest embolic va ser en Francesc Baucells, gràcies per donar-me un cop de mà!. Gràcies també a l'Esther Viñeta i a en Jordi Soler. Ja de camí cap a les granges, què dir de la gent sempre tant disposada a ajudar-me que m'he trobat, amb les seves històries, amb el seu tarannà (encara queda tanta bona gent!). La "noia de la universitat" us envia a tots una abraçada ben forta. I finalment als escorxadors, els meus agraiments es queden curts per la valuosíssima ajuda que vaig rebre. Tant dels encarregats (Jordi, Joan, Genís, Mari, Quico, Rafà i en Jordi), com dels treballadors de la línia de sacrifici de tots tres escorxadors. Des de'n Jerónimo que realitzava el degollat, fins a en Piu que s'encarregava del pesatge i la classificació de les canals i faig també, una parada per saludar als "meus amics de la zona d'evisceració". Sense ells no hagués estat possible recollir tan valuoses mostres (almenys per a mi). I no em vull deixar el meu pas per la sala d'especejament (Joan Franc, gràcies per tenir les portes sempre obertes per a mi). I mil agraiments també per a en Cesc i la Pilar (per voler donar sempre el màxim de vosaltres i sobretot, aguantar-me tantes hores!), i en general, a tota la gent que en algun moment ha pujat al meu Fiat Punto blau amb destinació a recollir m..... I és clar, gràcies també a tu, Fiat Punto, per aguantar tants viatges, tants sotracs i sobretot, olors d'allò ben estranyes. I no em quedaria tranquil·la si no escrivís aquestes línies: que em perdonin els porcs que van tenir que patir la meua falta d'experiència traient sang!.

Cap a terres més llunyanes envio també els meus agraiments. I also have to thank my colleagues from the South Australian Research Center in Adelaide, specially David Hamilton (thank you mate for all the capuchinos we shared) and also, Hugh Wallwork and all the family (you always will be my australian family). Also, I would like to thank to Jaap Boes from the Danish Bacon and Meat Council because he organized an excellent visit in Denmark. With special regards to Peter van der Wolf, who shared with me all his huge knowledge about *Salmonella*. For that special days in Deventer, thanks a lot!.

I tornant a casa nostra, faig una parada a Reus. Josep M^a, gràcies per tractar-me tan bé a l'empresa i una forta abraçada per a en Sígfrid i en Josep Ramon (visca la Sirius!).

Envio també petons a la Sara, la Lorena i la Judith, no només per haver-me fet costat durant els anys de la carrera, sinó per companyar-me encara avui. I cap al maresme ja toca mirar. Un petonàs per la Marina i la Cristina (molts ànims nena i sí, que ja sé que Blanes és de la Selva). I també per les meves amigues de sempre, les que saben que ja des de petita volia ser veterinària (però d'això dels porcs no us n'havia parlat oi?). Per la Montse, la Loreto, l'Eva, i totes les altres que de tant en tant ens anem trobant: visca les Dominiques!. I és clar, una abraçada ben forta per les meves companyes del gimnàs. No hi ha res de millor que una classe d'step per a desestressar-se!.

I finalment, què seria de la vida sense una mica d'humor. Visca Barrio Sésamo perquè és allà on hi viuen l'Epi i en Blas!.

I he volgut reservar aquesta pàgina tan especial per a donar les gràcies *ALS DE CASA*, realment a ells els dec que hagi lluitat tots aquests anys fins arribar a aquí. Per als que hi sou (els grans i sobretot els tres petits de la casa), perquè vau estar amb mi, sempre hi sou i sé de segur que sempre hi sereu.

I per últim, per al qui no hi és, tot per tu Marc, per sempre.

RESUM

El present treball forma part d'un projecte realitzat dins d'un conveni de col·laboració universitat-empresa i que va portar com a títol: "Programa Integral de Control de *Salmonella*: del pienso a la carne". L'objectiu principal d'aquest projecte va ser el de conèixer la situació de la contaminació per *Salmonella* des de l'etapa de fabricació de pinsos fins a la fase de sacrifici i processat del porcí a l'escorxador per tal de poder disposar d'una sèrie d'eines per al seu control. En la següent tesi es presenten els estudis realitzats en les granges d'aquesta empresa i els seus escorxadors associats.

Amb la finalitat d'obtenir la informació necessària per a assolir l'anterior objectiu, es van dissenyar tres estudis (capítols 4-6). En l'**Estudi I** es va determinar la seroprevalença de *Salmonella* i els principals factors de risc associats a aquesta infecció en un total de 43 explotacions d'engreix d'aquest sistema de producció. De cada granja varen recollir-se mostres de sang a l'escorxador i es va realitzar un qüestionari que incloïa diferents aspectes relacionats amb el seu maneig, sanitat i bioseguretat, entre d'altres factors. Alhora es va estudiar un sistema de producció en múltiples fases amb l'objectiu de conèixer la distribució de *Salmonella* en cadascuna de les seves fases. En aquest estudi longitudinal es va determinar la prevalença serològica i bacteriològica de les reproductores i de 40 garrins fills seus que es varen seguir al llarg de la transició i l'engreix. Els resultats obtinguts en les unitats d'engreix estudiades varen indicar una elevada presència de *Salmonella* donat que totes les granges excepte una resultaren positives i, a més, una elevada proporció d'aquestes (39,5%) presentaren un nivell de seroprevalença individual superior al 50%. L'anàlisi de les enquestes va revelar que el maneig dels animals seguint un flux continu de producció, juntament amb el seguiment de certes pautes d'higiene i de bioseguretat que podrien anar lligades amb un elevat índex de mortalitat són factors relacionats amb un major grau de seroprevalença per *Salmonella* en aquestes explotacions. De l'estudi longitudinal se'n desprèn que, en aquest sistema de producció estudiat, la infecció per *Salmonella* dels animals té lloc principalment durant la fase d'engreix i que per tant, és en aquesta etapa quan principalment haurien d'aplicar-se mesures de control adreçades a reduir els nivells de prevalença.

Amb l'objectiu de valorar l'eficàcia d'una estratègia d'alimentació, en concret l'administració d'una dieta acidificada (pinso granulat) per al control de *Salmonella* en granges comercials d'engreix, es va portar a terme l'**Estudi II**. Aquest estudi va englobar dues proves experimentals. En la primera prova va administrar-se un pinso acidificat amb un 1,2% d'àcids làctic i fòrmic (50%:50%) durant tot el període d'engreix dels animals. En el segon experiment, realitzat en dues granges, va reduir-se la dosi d'inclusió dels àcids (0,8%) i es va escurçar el seu període d'administració (últimes 7-8 setmanes de l'engreix). En la primera prova, l'addició d'àcids a la dieta va resultar en una menor proporció d'animals portadors de *Salmonella* en ganglis limfàtics a l'edat de sacrifici. En el segon experiment, la dieta acidificada va resultar efectiva per a reduir els nivells de seroprevalença de *Salmonella* dels animals a l'escorxador, tot i que només va tenir un efecte parcial en la reducció del nombre de porcs portadors en budell o en ganglis. Per qüestions econòmiques, la limitació tant de la dosi com del període d'administració dels àcids administrats en l'aliment sembla ser una opció efectiva per a reduir inicialment els nivells de prevalença en aquelles granges amb una elevada proporció d'animals positius tot i que, en no cobrir tota la fase d'engreix, el nivell d'infecció dels animals en el moment d'iniciar-se l'administració del pinso acidificat podria condicionar la seva eficàcia.

Finalment, a l'**Estudi III** es va determinar la freqüència, la distribució i els circuits de la contaminació per *Salmonella* en tres escorxadors de porcí. Es varen recollir diverses mostres de l'ambient de l'escorxador (corrals d'espera, aigua del tanc d'escaldat, utensilis d'evisceració, etc.) i dels animals sacrificats (contingut rectal i hisops de les mateixes canals en les etapes posterior a la neteja, posterior a l'evisceració i prèvia a l'oreig). Aquest mostreig es va repetir en quatre dies diferents i, en un mateix dia, es miraven tres moments separats de mostreig. Van aïllar-se salmonel·les en diferents mostres de l'ambient de tots tres escorxadors i, fins i tot, abans de l'inici de la jornada de treball. Tot i que el nivell de contaminació va diferir considerablement entre escorxadors i guardava una relació directa amb la proporció d'animals positius que rebia l'escorxador, els corrals d'espera i l'àrea d'evisceració van ser els punts més contaminats en tots tres casos. En concret, l'evisceració va ser l'etapa a partir de la qual

s'observà un major increment en el nombre de canals contaminades i de fet, només un 15% de les canals positives resultaren contaminades amb el mateix serotip del qual l'animal n'era portador. Aquests resultats accentuen la importància que té l'ambient de l'escorxador en la contaminació final de les canals i evidencien la presència de complexos cicles de contaminació que al mateix temps guardarien relació amb la pressió d'animals positius processats a l'escorxador. En conjunt, els nostres resultats indicarien que la reducció de la presència de *Salmonella* en les canals requereix tant de la millora de la higiene del procés de sacrifici, com de la reducció de la prevalença d'animals portadors en granja.

ABSTRACT

The present study was done as a part of the collaborative project “Global control of *Salmonella*: from feed to meat” carried out between the UAB and a swine producing company. The main objective of that project was to get a global perspective on the situation of *Salmonella* in the whole productive system of the company, from feed mills to the slaughterhouse, in order to figure out how to develop control strategies. In the present thesis are presented a part of the different studies carried out in pig herds of this company and the associated slaughterhouses. To achieve the goals of the project, a number of studies were planned and conducted (chapters 4-6).

In **Study I**, the seroprevalence of *Salmonella* and the risk factors associated with the occurrence of *Salmonella* in 43 finishing herds of this company were determined. For each finishing herd, blood samples were collected and a questionnaire was fulfilled. The questionnaire included, among others, questions regarding management procedures, biosecurity aspects and the health status of the farms. Furthermore, the dynamics of *Salmonella* in a multiple-site-swine production of this company was also investigated in a longitudinal study. For this, serological and bacteriological prevalence was determined for sows and for its offspring (40 piglets) that was followed all through the nursery and finishing period. The results of this study showed that all but one of the farms had seropositive animals. Moreover, most farms (39.5%), had an individual seroprevalence above 50%. The logistic regression analysis showed that a continuous flow system and the implementation of hygienic and biosecurity measures are probably related with the within farm dissemination of the infection. Also, farms with mortality rates above the median had higher prevalences. Regarding the dynamics of *Salmonella*, the dissemination of the infection occurred mainly during the fattening phase.

In a second part, now on, **Study II**, the efficacy of feeding strategies to control *Salmonella* in fattening units was evaluated. This study consisted initially of a trial in which a commercial feed added with 1.2% of lactic and formic acid (50%:50%) was administered during the whole fattening period. In a second experiment, carried out in two herds, the doses were reduced by one third (final concentration 0.8%; 0.4% lactic

acid and 0.4% formic acid) and the period of administration was reduced to the last 8-9 weeks of the fattening period. The addition of 1.2% of acids in feed resulted in a lower proportion of *Salmonella* carriers (mesenteric lymph nodes) reaching the slaughterhouse. In the second experiment, the acidified feed (0.8%) was effective to reduce *Salmonella* seroprevalence in age-market pigs, although the reduction in the proportion of carriers either in mesenteric lymph nodes or in faeces was only seen in one of the herds. Considering the economic cost of this strategy, the reduction of the doses and the period of administration of the acids seems to be an effective option to reduce initially prevalence in finishing pigs which high number of seropositive animals. However, if the prevalence at the start of the administration period is high, the efficacy of this treatment can be hampered.

A third study, **Study III**, was then carried out to ascertain the frequency, distribution and sources of *Salmonella* contaminations in three commercial pig abattoirs. Samples from the slaughterhouse environment (lairage pens, scalding water, evisceration tools, etc.) and from slaughtered animals (rectal contents and from the same pigs, swabs of carcasses at the three process stages: after polishing, after evisceration and before chilling). This sampling was repeated in four different days. Within each given sampling day, samples were collected at three separate times. *Salmonella* was isolated in different environmental samples from all three slaughterhouses even before the beginning of the slaughtering process. Although contamination levels differed between slaughterhouses and were related with the proportion of positive animals entering in the slaughterhouse, lairage and the evisceration areas were the most contaminated points in all abattoirs. In particular, evisceration was the stage from which carcass contamination increased considerably. Only about 15% of the positive carcass were contaminated with the same serotype isolated from the corresponding carrier pig. These results highlight the importance of slaughterhouse environment in carcass contamination and show the presence of complex environmental contamination cycles which depend at the same time, on the input of infected pigs entering the slaughterline. Taking together, our results indicate that the reduction of the presence of *Salmonella* in carcass needs the improvement of hygienic procedures at slaughterhouse and the reduction in the prevalence of carrier pigs.

INDEX

Capítol 1. Introducció general	1
Capítol 2. Revisió bibliogràfica	8
2.1. Característiques del gènere <i>Salmonella</i>	10
2.2. Epidemiologia de <i>Salmonella</i> en les explotacions porcínes	12
2.2.1. Nivells de prevalença en les granges d'engreix	12
2.2.2. Distribució i dinàmica de transmissió de <i>Salmonella</i> dins les granges	16
2.2.3. Factors que intervenen en la introducció i la transmissió de <i>Salmonella</i> dins les granges	18
2.2.3.1. Mesures de bioseguretat i sanitat	18
2.2.3.2. Característiques de les granges i sistemes de maneig	20
2.2.4. Paper de l'alimentació animal en l'epidemiologia de la salmonel·losi porcina	22
2.2.4.1. Contaminació per <i>Salmonella</i> en matèries primeres i pinsos	22
2.2.4.2. Pràctiques d'alimentació	25
2.3. Epidemiologia de <i>Salmonella</i> durant el transport i l'espera a l'escorxador	31
2.4. Epidemiologia de <i>Salmonella</i> a l'escorxador	33
2.4.1. Nivells de contaminació	34
2.4.2. Factors de risc associats a la presència de <i>Salmonella</i> en les canals	35
2.4.2.1. Processat de les canals	36
a) Etapes anteriors a l'evisceració	38
b) Evisceració i etapes posteriors	39
2.4.3. Metodologia de mostreig de les canals a l'escorxador	44
2.5. Epidemiologia de <i>Salmonella</i> a les sales d'especejament i durant la distribució i la venda de carn	47
2.6. Epidemiologia de <i>Salmonella</i> en l'àmbit domèstic	48
2.7. Mètodes de detecció de <i>Salmonella</i>	49
2.7.1. Mètodes bacteriològics	49
2.7.2. Mètodes immunoenzimàtics	52
2.7.3. Mètodes moleculars	56

Capítol 3. Objectius	58
Capítol 4. Estudi I. Prevalence, risk factors and distribution of <i>Salmonella</i> infections in a swine production system of Catalonia	62
4.1. Introduction	66
4.2. Material and methods	66
4.2.1. Cross-sectional study	66
4.2.2. Longitudinal study	67
4.2.3. Sampling procedures and analyses	69
4.2.4. Statistical analyses	69
4.3. Results	70
4.3.1. Cross-sectional study	70
4.3.2. Longitudinal study	71
4.4. Discussion	73
4.4.1. Cross-sectional study	73
4.4.2. Longitudinal study	74
4.5. Conclusions	76
4.6. References	76
Capítol 5. Estudi II. Effect of acidified feed on the prevalence of <i>Salmonella</i> in age-market pigs	80
5.1. Introduction	84
5.2. Material and methods	85
5.2.1. Sampling procedures and analyses	86
5.2.2. Statistical analyses	87
5.3. Results	88
5.4. Discussion	91
5.5. Conclusions	92
5.6. References	93
Capítol 6. Estudi III. Evaluation of critical points for <i>Salmonella</i> contamination in pig abattoirs	96
6.1. Introduction	100
6.2. Material and methods	100
6.2.1. Slaughterhouses and slaughtering processes	101
6.2.2. Sampling design	101

	<i>Index</i>
6.2.3. Methods of sampling	101
6.2.4. <i>Salmonella</i> isolation procedures	104
6.2.5. Statistical analyses	104
6.3. Results	105
6.4. Discussion	111
6.5. Conclusions	113
6.6. References	114
Capítol 7. Discussió general	118
Capítol 8. Conclusions	128
Bibliografia	132
Annex I: Monitorització de la salmonel·losi porcina a nivell europeu	168
Annex II: Enquesta “salmonel·losi en explotacions porcines d’engreix”	174

Index de figures

Capítol 2

- Figura 2.1.** Diagrama de flux del processat del porcí a l'escorxador 37
- Figura 2.2.** Esquema de l'ELISA de captura per a la detecció de *Salmonella* 54
- Figura 2.3.** Principi d'un ELISA indirecte 55

Capítol 4

- Figure 4.1.** Evolution of serological *Salmonella* response in individual pigs
a the nursery 72

Capítol 6

- Figure 6.1.** Schematic floor diagram of the slaughterhouses with indication of
the sampling points (in bold and in squares) where *Salmonella*
contamination was investigated 103

Index de taules

Capítol 2

- Taula 2.1.** Nivells de contaminació per *Salmonella* en matèries primeres i pinsos 23
- Taula 2.2.** Concentració mínima inhibidora (CMI) de diferents àcids orgànics sobre *Salmonella* Typhimurium en funció del Ph 29

Capítol 4

- Table 4.1.** Summary of factors that were included in the questionnaire on risk factors for *Salmonella* in finishing pigs 68
- Table 4.2.** Risk factors associated by the logistic regression models for high *Salmonella* seroprevalence levels 71
- Table 4.3.** Distribution by parities of *Salmonella* seroprevalence in sows at the beginning of the study 71

Capítol 5

- Table 5.1.** Experiment 1: Productive results in pigs receiving a diet containing 1.2% of 50%:50% lactic:formic acid (Lac-Formic-1.2) or an estandard diet (STD) during the last 14 weeks of the fattening period 88
- Table 5.2.** Experiment 2: Distribution of *Salmonella* isolates by serovar and group 89
- Table 5.3.** Experiment 3: Effect of the administration of an unacidified standard diet (STD), an acidified diet with 0.8% of formic acid (Formic-0.8) or 0.8% of 50%:50% lactic-formic acids (Lac-Formic-0.8) for 8 and 9 weeks in two herds (Herd I and Herd II) upon *Salmonella* carriage in faeces and mesenteric lymph nodes and on seroprevalence as determined by sampling at the slaughterhouse 90

Capítol 6

- Table 6.1.** Isolation of *Salmonella* from environmental samples of each Slaughterhouse 107
- Table 6.2.** Isolation of *Salmonella* from pigs and pig carcasses 108

Table 6.3. Serotype distribution and number (between brackets) of <i>Salmonella</i> isolates from environment and in animals and carcasses samples. In bold serotypes isolated from carcasses also being recovered from carrier pigs and the environment (lairage areas excluded)	110
--	-----

Annex I

Taula I.1. Principals característiques dels programes de monitorització i vigilància de la salmonel·losi porcina a nivell europeu	170
Taula II.2. Principals característiques dels programes de monitorització i vigilància de la salmonel·losi porcina a nivell europeu	171

Capítol 1

INTRODUCCIÓ GENERAL

En els últims anys, diversos incidents relacionats amb la seguretat alimentària (encefalopatia espongiforme bovina, dioxines, influença, etc.) han creat una intensa alarma social que ha conduït als consumidors a demanar una major transparència, traçabilitat i seguretat en tota la cadena de producció d'aliments, de tal manera que la protecció de la salut pública ha esdevingut una qüestió prioritària de la política Europea. Aquestes circumstàncies han obligat a la indústria alimentària i de retruc al sector primari, a augmentar les mesures de control sanitari dels seus productes.

Les toxiinfeccions alimentàries constitueixen un important problema de salut pública en els països desenvolupats. L'Organització Mundial de la Salut (OMS) estima que, en aquests països, més del 30% de la població se'n veu afectada cada any. Aquest fet resulta finalment en una important despesa sanitària com a conseqüència de baixes laborals, hospitalitzacions, costos associats al tractament i, fins i tot, morts. *Salmonella*, juntament amb *Campylobacter*, són els agents zoonòtics més freqüentment aïllats en casos de gastroenteritis d'origen alimentari tant a Europa com als Estats Units (CDC, 2006; EFSA, 2006). Si la major part d'infeccions causades per *Campylobacter* corresponen a casos esporàdics i no solen provocar brots comunitaris, *Salmonella*, en canvi, es descriu com la causa majoritària dels brots declarats de toxiinfeccions alimentàries. Segons dades de l'any 2005, a Europa es declararen un total de 171.775 casos de salmonel·losi humana, resultant en una incidència de 38,2 casos per cada 100.000 habitants (EFSA, 2006). A Espanya, entre els anys 2002 i 2003, el nombre d'aïllaments registrats (procedents tant de casos aïllats com de brots d'origen alimentari) va ser de 12.576 (Echeita *et al.*, 2005a). Tanmateix, aquesta xifra no reflectiria el nombre real de casos de salmonel·losi, estimant-se que els casos en els que es disposa d'aïllament només representen entre el 25% i el 50% dels casos totals declarats a l'estat espanyol. A Catalunya, durant l'any 2004, es van declarar 188 brots epidèmics de toxiinfeccions alimentàries amb un total de 1.437 afectats. De tots els brots en els que se n'identificà la causa (65% del total), *Salmonella* va ser l'agent etiològic en el 75% dels casos (BEC, 2005).

Si bé en les persones la salmonel·losi cursa principalment amb un quadre gastroentèric que sol durar uns 3 o 4 dies, en casos molt extrems i en especial en

aquella població considerada de risc (nens, gent gran i pacients immunodeficients), pot arribar a causar la mort. Als Estats Units, la proporció estimada de persones mortes atribuïbles a la salmonel·losi ascendeix al 31% del total de les morts causades per brots de toxiinfeccions alimentàries d'origen bacterià (Mead *et al.*, 1999).

A Europa, els serotips més comunament aïllats en persones són *Salmonella* Enteritidis i *Salmonella* Typhimurium, representant el 52% i el 9% del total dels casos, respectivament (EFSA, 2006). Dades dels Estats Units de l'any 2004 indiquen en aquest país una major proporció de casos provocats pel serotip Typhimurium que per l'Enteritidis (19,2% i 14,1%, respectivament) (CDC, 2005).

Segons diverses dades epidemiològiques, els ous i els seus productes derivats, juntament amb la carn d'aus són considerades les principals fonts de salmonel·losi humana, essent *Salmonella* Enteritidis el serotip predominant, tot i que també poden ser l'origen de *Salmonella* Typhimurium. A continuació, la carn de porc és l'aliment que hi està més implicat, associant-se fonamentalment el serotip Typhimurium a aquests casos (EFSA, 2006). En concret, a Dinamarca i a Holanda s'estima que la carn de porc pot ser l'origen d'entre el 9% i el 15% dels casos humans de salmonel·losi (Berends *et al.*, 1998; Hald *et al.*, 2004) i a més, són diversos els estudis que associen el seu consum amb brots de salmonel·losi declarats (Narain i Lofgren, 1989; Delpech *et al.*, 1998; Cornell i Neal, 1998; Llewellyn *et al.*, 1998; Maguire *et al.*, 1993; Wegener i Baggesen, 1996; Mølbak *et al.*, 1999; Buchholz *et al.*, 2005; Noel *et al.*, 2006). En general, en els diferents països europeus es descriu un rang de prevalença per *Salmonella* en la carn de porc a nivell de les sales de desfer que varia entre el 0% i el 18,4% (EFSA, 2006).

Un altre aspecte a tenir en compte i que suposa un especial risc sanitari, és l'emergència a nivell mundial dels casos de gastroenteritis lligats a soques de *Salmonella* multiresistents als agents antimicrobians (Mølbak *et al.*, 1999; Cruchaga *et al.*, 2001) i en particular, de les soques del serotip Typhimurium anomenades DT104 (Gebreyes *et al.*, 2004b; Helms *et al.*, 2005). En concret, aquest fagotip presenta resistència a ampicil·lina, cloranfenicol, estreptomina, sulfamida i

tetraciclina (R-ACSSuT). L'existència d'aquests clons multiresistents compromet el tractament dels pacients considerats de risc davant d'un brot de salmonel·losi. Si bé aquest fagotip DT104 va ser descrit per primera vegada l'any 1984 al Regne Unit, s'ha estès ràpidament durant els anys 90 i en l'actualitat ha esdevingut un aïllament comú en diferents països, inclosos Espanya (Usera *et al.*, 2000a; 2000b; 2001a; 2001b), Alemanya (Malorny *et al.*, 1999), el Regne Unit (Threlfall, 2002) i els Estats Units (Besser *et al.*, 1997; Akkina *et al.*, 1999). Diversos estudis danesos descriuen la carn de porc i els seus derivats com a importants fonts en la transmissió de *Salmonella* Typhimurium DT104 a les persones (Baggesen i Aarestrup, 1998; Mølbak *et al.*, 1999). En els últims anys, d'altres fagotips d'aquest mateix serotip, com per exemple el DT193 (Maguire *et al.*, 1993; Pontello *et al.*, 1998) també han estat implicats en brots de toxiinfeccions en persones que tenien com a origen el consum de carn de porc poc cuinada. A Espanya, els aïllaments del fagotip DT193 i en especial els del U302 han anat augmentant ràpidament en els darrers anys. En concret, el fagotip U302 ja encapçala la llista dels fagotips més freqüents de *Salmonella* Typhimurium aïllats de mostres clíniques d'origen humà (Echeita *et al.*, 2005b) i és un dels més freqüents en el porcí a Espanya (de la Torre *et al.*, 2003). Aquests aïllaments suposen, per tant, un important problema tant per a la salut pública com per a la producció animal.

La rellevància de la salmonel·losi com a zoonosi i el fet que els porcs portadors de *Salmonella* que arriben a l'escorxador són considerats la principal font de contaminació de les canals, ha posat de manifest la necessitat d'adoptar mesures de control per a la salmonel·losi porcina en els plans de salut pública europeus. Aquests objectius de control queden recollits en l'actual normativa comunitària referent a la vigilància de les zoonosis i els agents zoonòtics (Directiva 2003/99/CE) i sobre el control de salmonel·la i altres agents zoonòtics específics transmesos pels aliments (Reglament CE núm. 2160/2003 del Parlament Europeu i del Consell, de 17 de novembre de 2003). En concret, el reglament estableix que per al porcí s'hauran de realitzar estudis nacionals de prevalença d'un any de durada -ja iniciat l'1 d'octubre de 2006 en el porcí d'engreix (Decisió de la Comissió núm. 2006/668/CE, de 29 de setembre de 2006)- que serviran de base per a fixar un objectiu comunitari de

reducció (previst pel desembre de 2007 en el porcí d'engreix i un any més tard en les reproductores). Finalment, a finals de l'any 2009 o a començaments del 2010 (un any posterior pel que fa a les reproductores), es té previst que s'iniciï un Programa Nacional de Control en cada Estat membre i és quan serà obligatori l'aplicació de proves de detecció i certificació en el porcí d'engreix. Aquests programes seran continus i englobaran com a mínim, un període de 3 anys consecutius per tal d'assolir els objectius de reducció especificats.

Des d'un punt de vista comercial, el fet que diversos països, i entre ells alguns dels principals productors de porcí, ja hagin instaurat programes de control (Suècia, Finlàndia, Noruega, Dinamarca i el Regne Unit) o estiguin en vies de fer-ho (Holanda, Alemanya, Bèlgica, etc.) (Annex I) podria suposar, i en un termini no gaire llunyà en el temps, la creació de barreres sanitàries que perjudiquessin seriosament l'exportació d'animals i carns procedents de països sense la seva implantació. L'èxit dels primers programes de control de *Salmonella* iniciats en els països nòrdics i a Dinamarca estarien creant una pressió sobre els mercats internacionals dirigida a la demanda d'animals lliures de *Salmonella* (Wegener *et al.*, 2003).

Independentment de la importància des del punt de vista de la seguretat alimentària i del comerç internacional, la salmonel·losi també destaca a nivell de la producció porcina pel seu vessant sanitari i econòmic. La salmonel·losi porcina afecta en especial a porcs en edats de transició i engreix i pot manifestar-se clínicament de dues formes. La primera i més greu, sol estar causada per *Salmonella* Choleraesuis i es caracteritza bàsicament per un procés septicèmic, tot i que ocasionalment pot cursar de forma entèrica. Cal destacar que aquest serotip, tot i ser el primer aïllament en freqüència en el porcí als Estats Units, no és gaire comú a Europa. La segona forma en canvi, en la que hi poden estar implicats d'altres serotips de *Salmonella*, tot i que principalment el serotip Typhimurium, s'associa normalment amb un quadre d'enterocolitis. En aquest cas, els principals signes de la malaltia solen ser anorèxia, febre elevada i diarrea abundant. Com a conseqüència de la diarrea sol produir-se una deshidratació intensa o fins i tot, pot acabar desenvolupant-se una septicèmia; essent aquests dos factors els principals causants de la majoria de les baixes originades.

La presentació d'un brot de salmonel·losi en qualsevol de les seves formes pot representar un impacte econòmic considerable per a l'explotació degut al percentatge de baixes, especialment en les formes septicèmiques. Cal destacar també, l'increment en les despeses de medicació i el retard del creixement en aquells animals que sobreviuen. A més, la salmonel·la pot quedar acantonada en diversos òrgans (ganglis limfàtics mesentèrics, tonsil·les, pulmons, cec i colon) i eliminar-se intermitentment per via fecal durant un període llarg sense que l'animal mostri símptomes de la malaltia (Schwartz, 1999). Aquesta fase de portador, actualment la forma més comuna d'infecció, fa que aquests animals esdevinguin una font de contaminació a l'escorxador.

Salmonella té una naturalesa ubiqüitària i pot entrar en qualsevol punt de la cadena alimentària, des de l'alimentació dels animals, passant per les granges, els escorxadors i les sales de desfer, així com en tot el procés d'elaboració, processat i distribució dels aliments i també durant la seva posterior preparació pels consumidors. Aquest fet obliga a l'adopció d'un plantejament de control de la salmonel·losi global i integrat. I aquesta perspectiva de control, basada en el concepte "de la granja a la taula", en el que la responsabilitat sigui compartida per tots i cadascun dels responsables de la cadena alimentària, constitueix un dels principis bàsics dels plans de seguretat alimentària europeus recollits al Reglament CE núm. 178/2002 del Parlament Europeu i del Consell, de 28 de gener de 2002.

El coneixement de l'epidemiologia i la dinàmica de la infecció per *Salmonella* dins de cada esglau de la cadena de producció animal, així com la interrelació existent entre aquestes diferents fases, és bàsic de cara l'establiment de qualsevol mesura de vigilància i control de la salmonel·losi porcina. Alhora, resulta igualment necessari la cerca d'efectives estratègies de control que s'adaptin a les diferències pròpiament geogràfiques i dels sistemes de producció entre països i que permetin finalment, la seva aplicabilitat des d'un punt de vista pràctic i econòmic.

Capítol 2

REVISIÓ BIBLIOGRÀFICA

2.1. Característiques del gènere *Salmonella*

El gènere *Salmonella* s'inclou en la família *Enterobacteriaceae* i agrupa bacils gramnegatius, anaerobis facultatius, mòbils, amb flagels i no productors d'espores. Tot i que el seu hàbitat principal és el tracte intestinal de les persones i els animals, la seva gran capacitat d'adaptació fa que pugui aïllar-se en una àmplia varietat de substrats. *Salmonella* sobreviu llargs períodes de temps en l'ambient, suportant bé la congelació i la dessecació. Es multiplica en un ampli rang de temperatures que van des dels 5°C fins als 46°C i la seva inactivació es produeix a temperatures superiors als 60°C i a pHs per sota de 4. Els desinfectants comuns com els fenols, els clorats i els iodats serien efectius per a la seva inactivació.

Existeix una gran controvèrsia respecte a la nomenclatura i classificació dels bacteris d'aquest gènere, de tal manera que el nombre d'espècies i subespècies que el componen, a més del seu nom i posició taxonòmica, varia segons diferents propostes. Actualment, la classificació més utilitzada, però encara no acceptada oficialment pel Comitè Internacional de Taxonomia Bacteriana (ICBT), és la que proposa que el gènere *Salmonella* està format per dues espècies: *Salmonella bongori* i *Salmonella enterica*; si bé s'ha proposat recentment una nova espècie del gènere, *Salmonella subterranea* (Shelobolina *et al.*, 2004). Alhora, *Salmonella enterica*, que agrupa la majoria dels bacteris d'aquest gènere que s'associen amb animals de sang calenta i amb l'home, es divideix en sis subespècies: *enterica* (I), *salamae* (II), *arizonae* (IIIa), *diarizonae* (IIIb), *houtenae* (IV) i *indica* (VI) (Le Minor i Popoff, 1987; Reeves *et al.*, 1989).

En base a la caracterització de la seva fórmula antigènica, s'estableixen una sèrie de serotips (o serovars) que permeten identificar els aïllaments per sota del nivell de subespècie. La combinació dels antigens somàtics o de paret bacteriana (O) i els antigens flagel·lars (H) dona lloc a una fórmula antigènica que permet la identificació de més de 2.500 serotips diferents en el cas de *Salmonella enterica* subesp. *enterica*, subespècie que agrupa la majoria de salmonel·les i l'única que afecta a l'home i als animals de sang calenta. Aquesta fórmula s'expressa com x,y,z (antigens somàtics):r,r (antigens flagel·lars de fase 1):n,n (antigens flagel·lars de fase 2). Per exemple,

Salmonella Typhimurium es caracteritza per la seva fórmula antigènica de 1,4,5,12:i:1,2 i té per tant, els antígens O 1, 4, 5 i 12. Alhora, tots els serotips que comparteixen antígens O formen un serogrup. Fins al moment, els diferents serovars de *Salmonella enterica* subesp. *enterica* s'agrupen en 46 serogrupos diferents.

Així, en realitat, quan ens referim a *Salmonella* Typhimurium estem parlant de *Salmonella enterica* subesp. *enterica* serotip Typhimurium. Però amb la finalitat d'agilitzar-ne l'escriptura, es va proposar que el serotip al què es feia referència s'escriuís en lletra no cursiva i s'iniciés amb majúscula. D'altres serotips d'aquesta mateixa subespècie deuen el seu nom a la localització geogràfica del brot, com per exemple, *Salmonella* Montevideo o *Salmonella* Ohio. Finalment, quan no és possible detectar en el laboratori la fórmula antigènica completa d'un bacteri, s'especifiquen tots els antígens identificats i s'indica, entre parèntesi, la subespècie a la qual pertany. Aquest és el cas de *Salmonella* 4, 5, 12:i:- (Sub. I), una variant monofàsica del serotip Typhimurium que ha perdut la capacitat de produir antígens flagel·lars de fase 2 (de la Torre *et al.*, 2003). En general, tots els serotips coneguts es troben llistats segons l'esquema de Kauffman-White-Le-Minor; tot i que a la pràctica, habitualment només se n'aïllin uns quants. En definitiva, la serotipificació s'utilitza actualment com a marcador epidemiològic ja que permet realitzar el seguiment dels principals serotips.

Encara que existeixen alguns serotips de *Salmonella* especialment adaptats a determinats hostes, com per exemple, Typhi, Gallinarum, Abortusovis i Abortus equi que afectarien a l'home, les aus, les ovelles i els cavalls, respectivament, la majoria de serotips es caracteritzen per la seva naturalesa ubiqüitària, podent sobreviure en un ampli rang d'espècies. Pel que fa al porc, aquest pot infectar-se per un serovar adaptat a ell que és *Salmonella* Choleraesuis i també per molts altres serovars no específics d'espècie, principalment *Salmonella* Typhimurium tot i que també cal destacar els serotips Rissen, Derby, Anatum, entre d'altres.

Sovint, la determinació del serotip d'una soca aïllada pot no ser suficient i es requereixen investigacions epidemiològiques més detallades basades en la fagotipificació, és a dir, l'avaluació de la sensibilitat dels aïllaments davant un grup

seleccionat de bacteriòfags (Tenover *et al.*, 1995). S'han desenvolupat diferents esquemes de fagotipificació principalment per aquells serotips d'especial importància clínica o epidemiològica, com per exemple, els serotips Typhimurium (DT104, DT104b, DT U302), Enteritidis (1, 4, 6A) i Virchow (8, 19, 31) (Anderson *et al.*, 1977; Ward *et al.*, 1987). A nivell pràctic, el seu interès es basa en que determinats fagotips estarien associats a certes característiques com són la multiresistència als antibiòtics o la seva capacitat invasiva.

Un altre nivell de determinació dels aïllaments pot obtenir-se mitjançant tot un seguit de tècniques moleculars posades a punt en els últims anys. D'entre elles es poden destacar en primer lloc l'electroforesi de camp polsat (*Pulsed Field Gel Electrophoresis*, PFGE), els perfils plasmídics i el ribotipat, entre d'altres. Aquests mètodes són útils per a investigar brots de malaltia, identificar fonts de contagi, definir les relacions clonals entre diferents soques aïllades, així com avaluar la seva distribució en determinats ambients (Millemann *et al.*, 1995; On i Baggesen, 1997). Entre d'altres mètodes moleculars utilitzats cal comentar els basats en la reacció en cadena de la polimerasa (PCR), com la RAPD i l'ERIC-PCR.

2.2. Epidemiologia de Salmonella en les explotacions porcines

2.2.1. Nivells de prevalença en les granges d'engreix

En els darrers anys s'han realitzat un gran nombre d'estudis bacteriològics i serològics en diversos països per a determinar la prevalença de *Salmonella* en el porcí. Tradicionalment, el mètode analític més utilitzat s'ha basat en el cultiu bacteriològic de mostres fecals recollides a la granja o a l'escorxador. Últimament, però, la determinació i la classificació de les granges en funció de la seva seroprevalença s'ha estès considerablement.

En termes generals, la prevalença bacteriològica donaria informació sobre la proporció d'animals que excreten activament el bacteri en femtes i la seroprevalença, en canvi, basada en la detecció per ELISA d'anticossos específics contra *Salmonella*, indicaria el contacte previ dels animals amb la infecció, tot i no estar necessàriament infectats en aquell moment.

De les dades obtingudes a partir de la bibliografia, es pot observar que la prevalença bacteriològica per *Salmonella* en granges porcines de diferents països és molt variable. Mentre que a Holanda, Dinamarca, Irlanda i Itàlia es varen descriure un 23%, 11,4%, 51% i 36,8%, respectivament, de granges positives (van der Wolf *et al.*, 1999; Christensen *et al.*, 2002; Rowe *et al.*, 2003; Ricci *et al.*, 2005); a països com Estats Units, Canadà i Korea el percentatge se situaria en un 83%, 66,7% i 51,1%, respectivament (Davies *et al.*, 1997b; Rajic *et al.*, 2005; Suh i Song, 2005). Actualment, a Espanya, al voltant del 42,7% de les explotacions d'engreix serien positives a *Salmonella* (Carvajal, 2005; comunicació personal, VIII Jornadas de Porcino de la UAB) i en concret, a Catalunya, el percentatge se situaria en un 28% (Mejía *et al.*, 2006).

Respecte al nivell de prevalença bacteriològica individual, aquest últim estudi descriu un percentatge de portadors subclínic en les granges catalanes d'entre el 2% i el 3%. Similars percentatges han estat determinats a Dinamarca, Grècia i Noruega, situant-se els valors en un 2,1%, 1,4% i entre 1%-4%, respectivament (Stege *et al.*, 2000; Grafanakis *et al.*, 2001; Sandberg *et al.*, 2002). Tanmateix, a Holanda, als Estats Units i al Japó s'han descrit prevalences del 12%, 17,6% i 9,8%, respectivament (Davies *et al.*, 1998; van der Wolf *et al.*, 1999; Asai *et al.*, 2002).

Els resultats de seroprevalença en les granges també oscil·len àmpliament entre estudis. A Dinamarca, Grècia, Japó i als Estats Units els nivells van situar-se en un 47%, 35,6%, 67,3% i 19%, respectivament (Mousing *et al.*, 1997a; Grafanakis *et al.*, 2001; Asai *et al.*, 2002; O'Connor *et al.*, 2006). Dades holandeses referents a mostres realitzats els anys 1996 i 1999 varen indicar uns valors de seroprevalença del 23,7% i 24,5%, respectivament (van der Wolf *et al.*, 2001b). Resultats d'Àustria de l'any 2003 situaren en només un 5,2% el nivell de seroprevalença en les seves explotacions d'engreix (Köfer *et al.*, 2006). A Catalunya, segons resultats de l'any 2002, la proporció d'engreixos positius seria d'un 77,3% (Mejía *et al.*, 2006).

Tal i com es pot observar, s'han realitzat un gran nombre d'estudis en diferents països encaminats a determinar els nivells de prevalença per *Salmonella* en el porcí i en

general, existeix una àmplia variació en quan als resultats que es descriuen. Diferències pròpiament geogràfiques i lligades als diferents sistemes de producció entre països, així com la manca d'informació sobre com s'ha realitzat el propi mostreig (criteri de selecció i com són de representatives les granges mostrejades, distribució dels animals mostrejats en les naus, etc.) explicarien part d'aquesta variació en els valors obtinguts i dificultarien alhora, l'establiment de comparacions entre estudis.

També cal tenir en compte que els valors obtinguts en cada estudi particular només són indicatius del nivell de prevalença d'un període concret; l'estatus de *Salmonella* d'un grup de granges, d'una explotació concreta o fins i tot d'un lot d'animals pot variar àmpliament al llarg del temps i per tant, un sol mostreig donaria només una instantània de la situació (Funk *et al.*, 2001; Lo Fo Wong *et al.* 2004b; Rajic *et al.*, 2005). A més a més, diversos països europeus, com Dinamarca, el Regne Unit i Irlanda han implementat en els darrers anys algun tipus de programa de control de la salmonel·losi porcina i per tant, els resultats d'alguns d'aquests estudis podrien no reflectir la situació en la que es troba actualment la infecció en els seus sistemes de producció.

A l'hora de comparar diferents estudis bacteriològics, a més del mètode de cultiu emprat, tema del que es farà referència en un apartat posterior, cal destacar diversos factors relacionats amb el mètode de mostreig. En primer lloc cal tenir en compte que el caràcter intermitent de l'excreció de *Salmonella* per femtes en els animals infectats subclínicament és un factor que podria limitar la sensibilitat dels estudis (Hurd *et al.*, 1999). També hi influeix la quantitat de mostra recollida, donat que la sensibilitat dels mètodes bacteriològics s'incrementa significativament quan major és la quantitat de mostra analitzada (Funk *et al.*, 2000). Per últim, el lloc de recollida de les mostres resulta igualment important. Per facilitat i disponibilitat d'un gran nombre de mostres (femtes, ganglis limfàtics, etc.) s'acostuma a triar el mostreig a l'escorxador. Tanmateix, els resultats bacteriològics de les mostres obtingudes a l'escorxador podrien estar sobreestimant la prevalença en granja. Durant el transport i l'espera a l'escorxador, els animals poden infectar-se degut al contacte amb d'altres animals i

l'ambient contaminat dels camions i els corrals (Hurd *et al.*, 2001a; 2002; 2004; Gebreyes *et al.*, 2004a). En concret, el temps necessari perquè una infecció inicial de *Salmonella* en tonsil·les pugui aïllar-se finalment en femtes es calcula d'unes dues hores (Hurd *et al.*, 2001a). Per altra banda, els resultats obtinguts del mostreig en granja no tindrien en compte el percentatge real d'animals que, essent portadors en aquell moment, no eliminarien el bacteri per femtes.

Respecte als estudis serològics, tant la classe de mostra analitzada com el tipus i el punt de tall de l'ELISA utilitzat són factors addicionals que poden influir en la variació dels valors de prevalença obtinguts. En general, la determinació d'anticossos a partir de mostres de suc de carn (obtingut de la descongelació d'un fragment de múscul, normalment diafragma) tindria una menor sensibilitat en comparació amb l'ús de sèrum. Segons Mousing *et al.* (1997a) i Nielsen *et al.* (1998), la utilització de mostres de suc de carn es caracteritza per tenir una sensibilitat lleugerament inferior (81%-89%) en comparació amb el sèrum. Per altra banda, a nivell pràctic, l'obtenció i la identificació de les mostres de suc de carn resulta molt més simple i per tant, de més utilitat en el cas d'estudis a gran escala (Mousing *et al.*, 1997a; Nielsen *et al.*, 1998).

Pel que fa al tipus de prova utilitzada, cal tenir en compte que els ELISA es basen en la detecció d'anticossos enfront de determinats lipopolisacàrids (LPS) del bacteri i per tant, només detecten anticossos contra uns serogrupos de *Salmonella* determinats. Actualment, els ELISAs més utilitzats només detecten anticossos contra els serogrupos B, C1 i D1 ja que la majoria d'infeccions per *Salmonella* en porcs són produïdes per algun d'aquests serogrupos. Tanmateix, si bé a Dinamarca i a Holanda aquests tests serien capaços de detectar al voltant del 90%-95% de tots els aïllaments de *Salmonella* obtinguts (Baggesen *et al.*, 1996; van der Wolf *et al.*, 1999), s'ha descrit que a Catalunya, només un 63,4% dels aïllaments de *Salmonella* serotipificats pertanyen a aquests serogrupos concrets (Mejía *et al.*, 2006). En paral·lel, la presència de soques amb una diferent capacitat d'invasió i disseminació podrien resultar en respostes humorals d'una intensitat variable i no detectades per igual amb tots els ELISAs (van Winsen *et al.*, 2001a).

També cal considerar el punt de tall utilitzat per a designar els positius a la prova, doncs la capacitat de detectar animals seropositius, és a dir, la sensibilitat de la tècnica en qüestió, es veu reduïda a l'incrementar-se el punt de tall. Mousing *et al.* (1997a) descriuen una variació en la proporció de granges positives del 47% al 90% al passar d'utilitzar un punt de tall corresponent a una densitat òptica (D.O.) equivalent al 40% del control positiu a una D.O. de l'11%.

Un darrer factor a comentar és l'edat dels animals en el moment del mostreig. Per una banda, el fet que els animals puguin seronegativitzar al final de l'engreix determinaria que un mostreig en aquest període pogués resultar en un menor nombre d'animals positius (van der Wolf *et al.*, 2001c). Per contra, s'ha descrit que és en l'últim mes de l'engreix quan són més freqüents els casos clínics de salmonel·losi, suggerint-se per tant, un increment en el nombre d'animals que arriben seropositius en aquestes edats (van der Wolf *et al.*, 2001a).

2.2.2. Distribució i dinàmica de transmissió de *Salmonella* dins les granges

Fins i tot en les explotacions on es detecta *Salmonella*, s'observa una variació en la distribució de la prevalença d'acord al grup d'edat dels animals. Si bé normalment la prevalença bacteriològica per *Salmonella* en els animals d'engreix resulta superior que en les reproductores (Christensen *et al.*, 1999; Funk *et al.*, 2001; Kranker *et al.*, 2003; Rowe *et al.*, 2003), diversos estudis descriuen una considerable prevalença individual en aquestes últimes. Als Estats Units, Davies *et al.* (1998) van detectar una prevalença bacteriològica d'entre el 18% i el 22% en la població de reproductores d'un sistema de producció en múltiples fases. Al Canadà, també Letellier *et al.* (1999) van trobar uns majors nivells de prevalença en les granges de truges que en els engreixos. A Catalunya, el nivell d'aïllaments obtingut en les unitats de reproductores va resultar superior al dels engreixos; en concret, es detectà al voltant d'un 13,4% de truges excretores actives del patogen (Mejía *et al.*, 2006). Respecte al cicle productiu de les truges en el qual s'observa una major prevalença per *Salmonella*, les opinions són diverses. Alguns estudis consideren que les truges gestants tindrien una major probabilitat de ser excretores que les llevores i les truges lactants (Funk *et al.*, 2001;

Korsak *et al.*, 2003). Per contra, Letellier *et al.* (1999) descriuen una major prevalença d'infecció en les llevores en comparació amb altres grups d'edat i segons Nollet *et al.* (2005b), és en el període de deslletament quan s'observa un major increment en el nombre de truges excretores de *Salmonella*.

La presència de *Salmonella* en les unitats de reproductores resulta rellevant pel possible paper que poden tenir en la transmissió de la infecció a la seva descendència i en conseqüència, als animals d'engreix. Tot i que s'aïlla *Salmonella* en garrins en lactació i just després del seu deslletament; indicant per tant, la possible infecció procedent de les mares, en general, la prevalença sol ser baixa en els garrins (Funk *et al.*, 2001; Nollet *et al.*, 2005b). Segons Funk *et al.* (2000) aquests valors podrien estar subestimats degut a que la tècnica de mostreig utilitzada, basada en l'ús d'hisops rectals, es caracteritza per tenir una menor sensibilitat en comparació a la recollida d'una major quantitat de femtes. Per contra, d'altres estudis sostenen la hipòtesi que la transmissió mare-descendència és relativament poc important. Per una banda, és possible prevenir la infecció de garrins procedents de granges de reproductores amb problemes de *Salmonella* mitjançant el seu moviment a ambients més nets, just deslletats (Fedorka-Cray *et al.*, 1997a; Nietfeld *et al.*, 1998) o fins i tot amb 10 setmanes d'edat (Dahl *et al.*, 1997). Per l'altra, la diferència entre els serotips aïllats durant les fases de transició i engreix enfront dels que es troben en les reproductores suggereix també el menor paper d'aquestes últimes en la presència de *Salmonella* en els engreixos (Davies *et al.*, 1998; Funk *et al.*, 2001; Belœil *et al.*, 2003). Contràriament, Nollet *et al.* (2005a) descriuen una similitud entre el perfil genètic dels serotips aïllats en unitats de reproductores i aquells trobats en els animals durant els períodes de transició o engreix. Tot i això, aquests autors no van poder demostrar la transmissió directa de les truges a la seva descendència, proposant la transmissió indirecta per mitjà dels treballadors i de l'ambient de les instal·lacions.

Respecte a la relació entre la infecció en les reproductores i els animals d'engreix, no s'ha pogut demostrar que els garrins de truges positives tinguin un major risc d'excretar *Salmonella* durant la fase de transició i engreix; suggerint-se per tant, el paper dels anticossos maternals en la protecció (Funk *et al.*, 2001; Kranker *et al.*,

2003; Nollet *et al.*, 2005a). Segons Berends *et al.* (1996), les infeccions per *Salmonella* procedents de les unitats de reproductores només representarien entre un 1%-10% del total d'infeccions produïdes durant la fase d'engreix. D'altra banda, un estudi realitzat per a determinar la relació entre la seropositivitat de les truges i l'estatus bacteriològic dels garrins en granges de cicle tancat, descriu una correlació positiva entre aquests dos paràmetres; tot i que dels cinc països europeus participants en l'estudi, només es va trobar aquesta associació a Dinamarca (Lo Fo Wong, 2001).

Una vegada desapareguts els anticossos maternals, generalment aquests persisteixen fins a les 7-8 setmanes d'edat, la seroconversió dels animals tindria lloc de nou durant l'engreix, sobretot en l'últim terç (Berends *et al.*, 1996; Proux *et al.*, 2000; Belœil *et al.*, 2003; Silva *et al.*, 2003). A més, l'excreció de *Salmonella* també s'observa principalment durant la primera meitat de l'engreix; originada bàsicament pel contacte amb noves fonts d'infecció. Aquests fets, juntament amb el canvi en el perfil dels serotips circulants entre les fases de transició i engreix i en la mateixa fase d'engreix (Davies *et al.*, 1999), indicarien molt possiblement que aquesta etapa és crítica per a la presència de *Salmonella* en els animals destinats a l'escorxadador.

2.2.3. Factors que intervenen en la introducció i la transmissió de *Salmonella* dins les granges

Certs aspectes relacionats amb la bioseguretat i l'estat sanitari a les explotacions, així com determinats sistemes de producció, de maneig i d'alimentació s'associen amb un major risc d'introducció i disseminació de *Salmonella* en les explotacions porcines. En base a aquests factors de risc, s'han proposat diverses mesures d'intervenció i control a les granges. Així mateix, cal tenir en compte que no existeix una estratègia de control única i aplicable a totes les situacions, sinó que aquesta hauria de basar-se en una combinació de mesures pràctiques i econòmicament factibles formulades en funció de cada granja (Lo Fo Wong *et al.*, 2004a).

2.2.3.1. Mesures de bioseguretat i sanitat

Les granges d'engreix no són sistemes aïllats, sinó que contínuament s'estableixen contactes amb diferents factors externs que poden introduir *Salmonella* a les

instal·lacions. D'entre les nombroses fonts d'introducció, cal destacar l'entrada de nous animals i el pinso, factor aquest últim que serà comentat en un apartat posterior.

El paper de l'entrada d'animals infectats resulta especialment important quan es tracta de truges de reposició ja que suposa un risc d'introducció de la infecció en una nova granja. Davies *et al.* (2000a) van observar que elevats índexs de reposició externa i a més, procedent de múltiples orígens, són factors que poden contribuir a una major entrada de *Salmonella* en les explotacions de reproductores. Per una banda, l'estrès del transport pot reactivar la infecció en aquells animals portadors i convertir-se d'aquesta manera, en una font de contaminació per a les truges pròpies de les granges. A més, la nova reposició presenta en general una major susceptibilitat a la infecció degut a una menor immunitat específica. Els elevats nivells de prevalença descrits en general en truges (Davies *et al.*, 1998) i sobretot, en truges de reemplaçament (Letellier *et al.*, 1999) fan necessari, per tant, l'aplicació de programes d'avaluació dels proveïdors d'animals reproductors i la utilització de sistemes d'adaptació o quarantena.

En referència a les unitats d'engreix, a banda de la necessitat de portar a terme el control sanitari dels animals de procedència, resulta bàsic minimitzar el número d'orígens. Diversos estudis descriuen l'associació entre l'entrada a les granges d'engreix d'animals de múltiples orígens i una major seropositivitat a *Salmonella* (Quessy *et al.*, 1999; Lo Fo Wong *et al.*, 2004a).

A més de la via d'introducció a partir de la nova reposició i l'aliment contaminat, *Salmonella* pot vehicular-se a través de diverses espècies d'animals presents en les explotacions. Gats, gossos, ocells, rosegadors i insectes (mosques i escarabats) poden actuar com a reservoris o vectors del patogen (Coulson *et al.*, 1983; Letellier *et al.*, 1999; Barber *et al.*, 2002; Liebana *et al.*, 2003). S'han detectat recomptes de *Salmonella* superiors a 10^5 UFC en femtes de rosegadors trobats als voltants de granges d'aviram (Henzler i Opitz, 1992). Barber *et al.* (2002) aïllaren *Salmonella* d'un 8% de les femtes dels ocells presents en explotacions positives; a més, la falta de mesures per controlar l'entrada d'ocells a les instal·lacions s'ha associat

significativament amb la seropositivitat a *Salmonella* (Bahson *et al.*, 2001; Mejía *et al.*, 2006). Aquests animals poden transmetre la infecció als porcs ja que actuarien com a una font de contaminació dels pinsos i l'aigua a través de les seves femtes (Harris *et al.*, 1997) i també perquè els seus cadàvers podrien ser consumits pels mateixos porcs.

També s'ha descrit la importància del paper de l'aigua en la disseminació de la infecció per *Salmonella* en les explotacions (Letellier *et al.*, 1999), així com la relació entre l'origen de l'aigua i la seva cloració, amb la seropositivitat de la granja; essent les granges que utilitzen normalment aigua de pou sense potabilitzar més probable que resultin contaminades (Mejía *et al.*, 2006).

Per últim, la presència en les explotacions d'altres espècies de bestiar també constituiria un risc important (Funk i Gebreyes, 2004; Mejía *et al.*, 2006). Fins i tot les visites i els propis treballadors poden vehicular i ajudar a la transmissió del patògen dins les instal·lacions. En diversos estudis s'ha aïllat *Salmonella* de les botes dels treballadors (Letellier *et al.*, 1999; Rajic *et al.*, 2005). En paral·lel, la neteja freqüent de les mans per part del personal de les granges s'ha associat amb una disminució dels valors de seroprevalença (Lo Fo Wong *et al.*, 2004a).

En quant a l'aspecte de la sanitat, és important incidir en el control sanitari dels animals, sobretot pel que fa a la prevenció de problemes entèrics. L'excreció fecal de *Salmonella* és molt elevada en animals que pateixen un quadre entèric de salmonel·losi o en altres casos de diarrea (van der Wolf *et al.*, 2001a; Mejía *et al.*, 2006; Oliveira *et al.*, 2005; Quessy *et al.*, 2005). Es creu que la presència d'altres patògens digestius predisposaria a un desequilibri en l'ecosistema microbiològic intestinal dels animals (Belœil *et al.*, 1999).

2.2.3.2. Característiques de les granges i sistemes de maneig

Els sistemes de producció TD/TF (tot dins/tot fora) que segueixen principis basats en un eficient programa de neteja i desinfecció entre lots i en no barrejar grups d'animals de diferents edats, etc., combinats amb d'altres mesures com el seguiment de

determinades pautes higièniques en la rutina diària de treball com rentar-se les mans, canvi de roba i botes, entre d'altres pràctiques, semblen ser efectius per a controlar la proporció de portadors a les granges (Fedorka-Cray *et al.*, 1997a; Lo Fo Wong *et al.*, 2004a; Farzan *et al.*, 2006). Aquests sistemes no evitarien la introducció del patogen dins l'explotació, però al permetre l'aplicació d'unes eficients mesures de neteja i desinfecció entre lots es disminuirien les reinfeccions contínues procedents de l'ambient. *Salmonella* pot persistir diversos mesos en restes de pols i matèria orgànica presents en corrals buits, equipaments i sistemes de ventilació (Berends *et al.*, 1996; Rajic *et al.*, 2005). En concret, realitzar períodes de buidat i neteja entre lots successius de menys d'un dia, clarament insuficients per a permetre una neteja i desinfecció a fons dels corrals, s'ha associat significativament a un major risc d'excreció de *Salmonella* en els animals d'engreix (Belœil *et al.*, 1999).

Respecte a la influència que podrien tenir certes característiques de les granges en la infecció per *Salmonella* en els animals, la mida més gran de les explotacions s'associa generalment, amb una prevalença bacteriològica o serològica més elevada (Mousing *et al.*, 1997a; Quessy *et al.*, 1999; Mejía *et al.*, 2006), si bé altres estudis han descrit una major seroprevalença en aquelles granges més petites (van der Wolf *et al.*, 2001a). Segons diversos autors, aquests resultats contradictoris es podrien deure a que la mida de la granja es comporta com a una variable de confusió ja que englobaria múltiples factors que actuen tant a nivell general (tipus d'alimentació, mètode de desinfecció, número de treballadors, etc.), com individual (densitat, tipus de corral, separació entre corrals, etc.) de la granja (Carstensen i Christensen, 1998; Farzan *et al.*, 2006; Mejía *et al.*, 2006).

Seguint amb determinades característiques de les instal·lacions, sembla ser que la utilització de separacions sòlides i suficientment altes entre corrals resultaria útil per a prevenir la disseminació de la infecció entre grups d'animals (Dahl *et al.*, 1996; Lo Fo Wong *et al.*, 2004a). Aquests tipus de separacions reduirien el contacte dels animals amb les femtes dels altres porcs, evitant-se d'aquesta manera la continuïtat del cicle feco-oral, considerada com la via més important de transmissió de *Salmonella* (Schwartz, 1999) i també disminuirien el contacte nasal entre animals de

corrals contigus. Paral·lelament al mode de transmissió per ingestió, *Salmonella* pot disseminar-se per l'aire a través d'aerosols (Fedorka-Cray *et al.*, 1995; Lever i Williams, 1996; Oliveira *et al.*, 2006) i de partícules de pols (Lettellier *et al.*, 1999).

Els corrals amb terres totalment d'eslat, que permeten una millor neteja i drenatge de les dejeccions que els de ciment, ajudarien a prevenir la infecció ja que reduirien l'exposició repetida dels animals amb les femtes (Davies *et al.*, 1997a; Davies *et al.*, 1997b; Nollet *et al.*, 2004). Aquest contacte continu amb material fecal seria el motiu pel qual els abeuradors del tipus caçoleta s'han associat a un major risc d'infecció (Bahson *et al.*, 2006a).

2.2.4. Paper de l'alimentació animal en l'epidemiologia de la salmonel·losi porcina

L'alimentació animal juga un doble paper en l'epidemiologia de la salmonel·losi porcina. A més de ser una possible via d'introducció de *Salmonella* en les explotacions a través de pinso contaminat, destaca pel seu paper en el control de la transmissió de la infecció degut al seu impacte sobre la fisiologia digestiva dels animals.

2.2.4.1. Contaminació per *Salmonella* en matèries primeres i pinsos

Des de que es va demostrar experimentalment que els animals poden infectar-se per l'aliment contaminat (Williams, 1960), s'han realitzat diversos estudis amb l'objectiu de determinar la presència del patogen en l'alimentació animal. Tot i que es descriuen diferents rangs de contaminació entre països (Taula 2.1), en termes generals pot afirmar-se que pràcticament totes les matèries primeres poden resultar potencialment contaminades per *Salmonella*; tant les d'origen animal (tradicionalment considerades les principals fonts de *Salmonella*), com les d'origen vegetal (Eld *et al.*, 1991; Malmqvist *et al.*, 1995; del Pozo *et al.*, 2001). D'aquestes últimes, els productes de naturalesa proteica, com les farines de soja i d'altres oleaginoses, juntament amb els derivats de cereals com les segones de blat, s'associen en general a uns majors nivells de contaminació. Per contra, els grans de cereals són considerats ingredients de baix

risc en comparació amb els seus productes processats (McChesney *et al.*, 1995; Israelsen *et al.*, 1996).

Taula 2.1. Nivells de contaminació per *Salmonella* en matèries primeres i pinsos

País	Producte	Contaminació (%)	Referència
Unió Europea	Farines d'oleaginoses	0,4-6,7	EFSA, 2006
	Cereals	0-3,3	
	Pinsos	0-6,2	
Holanda	Matèries primeres	17	Veldman <i>et al.</i> , 1995
	Pinsos	10	
Espanya	Matèries primeres	3	Adiveter, 2005 (Comunicació personal)
	Pinsos	3,3	Creus <i>et al.</i> , 2004
	Matèries primeres	5,5	
Estats Units	Pinsos	25	Muirhead, 1995
	Matèries primeres	8,8	Jones i Richardson, 2004
	Pinsos	5,5	

Respecte a la presència de *Salmonella* en pinsos comercials, els nivells descrits s'indiquen a la Taula 2.1. Tal i com es pot observar, el percentatge de contaminació que generalment es troba no resulta molt elevat. Tot i això, cal tenir en compte que aquests resultats podrien estar subestimats degut, principalment, a l'insuficient nombre de mostres sovint recollides i analitzades (Lo Fo Wong, 2001). En general, els baixos recomptes del bacteri presents en aquests tipus de productes i la distribució tant poc uniforme de la contaminació, a més dels volums tant elevats de material amb els que se sol treballar, dificulta enormement la realització d'un correcte protocol de mostreig (D'Aoust i Sewell, 1986; McChesney *et al.*, 1995).

No obstant, en el darrers anys s'ha observat una certa disminució en els percentatges de contaminació presents en els pinsos comercials. Aquest fet podria tenir una relació directa amb la creixent aplicació d'algun tipus de tractament de descontaminació, físic o químic, dels pinsos, juntament amb la prohibició de la utilització de proteïnes animals en l'alimentació animal. Cal destacar, però, que els tractaments de descontaminació no permeten garantir l'absència total de *Salmonella* en el pinso que

arriba als animals; aquest pot recontaminar-se durant la seva manipulació a la mateixa fàbrica (Davies i Wray, 1997; Jones i Richardson, 2004) o al llarg del seu transport (Fedorka-Cray *et al.*, 1997b), emmagatzematge i distribució a la granja (Berends *et al.*, 1996; Daniels *et al.*, 2003).

Si bé l'aliment contaminat és considerat una de les principals fonts d'exposició de *Salmonella* en els animals, el seu paper en l'epidemiologia de la infecció no està del tot clar (Berends *et al.*, 1996; Lo Fo Wong, 2001; Davies *et al.*, 2004). En general, els aïllaments obtinguts dels pinsos no solen correspondre's amb els que afecten amb més freqüència a persones i animals. Al mateix temps, els serotips amb major incidència entre la població humana i animal tampoc resulten gaire freqüents en els pinsos. Aïllaments com *Salmonella* Mbandaka, *Salmonella* Senftenberg, *Salmonella* Livingstone, *Salmonella* Bredeney, *Salmonella* Tennessee, *Salmonella* Agona, *Salmonella* Montevideo, entre d'altres i que afecten només esporàdicament a l'home i als animals són dels més comuns en matèries primeres i pinsos. En paral·lel, *Salmonella* Enteritidis, principal serotip implicat en els casos de toxiinfeccions en humans en els últims anys i el de major incidència en la població d'aus, no sol aïllar-se en els pinsos; fet similar succeeix amb l'aïllament de *Salmonella* Typhimurium, serotip que actualment predomina en les explotacions porcines (EFSA, 2006).

Tot i això, alguns serotips s'han relacionat com a causants d'infeccions subclíniques en els animals i coincideixen en ocasions amb els implicats en casos de toxiinfeccions en persones. Aquest és el cas de *Salmonella* Anatum en el porcí, un dels cinc serotips més comuns de *Salmonella* aïllat en diferents explotacions espanyoles entre els anys 2002 i 2004 (de Frutos *et al.*, 2005) i també en mostres procedents de matèries primeres analitzades durant l'any 2002 (Valdezate *et al.*, 2003). En concret, en un estudi realitzat a Catalunya sobre un total de 72 unitats de reproductores, *Salmonella* Anatum va ser el serotip predominant (Mejía *et al.*, 2006). També *Salmonella* Bredeney i *Salmonella* Mbandaka es troben a la llista dels serotips aïllats en més ocasions en humans en els darrers anys (Usera *et al.*, 2003; Echeita *et al.*, 2005a).

Aquesta diversitat entre els aïllaments obtinguts en els pinsos i els de major importància epidemiològica es podria relacionar principalment amb la diferent capacitat invasiva de les soques, és a dir, la seva habilitat per disseminar-se a través dels teixits i establir una infecció persistent en humans i animals (Malmqvist *et al.*, 1995; Veldman *et al.*, 1995). També té importància la dosi infectiva mínima (Williams, 1960; Sarwari *et al.*, 2001; Crump *et al.*, 2002). D'aquesta manera, mentre l'exposició oral a dosis infectives tant reduïdes de 5×10^8 UFC de *Salmonella* Typhimurium en 25 grams de pinso són suficients per a causar infecció en els porcs, l'exposició a dosis similars d'altres serotips menys invasius no resulten en infecció (van Winsen *et al.*, 2001a).

2.2.4.2. Pràctiques d'alimentació

Encara que els tractaments de descontaminació del pinso ajudarien a prevenir el risc d'introducció de *Salmonella* en les explotacions, i això és especialment important en aquelles unitats completament negatives, no ajudarien al control de la transmissió de la infecció quan aquesta es troba ja present entre els animals. D'aquesta forma, independentment de la higiene microbiològica del pinso, determinades pràctiques d'alimentació s'han relacionat amb un major o menor risc de colonització del tracte digestiu per *Salmonella*. Aquest fet és degut, principalment, a l'efecte que l'aliment exerceix sobre l'ecosistema gastrointestinal dels animals, fet que resultaria en unes condicions desfavorables per al creixement del patògen. A continuació es detallen les principals pràctiques d'alimentació utilitzades per al control de *Salmonella* en els animals:

- Processat i composició de la dieta

Diversos estudis han trobat en l'anàlisi de factors de risc que, en comparació amb les presentacions en farina, la utilització d'aliment granulat és un factor que predisposa a l'augment de la prevalença per *Salmonella* en porcs d'engreix (Bush *et al.*, 1999; Hamilton *et al.*, 2000; Kranker *et al.*, 2001; Leontides *et al.*, 2003; Lo Fo Wong *et al.*, 2004a). Per altra banda, l'administració de pinsos en farina amb una mida de partícula grosser (més de 3 mm d'orifici en el molí), així com la inclusió de determinats ingredients fibrosos a la dieta com la polpa de remolatxa (a nivells d'un 10%) o

també la barreja amb grans de cereals partits, especialment ordi, resulta efectiva per a reduir la incidència del patogen en els animals (Jorgensen *et al.*, 1999; Kjeldsen i Dahl, 1999; Jorgensen *et al.*, 2001; Mikkelsen *et al.*, 2004; Hansen, 2004). Per contra, l'inconvenient d'aquestes pràctiques serien els pitjors índexs de conversió que s'obtenen, determinats principalment per una menor digestibilitat del pinso (Wondra *et al.*, 1995; Laurinen *et al.*, 2000).

Sembla ser que aquests tipus de dietes indueixen determinats canvis en les condicions físiques de l'estómac (major consistència, més temps de retenció de la digesta, etc.) que resultarien en un ambient favorable per a l'establiment d'un millor equilibri de l'ecosistema microbiològic intestinal de l'animal (Hansen *et al.*, 2003; Mikkelsen *et al.*, 2004; Canibe *et al.*, 2005). Bàsicament, afavorint el creixement de la població de bacteris àcid làctics i per tant, a un increment en la concentració d'àcids orgànics a nivell d'estómac i budell prim, factors que contribuirien a una reducció en el nombre d'enterobacteriàcies al llarg del tracte gastrointestinal dels animals. D'aquesta forma, l'estómac actuaria com una barrera que limitaria el pas i la proliferació de microorganismes patògens fins a trams posteriors del tracte gastrointestinal.

- Alimentació líquida pre-fermentada

L'efecte protector de les dietes líquides, bàsicament, les pre-fermentades i la seva associació amb una menor seroprevalença per *Salmonella* en granges d'engreix ha estat descrita en diversos estudis (van der Wolf *et al.*, 1999; 2001a; 2001c; Lo Fo Wong *et al.*, 2004a; Farzan *et al.*, 2006). Aquest efecte s'associa principalment a la presència d'àcids orgànics resultants de la fermentació natural que té lloc en aquest tipus d'aliment. Els àcids làctic i acètic, produïts per l'elevada població de bacteris àcid làctics presents en els subproductes utilitzats en la seva elaboració, en combinació amb la disminució del pH en el tram proximal del tracte gastrointestinal, donarien com a resultat un ambient desfavorable per al creixement d'enterobacteriàcies en el tracte digestiu (van Winsen *et al.*, 2002; Canibe i Jensen, 2003). En concret, l'administració d'una dieta líquida pre-fermentada redueix el pH gàstric a valors del voltant de 4 i també la densitat de coliforms al llarg de tot el tracte digestiu dels animals (van Winsen *et al.*, 2001b; Jensen *et al.*, 2003).

Tot i els bons resultats productius que en general s'atribueixen a aquest tipus d'alimentació, el seu principal inconvenient es deu a la important inversió inicial que suposa la seva instal·lació (tancs d'emmagatzematge, dipòsits de barreja, sistema de distribució, etc.); essent només rentable en el cas d'explotacions d'una grandària considerable (van der Wolf *et al.*, 2001a). A part, cal tenir en compte la necessitat de realitzar controls periòdics dels sistemes per tal d'assegurar l'òptima fermentació de l'aliment i l'obtenció d'uns nivells de pH efectius (inferiors a 4,5).

- Acidificació del pinso i/o l'aigua de beguda

Com alternativa a les dietes líquides pre-fermentades, la incorporació directa d'àcids orgànics en l'aliment o l'aigua de beguda pot resultar efectiva no només per la seva activitat antimicrobiana en el pinso i l'aigua, sinó també en el tracte gastrointestinal dels animals. Diversos estudis suggereixen que l'administració d'àcids orgànics a través de la dieta contribueix a la reducció del número d'enterobacteriàcies al llarg del tracte digestiu (Canibe *et al.*, 2001; Knarreborg *et al.*, 2002; Jensen *et al.*, 2003) i a una millora dels rendiments productius en garrins i en porcs en creixement (Partanen i Mroz, 1999; Kluge *et al.*, 2006).

La quantitat i el tipus d'àcid afegit a la dieta és un requisit indispensable per a esperar un cert efecte en l'animal. Si bé solen addicionar-se quantitats d'àcids inferiors a 3 kg/t (0,3%) amb l'objectiu de conservar matèries primeres i pinsos en front del creixement fúngic i bacterià, en general es necessiten nivells més elevats per assegurar l'arribada d'aquests àcids al tracte gastrointestinal dels animals i obtenir l'efecte desitjat. Segons Jensen *et al.* (2003) són necessaris nivells d'inclusió d'entre 1,5%-2% per a poder detectar una elevada concentració d'àcids a l'estómac i al llarg de l'intestí prim. Segons aquests mateixos autors, la combinació de 0,7% d'àcid fòrmic i 0,7% d'àcid làctic resultaria efectiva per a reduir la població de coliforms. Pel que fa a l'efecte vers *Salmonella*, s'ha descrit que la inclusió d'una dosi de 2,8% d'àcid làctic permet reduir-ne l'excreció fecal en garrins, i resultant a més, en una millora dels paràmetres productius (Jorgensen *et al.*, 2001).

Una vegada l'àcid arriba al tracte digestiu, el seu efecte com a antimicrobià s'atribueix a dos mecanismes simultanis. En primer lloc a la baixada de pH que provoquen a nivell del tracte gastrointestinal i, en segon lloc, a l'acció directa de la pròpia molècula sobre el metabolisme bacterià que es considera l'efecte més important (Roth, 2000; Wilson *et al.*, 2003). Aquest últim fet es deu a que la forma no dissociada de l'àcid difon passivament a través de la membrana del patogen i al dissociar-se intracel·lularment, altera el gradient de protons, causant una caiguda del pH intern del bacteri i inhibint sistemes enzimàtics necessaris per a la síntesi de proteïnes microbianes i el transport de nutrients. L'eficàcia d'inhibició d'un àcid depèn del seu valor de pKa, que és el pH al qual un 50% de l'àcid es troba dissociat. D'aquesta manera, a pHs per sota del pKa de l'àcid, s'incrementa la seva eficàcia ja que la major part de la molècula d'àcid es troba en la forma no dissociada. En general, els àcids forts com per exemple l'àcid clorhídric tenen valors de pKa pròxims a 1, mentre que la majoria d'àcids orgànics utilitzats comunament en l'alimentació animal (àcids dèbils) els seus valors de pKa se situen entre 3 i 5.

Els principals àcids orgànics amb efecte antimicrobià utilitzats en l'alimentació animal són els monocarboxílics de cadena curta com els àcids propiònic, fòrmic, acètic, butíric, sòrbic i fumàric, i els que tenen un grup hidroxil com els àcids làctic, màlic, tartàric i cítric. En concret, l'àcid fòrmic es caracteritza per tenir un efecte reductor de la població de llevats, que són actius consumidors d'àcid làctic, i se li atribueix un destacat efecte bactericida sobre *Salmonella*. Aquest efecte es deu en primer lloc a que la concentració mínima inhibidora de la seva forma no dissociada sobre *Salmonella* a pHs d'entre 4,2 i 5,4, valors de pH propis de l'estómac i la porció proximal del budell prim, se situa per sota de la dels àcids acètic i làctic (Östling i Lindgren, 1993). A més, també s'ha descrit que la seva eficàcia davant *Salmonella* Typhimurium en un substrat de digesta gàstrica a pH=4 va resultar superior que la dels àcids propiònic i làctic (Mroz, 2003). En la Taula 2.2 es mostra la concentració mínima inhibidora de diferents àcids orgànics sobre *Salmonella* Typhimurium (Peralta *et al.*, 2004).

Taula 2.2. Concentració mínima inhibidora (CMI) de diferents àcids orgànics sobre *Salmonella Typhimurium* en funció del pH

	CMI (vol/vol)		
	pH=7,2	pH=6,2	pH=5,2
Àcid làctic	>2,5	>2,5	1,25
Àcid acètic	>2,5	2,5	0,16
Àcid propiònic	>2,5	1,25	0,16
Àcid butíric	>2,5	2,5	0,16
Àcid fòrmic	*ND	>2,5	0,16

*ND: No determinat

Aquests tipus d'àcids poden administrar-se sols o en combinació i, fins i tot, en la seva forma de sal. Últimament, la utilització de les sals d'àcids orgànics, principalment en forma de sals de potassi, calci o sodi, té un interès creixent degut al seu millor maneig i per tant, dosificació més precisa; són menys corrosives i volàtils que els seus àcids lliures i a més, inodores. Les sals, a l'igual que els àcids, també destaquen pels seus efectes positius sobre la microbiota intestinal i els rendiments productius dels animals. Øverland *et al.* (2000) van observar una disminució de la població de coliforms a nivell del duodè, el jejú i el recte de porcs d'engreix després de la inclusió d'un 1,2% de diformiat potàssic en el pinso. Pel que fa al seu efecte sobre *Salmonella*, la combinació d'un pinso granulat amb una mida de partícula grossera i l'addició d'un 1,2% de diformiat potàssic va resultar efectiva per a escurçar el període d'excreció fecal del patogen en garrins infectats experimentalment (Papenbrock *et al.*, 2005).

Un altre aspecte que fa molt interessant l'aplicació de les sals d'àcids orgànics és el fet que la sal es manté pràcticament intacte durant el seu pas per l'estómac, alliberant bona part de la molècula d'àcid a nivell del duodè. D'aquesta manera, s'evita que l'àcid es dissociï totalment a l'estómac i per tant, pugui arribar encara actiu en trams posteriors del budell. Un efecte similar sembla que s'obté a través de la protecció de l'àcid mitjançant tecnologies d'encapsulació o la incorporació dins una matriu d'origen lipídic o mineral. D'aquesta manera, a més d'incrementar-ne la seva

palatabilitat, s'assegura que l'àcid es mantingui intacte fins a trams encara més posteriors del tracte digestiu (Mroz, 2003). Tot i això, encara hi ha pocs estudis que confirmin la seva eficàcia vers *Salmonella* en el porcí i la majoria de treballs estan realitzats en l'avicultura (Van *et al.*, 2004; Van *et al.*, 2005).

Com s'ha comentat anteriorment, una altra possibilitat d'administració dels àcids orgànics és a través de la seva incorporació a l'aigua de beguda. Segons van der Wolf *et al.* (2001d), l'acidificació de l'aigua amb una barreja d'àcids al 0,2% sembla resultar efectiva per a reduir la seroprevalença de *Salmonella* en porcs d'engreix. Tanmateix, un dels inconvenients d'aquesta pràctica és la problemàtica d'obturació i corrosió dels abeuradors. Per contra, l'addició d'àcid fòrmic als sistemes de beguda a dosis més reduïdes (0,1%), no va donar resultats del tot conclouents pel que fa a la reducció de la incidència de *Salmonella* durant la fase d'engreix (Hansen *et al.*, 1999).

- Probiòtics, prebiòtics i altres additius

En general, la presència d'àcids orgànics en el tracte digestiu depèn fonamentalment de la producció directa a partir de la microbiota intestinal de l'animal. Aquests bacteris intestinals, principalment lactobacils i bifidobacteris, coneguts com a probiòtics, també poden administrar-se directament als animals mitjançant la seva addició a l'aliment. Si bé aquesta pràctica es troba més estesa en el sector de l'avicultura (Goren *et al.*, 1984; Blankenship *et al.*, 1993), en el porcí també s'ha descrit l'efecte beneficiós d'aquesta pràctica. En concret, l'addició directa de cultius bacterians a la dieta de garrins acabats de deslletar, amb l'objectiu d'afavorir un fenomen d'exclusió competitiva, s'ha associat a una disminució en l'excreció fecal de *Salmonella* i en general, a uns menors recomptes del patogen en el contingut del cec i el colon dels animals (Fedorka-Cray *et al.*, 1999; Genovese *et al.*, 2003).

La presència a l'intestí d'aquests bacteris considerats com a beneficiosos també es pot promoure mitjançant la incorporació de prebiòtics a la dieta. Aquests productes, bàsicament carbohidrats, es caracteritzen per no ser digerits pel propi animal, servint així de substrat fermentable per a un limitat rang d'espècies bacterianes intestinals. Els fructooligosacàrids (FOS) han estat els prebiòtics més extensament estudiats. En

concret, s'ha observat una reducció en els nivells d'excreció fecal de *Salmonella* en porcs inoculats experimentalment mitjançant l'administració d'una dieta complementada amb FOS (Letellier *et al.*, 2000). També s'han suggerit altres additius amb l'objectiu de minimitzar la colonització intestinal de *Salmonella* en els animals. Entre aquests hi trobem el clorat sòdic, que administrat a través de la dieta o l'aigua de beguda, es mostra realment efectiu per a reduir la concentració de *Salmonella* en el cec de garrins i porcs d'engreix (Anderson *et al.*, 2001; Anderson *et al.*, 2004). Si bé encara en fase més de desenvolupament, també cal destacar l'efecte bactericida d'alguns olis essencials, en especial, els de l'orenga (Penalver *et al.*, 2005).

- Altres pràctiques

En paral·lel a l'administració de determinades dietes, també s'està estudiant l'efecte del temps de dejuni previ al sacrifici sobre l'excreció de *Salmonella* en porcs d'engreix. Generalment, es recomanen dejunis perllongats pel seu efecte sobre la qualitat de les canals i reduir d'aquesta manera, el percentatge de canals pàl·lides/toves/exudatives (carns PSE) i també per a disminuir el pes del tracte gastrointestinal, minimitzant-se així la possibilitat del trencament accidental de l'estómac o els budells durant el procés d'evisceració (Miller *et al.*, 1997). Tanmateix, sembla ser que elevats temps de dejuni provocarien cert estrès en els animals, resultant finalment en un increment de la proporció d'animals excretors de *Salmonella* a l'escorxador (Isaacson *et al.*, 1999). Per altra banda, hi ha estudis que indiquen que períodes d'entre 12 i 24 hores no tenen aquest efecte negatiu i no incrementarien el percentatge de porcs positius a *Salmonella* a l'escorxador (Morrow *et al.*, 2002). Amb tot, els estudis realitzats fins al moment sembla que no permeten extreure'n una conclusió clara.

2.3. Epidemiologia de *Salmonella* durant el transport i l'espera a l'escorxador

Diversos estudis han avaluat la validesa d'utilitzar les dades de prevalença obtingudes en mostreigs a granja per a estimar la contaminació per *Salmonella* dels animals que arriben a l'escorxador. Hi ha indicis de que l'estatus, serològic o bacteriològic, per *Salmonella* dels animals a la granja pot guardar relació amb la contaminació de les canals (Sørensen *et al.*, 2004; Bahnson *et al.*, 2005). En concret, les canals procedents

d'explotacions amb elevats nivells de seroprevalença tindrien un major risc de resultar positives a l'escorxador (Alban i Sørensen, 2005; Quessy *et al.*, 2005). Tanmateix, sembla ser que només en el cas de lots d'animals de granges altament infectades, les determinacions realitzades a la granja podrien relacionar-se amb el nivell de contaminació de les canals. De fet, fins i tot s'ha aïllat *Salmonella* en mostres de femtes i canals a l'escorxador d'animals procedents de granges negatives (Swanenburg *et al.*, 2001c).

Tot i que la relació exacta entre el percentatge de portadors que arriben a l'escorxador i la proporció de canals contaminades no s'ha pogut determinar de forma consistent, se sap que el transport i l'espera a l'escorxador pot produir un augment del nombre d'excretors (McKinley *et al.*, 1980; Morgan *et al.*, 1987; Berends *et al.*, 1996; Morrow *et al.*, 1999; Isaacson *et al.*, 1999; Hurd *et al.*, 2001b; Hurd *et al.*, 2002; Davies *et al.*, 2003; Gebreyes *et al.*, 2004a).

Malgrat el què acabem de comentar, la diversitat de serotips que es poden aïllar en les canals dels animals d'una granja concreta sol ser superior a la dels serotips presents en els animals vius a la granja. Aquesta disparitat probablement guarda relació amb els esdeveniments que tenen lloc una vegada l'animal deixa la granja per anar a l'escorxador. Principalment, durant les fases de transport i espera a l'escorxador, encara que també, i com es comentarà en el següent apartat, durant el seu pas per la mateixa línia de sacrifici (McKinley *et al.*, 1980; Hurd *et al.*, 2001b; 2002; Rostagno *et al.*, 2003).

Durant el transport, determinats canvis fisiològics relacionats amb l'estrès afectarien l'ecologia bacteriana del tracte gastrointestinal i la immunitat de l'animal resultant finalment, en una activació de l'excreció de *Salmonella* en aquells animals portadors en fase de latència (Isaacson *et al.*, 1999). Certes pràctiques de maneig durant aquesta etapa, com l'elevada densitat d'animals, perllongats temps de transport, inclòs l'efecte de determinats períodes de dejuni i privació d'aigua, s'han associat a un increment en la concentració de cortisol plasmàtic en porcs, un dels principals indicadors immunològics d'estrès (Kelley, 1980; McGlone *et al.*, 1993). En

conseqüència, el nombre d'animals que arribarien excretors de *Salmonella* a l'escorxador s'incrementaria i per altra banda, aquells animals no portadors esdevindrien més susceptibles a la infecció (Berends *et al.*, 1996; Isaacson *et al.*, 1999); arribant a infectar-se aquests últims d'altres animals positius que viatjaven junts o de l'ambient contaminat del camió degut a la seva neteja insuficient (Rajkowski *et al.*, 1998).

Una vegada transportats, els animals restaran un temps, generalment un mínim de dues o tres hores, als corrals d'espera; temps que sembla suficient per a recuperar-se de l'estrès ocasionat pel transport (Warriss *et al.*, 1992). Tanmateix, aquesta estada en els corrals també produeix una resposta similar a l'originada durant el transport. L'estrès social dels animals per una banda, sobretot en situacions de llargs temps d'espera (Morgan *et al.*, 1987; Keenlside *et al.*, 2005), juntament amb l'elevada contaminació normalment present als corrals (Lázaro *et al.*, 1997; Swanenburg *et al.*, 2001a; Rostagno *et al.*, 2003; Boughton *et al.*, 2005a) i el fet que en només dues o tres hores *Salmonella* pot passar de la cavitat oral al budell (Hurd *et al.*, 2001a; Loynachan *et al.*, 2004; Boughton *et al.*, 2005b), indiquen que els corrals d'espera poden ser una important font d'infecció a curt termini per als animals nousinguts (Swanenburg *et al.*, 2001c). En concret, períodes perllongats d'espera (superiors a les 4 hores) i l'allotjament dels animals en corrals amb terra de ciment s'ha associat significativament a una major entrada d'animals excretors a l'escorxador (Morgan *et al.*, 1987; Hurd *et al.*, 2005; Keenlside *et al.* 2005).

2.4. Epidemiologia de *Salmonella* a l'escorxador

Tot i que les fonts de contaminació de *Salmonella* a l'escorxador poden ser múltiples (pell, pèl peülles, etc.), es considera que el principal origen de la contaminació de les canals són les salmonelles provinents del tracte digestiu dels animals en tot el seu trajecte; inclòs també, el teixit limfoide associat (Davies *et al.*, 1999; Botteldoorn *et al.*, 2003; Stathopoulou *et al.*, 2003; Vieira-Pinto *et al.*, 2005; Bahnson *et al.*, 2006b). L'esquinçament dels budells degut a pràctiques inadequades d'evisceració, molt probablement, serà la principal font de contaminacions (Berends *et al.*, 1996). Així doncs, tot i que molts d'aquests teixits no representen un risc directe per a la salut

pública, donat que en la seva majoria no arriben al consumidor, cal considerar el seu paper rellevant en la difusió de la contaminació a l'escorxador.

Tant el grau de contaminació present en aquest teixit com la interpretació que se'n faci dels resultats poden diferir considerablement en funció de la mostra analitzada. Si la presència de *Salmonella* en mostres de tonsil·les i de contingut fecal indicaria una infecció de l'animal bé sigui a la granja, bé durant el transport o als corrals d'espera, l'aïllament en mostres de limfonodes reflectiria amb més precisió l'estatus dels animals en la pròpia la granja ja que és menys probable que resultin contaminats durant les etapes de transport i espera a l'escorxador. Per altra banda, l'aïllament del patogen de la superfície de les canals i també del fetge donaria més informació sobre les pràctiques higièniques realitzades a l'escorxador (Swanenburg *et al.*, 2001b).

2.4.1. Nivells de contaminació

Tot i l'àmplia varietat de resultats, la majoria de treballs destaquen, en general, una major prevalença per *Salmonella* en les mostres de contingut fecal i de teixits limfàtics (principalment les tonsil·les i els limfonodes ileocecal) en comparació amb les canals, que presentarien un nivell més baix de contaminació (Stathopoulou *et al.*, 2003; Viera-Pinto *et al.*, 2005).

Un estudi realitzat en diferents escorxadors europeus (Hald *et al.*, 2003) descriu uns nivells de contaminació per *Salmonella* en la superfície de canals, fetges i llengües d'entre el 2,5% fins al 8,5%. En un altre estudi, el 77,5% i el 40% de les mostres de tonsil·les i de ganglis limfàtics mesentèrics, respectivament, resultaren contaminades (Lázaro *et al.*, 1997). Swanenburg *et al.* (2001b) aïllaren *Salmonella* en el 25,6% de mostres de contingut rectal mentre que a les tonsil·les, als ganglis limfàtics mesentèrics i a les canals el percentatge resultà lleugerament inferior, situant-se en un 19,6%, 9,3% i 1,4%, respectivament. Encara que el percentatge de contaminació de les canals podria considerar-se relativament baix si es compara amb d'altres mostres recollides a l'escorxador, les freqüències de contaminació descrites en els diferents estudis oscil·len considerablement; en concret, des de valors de l'1,4% fins al 37%

(Oosterom *et al.*, 1985; Korsak *et al.*, 1998; Davies *et al.*, 1999; Käsbohrer *et al.*, 2000; Swanenburg *et al.*, 2001b; Botteldoorn *et al.*, 2003; Vieira-Pinto *et al.*, 2005).

Aquest ampli rang de resultats podria atribuir-se, independentment de les qüestions relacionades amb el propi mostreig i a la metodologia d'anàlisi escollida, a les diferències pròpies que tenen lloc entre països; bàsicament degut a les diferents condicions climàtiques i sobretot, als propis sistemes de producció (maneig, densitat i raça d'animals, tecnologia dels escorxadors, etc.) (Swanenburg *et al.*, 2001b). També, en un mateix estudi és freqüent trobar una gran variació en els valors obtinguts en funció dels escorxadors participants i fins i tot, entre dies de mostreig i entre les hores de feina d'un mateix dia (Swanenburg *et al.*, 2001b; Botteldoorn *et al.*, 2003; Hald *et al.*, 2003). El diferent origen i prevalença de *Salmonella* dels animals que hi arriben, juntament amb les mesures higièniques adoptades per cada escorxador explicarien, en part, aquesta variabilitat en els resultats (Berends *et al.*, 1997; Swanenburg *et al.*, 2001b; Botteldoorn *et al.*, 2003; Bouvet *et al.*, 2003; Alban i Sørensen, 2005).

2.4.2. Factors de risc associats a la presència de *Salmonella* en les canals

La contaminació per *Salmonella* en la carn de porcí s'ha relacionat principalment amb l'entrada d'animals positius a l'escorxador (Fedorka-Cray *et al.*, 1994; Borch *et al.*, 1996; Botteldoorn *et al.*, 2003; Vieira-Pinto *et al.*, 2005). No obstant, no només el propi animal és un factor de risc per a la presència del patògen en les canals; l'ambient que envolta el seu processat també és una font important de contaminació (Oosterom *et al.*, 1985). Pel que fa al pes de cadascun d'aquests factors en la contaminació final de les canals, els pocs estudis realitzats deriven en opinions diverses. Segons Berends *et al.* (1997), el 70% de les contaminacions de canals es podrien considerar "autocontaminacions"; és a dir, tindrien el seu origen en l'estat de portador del propi animal i en defectes del processament que permetrien que, des dels budells, limfonodes o tonsil·les, el bacteri passés a la canal. L'altra 30% resultaria de les contaminacions creuades produïdes durant el processat, és a dir, pel contacte directe d'aquestes canals amb altres fonts de contaminació ambientals (estris, superfícies, manipulació pels treballadors, etc.). En canvi, estudis més recents que es basen en la caracterització dels aïllaments mitjançant mètodes moleculars accentuen

la importància d'aquests cicles de contaminació procedents de l'ambient de l'escorxador. Mentre per Wonderling *et al.* (2003) el propi animal com a portador representaria el 46% de les contaminacions en canals, Botteldoorn *et al.* (2004) situen aquesta xifra en només entre un 4% i un 25%.

Una vegada *Salmonella* arriba a la línia de sacrifici, les mateixes etapes del processat de les canals s'encarregaran de redistribuir la contaminació per l'ambient de l'escorxador: des de a la mateixa maquinària fins als estris i al sòl (Botteldoorn *et al.*, 2003; Letellier *et al.*, 2005). Segons Berends *et al.* (1997), el personal i els seus estris associats contribuirien en un major grau a les contaminacions creuades que tenen lloc a l'escorxador. Per contra, Hald *et al.* (2003) consideren que la contaminació present en la maquinària i els equips juga un paper molt més destacat en la contaminació final de les canals per *Salmonella*; principalment per l'elevat risc que proliferi aquesta contaminació residual durant les hores de treball i en especial, en mesos de forta calor.

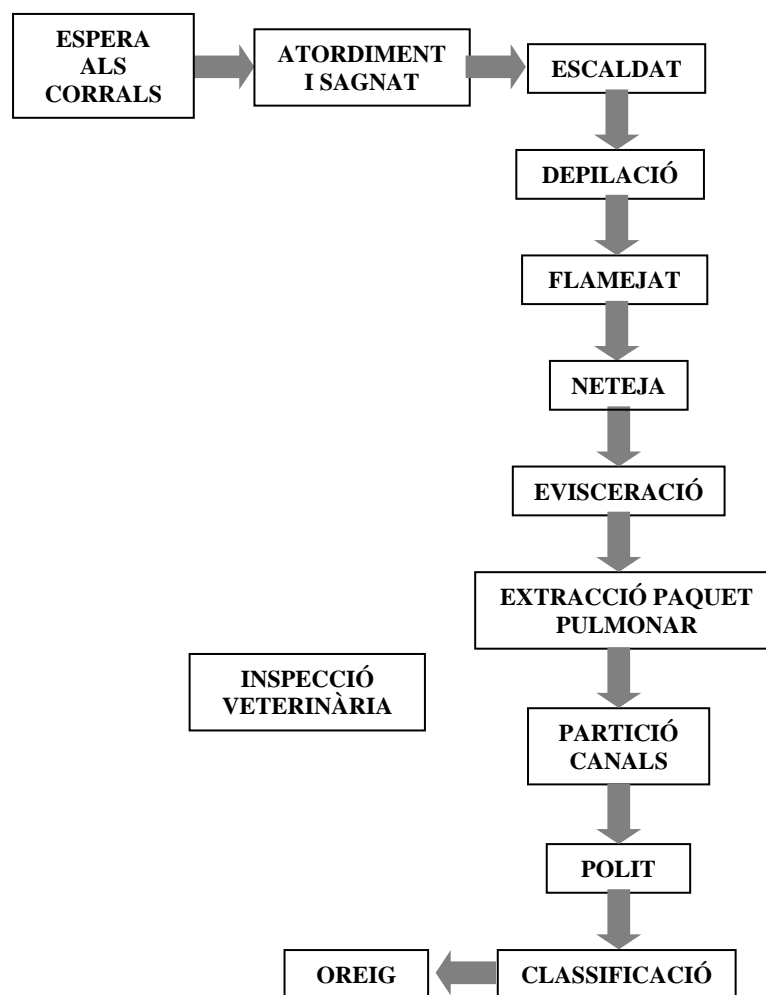
El processat de les canals sota el concepte del sistema d'Anàlisi de Perills i Punts de Control Crític (APPCC, o HACCP segons les sigles en llengua anglesa) i d'acord amb els principis del Codi de Bones Pràctiques és considerada una pauta necessària i eficaç per a poder reduir el grau de contaminació a l'escorxador (Simonsen *et al.*, 1987). Conceptualment, els sistemes APPCC proporcionen una metodologia per a identificar i avaluar els riscos sanitaris en els processos de producció i aplicar els mitjans per al seu control i correcció. D'aquesta manera, fent especial incidència en les etapes que suposen més risc, es té controlat tant el procediment com el producte i no cal esperar-se als resultats obtinguts de l'avaluació del producte final. Sovint, però, els procediments de monitorització i de control del sistema acaben essent inadequats i/o difícils d'aplicar, resultant finalment en l'entrada del patogen a l'escorxador.

2.4.2.1. Processat de les canals

En la Figura 2.1 es mostra el diagrama de flux del processat de les canals a l'escorxador. Generalment, es considera que els processos previs a l'evisceració de l'animal reduirien pràcticament la presència de *Salmonella* de la seva superfície

externa. Serà a partir d'aquesta pràctica i durant les etapes posteriors, quan la part interior de les canals, considerada en principi estèril (Dickson i Anderson, 1992; Gill *et al.*, 1995), podrà contaminar-se. Segons Berends *et al.* (1997), les pràctiques que tenen lloc durant i posteriorment a l'evisceració de les canals explicarien la presència de *Salmonella* en el 85%-95% de les canals; l'altra 5%-15% de la contaminació tindria l'origen en les fases prèvies, principalment en l'etapa de neteja posterior al flamejat. Per altra banda, Letellier *et al.* (2005) incideixen en la importància que suposa l'ambient previ a l'evisceració (corrals d'espera, tanc d'escaldat, etc.) en la prevalença per *Salmonella* en les canals. Segons aquests mateixos autors, en la majoria de canals contaminades el perfil genètic dels aïllaments no coincidien amb els que es trobaven a la zona d'evisceració, sinó en etapes anteriors.

Figura 2.1. Diagrama de flux del processat del porcí a l'escorxador



A continuació es descriuen les etapes del processat a l'escorxador considerades més crítiques per a la contaminació de les canals per *Salmonella*:

a) Etapes anteriors a l'evisceració

Una vegada l'animal és sacrificat, el seu pas pel tanc d'escaldat reduirà considerablement la seva contaminació superficial. Cal comentar, però, que el grau de brutícia dels animals abans del seu sacrifici també ha estat considerat com a possible factor de risc per a la contaminació de les canals. En concret, Letellier *et al.*, (2005) van trobar una relació significativa entre el pitjor estat de neteja dels animals a la seva entrada a l'escorxador i una major prevalença per *Salmonella* a les canals. L'acumulació de matèria fecal a la seva superfície incrementaria la probabilitat d'introducció del patogen a l'escorxador i en conseqüència, el risc de contaminació de les canals.

Està ben establert que si la temperatura de l'aigua d'escaldat és suficientment alta (com a mínim de 61°C), enterobacteriàcies com la salmonella presents en la superfície de les canals i residualment en l'aigua del tanc en resultaran afectades (Mafu *et al.*, 1989; Lázaro *et al.*, 1997; Pearce *et al.*, 2004). Tanmateix, si el temps d'immersió de les canals és escàs i/o la quantitat de material orgànic en el tanc (brutícia, femtes, ingesta, etc.) permet protegir el bacteri davant la calor, podria afavorir-se la seva supervivència i per tant, la contaminació de la pròpia canal així com de les successives (Lázaro *et al.*, 1997; Bolton *et al.*, 2003; Hald *et al.*, 2003). Una altra conseqüència seria l'increment en el risc de contaminació de les canals degut al procés d'extracció dels pulmons i òrgans associats (Hald *et al.*, 2003). Durant l'escaldat, *Salmonella* pot ser introduïda als pulmons pels moviments respiratoris voluntaris o involuntaris dels animals acabats de sacrificar (Thornton, 1974; Borch *et al.*, 1996).

L'aïllament de *Salmonella* de la maquinària de depilació (Gill i Bryant, 1993) i l'increment significatiu dels percentatges de contaminació de les canals observats al seu pas per equipament brut (Yu *et al.*, 1999; Pearce *et al.*, 2004) confirmen el risc d'aquesta etapa per a la presència del patogen en les canals. Normalment, l'equip de

depilació consisteix en uns flagells de goma que arranquen el pèl de l'animal mentre la canal és ruixada amb aigua. Durant aquest procés, restes de femtes poden escapar-se de l'anús i esdevenir una font de contaminació per a la mateixa maquinària i aigua recirculant del sistema (Morgan *et al.*, 1987; Borch *et al.*, 1996). A més a més, la dificultat que presenten aquests tipus d'equipaments per a la seva neteja, contribuiran a que la contaminació pugui persistir fins i tot entre dies consecutius de treball (Gill i Bryant, 1993; Hald *et al.*, 2003).

El subsegüent procés de flamejat, en el que la temperatura de la superfície de les canals pot incrementar fins al voltant dels 100°C, permet eliminar pràcticament tota contaminació superficial (Borch *et al.*, 1996). No obstant, defectes en el propi procés (aplicació no uniforme de la calor, insuficient combinació temps-temperatura, etc.) i/o el fet que certa brutícia pugui quedar amagada en determinades àrees de la pell (plecs profunds, fol·licles, base i orificis de les orelles, etc.), poden afavorir que qualsevol bacteri que sobrevisqui al flamejat sigui redistribuït per tota la canal al seu pas per l'etapa posterior de neteja (Simonsen *et al.*, 1987; Yu *et al.*, 1999). En similitud al què succeïa durant el procés de depilat, els flagells rotatoris i els raspalls de l'equip poden facilitar la sortida de contingut fecal dels animals, arribant a contaminar el mateix equip i en conseqüència, les successives canals (Berends *et al.*, 1997). En diversos estudis s'ha aïllat *Salmonella* de la maquinària de neteja de les canals (Swanenburg *et al.*, 2001b; Hald *et al.*, 2003).

Com a darrer punt i a mode de recomanació, tots aquells processos automatitzats que presentin problemes de contaminació persistent i que siguin a més, difícils de netejar i esterilitzar correctament, requereixen de l'aplicació d'efectius programes de neteja i desinfecció de la maquinària, així com de dissenys que ho permetin.

b) Evisceració i etapes posteriors

El procés d'evisceració és comunament considerat un dels principals punts crítics de control de la contaminació microbiana de les canals (Gill i Bryant, 1993; Saide-Albornoz *et al.*, 1995; Berends *et al.*, 1997). Evidents increments en la incidència per *Salmonella* de les canals just al seu pas pel procés d'evisceració han estat descrits en

diferents treballs. Davies *et al.* (1999) van observar uns nivells de contaminació pre-evisceració i post-evisceració d'un 1,4% i un 4%, respectivament. En un altre estudi, es descriu una major variació entre les dues etapes, en concret, del 0% al 7% (Pearce *et al.*, 2004). Inadequades pràctiques durant aquesta etapa incrementarien el risc que bacteris patògens com la salmonel·la siguin transferits a les canals des dels budells, l'estómac i l'esòfag (Borch *et al.*, 1996).

El primer pas durant l'evisceració és la separació del recte del teixit que l'envolta. En aquest cas, si no es prenen mesures per a evitar que una vegada separat el recte, aquest entri en contacte amb la canal (per exemple mitjançant el segellat amb una bossa de plàstic o l'aspiració del seu contingut), la possible sortida del seu contingut pot suposar una font de contaminació de les canals (Andersen *et al.*, 1991; Nesbakken *et al.*, 1994).

Durant les successives etapes, encara que part de la contaminació pot ocasionar-se durant les operacions d'extracció de l'esòfag i el recte, el trencament accidental dels budells durant la seva retirada del cos de l'animal, és considerada la principal causa de contaminació de les canals (Davies *et al.*, 1999). L'elevada quantitat d'ingesta en els budells degut a períodes de dejú massa curts i les possibles distensions del tracte digestiu produïdes durant l'estrès associat al transport i l'espera a l'escorxador acabarien debilitant la mucosa intestinal. Aquest fet, juntament amb el major pes del tracte gastrointestinal que en dificultaria la seva retirada, incrementarien considerablement el risc d'ocasionar laceracions en aquests òrgans (Miller *et al.*, 1997; Kephart i Mills, 2005). Com a conseqüència, no només la pròpia canal en resultaria contaminada, sinó que també és freqüent l'aïllament de *Salmonella* en ganivets i mans del personal encarregat d'aquestes pràctiques, així com en les taules i el terra propers a aquesta zona (Lázaro *et al.*, 1997; Hald *et al.*, 2003; Letellier *et al.*, 2005). Aquest fet suposaria, finalment, en un increment en el risc de contaminacions creuades de les canals.

L'estricta monitorització de les pràctiques d'evisceració i en especial, la instrucció del personal que realitza aquesta tasca són bàsics a l'hora de reduir la contaminació de les

canals durant aquesta etapa. La retirada de contaminació visible de la superfície de l'animal, així com la neteja i la desinfecció de ganivets i mans entre cada animal són pautes bàsiques i necessàries a seguir (Simonsen *et al.*, 1987; Borch *et al.*, 1996; Berends *et al.*, 1997). Respecte a aquest darrer punt, resulta útil operar mitjançant el sistema de dos ganivets; alhora que s'utilitza un ganivet, l'altre s'està desinfectant a l'esterilitzador (Bolton *et al.*, 2002). En addició, l'aplicació de períodes de dejú superiors a les 24 hores amb l'objectiu de reduir el pes i la mida del tracte gastrointestinal ajudarien a minimitzar el risc de produir esquinçaments en aquests òrgans (Hald, 2001).

La posterior retirada del paquet pulmonar (llengua, tonsil·les, esòfag, laringe, tràquea, pulmons, cor, fetge i diafragma) també suposa un important risc per a la presència de *Salmonella* en les canals. Com s'ha comentat anteriorment, durant la seva extracció, la incisió accidental dels pulmons i/o la tràquea o fins i tot el seu trencament degut a possibles adhesions associades a problemes respiratoris podria contaminar les canals en el supòsit que al seu interior s'hi hagués introduït aigua contaminada procedent del tanc d'escaldat (Thornton, 1974; Borch *et al.*, 1996; Hald *et al.*, 2003).

Òrgans com la llengua, les tonsil·les i en general el cap i tota la part anterior de l'animal també poden resultar una font important de contaminació (Swanenburg *et al.*, 2001b; Vieira-Pinto *et al.*, 2005). Una vegada les canals són eviscerades i durant el seu recorregut per la línia de sacrifici, la zona de l'orofaringe pot resultar fàcilment contaminada pel contacte amb aigua residual bruta procedent del rentat de l'interior de la canal o fins i tot per l'arribada de contingut procedent del mateix estómac (Berends *et al.*, 1997). A més, aquesta zona alberga diferents òrgans limfàtics (tonsil·les i ganglis limfàtics mandibulars) en els quals és freqüent aïllar-hi *Salmonella* (Wood *et al.*, 1989) i molt especialment, en casos d'infeccions recents durant el transport i espera dels animals a l'escorxador. S'ha descrit una elevada contaminació per *Salmonella* en les tonsil·les d'animals exposats tan sols una hora als ambients contaminats dels corrals (Boughton *et al.*, 2005b). La no partició del cap dels animals durant el seu processat a l'escorxador es consideraria una mesura

sanitària efectiva per a reduir la incidència de *Salmonella* de les canals (Olsen *et al.*, 2001).

Cal tenir en compte el risc que suposa l'elevada presència de *Salmonella* en aquests i altres òrgans limfàtics (per exemple, ganglis limfàtics preescapulars i inguinals) en la contaminació de la carn per *Salmonella*; normalment no són retirats de la canal i la seva incisió durant el desfet de la carn podria facilitar la contaminació creuada de les diferents peces a través dels utensilis de tall (Lázaro *et al.*, 1997). A més, els limfonodes mandibulars és freqüent que quedin adherits a la peça de carn fins a la seva arribada al consumidor (Vieira-Pinto *et al.*, 2005). Per aquest motiu, s'hauria de posar especial atenció al realitzar la inspecció sanitària de les canals degut al risc potencial d'afavorir les contaminacions creuades a l'escorxador (Berends *et al.*, 1997). La incisió i la freqüent palpació d'aquests òrgans limfàtics podrien facilitar que patògens com la salmonel·la siguin transferits a d'altres parts de la mateixa canal o entre canals via estris i mans del personal d'inspecció (Mousing *et al.*, 1997b; Vieira-Pinto *et al.*, 2005).

En general, al llarg de les següents etapes del procés, *Salmonella* tindrà moltes oportunitats de ser transferida a les canals a partir de l'ambient que envolta el seu processat. Durant la partició de les canals i els successius processos associats al seu polit i acabat, és probable que diferents utensilis i equipaments acabin contaminant-se i en conseqüència, també les canals. S'ha aïllat *Salmonella* en ganivets, esmoladors, serres de partició de les canals, mans i davantals dels treballadors, així com en drenatges i recipients d'aigua utilitzats (Swanenburg *et al.*, 2001b; Botteldoorn *et al.*, 2003; Hald *et al.*, 2003; Stathopoulou *et al.*, 2003). En concret, Davies *et al.* (1999) descriuen un increment en el percentatge de canals contaminades al seu pas per la serra de partició.

La pròpia temperatura elevada de les canals, juntament amb el fet que el seu processat es realitza a temperatura ambient són factors que poden afavorir el creixement del bacteri al llarg de la línia de sacrifici (Borch *et al.*, 1996) i l'increment en la contaminació ambiental durant les hores de treball (Hald *et al.*, 2003). Certs serotips

presentes en les femtes d'animals sacrificats a l'inici del dia s'han aïllat posteriorment en les canals dels porcs sacrificats al final de la jornada (Botteldoorn *et al.*, 2003). Fins i tot es descriu la presència d'una flora més o menys estable que es podria estendre entre diferents dies de mostreig. Quan algunes àrees de l'escorxador no es netegen ni es desinfecten correctament, determinades soques poden persistir entre dies consecutius en els equipaments i les aigües de drenatge (Berends *et al.*, 1997). La presència de *Salmonella* en l'ambient de les instal·lacions, fins i tot abans de l'inici de la jornada laboral, ha estat descrita en diversos treballs (Giovannacci *et al.*, 2001; Botteldoorn *et al.*, 2003; Bouvet *et al.*, 2003; Hald *et al.*, 2003; Stathopoulou *et al.*, 2003).

Si al llarg de tota la línia del processat, la incidència de *Salmonella* de les canals pot incrementar-se degut a l'ambient que envolta totes aquestes etapes, la dutxa de les canals amb aigua potable i a temperatura ambient es contempla com un mètode pràctic i eficaç per a reduir la contaminació de les canals prèviament al seu pas a l'oreig. Alguns autors consideren el rentat de les canals com a una mesura útil per a reduir la càrrega microbiana superficial de les canals; principalment lligat al cert efecte d'arrossegament que exerceix l'aplicació d'aigua (Crouse *et al.*, 1988; Saide-Albornoz *et al.*, 1995). Per contra, d'altres estudis discrepen d'aquesta pràctica; no es mostra efectiva i en molts casos, al no realitzar-se correctament, contribueix a la redistribució de la contaminació entre diferents zones de les canals (Dickson i Anderson, 1992; Ellerbroek *et al.*, 1993; Rivas *et al.*, 2000; Bolton *et al.*, 2002). Tenint en compte el limitat efecte que s'obtindria amb el rentat de les canals amb aigua freda, millors resultats s'han obtingut a nivell experimental amb l'aplicació de raigs d'aigua, en comptes del simple espraiat, a temperatures de 80°C-85°C (Smith, 1992). En un àmbit més comercial, un treball de Gill *et al.* (1997) descriu l'eficàcia d'un tractament de pasteurització (aplicació d'aigua a 85°C durant només 15 segons) per a millorar la qualitat microbiològica de les canals. Per contra, períodes de tractament excessivament llargs o l'aplicació d'aigua massa calenta podrien provocar una certa descoloració de les canals (Gill *et al.*, 1995).

D'altres mètodes alternatius per a millorar la qualitat microbiològica de les canals inclouen l'addició de diferents substàncies descontaminants a l'aigua de rentat de les canals, com per exemple àcids orgànics (principalment àcids làctic i acètic), fosfat trisòdic, solucions amb clorina o diòxid de clorina, etc., a més de procediments de depilació química, l'aplicació de vapor mitjançant el buit i la radiació de les canals (Dickson i Anderson, 1992; Epling *et al.*, 1993; Morris *et al.*, 1997; Smulders i Greer, 1998; Sofos i Smith, 1998). Tanmateix, a diferència dels Estats Units on estan aprovades totes aquestes pràctiques de descontaminació de les canals, la normativa europea només permet el rentat de les canals amb aigua potable (Reglament CE núm. 854/2004 del Parlament Europeu i del Consell, de 29 d'abril de 2004). El tractament de les canals amb aigua a un màxim de 80°C durant 15 segons ha estat introduït a Dinamarca i s'utilitza de forma rutinària en les canals d'aquells animals procedents de granges amb un elevat nivell de prevalença per *Salmonella* (Goldbach i Alban, 2006).

Com a etapa final, la refrigeració també tindria un cert efecte en l'evolució de la microbiota superficial de les canals i per tant, sobre la presència de *Salmonella*. D'aquesta manera, tot i que Epling *et al.* (1993) van detectar un increment en els recomptes de *Salmonella* en canals refrigerades a 4°C durant 24 hores, la majoria d'estudis coincideixen en assenyalar l'efectivitat del procés de refrigeració per a disminuir la població de coliforms i en concret, de *Salmonella* (Saide-Albornoz *et al.*, 1995; Chang *et al.*, 2003; Gill i Landers, 2004). Contràriament, la població d'aerobis sembla no afectar-se per aquest descens de la temperatura, observant-se, fins i tot, un cert increment en el seu recompte (Bolton *et al.*, 2002; Gill i Landers, 2004). Factors relacionats amb el temps que triguin els animals a arribar a l'etapa de refrigeració, així com els diferents mètodes utilitzats per a refrigerar les canals (velocitat i flux de l'aire, humitat relativa, temps i temperatura, espai físic entre les canals, etc.) poden reduir l'efecte positiu de la refrigeració sobre les canals (Feldhusen *et al.*, 1992).

2.4.3. Metodologia de mostreig de les canals a l'escorxador

De les diferents tècniques desenvolupades per a determinar els nivells de contaminació microbiana de la superfície de les canals, l'excisió (extracció d'una mostra de teixit i posterior homogeneïtzació amb un medi d'enriquiment) i la

utilització d'hisops (mostreig de la superfície de la canal) són les més àmpliament utilitzades. L'excisió consisteix en l'obtenció d'un fragment d'uns 2-3 cm de gruix de pell i múscul abdominals des de la regió inguinal fins a l'apòfisi xifoide. En general, aquesta tècnica es considera més efectiva que la majoria de tècniques basades en la utilització d'hisops ja que permetria l'obtenció d'uns majors recomptes microbians (Anderson *et al.*, 1987; Dorsa *et al.*, 1996; Sharpe *et al.*, 1996; Palumbo *et al.*, 1999). D'altra banda i des d'un punt de vista pràctic, té certs desavantatges, principalment el fet de devaluar les canals i la laboriositat a l'hora d'obtenir la mostra. Respecte a la sensibilitat de la utilització dels hisops, resulta difícil donar-ne una estimació exacta ja que els percentatges de recuperació poden variar àmpliament entre estudis i acostar-se, fins i tot, als resultats obtinguts amb l'excisió (Dorsa *et al.*, 1996; Sharpe *et al.*, 1996; Gill i Jones, 2000; Pepperell *et al.*, 2005; Pearce i Bolton, 2005). Factors relacionats amb la pròpia tècnica de mostreig, les condicions de la superfície de les canals i fins i tot, l'espècie animal en qüestió explicarien aquest poc consens en els resultats. A continuació es comenten alguns d'aquests factors.

El material del què és fabricat l'hisop podria condicionar l'eficàcia del mostreig. Diversos estudis descriuen que el nombre de bacteris recuperats mitjançant hisops tendeix a incrementar quan més abrasiu és el material utilitzat (Dorsa *et al.*, 1996; Korsak *et al.*, 1998; Gill i Jones, 2000). D'aquesta manera, amb la utilització d'hisops fets d'esponja (d'acetat de cel.lulosa, de poliuretà, etc.) o de gasa s'obtidrien unes taxes de recuperació de *Salmonella* superiors que amb els hisops fabricats amb llana de cotó i fins i tot, equivalents als obtinguts amb la tècnica d'excisió (Pearce i Bolton, 2005). El tipus d'adhesió dels bacteris a la superfície de les canals també podria condicionar els percentatges de recuperació que s'obtenen amb els hisops. Determinats paràmetres físics de la superfície de les canals (temperatura, humitat i presència de fissures), juntament amb les propietats inherents dels propis microorganismes poden influir en la capacitat que tenen alguns bacteris per adherir-se fortament a la superfície de la carn (Benito *et al.*, 1997; Yu *et al.*, 2001). Durant la refrigeració, la certa deshidratació que pateix la superfície de les canals per una banda i l'increment en la formació d'esquerdes per l'altra, facilitarien l'adhesió dels bacteris (Yu *et al.*, 2001). Aquest lligam amb la superfície de les canals, senzillament anclant-

s'hi o mitjançant la formació d'una capa de biofilm (Zottola i Sasahara, 1994), acabarà limitant-ne el nombre de microorganismes recuperats (Anderson *et al.*, 1987).

La mida de la zona mostrejada també és un factor que pot influir en els percentatges de recuperació. En general, els baixos recomptes d'enterobactèries que normalment contaminen les canals, juntament amb la distribució irregular per la seva superfície requeririen àrees de mostreig més grans per tal de millorar els percentatges de recuperació (Gill i Jones, 2000; Gill *et al.*, 2001; Pearce i Bolton, 2005). No obstant, segons Pepperell *et al.* (2005), un increment en l'àrea mostrejada no tindria un efecte directe sobre l'augment de la fracció de microorganismes recuperats. Una altra forma d'incrementar les taxes de recuperació de salmonel·les (Korsak *et al.*, 1998; Palumbo *et al.*, 1999) passa per seleccionar tres o quatre zones concretes de la canal. D'aquesta manera, la proporció de microorganismes recuperats estaria en funció del nombre de punts mostrejats; essent el pernil, la papada, la panxa i l'esquena les zones més freqüentment elegides.

Finalment, a l'hora de comparar resultats també cal tenir en compte en quina espècie animal s'ha realitzat l'estudi. Mentre Gill i Jones (2000) no van trobar diferències significatives en els percentatges de recuperació entre la tècnica d'excisió i la utilització d'hisops d'acetat de cel·lulosa en les canals bovines, sí van observar una variació pel que fa al porcí. Aquesta variació podria atribuir-se a la diferent superfície externa de cada espècie; amb pell en les canals porcines i amb una presència considerable de greix en les bovines (Pearce i Bolton, 2005).

La legislació vigent (Reglament CE núm. 2073/2005 de la Comissió, de 15 de novembre de 2005) estableix el mostreig de les canals mitjançant hisops d'esponja amb material abrasiu i en diversos punts de la canal (mínim de 100 cm² per localització seleccionada). Aquest mètode es recull també en la Decisió de la Comissió núm. 2006/668/CE, de 29 de setembre de 2006, com a mètode de referència per a l'estudi bàsic de prevalença de *Salmonella* en el porcí.

2.5. Epidemiologia de *Salmonella* a les sales d'especejament i durant la distribució i la venda de carn

L'entrada de canals contaminades es reconeix com la via més important d'introducció de *Salmonella* a les línies de retall i desfet de la carn. I de fet, el producte contaminat que surt d'aquestes sales de desfer constitueix també la principal font de contaminació encreuada que té lloc posteriorment a les carnisseries i d'altres centres de venda (Berends *et al.*, 1998). Mitjançant l'ús de tècniques moleculars, Giovannacci *et al.* (2001) van confirmar que la majoria de soques aïllades en dues plantes de processat de la carn coincidien amb les prèviament identificades a l'escorxador d'origen el mateix dia de mostreig.

Respecte als nivells de contaminació per *Salmonella* en la carn de porc, Berends *et al.* (1998) van estimar que la incidència de contaminació en la carn que s'expedeix de les sales de desfer holandeses se situaria entre un 5% i un 40%. Per altra banda, mostrejors realitzats en diferents països situen aquest percentatge en un rang que va des de el 3,3% fins al 9,9% (Duffy *et al.*, 2001; Zhao *et al.*, 2001; Mattick *et al.*, 2002; Boughton *et al.*, 2004; Buchholz *et al.*, 2005). A Espanya, en un estudi realitzat en una planta dedicada al desfet de porc ibèric, aïllaren *Salmonella* en el 4,46% de les peces càrnies per a comercialitzar i en el 13,58% de la carn destinada a la fabricació d'embotits curats (Pala i Sevilla, 2004). En similitud al què succeïa amb els estudis de prevalença realitzats a l'escorxador, els factors relacionats amb el mètode de mostreig i la tècnica analítica dificultarien la comparació de resultats.

Cal tenir en compte que en el moment que una canal contaminada arriba a la sala de desfer, el risc de contaminació creuada dels productes, associat a la major presència de *Salmonella* en superfícies, maquinària i utensilis del personal, incrementa considerablement. En conseqüència, aquelles parts de la línia (cintes transportadores, cubetes col·lectores, estris de tall i mans dels manipuladors, etc.) constantment en contacte amb les canals i les peces de carn, es mantindran positives pràcticament durant tota la jornada laboral. La dificultat de netejar i desinfectar periòdicament les línies de treball durant el seu funcionament, juntament amb la manipulació inevitable de productes contaminats i el seu contacte amb superfícies i estris també contaminats

són factors que, sols o en combinació, poden duplicar o triplicar la prevalença per *Salmonella* en els retalls de carn (Berends *et al.*, 1998).

Però no tan sols la manipulació que té lloc durant el desfet de la carn influeix en la seva qualitat microbiològica final, la temperatura assolida durant aquesta fase i també durant l'emmagatzematge dels productes, així com la durada d'aquestes etapes, acabaran determinant la vida útil del producte. Generalment, el manteniment de temperatures per sota dels 5°C durant aquests processos ajudarien a mantenir al mínim la proliferació bacteriana (Hald, 2001). Tot i això, durant la fase de distribució i venda de la carn es fa especialment difícil el manteniment de la cadena de fred i s'incrementa, per tant, el risc de contaminació d'aquests productes. Si aquestes peces de carn no han de rebre cap mena de processament posterior que en redueixi o n'elimini la contaminació existent, poden suposar un risc potencial de contaminació per als consumidors. Per altra banda, tot i que molts productes es comercialitzen ja transformats, és a dir, se'ls ha tractat d'alguna manera per a preservar la seva qualitat microbiològica (acidificació, fermentació, curat, fumat, tractament tèrmic, etc.), la seva qualitat final dependrà en primera instància, a més d'aquells factors inherents al propi procés i producte (pH, activitat d'aigua, temperatura, potencial redox, etc.), de la càrrega microbiana inicial.

D'una manera general, el seguiment dels codis de bones pràctiques de fabricació, dins la metodologia dels plans HACCP, ajudarien a reduir el risc de contaminació dels productes. Especialment, l'educació del personal encarregat de la manipulació dels aliments és bàsic per a reduir el risc de contaminacions creuades al llarg del procés. Tot i això, la presència final de *Salmonella* en els productes carnis només pot reduir-se d'una manera parcial. Segons Berends *et al.* (1998), mentre continuï el flux d'entrada de canals positives a les línies de retall de la carn, el 90% de la contaminació creuada que hi té lloc serà pràcticament inevitable. Fet similar succeeix a les carnisseries i als centres de venda de carn.

2.6. Epidemiologia de Salmonella en l'àmbit domèstic

En aquesta etapa, a més de la utilització de productes contaminats inicialment, els factors relacionats amb una manipulació inadequada dels aliments per part dels consumidors, tant pel que fa al seu transport, emmagatzematge, manipulació, elaboració i/o consum, són els que contribueixen d'una manera més significativa als brots de salmonel·losi declarats en persones (Michanie *et al.*, 1988; BEC, 2005). D'entre aquests factors destaquen principalment una manipulació no higiènica dels aliments, emmagatzematge o conservació incorrectes (tardana i/o a temperatura ambient), separació incorrecta d'aliments crus/cuinats, cocció insuficient, preparació del menjar amb molta antelació, a més de les contaminacions creuades per mitjà d'estrils de cuina (ganivets, superfícies, etc.). A diferència de les anteriors etapes en la cadena alimentària on és possible la seva regulació a nivell legislatiu, la lluita contra la salmonel·losi a nivell del consumidor gira al voltant de la difusió de programes d'educació, basats principalment en l'intercanvi d'informació i d'una sèrie de recomanacions per a la correcta manipulació i preparació dels aliments.

2.7. Mètodes de detecció de Salmonella

2.7.1. Mètodes bacteriològics

Tradicionalment, el cultiu bacteriològic i la posterior identificació mitjançant proves bioquímiques ha estat el mètode més utilitzat i avui encara el de referència, per a la detecció de *Salmonella* en els animals i en les mostres ambientals i d'aliments. Aquest mètode es caracteritza per una especificitat pràcticament del 100% i a diferència de les altres tècniques, permet l'aïllament i la posterior identificació de les soques mitjançant mètodes fenotípics de tipificació, com per exemple, la serotipificació, la fagotipificació i l'anàlisi del perfil de resistència a diversos antibiòtics.

La majoria dels protocols utilitzats per a l'aïllament de *Salmonella* en mostres fecals varen desenvolupar-se inicialment per al diagnòstic de la salmonel·losi clínica, en la qual és freqüent que el bacteri s'excreti en un gran nombre per femtes. Tanmateix, en els casos d'infeccions subclíniques (actualment les més freqüents), s'elimina per femtes intermitentment i a uns nivells molt baixos. En mostres de pinso i de carn,

l'aïllament de *Salmonella* també resulta difícil; normalment es troben en un baix número i força debilitades degut als processos tecnològics i a les etapes de refrigeració i descongelació a les que sovint són sotmesos aquests productes. Per aquest motiu, l'aïllament de *Salmonella* en aquest tipus de mostres requereix mètodes de cultiu amb tot un seguit de passos d'enriquiment selectiu per tal d'incrementar-ne la sensibilitat (D'Aoust i Sewell, 1986; Aho, 1992; Davies *et al.*, 2000b; Funk, 2003). Degut a aquests procediments, els mètodes bacteriològics presenten l'inconvenient de ser més cars i consumir molt temps. A més a més, tot i tenir una elevada especificitat, es caracteritzen en general per una baixa sensibilitat (Funk, 2003).

En general, els mètodes de cultiu bacteriològic inclouen les següents etapes: un pre-enriquiment no selectiu, seguit per un enriquiment selectiu i posteriorment, la sembra en un medi sòlid selectiu i indicatiu. Com a darrer pas, les colònies sospitoses són identificades amb un seguit de proves bioquímiques i serotipades segons l'esquema de Kauffman-White-Le-Minor mitjançant proves serològiques. Tot seguit es detallen les diferents etapes del cultiu bacteriològic:

- Pre-enriquiment

Com s'ha comentat anteriorment, en mostres d'animals excretors asimptomàtics, mostres ambientals i d'aliments es fa necessari la realització d'una pas de pre-enriquiment. D'aquesta manera, s'afavoreix el desenvolupament de les salmonelles i s'ajuda a revitalitzar les que poguessin estar malmeses o sotmeses a condicions d'estrès. Durant anys, l'ús del pre-enriquiment en material amb una elevada càrrega microbiana com és el cas de les femtes ha estat força qüestionat i no s'utilitzava donat que es pensava que afavoria el creixement de la microflora acompanyant a *Salmonella* i per tant, augmentava el nombre de falsos positius (Aho, 1992). Avui en dia, però, s'ha convertit en una pràctica comú per a l'aïllament de *Salmonella* (Davies *et al.*, 2000b).

En els últims anys s'han formulat diversos medis de pre-enriquiment, com per exemple, el brou lactosa (BL), el brou universal (UB), el medi M9, l'aigua de peptona tamponada (APT), entre d'altres. Respecte a la seva eficàcia, Juven *et al.* (1984)

descriuen que els medis APT i M9 són millors que el medi BL. Per altra banda, Hoorfar i Mortensen (2000) no van trobar diferències significatives pel que fa al pre-enriquiment de les mostres amb UB o APT.

- Enriquiment selectiu

En l'etapa posterior d'enriquiment mitjançant un medi selectiu, es restringeix la proliferació de la flora competitiva amb l'objectiu d'afavorir el creixement de *Salmonella* a uns nivells que puguin ser detectats després en un medi sòlid. En la pràctica, els tres medis d'enriquiment més utilitzats són els brous selenit-cistina, tetracionat i Rappaport-Vassiliadis (RV). Aquests darrers, juntament amb l'aigua de peptona tamponada com a pas de pre-enriquiment, són els medis recomanats per les normes ISO (ISO 6579) en els protocols d'aïllament de *Salmonella* en mostres de pinsos i d'aliments. Per contra, encara no existeix un mètode de referència oficial per a la detecció del patogen en femtes. Respecte a la seva eficàcia, els pocs estudis realitzats comparant les diferents metodologies d'enriquiment per a l'aïllament de *Salmonella* a partir de femtes de porcs han donat resultats força contradictoris. Diversos autors descriuen que amb el brou RV s'obtenen menors resultats que amb els brous tetracionat i selenit (Skovgaard *et al.*, 1985; Cherrington i Huis, 1993). Per altra banda, segons Bager i Petersen (1991), els resultats obtinguts amb l'enriquiment amb brou RV resulten superiors als del tetracionat i el selenit. Respecte a aquests darrers medis, sembla ser que l'enriquiment amb brou selenit es caracteritzaria per una menor sensibilitat que el brou tetracionat (Hoorfar i Mortensen, 2000).

Com alternativa als anteriors medis, s'han desenvolupat diversos medis selectius semi-sòlids. Diversos estudis destaquen la major eficàcia d'aquests medis en comparació als brous d'enriquiment convencionals (Dusch i Altwegg, 1995; Davies *et al.*, 2001; Voogt *et al.*, 2001; Champagne *et al.*, 2005). Un dels més utilitzats és el medi semi-sòlid Rappaport-Vassiliadis (MSRV), que combina les propietats selectives del RV i la característica de mobilitat de la majoria de serotips de *Salmonella*.

- Medis selectius sòlids

En el darrer pas del cultiu, la sembra en medis selectius sòlids té com a objectiu restringir encara més el creixement de la flora competitiva i estimular al màxim el creixement de *Salmonella*. La seva propietat de selectivitat és deguda a la incorporació d'una substància inhibidora que dificulta específicament el creixement d'altres enterobacteriàcies. A més, la composició determinada de cada medi permet el creixement de colònies amb aspecte característic i per tant, la diferenciació visual de les salmonel·les amb d'altres bacteries. Els caràcters més utilitzats són la producció d'àcid sulfhídric (SH₂⁺) o la incapacitat de fermentar la lactosa.

Existeixen una gran varietat de medis selectius per a l'aïllament de *Salmonella*. Per exemple, l'agar xilosa-lisina-desoxicolat (XLD), l'agar xilosa-lisina-tergitol 4 (XLT4), l'agar Rambach (Ra), l'agar verd brillant-roig fenol (BGA) i l'agar Hektoen enteric (HE), entre d'altres. En concret, l'agar XLT4 s'ha demostrat efectiu per a recuperar les salmonel·les a partir de mostres d'aliments i femtes i es considera un dels més selectius (Dusch i Altwegg, 1995). Contràriament, Mallison *et al.* (2000) i Mejía *et al.* (2005a) descriuen l'obtenció d'un elevat percentatge de falsos positius a l'utilitzar l'agar XLT4 juntament amb un enriquiment previ amb RV per a l'aïllament de *Salmonella* en femtes de porc. Sembla ser que l'eficàcia d'aquest medi sòlid dependria en gran mesura de l'eficàcia de la fase d'enriquiment selectiu.

En general, la majoria d'estudis publicats al voltant de les diferents metodologies de cultiu se centren en comparar l'especificitat i la sensibilitat dels diferents mètodes de cultiu per a la detecció de mostres positives a *Salmonella* i no es té tant en compte l'aïllament de múltiples serovars en una mateixa mostra. La selecció de varies colònies per placa permetria identificar la presència de diversos aïllaments en una sola mostra. D'altra banda, Rostagno *et al.* (2005) descriuen que és més eficient combinar diferents medis de cultiu, tant d'enriquiment com de cultiu en placa. A més, s'han trobat diferents medis d'enriquiment que inhibirien el creixement d'alguns serotips determinats (Hoorfar i Mortensen, 2000).

2.7.2. Mètodes immunoenzimàtics

L'elevat temps que requereixen els mètodes de cultiu tradicionals (entre 3-7 dies), ha propiciat que s'hagin desenvolupat en els últims anys, especialment en la indústria alimentària, un gran nombre de mètodes alternatius de major rapidesa per a la detecció, directa o indirecta, de la presència de *Salmonella*. D'entre les diferents tècniques, els ELISA (*Enzyme-Linked Immunosorbent Assays*), que poden utilitzar-se tant per a la detecció antigènica del patògen com de la resposta humoral activada per l'animal, són les més àmpliament utilitzades:

- Detecció antigènica de *Salmonella*

En els darrers anys, la utilització de l'ELISA de captura ha guanyant una gran acceptació en les indústries alimentàries i de fabricació de pinsos. Els mètodes actuals, sovint automatitzats, es caracteritzen per ser ràpids, menys laboriosos i tenir la capacitat d'analitzar un gran nombre de mostres.

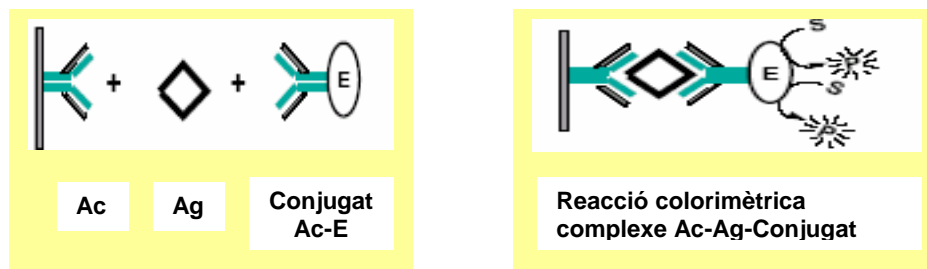
El principi de la tècnica (Figura 2.2) es basa en la unió específica d'un anticòs als antigens flagel·lars o somàtics de *Salmonella* un cop sotmesa la mostra a calor per tal d'inactivar-ne els bacteris. Després d'un període d'incubació i rentat posterior, s'agrega un segon anticòs conjugat amb peroxidasa. Aquest conjugat s'unirà al complex antigen-anticòs i la seva reacció es visualitzarà mitjançant l'addició d'un substrat o compost cromogènic. La intensitat de color mesurada a partir d'un espectrofotòmetre serà proporcional a la concentració d'antígens en la mostra.

Diversos estudis descriuen una eficàcia similar entre aquests sistemes immunoenzimàtics i els mètodes convencionals de cultiu per a la detecció de *Salmonella* en mostres de pinsos i aliments (Curiale *et al.*, 1997; Massó i Oliva, 1997; Uytendaele *et al.*, 2003). Per contra, amb les femtes o les mostres contaminades amb femtes, l'eficàcia de la prova resulta inferior (Fedorka-Cray, 2000). En general, com més neta és la mostra, millor n'és l'eficàcia. Per contra, la dificultat en detectar els bacteris més debilitats, la presència de reaccions creuades i el fet que els resultats positius han d'acabar confirmant-se mitjançant la metodologia convencional de cultiu, són alguns dels seus desavantatges (Maciorowski *et al.*, 2006). A més, encara que la realització de l'ELISA es pot efectuar en menys d'un dia,

en total es necessiten entre 24-48 hores per detectar *Salmonella* degut a la necessitat de realitzar un enriquiment previ de les mostres. Segons van Poucke (1990), es requereixen un mínim de 10^4 - 10^5 UFC/ml per a detectar al microorganisme.

Figura 2.2. Esquema de l'ELISA de captura per a la detecció de *Salmonella*

(Ac = Anticòs específic fixe; Ag = Antigen de *Salmonella*;
 Conjugat Ac-E = Anticòs conjugat amb Peroxidasa)



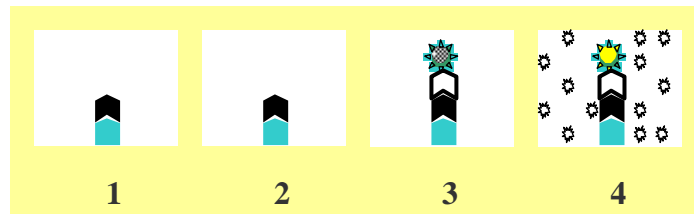
- Detecció d'anticossos

Un segon ús de l'ELISA per a la monitorització de *Salmonella* en el porcí és la detecció d'anticossos en sèrum o suc de carn (Nielsen *et al.*, 1995; Mousing *et al.*, 1997a). Habitualment, els ELISAs utilitzats es basen en la detecció d'anticossos (IgM) específics a lipopolisacàrids (LPS) o antígens de paret (O) del bacteri. Poden utilitzar-se els lipopolisacàrids (LPS) d'un sol serogrup o com en el cas del mix-ELISA, barrejar els de varis serogrup i així cobrir un major espectre de serotips.

L'esquema de la tècnica es mostra en la Figura 2.3. A diferència de l'ELISA de captura, la mostra de sèrum o suc de carn s'agrega a una placa d'ELISA recoberta amb LPS de *Salmonella*. En el cas que la mostra presenti anticossos, aquests s'uniran a l'antigen. Passat el període d'incubació i posterior rentat, els següents passos són els mateixos que els descrits per a l'anterior tècnica: s'afegeix un segon anticòs (anti-IgG de porc) conjugat amb peroxidasa, formació d'un complex antigen-anticòs i finalment, addició d'un substrat per a visualitzar la reacció mitjançant l'espectrofotòmetre.

Figura 2.3. Principi d'un ELISA indirecte

(1. Pou recobert amb LPS de *Salmonella* ; 2. Anticòs present en les mostres (sèrum o carn); 3. Anticòs anti-IgG de porc marcat (conjugat); 4. Substrat per a revelar el conjugat i desenvolupar color)



Els anticossos contra *Salmonella* poden estar presents fins a un període de 3 a 4 mesos després d'iniciar-se la infecció (van der Gaag *et al.*, 2001) i indiquen que l'animal ha estat en contacte amb el microorganisme. D'aquí que l'ELISA sigui d'utilitat per a detectar infeccions subclíniques o animals que essent portadors, no excreten el bacteri en aquell moment. D'altres avantatges serien la seva facilitat d'estandarització entre estudis i països, així com una millor sensibilitat i relació cost-eficàcia en relació als mètodes bacteriològics. També, en el cas que el mostreig tingui lloc a l'escorxador, no hi ha interferències en els resultats per problemes de contaminacions creuades des de els camions, corrals d'espera o en el procés de matança (van der Wolf *et al.*, 1999). Per contra, no permet assegurar que la infecció estigui encara present a la granja en el moment del mostreig i no detecta infeccions molt recents. A més, tot i que l'ELISA pot utilitzar-se com a prova de grup i granja, no resulta útil per a determinar la prevalença a nivell individual ja que existeix una gran variabilitat en la resposta serològica concreta de cada animal (Nielsen *et al.*, 1995; Mousing *et al.*, 1997a).

Respecte a la concordança entre els mètodes serològics i bacteriològics per a determinar el nivell de prevalença per *Salmonella* en els animals, existeix certa discrepància en els resultats. Així, mentre diversos estudis descriuen l'existència d'una elevada correlació entre la serologia i l'excreció fecal del patogen (Nielsen *et al.*, 1995; Christensen *et al.*, 1999; Sørensen *et al.*, 2004), d'altres indiquen la falta d'associació entre ambdues tècniques (Botteldoorn *et al.*, 2003; Casey *et al.*, 2004). D'altra banda, la majoria coincideixen en afirmar que encara que a nivell individual la

correlació entre la bacteriologia i la serologia resulti pobre, bàsicament a causa d'infeccions produïdes recentment, sol trobar-se una millor correlació en els resultats quan aquests s'avaluen a nivell de granja.

En estudis experimentals, es descriu que la sensibilitat i l'especificitat de la tècnica s'aproximen al 100% (Nielsen *et al.*, 1995). Tot i això, aquests valors poden variar considerablement quan l'ELISA s'avalua en condicions de camp (Harris, 2003). D'entre les possibles causes d'aquesta discrepància cal destacar la poca concordança entre els antígens utilitzats per a tapissar les plaques i els serotips que poden estar afectant als animals en un moment donat, així com les menors dosis infectives que normalment es troben en condicions de camp en comparació amb les dosis experimentals utilitzades. També cal comentar els fenòmens de reaccions creuades ja que afectarien considerablement l'especificitat de la prova. Aquest fet es relaciona amb la presència d'anticossos no específics de *Salmonella* produïts com a resposta contínua a d'altres enterobacteriàcies o fins i tot a d'altres infeccions o a bacteris inactius presents en els pinsos (Wiuff *et al.*, 2002).

Com a darrer punt, caldria comentar que en els últims anys s'han desenvolupat un gran nombre de tests d'ELISA comercials i sovint, amb una escassa validació. Aquest fet, juntament amb la poca concordança en els resultats que s'obtenen exigeix clarament una harmonització de les diferents proves serològiques (van der Heijden, 2001; van der Wolf *et al.*, 2001c; Mejía *et al.*, 2005b).

2.7.3. Mètodes moleculars

Aquests mètodes, basats en el DNA, són els que s'han desenvolupat més recentment per a la determinació de *Salmonella* en mostres clíniques i d'aliments (Lin i Tsen, 1996; Gouws *et al.*, 1998). Entre aquestes tècniques cal destacar les sondes d'hibridació de DNA i en particular, la reacció en cadena de la polimerasa (PCR).

La PCR és una tècnica que permet amplificar seqüències específiques de DNA mitjançant l'activitat de l'enzim DNA-polimerasa i d'aquesta manera disposar d'una quantitat suficient d'aquest fragment per a ser detectada mitjançant electroforesi. Per

a la seva realització, la mostra és introduïda dins un termociclador juntament amb nucleòtids (adenina, timina, citosina i guanina) i una petita cadena de DNA o *primer* capaç d'unir-se a la molècula que volem copiar i iniciar així la reacció.

Pel que fa a la seva aplicació, la PCR s'utilitza tant per a identificar la presència de salmonel·les en aliments com en mostres clíniques (Lampel *et al.*, 2000; Feder *et al.*, 2001; Oliveira *et al.*, 2003). El seu avantatge es basa principalment en una major rapidesa en comparació als mètodes convencionals de cultiu; normalment un període de 24-30 hores (Whyte *et al.*, 2002; Bansal *et al.*, 2006). Per contra, al necessitar concentracions mínimes d'entre 10^2 - 10^3 UFC/ml del microorganisme per tal d'assegurar la seva eficàcia, es fa necessari incorporar prèviament un pas d'enriquiment de la mostra (Chiu i Ou, 1996; Löfstrom *et al.*, 2004). Amb aquest pas, tot i que s'allarga el procediment, s'afavoreix la multiplicació de *Salmonella* fins a millorar-ne els nivells de detecció i es dilueixen substàncies que podrien interferir en la reacció. S'han descrit com a inhibidors de la reacció diferents components dels aliments (lípid, sals i proteïnes) o la presència de DNA d'altres fonts, principalment de la contaminació creuada amb d'altres microorganismes diferents a *Salmonella* (Rossen *et al.*, 1992).

Capítol 3

OBJECTIUS

El present treball ha sorgit arran de la iniciativa d'una empresa del sector porcí de Catalunya i forma part d'un projecte més ampli que porta com a títol: "Programa Integral de Control de *Salmonella*: del pienso a la carne". Aquesta empresa, amb una gran concentració de bestiar a la comarca d'Osona, es caracteritzava per una producció integrada i englobava des de la producció de pinsos compostos fins a la producció de carn. El seu interès es va centrar en conèixer la situació de la contaminació per *Salmonella* en la seva fàbrica de pinsos, les granges de la seva propietat i els escorxadors associats per tal de disposar d'una sèrie d'eines per al seu control. El projecte va realitzar-se conjuntament entre el Departament de Ciència Animal i dels Aliments i el Departament de Sanitat i d'Anatomia Animals. La present tesi, que engloba el treball realitzat a nivell de les granges i els escorxadors, va orientar-se cap a:

1. Estudi de l'epidemiologia de *Salmonella* en les explotacions porcines.
2. Cerca d'estratègies d'alimentació per al control de *Salmonella* en les explotacions porcines.
3. Estudi de l'epidemiologia de *Salmonella* a l'escorxador.

Per arribar a aquests tres objectius, varen dissenyar-se tres estudis experimentals els quals es descriuran als capítols 4, 5 i 6, respectivament.

En l'**Estudi I**, l'objectiu específic va ser el de conèixer la prevalença d'infecció per *Salmonella* en aquest sistema de producció porcí i identificar els factors de risc associats a aquesta infecció en el conjunt de les seves granges. Alhora, va avaluar-se la distribució de *Salmonella* en els diferents nivells d'un esquema de producció en múltiples fases per estudiar la dinàmica d'aquestes infeccions en aquesta granja.

L'**Estudi II** va ser dissenyat per a determinar l'efecte de l'administració de dietes acidificades, durant tot l'engreix o durant les setmanes prèvies al sacrifici dels animals, sobre la prevalença per *Salmonella* en porcs d'engreix de granges comercials.

Objectius

Finalment i ja en l'etapa de l'escorxador, a l'**Estudi III** es va determinar la freqüència i la distribució de les contaminacions per *Salmonella* en tres escorxadors de porcí i s'avaluaren les possibles fonts de contaminació de les canals durant el seu processat.

Capítol 4

**PREVALENCE, RISK FACTORS AND DISTRIBUTION OF
SALMONELLA INFECTIONS IN A SWINE PRODUCTION
SYSTEM OF CATALONIA**

Abstract

Forty-three finishing pig units owned by the same pig company in Catalonia, Spain, were examined to determine the seroprevalence of *Salmonella* and the risk factors associated with the occurrence of *Salmonella* in those herds. Furthermore, the distribution of *Salmonella* in a multiple-site swine production system of this company was also investigated in a longitudinal study. For each finishing herd, 25 blood samples were tested by a mix-ELISA and a questionnaire with 68 items was filled. In the longitudinal study, 141 sows of different ages were examined serologically and bacteriological analyses were done for 40 of them. Also, from 40 piglets randomly selected from these sows, blood and rectal samples were taken from 4 to 28 weeks of age. In 42/43 of the herds (97.7%, CI_{95%}: 86.2%-99.9%), at least one animal was found to be seropositive, and 39.5% (17/43, CI_{95%}: 25.3%-55.5%) of those farms had an individual seroprevalence higher than 50%. The results of a logistic regression analysis showed that continuous flow systems (OR=7.86) and higher mortality rates (OR=9.28) were significantly ($p<0.05$) related to higher *Salmonella* seroprevalence levels in those farms. In the longitudinal study, 82/141 sows (58.1%, CI_{95%}: 49.5%-66.3%) were seropositive. None of the sows was found to be shedding *Salmonella* when examined. In the nursery, seroprevalence significantly decreased ($p<0.05$) from 20% (8/40, CI_{95%}: 9.6%-36.1%) at 4 weeks of age to 5.1% (2/39, CI_{95%}: 0.9%-18.6%) at 8 weeks of age and subsequently increased ($p=0.01$) during the finishing period reaching a peak of 25.6% (10/39, CI_{95%}: 13.6%-42.4%) in the mid-finishing period (19 weeks of age). Faecal shedding in the nursery ranged from 5% (2/40, CI_{95%}: 0.9%-18.2%) at 4 weeks of age to 2.5% (1/39, CI_{95%}: 0.1%-14.9%) at 8 weeks of age. All isolates belonged to the monophasic variant of *Salmonella* Typhimurium (1,4,12:i:-). Even though the high seroconversion rate in the finishing stage, *Salmonella* was not isolated from faeces during all the period. Our results showed a high presence of *Salmonella* in the studied production system suggesting that control measures, particularly based in management and biosecurity procedures, should be implemented to reduce the prevalence of *Salmonella* in the studied fattening herds.

4.1. Introduction

Salmonellosis is still considered one of the main causes of foodborne disease in industrialized countries. In Europe, human salmonellosis is mainly caused by the consumption of contaminated eggs as well as poultry and pig meat. However, in 2005, *Salmonella* was increasingly reported from fresh poultry and pig meat (EFSA, 2006). Although pigs usually do not develop clinical salmonellosis they can carry *Salmonella* in intestines, lymphnodes or tonsils for a considerable period of time (Wood et al., 1989; Vieira-Pinto et al., 2005) and as a result of stress during transport and lairage, these healthy carriers can become active shedders (Berends et al., 1996; Isaacson et al., 1999). Thus, the arrival of carrier pigs to the slaughterhouse is an important risk factor for the contamination of carcasses and meat products (Berends et al., 1996; Berends et al., 1998). From the perspective of food safety, more efforts have to be made in order to reduce the occurrence of *Salmonella* in pork.

The development of efficient on-farm strategies to control *Salmonella* in some countries, with an implemented *Salmonella* control program, should be based on the knowledge of the epidemiology of this infection in those production units. Since the dissemination of *Salmonella* between and within farms is related to multiple factors, including production and management aspects, these differences must be taken into account with regards to the feasibility and the cost/efficacy of any given measure in a particular situation.

The aim of this study was to determine the seroprevalence of *Salmonella* and the risk factors associated with *Salmonella* infections in finishing pig units of a particular swine production system in Catalonia. Furthermore, we evaluated the distribution of *Salmonella* at the different levels in a multiple-site swine production system to figure-out the dynamics of subclinical *Salmonella* infections in this farm.

4.2. Material and methods

4.2.1. Cross-sectional study

A serological survey was made between October 2002 and February 2003 and included all the available fattening units owned by the same pig company in two regions of central Catalonia (n=43). Blood samples were collected from age-market pigs during bleeding at the slaughterhouse. For each herd, a total of 25 samples were taken in one sampling day. With this sampling we expected to be able to detect all farms where at least 12.5% of the pigs were seropositive at the end of the fattening period.

For each farm a questionnaire including 68 questions was fulfilled. Questions were answered by the veterinarians in charge of the farms and included data regarding management practices, biosecurity aspects, hygiene procedures, facilities and health status of the herds among others. Table 4.1 shows a summary of the questionnaire.

4.2.2. Longitudinal study

This part of the study was done in a three sites production system: site 1 (sows and suckling pigs until weaned at 4 weeks of age), site 2 (weaners up to 9-10 weeks of age) and site 3 (fatteners from 10 to 26-28 weeks of age). Site 1 had 1,500 productive sows and produced on average some 700-800 piglets per week, being the major source of pigs for site 2. Sows were housed individually in all stages of production except for gilts that were allocated in yards. Site 2 was divided in six different units with a capacity for 1,000 weaners each. One of these units in which all pigs came from site 1 was randomly selected for the study. After their arrival, piglets were distributed in six different pens with open partitions (15 piglets/group) where they remained approximately five weeks. Afterwards pigs were transported to site 3. This site 3 was structured in four buildings with a total capacity of 4,500 fatteners. Pigs under study were allocated in the same building and remained together until they were sent to the slaughterhouse at 28 weeks of age. In this site 3 partitions between pens were solid (concrete). Site 1 operated with a continuous flow of sows while sites 2 and 3 operated in a strict all-in/all-out system.

Sows were sampled once (141 sows of different ages chosen by convenience) and blood was collected. The final sampling consisted of 32 sows of parity 0-2, 87 sows

with parities 2-3 and 22 sows of parities 3-4. With this sampling it was possible to detect a global prevalence of at least 2% in the global sow stock. Also rectal samples (25 g) were taken individually from 40 sows (enough to detect a rate of 7.5% shedders).

Table 4.1. Summary of factors that were included in the questionnaire on risk factors for *Salmonella* in finishing pigs

Subject	Factors
Housing	Size and type of the herd Number of workers Number of animals per compartment Type of floor Type of pen-separations Type of slurry-pit-separation Sort of ventilation
Hygiene and Biosecurity	Hygienic-lock facilities (yes/no and if with: changing clothes [*] , hands-washer [*] , showers) Cleaning (frequency and method) Disinfection (frequency and type of disinfectant) Slurry drainage (open/close) Anti-rat campaign Methods of fly control [*] Presence of other livestock or other domestic animals
Production parameters and Management practices	Production system (farrow-to-finish/finishing unit) Management flow system [*] (continuous or all-in/all-out) Number of suppliers [*] Mortality rate [*]
Feeding practice	Pelleted or not pelleted feed Purchased or home-mixed feed Feeding system (by hand/automatic) Type of feeders (metallic, wood, plastic, other) Drinkers inside feeders Drinking water (source, if chloration [*] which sort)
Health	<i>Salmonella</i> infections detected previously (yes/no and if so when and what sort of medication)
Medication	Feeding with growth promoters If medication in feed, when, why and what sort If others medications used, when, why and what sort

^{*}Factors that were kept ($p < 0.25$) for the logistic regression analysis

Upon arrival to site 2, 40 weaners (4 weeks of age) were randomly selected and ear-tagged. These animals were examined to investigate shedding of *Salmonella* and serological responses. Blood and rectal samples (≥ 10 g) were obtained individually from each animal at the beginning of the study, two weeks after the beginning of the observation and one week before they were transferred to the fattening unit (8 weeks of age). With this sampling we expected to detect all stages at which at least 7.5% of the animals had antibodies or were bacteriologically positive.

For fatteners (site 3), where the most part of seroconversions were expected to occur, pigs were bled at 12, 14, 19 and 28 weeks of age (slaughterhouse sampling) and rectal samples (25 g) were also taken from individual animals. Feedstuff (eight samples taken from feeders) and drinking water (four samples) were also collected for the microbiological analysis.

4.2.3. Sampling procedures and analyses

Serum samples were analysed by means of a commercial ELISA (Salmonella Covalent Mix-ELISA, Svanova Biotech AB, Uppsala, Sweden) while faecal samples were submitted to a microbiological analysis. Briefly, initially samples were thoroughly homogenized and seed (1:10) in Rappaport-Vassiliadis broth (RVB). After 48 h at 42°C an aliquote of RVB was finally transferred onto Xylose Lysine Tergitol-4 Agar (XLT4, Difco) and plates were incubated for 24h at 37°C. Suspect colonies were plated out on MacConkey's agar. Lactose-negative isolates were identified by means of the API 20E system (bioMérieux) and serotypes were determined by the Kauffmann-White-LeMinor scheme at the Spanish National Reference Centre for Animal Salmonellosis (Algete, Madrid). Procedures for the isolation of *Salmonella* from feedstuffs or water were similar.

4.2.4. Statistical analyses

Confidence intervals for the prevalences and their statistical comparison were calculated using EpiCalc v1.02. Data gathered in the questionnaires and from serological analyses were introduced and analysed using Epi-Info 2002 (Dean et al., 2002). Initially, descriptive statistics were calculated. Then, a simple analysis (χ^2 test or ANOVA/Kruskal-Wallis-test) was done using the serological status as a response

variable. Since all the farms included in the cross-sectional study but one were determined to be infected (at least one seropositive animal in the farm) the analysis was carried out considering two possible levels of infection: moderate-low (seroprevalence $\leq 30\%$) and high (seroprevalence $>30\%$). Variables yielding a p -value ≤ 0.25 were selected for further analysis by means of a multiple linear logistic regression. Before proceeding to the logistic regression a correlation matrix was constructed in order to ascertain collinearity between variables. In case of two or more variables being related ($p < 0.05$) only one was selected for the analysis. Logistic regression was done by means of the backward stepwise method. The variable with the highest p -value was removed at each step until all factors were significant at $p < 0.05$. For this final analysis, the variable mortality rate (MR) that initially had been recorded as a continuous one was recoded to a discrete variable. Thus, those farms with MR lower or equal than the median (4%) were considered to be of low mortality while those above 4% were considered to be of high mortality.

4.3. Results

4.3.1. Cross-sectional study

Of the 43 farms, 42 had seropositive animals (97.7%, $CI_{95\%}$: 86.2%-99.9%). According to their individual seroprevalence, 15 (34.9%, $CI_{95\%}$: 21.5%-51.0%) of the herds had a low prevalence ($\leq 30\%$); 11 (25.6%, $CI_{95\%}$: 14.0%-41.5%) had a medium prevalence (31%-50% of positive pigs) and 17 (39.5%, $CI_{95\%}$: 25.3%-55.5%) had a high prevalence (seroprevalence $>50\%$ of positive pigs).

Six factors were considered for the logistic-regression (Table 4.1), from which two were significantly associated ($p < 0.05$) with the seropositivity level of the farms: the management based in a continuous flow system and having a high mortality ratio. The variable changing clothes was at the limit of significance ($p = 0.06$) and for that reason was retained in the final model. Table 4.2 summarizes these results.

Table 4.2. Risk factors associated by the logistic regression models for high *Salmonella* seroprevalence levels

Variable	Parameter	Odds ratio	Confidence interval (95%)	S.E.	p-value
Pig flow	All in-All out	0.13	0.02-0.85	0.97	0.03
	Continuous	1			
Mortality ratio	<4%	0.11	0.01-0.73	0.98	0.02
	≥4%	1			
Changing clothes	No	6.08	0.90-41.09	0.97	0.06
	Yes	1			

Convergence:	Converged	Test	Statistic	D.F.	p-value
Iterations:	5	Score	10.2988	3	0.0162
Final -2*Log-Likelihood:	41.8667	Likelihood Ratio	11.6005	3	0.0089
Cases included:	42				

S.E.: Standard Error; D.F.: Degrees of Freedom

4.3.2. Longitudinal study

Of the 141 sows examined, 82 were seropositive (58.1%, CI_{95%}: 49.5%-66.3%). The number of positive sows according to their parity is shown in Table 4.3. No significant differences in *Salmonella* seroprevalence were observed between age-groups. None of the sows was microbiologically positive (0/40, CI_{95%}: 0.2%-10.9%).

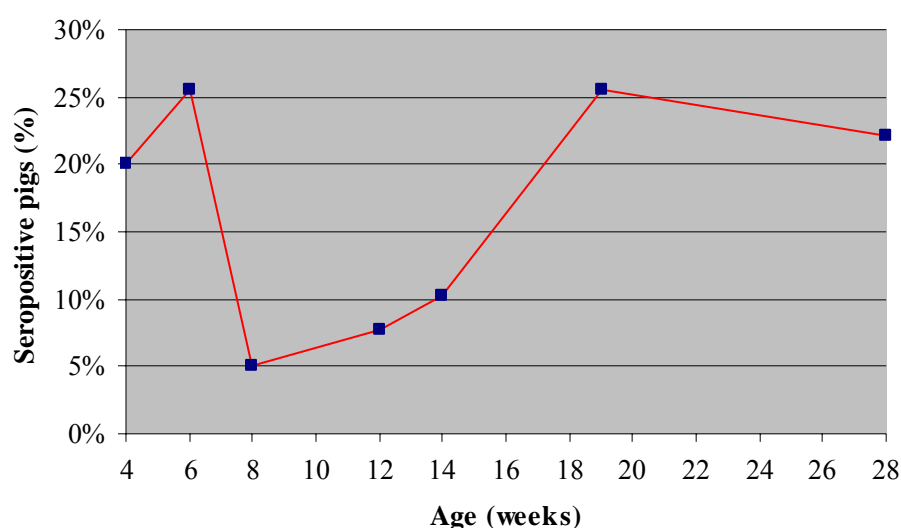
Table 4.3. Distribution by parities of *Salmonella* seroprevalence in sows at the beginning of the study

Parity	Number of samples	Number of positive samples (%)
0-2	32	46.9 % (15/32)
2-3	87	59.8 % (52/87)
3-4	22	68.2% (15/22)

Serological evolution of the group of pigs tested during the nursery and the finishing period is presented in Figure 4.1. In the nursery, 20% of the animals (8/40, CI_{95%}: 9.6%-36.1%) were seropositive at 4 weeks of age compared to 25.6% (10/39, CI_{95%}: 13.6%-42.4%) at 6 weeks of age and 5.1% (2/39, CI_{95%}: 0.9%-18.6%) at 8 weeks of age ($p < 0.05$). Thereafter, seroprevalence significantly increased ($p = 0.01$) from 7.7% in 12 weeks-old animals to 25.6% (10/39, CI_{95%}: 13.6%-42.4%) in 19 weeks-old animals. At the end of the study, 22.2% (8/36, CI_{95%}: 10.7%-39.6%) of the animals were seropositive at slaughter.

At a bacteriological level, *Salmonella* was only isolated from faeces of two pigs (2/40, 5%, CI_{95%}: 0.9%-18.2%) at the beginning of the nursery phase and in one animal (1/39, 2.5%, CI_{95%}: 0.1%-14.9%) at 8 weeks of age. All the isolates corresponded to *Salmonella* Typhimurium variant 4,5,12:i:-. No *Salmonella* isolations were obtained from the feedstuffs but one sample of drinking water of finishers yielded a *Salmonella* Roodepoort (13,22:z10:1,5) strain.

Figure 4.1. Evolution of serological *Salmonella* response in individual pigs at the nursery



4.4. Discussion

4.4.1. Cross-sectional study

A considerable number of studies have been carried out in the last years to elucidate the epidemiological aspects of *Salmonella* infections in pigs. Two main approaches are usually used to study the epidemiology of *Salmonella* in pigs: bacteriology and serology. Each one of these approaches has its advantages and disadvantages. While bacteriology provides certainty on the proportion of active shedders in the population, the methods are cumbersome when applied at a large scale and the cost is high (some 35 € per sample including labour costs). Moreover, this is a very specific method of detection but sensitivity is low (Bager and Petersen, 1991; Funk, 2003). In contrast, serology is easily applicable to large populations and the cost per tested animal is more affordable (about 3.5 €). However serology lacks specificity and does not provide information on the shedding status of a given animal (Kranker et al., 2003; Korsak et al., 2006). One additional advantage of serology is that it can be applied to serum but also to meat juice although in this later case, sensitivity seems to be lower than using serum (Mousing et al., 1997; Nielsen et al., 1998). Also, serological results allow an easy classification of farms based on the on-farm prevalence. This type of categorisations is routinely used in some well known *Salmonella* control programs such as the Danish one (Alban et al., 2002). In our case, we decided to take a serological approach for the cross-sectional study.

Our results showed that *Salmonella* was widespread in the studied production system and all but one of the farms had seropositive animals. In addition, most farms had a high within farm prevalence (28/43 farms with more than 30% of positive animals). Although extrapolation of results must be done with great caution, these results would agree with a previous study done in 141 farms of Catalonia (Mejía et al., 2006) in which on most Catalonian farms the intraherd prevalence was high. However, this classification into categories should be only valuable but a snapshot of the studied production system because the serological profiles of a given farm may vary from time to time (van der Wolf et al., 2001).

Two risk factors were found to be associated with a high level of *Salmonella* seroprevalence in the finishing herds studied: a continuous flow management and mortality rates above the median of the studied farms. Thus, herds with all-in/all-out procedures had a lower *Salmonella* prevalence than those with a continuous pig flow. Farzan et al. (2006) also associated all-in all/out (AI/AO) pig flow -which is known to be useful in general to reduce infectious disease spread in swine- with lower *Salmonella* shedding rates in grower-finisher farms. The combination of cleaning and disinfecting the facilities between groups of pigs, that is a requirement of AI/AO systems, could be effective to decrease the potential for a continuous *Salmonella* exposure and infection. According to Berends et al. (1996), residual contamination from the pig's environment is the main source of *Salmonella* infections during the fattening period.

The second factor that in our study was related to higher seroprevalences was a high mortality rate. Since none of the farms reported having diarrhoea or other conditions attributable to salmonellosis, we think that this factor was just an indicator of the general health status of the farm. Although not always so, farms with high mortality rates are more likely to have poor biosecurity measures and deficient management procedures. In our study, some biosecurity measures such as changing clothes showed a trend to be associated with higher seroprevalences. Similarly, Lo Fo Wong et al. (2004) found that hand-washing and the presence of hygienic-lock facilities where clothes and footwear could be changed when entering the herd were associated with decreased *Salmonella* seroprevalence. In our case, the number of farms included in the study did not allow detection of factors representing a relative risk lower than 3.5 and thus, probably some other factors related to the spread of *Salmonella* could have escaped to detection.

4.4.2. Longitudinal study

The present study was aimed to figure out a common pattern of evolution of *Salmonella* at the different levels of a particular multiple-site swine production system. So, even though the pattern of *Salmonella* infection in this farm is similar to the reported by others, extrapolation of the results should be very cautious. Repeated

sampling over time and in different cohorts of animals could have yielded different results.

In contrast to previous studies (Davies et al., 1998; Letellier et al., 1999; Mejía et al., 2006) where *Salmonella* shedding was found to be common in sows, in the present one none of the sows was found to be shedding *Salmonella* in faeces. Others authors also reported that the proportion of active shedders among sows was very low (Kranker et al., 2003; Rowe et al., 2003; Nollet et al., 2005b) suggesting that *Salmonella* infections in sows may play a minor role on the transmission of the infection to the piglets. The fact that the pre-enrichment step was omitted could have affected the sensitivity of the procedure. Nevertheless, according to others (Hoorfar and Baggesen, 1998), differences in sensitivity between procedures including pre-enrichment or not were scarce when applied to swine faeces. In contrast to the bacteriological findings, seroprevalence was relatively high (58%) and no differences were seen regarding the age of sows. This may indicate either a continuous *Salmonella* circulation (and this is little likely in view of the microbiological results) or may be the result of infections that took place when sows were gilts. Letellier et al. (1999) reported a high prevalence of *Salmonella* in replacement sows from an integrated production system.

Based on the results of the evolution of the serological response in these piglets, antibodies fading out about eight weeks of age were most probably of maternal origin (Proux et al., 2000). This is the point from where the infection probably begins to spread in fatteners. Thus, although *Salmonella* shedding during the fattening period was never detected, seroconversions occurred during the last third of this period and the highest number of seropositive pigs was reached at 19 weeks of age. These results, as reported by others (Berends et al., 1996; Davies et al., 1999; Belœil et al., 2003; Nollet et al., 2005a), suggest that most infections take place during the fattening period. Interestingly, *Salmonella* was isolated from water of the drinking system, although antibodies against this strain would not be detectable by ELISA.

The lack of *Salmonella* isolations from faeces during the fattening period could be related either with the sampling protocol or the bacteriological methods used. Our results were based on a single faecal sampling and the frequency of sampling probably was lower than needed to detect the real proportion of pigs shedding *Salmonella* before they seroconverted.

4.5. Conclusions

In summary, our results indicated that *Salmonella* was widespread in the studied production system and that management and biosecurity measures may help to reduce the spread of the disease. Also, it seems that dissemination of the *Salmonella* infection occurs mainly during the fattening stage of pigs.

4.6. References

- Alban, L., H. Stege, and J. Dahl. 2002. The new classification system for slaughter-pig herds in the Danish *Salmonella* surveillance-and-control program. *Prev. Vet. Med.* 53:133-146.
- Bager, F., and J. Petersen. 1991. Sensitivity and specificity of different methods for the isolation of *Salmonella* from pigs. *Acta Vet. Scand.* 32:473-481.
- Belœil, P. A., C. Chauvin, K. Proux, N. Rose, S. Queguiner, E. Eveno, C. Houdayer, V. Rose, P. Fravallo, and F. Madec. 2003. Longitudinal serological responses to *Salmonella enterica* of growing pigs in a subclinically infected herd. *Prev. Vet. Med.* 60:207-226.
- Berends, B. R., H. A. Urlings, J. M. Snijders, and F. van Knapen. 1996. Identification and quantification of risk factors in animal management and transport regarding *Salmonella* spp. in pigs. *Int. J. Food Microbiol.* 30:37-53.
- Berends, B. R., F. van Knapen, D. A. Mossel, S. A. Burt, and J. M. Snijders. 1998. Impact on human health of *Salmonella* spp. on pork in The Netherlands and the anticipated effects of some currently proposed control strategies. *Int. J. Food Microbiol.* 44:219-229.

- Davies, P. R., F. G. E. M. Bovee, J. A. Funk, W. E. M. Morrow, F. T. Jones, and J. Deen. 1998. Isolation of *Salmonella* serotypes from feces of pigs raised in a multiple-site production system. *J. Am. Vet. Med. Assoc.* 212:1925-1929.
- Davies, P. R., J. A. Funk, and W. E. M. Morrow. 1999. Fecal shedding of *Salmonella* by a cohort of finishing pigs in North Carolina. *Swine Health Prod.* 7:231-234.
- Dean, A. D., J. A. Dean, A. H. Burton, and R. C. Dicker. 2002. Epi-info version 2002: a word-processing, database, and statistics program for epidemiology on microcomputers. USD Incorporated, Stone Mountain, Georgia.
- EFSA, 2006. The Community Summary Report on Trends and Sources of Zoonoses, Zoonotic Agents, Antimicrobial Resistance and Foodborne Outbreaks in the European Union in 2005. *The EFSA Journal*, 94.
- Farzan, A., R. M. Friendship, C. E. Dewey, K. Warriner, C. Poppe, and K. Klotins. 2006. Prevalence of *Salmonella* spp. on Canadian pig farms using liquid or dry-feeding. *Prev. Vet. Med.* 73:241-254.
- Funk, J. A. 2003. Pre-harvest food safety diagnostics for *Salmonella* serovars. Part 1: Microbiological culture. *Swine Health Prod.* 11:87-90.
- Hoorfar, J., and D. L. Baggesen. 1998. Importance of pre-enrichment media for isolation of *Salmonella* spp. from swine and poultry. *FEMS Microbiol. Lett.* 169:125-130.
- Isaacson, R. E., L. D. Firkins, R. M. Weigel, F. A. Zuckermann, and J. A. DiPietro. 1999. Effect of transportation and feed withdrawal on shedding of *Salmonella* Typhimurium among experimentally infected pigs. *Am. J. Vet. Res.* 60:1155-1158.
- Korsak, N., J. N. Degeye, G. Etienne, J. M. Beduin, B. China, Y. Ghafir, and G. Daube. 2006. Use of a serological approach for prediction of *Salmonella* status in an integrated pig production system. *Int. J. Food Microbiol.* 108:246-254.
- Krunker, S., L. Alban, J. Boes, and J. Dahl. 2003. Longitudinal study of *Salmonella enterica* serotype Typhimurium infection in three danish farrow-to-finish swine herds. *J. Clin. Microbiol.* 41:2282-2288.
- Letellier, A., S. Messier, J. Pare, J. Menard, and S. Quessy. 1999. Distribution of *Salmonella* in swine herds in Quebec. *Vet. Microbiol.* 67:299-306.

- Lo Fo Wong, D. M., J. Dahl, H. Stege, P. J. van der Wolf, L. Leontides, A. Von Altrock, and B. M. Thorberg. 2004. Herd-level risk factors for subclinical *Salmonella* infection in European finishing-pig herds. *Prev. Vet. Med.* 62:253-266.
- Mejía, W., J. Casal, D. Zapata, G. J. Sanchez, M. Martin, and E. Mateu. 2006. Epidemiology of salmonella infections in pig units and antimicrobial susceptibility profiles of the strains of *Salmonella* species isolated. *Vet. Rec.* 159:271-276.
- Mousing, J., P. T. Jensen, C. Halgaard, F. Bager, N. Feld, B. Nielsen, J. P. Nielsen, and S. Bech-Nielsen. 1997. Nation-wide *Salmonella enterica* surveillance and control in Danish slaughter swine herds. *Prev. Vet. Med.* 29:247-261.
- Nielsen, B., L. Ekeroth, F. Bager, and P. Lind. 1998. Use of muscle fluid as a source of antibodies for serologic detection of *Salmonella* infection in slaughter pig herds. *J. Vet. Diagn. Invest.* 10:158-163.
- Nollet, N., K. Houf, J. Dewulf, L. Duchateau, L. De Zutter, A. de Kruif, and D. Maes. 2005a. Distribution of salmonella strains in farrow-to-finish pig herds: a longitudinal study. *J. Food Prot.* 68:2012-2021.
- Nollet, N., K. Houf, J. Dewulf, K. A. De, Z. L. De, and D. Maes. 2005b. *Salmonella* in sows: a longitudinal study in farrow-to-finish pig herds. *Vet. Res.* 36:645-656.
- Proux, K., C. Houdayer, F. Humbert, R. Cariolet, V. Rose, E. Eveno, and F. Madec. 2000. Development of a complete ELISA using *Salmonella* lipopolysaccharides of various serogroups allowing to detect all infected pigs. *Vet. Res.* 31:481-490.
- Rowe, T. A., F. C. Leonard, G. Kelly, P. B. Lynch, J. Egan, A. M. Quirke, and P. J. Quinn. 2003. *Salmonella* serotypes present on a sample of Irish pig farms. *Vet. Rec.* 153:453-456.
- van der Wolf, P. J., D. M. Lo Fo Wong, W. B. Wolbers, A. R. Elbers, H. M. van der Heijden, F. W. van Schie, W. A. Hunneman, P. Willeberg, and M. J. Tielen. 2001. A longitudinal study of *Salmonella enterica* infections in high-and low-seroprevalence finishing swine herds in The Netherlands. *Vet. Q.* 23:116-121.
- Vieira-Pinto, M., P. Temudo, and C. Martins. 2005. Occurrence of salmonella in the ileum, ileocolic lymph nodes, tonsils, mandibular lymph nodes and carcasses of pigs

slaughtered for consumption. J. Vet. Med. B Infect. Dis. Vet. Public Health 52:476-481.

Wood, R. L., A. Pospischil, and R. Rose. 1989. Distribution of persistent *Salmonella typhimurium* infection in internal organs of swine. Am. J. Vet. Res. 50:1015-1117.

Capítol 5

**EFFECT OF ACIDIFIED FEED ON THE PREVALENCE OF
SALMONELLA IN AGE-MARKET PIGS**

Zoonoses and Public Health

(under revision)

Abstract

Two trials were carried out to determine the effect of feed acidification upon *Salmonella* carriage in age-market pigs. In the first trial, the administration for the last 14 weeks of the fattening period of a commercial pelleted feed added with 0.6% lactic acid plus 0.6% formic acid (Lac-Formic-1.2) was compared to an unacidified standard diet (STD). A second experiment was carried out in two herds of growing pigs (Herd I, 3,000 pigs; Herd II, 900 pigs) in which three different diets were assayed during the last 8-9 weeks of the fattening period: a diet containing 0.8% formic acid (Formic-0.8), a diet containing 0.4% lactic acid plus 0.4% formic acid (Lac-Formic-0.8) and a STD. In the first experiment, serological evolution of the infection was examined by ELISA and microbiological cultures (rectal samples and mesenteric lymph nodes) were also done. Feed intake by pen and the individual weight of the animals were also measured. In the second trial, blood, rectal samples and mesenteric lymph nodes were collected at slaughter in both herds (30 pigs/ experimental group). In the first experiment, the acidified diet (Lac-Formic-1.2) reduced *Salmonella* carriers in mesenteric lymph nodes (Fisher's exact $p < 0.01$). In the second trial, Lac-Formic-0.8 diet significantly reduced *Salmonella* seroprevalence compared to the STD ($p < 0.05$) in both herds. Also Lac-Formic-0.8 and Formic-0.8 diets in Herd II showed a lower faecal excretion and *Salmonella* carriage in mesenteric lymph nodes than the STD ($p < 0.001$). Our results suggest that the administration of a combination of lactic and formic acids at the levels used in this study could be used to reduce *Salmonella* prevalence in finishing pigs.

5.1. Introduction

Salmonella is one of the most common human foodborne pathogens worldwide and one of the main concerns of the European policies for food safety. Poultry meat and eggs are considered the most frequent source of contamination for humans, but salmonellosis can be also acquired through the consumption of pig products. Pork has been traced back as the origin of 6%-9% of human cases of salmonellosis in Denmark (Hald et al., 2004), and up to 20% in Germany (Steinbach and Hartung, 1999).

Generic measures of hygiene and management practices can be helpful to reduce *Salmonella* throughout the pork production chain. However, hygienic measures alone may be insufficient to achieve an adequate control of *Salmonella* in pigs. At a farm level, some feeding strategies have been shown effective to prevent colonization of the gastrointestinal (GI) tract by salmonellae. For example, the administration of a coarsely ground meal diet to finisher pigs significantly reduced *Salmonella* prevalence compared with pelleted feed (Jorgensen et al., 1999; Kjeldsen and Dahl, 1999). The inhibitor effect has been related with changes on the physic-chemical properties of digesta and with higher fermentation and concentration of short-chain fatty acids (SCFA) in the gastrointestinal tract (Canibe et al., 2005). A similar effect can be achieved by using certain ingredients, such as sugar beet pulp or barley (Jorgensen et al., 2001; Hansen, 2004). However, some of these diets have a negative effect on productivity due to their lower digestibility (Laurinen et al., 2000).

Feeding fermented liquid feed (FLF) has also promoted a lower *Salmonella* prevalence in pig farms (van der Wolf et al., 2001a) associated with a higher level of organic acids (mostly lactic acid and acetic acid) in this type of feed (van Winsen et al., 2001). Then, the addition of organic acids to feed or to water has been also proposed as a strategy to prevent *Salmonella* in the gastrointestinal tract of pigs (Jensen et al., 2003; van der Wolf et al., 2001b). Thus, formic acid (1.8%) or its salt K-diformate (1.8%) have shown to be effective against pathogenic bacteria in the digestive tract of piglets and growing pigs (Canibe et al., 2001; Canibe et al., 2005), while other authors have referred that a combination of formic and lactic acids may improve the effect against *Salmonella* (Maribo et al, 2000; Jensen et al., 2003).

However, the doses of acid in feed proposed for a whole growing period markedly increases the feed cost and may discourage their practical application.

The aim of this study was to test if acidified pelleted feed, administered under field conditions either during the whole fattening period or during the last weeks prior to slaughter, allows a significant reduction on the prevalence of *Salmonella* in age-market pigs of commercial herds.

5.2. *Material and methods*

Experiment 1

The studied farm operated in a closed farrow-to-finish system. Previous records of that farm indicated a mean seroprevalence of 26.3% for sows (15/57, CI_{95%}: 15.9%-39.9%) and 44% for age-market pigs (11/25, CI_{95%}: 25.0%-64.7%).

At 10 weeks of age eighty-eight (88) pigs [(Landrace x Large White) x Pietrain] from one batch were transferred to a grower unit where they were divided in two groups and randomly housed (4 pigs per pen) in pens with opened partitions. Pigs were ear-tagged and were allowed to acclimatize for two weeks before starting the administration of the experimental diets. Two experimental pelleted diets (growing and finishing diets) were prepared: an unacidified standard diet (STD) and a diet containing 1.2% as-fed basis of 50:50% lactic-formic acid (Lac-Formic-1.2, Amasil® 85%, BASF; LacticapP® 50%, ITPSA). The diets were administered *ad libitum* for the following 14 weeks until pigs were sent to the slaughterhouse. During that period no antimicrobial treatments were administered to the experimental groups.

As starting hypothesis it was assumed that the acidified diet would be able to reduce *Salmonella* carriage by at least one third (95% confidence level, 80% power) compared to the STD, resulting in a sample size of 42 pigs/group. This calculation was made using Win Episcopo 2.0 software.

Feed intake was registered by pen weekly and body weight was individually measured at two months after the beginning of the experiment (change of the growing

diet to the finishing diet) and at the day before the slaughter. All pigs were examined to determine *Salmonella* shedding in faeces and seroconversion. Rectal samples were taken individually at the beginning of the trial, then every week in the first month of the experiment and also at weeks +7, +9, +11 and +13 from the beginning of the trial. At the abattoir (week +14), rectal samples and mesenteric lymph nodes were collected. Blood samples were obtained at the beginning of the study and at weeks +4, +9 and at the slaughterhouse. Animals were transported together to the slaughterhouse although each group was located in a different compartment of the truck.

Experiment 2

The study was carried out in two commercial herds previously identified as subclinically infected with *Salmonella*. Two batches of pigs (3,000 pigs in Herd I and 900 pigs in Herd II) were divided in three groups (each one in a separate building) and randomly allocated in pens (10 pigs per pen). Three experimental pelleted diets (finishing diets) were administered: an unacidified standard diet (STD), a diet containing 0.8% as-fed basis of formic acid (Formic-0.8, Amasil® 85%, BASF) and a diet containing 0.8% of 50%:50% formic - lactic acid (Lac-Formic-0.8, Amasil® 85%, BASF; LacticapP® 50%, ITPSA). Diets were administered for the last eight weeks before the slaughter of the pigs (from 19 to 27 weeks of age) in Herd I and for the last nine weeks (from 18 to 27 weeks of age) in Herd II. To determine the starting levels of *Salmonella* infection, blood and rectal samples were obtained from thirty pigs/group (randomly chosen from 10 pens) at the beginning of the study. Blood, rectal and mesenteric lymph nodes samples were also taken at the slaughterhouse (n=30 pigs/group) and carcass weights was also recorded. With this sampling we expected to be able to determine a reduction of prevalence by at least one third (95% confidence level, 80% power) in one or both of the acidified diets compared to the STD. This calculation was made using Win Episcope 2.0 software. Animals were transported together to the slaughterhouse although each group was located in a different compartment of the truck.

5.2.1. Sampling procedures and analyses

At slaughterhouse blood samples were taken during bleeding and rectal samples and mesenteric lymph nodes were taken in the slaughterline immediately after removal of the intestines. About 25 g of faeces were collected by emptying the rectal content in to sterile plastic recipients. Lymph nodes in the ileocaecal region weighing approximately 25 g were collected in sterile plastic recipients. Samples were immediately sent to the laboratory for microbiological analysis. Faecal samples were firstly thoroughly mixed with a sterile spatula before seeded. Lymph nodes were immersed in 95% ethanol, flamed and then smashed and homogenized in to a sterile container.

Microbiological analyses consisted of a pre-enrichment procedure in buffered peptone water (BPW Oxoid; dilution 1:10) at 37°C for 18 hours, transfer to Rappaport-Vassiliadis broth (Oxoid; 42°C, 48 h; dilution 1:100) and final plating onto Xylosine Lysine Tergitol-4 medium (XLT4 Difco; 37°C, 24 h). Suspect *Salmonella* colonies on XLT4 were further subcultured on MacConkey's agar (37°C, 24 h). Lactose-negative isolates were identified by using API 20E galleries (bioMérieux) and further confirmed and serotyped at the Spanish National Reference Laboratory for Animal Salmonellosis (Algete, Madrid) according to the modified Kauffman-White-Le Minor scheme.

Sera were examined with an indirect mix-ELISA (Salmonella Covalent Mix-ELISA, Svanova Biotech AB, Uppsala, Sweden) based on the O-antigens 1, 4, 5, 6, 7 and 12. The test was performed as recommended by the supplier and the results were interpreted accordingly. Samples with an optical density (OD) higher than 40% of the positive controls were considered positive.

5.2.2. Statistical analyses

Data were analyzed using StatsDirect (v. 2.5.6). Comparisons between groups were done by means of the chi-square test, one-way analysis of variance or Mann-Whitney tests depending on the nature of the data. Multiple comparisons were done using the Tukey-Kramer test. P-values of <0.05 were considered significant. Confidence intervals for the prevalences and their statistical comparison were calculated using

EpiCalc v1.02. The effect of diet on growth performance was tested by ANOVA analysis with the GLM procedure of SAS (SAS Inst., Inc. 8.2, Cary, NC).

5.3. Results

Experiment 1

Salmonella was isolated from faeces of two pigs, one in the STD group (week +2) and one from the Lac-Formic-0.8 group (week +3). In both cases, isolates corresponded to *Salmonella* Typhimurium variant 4,5,12:i:-. After slaughtering, two pigs (2/43, 4.6%, CI_{95%}: 0.8%-16.9%) in the STD group and one (1/42, 2.4%, CI_{95%}: 0.1%-13.9%) in the Lac-Formic-0.8 group were positive for *Salmonella* in faeces. Regarding lymph nodes, 8/43 (18.6%, CI_{95%}: 8.9%-33.9%) animals were positive in the STD group compared to none (0/42, CI_{95%}: 0.2%-10.4%) in the Lac-Formic-0.8 group (Fisher's exact $p < 0.01$). All isolates resulted to belong to serotype Rissen. Regarding the serological evolution, all pigs remained seronegative until 21 weeks of age (9 weeks of feeding experimental diets) but three animals seroconverted in the STD group when examined at the slaughterhouse. No differences in productive performance were observed between groups for daily feed intake, daily gain and the feed:gain ratio although the feeding cost was significantly ($p < 0.05$) higher for treated animals (1.19 €/Kg of body weight) compared to controls (1.13 €). Table 5.1 summarizes productive results.

Table 5.1. Experiment 1: Productive results in pigs receiving a diet containing 1.2% of 50%:50% lactic:formic acid (Lac-Formic-1.2) or an standard diet (STD) during the last 14 weeks of the fattening period

Item	Group	
	Lac-Formic-1.2	STD
Voluntary feed intake (kg/day)	2.19 (±0.22)	2.18 (±0.18)
Average Daily Gain (kg/day)	0.81 (±0.07)	0.82 (±0.06)
Feed: gain ratio	2.71 (±0.08)	2.66 (±0.11)
Feeding Cost* (€/kg body weight gain)	1.19 ^a	1.13

*Feeding cost = Feed: gain ratio x Cost of feed (€/kg)

^a $p < 0.05$

Experiment 2

At the beginning of the study no significant differences in *Salmonella* seroprevalence were observed between the experimental groups in Herd I or Herd II. However average starting seroprevalence in Herd I (20%, CI_{95%}: 12.6%-30.3%) was higher than in Herd II (8.9%, CI_{95%}: 4.2%-17.2%). None of the animals were positive in rectal samples in the starting sampling.

For Herd I, no differences between groups were detected for faecal or lymph node carriage at the slaughterhouse. *Salmonella* Typhimurium and its monophasic variant 4,12:i:- was the predominant serovar. Thus, all isolates belonged to that serotype except for isolates obtained from faecal samples of the STD animals. Table 5.2 summarizes the distribution of serotypes in this experiment. Only one of the animals (Formic-0.8 group) with lymph node carriage was simultaneously positive in faeces. In contrast, at the end of the experiment, final seroprevalence was higher ($p < 0.05$) in the STD (28/30, 93.3%, CI_{95%}: 76.4%-98.2%) and Formic-0.8 groups (26/30, 86.6%, CI_{95%}: 68.3%-95.6%) than in the Lac-Formic-0.8 group (20/30, 66.6%, CI_{95%}: 47.1%-82.0%).

Table 5.2. Experiment 2: Distribution of *Salmonella* isolates by serovar and group

	Serotypes isolated		
	Formic-0.8	Lac-Formic-0.8	STD
Herd I			
Faeces	4,12:i:- (5)	4,12:i:- (5) Typhimurium (2)	Muenchen (3) 4,12:i:- (5)
Mesenteric lymph nodes	4,12:i:- (1)	4,12:i:- (2)	4,12:i:- (2)
Herd II			
Faeces	Rissen (2)	0	Rissen (10) 1,4,12:i:- (1)
Mesenteric lymph nodes	Rissen (1)	Rissen (1)	Rissen (8)

Formic-0.8: Pigs receiving a diet containing 0.8% of formic acid

Lac-Formic-0.8: Pigs receiving a diet containing 0.4% of lactic acid plus 0.4% formic acid

STD: Unacidified standard diet

For Herd II, differences in faecal and lymph node carriage were observed between the STD and the acidified groups ($p < 0.001$). In the STD group 11/30 (36.6%, $CI_{95\%}$: 20.5%-56.0%) animals were positive for *Salmonella* in faeces and 8/30 (26.6%, $CI_{95\%}$: 12.9%-46.1%) tested positive in lymph nodes. In contrast, in the acidified groups only one animal per group (1/30, 3.3%, $CI_{95\%}$: 0.2%-19.0%) tested positive for lymph nodes and two (2/30, 6.6%, $CI_{95\%}$: 1.1%-23.4%) of the Formic-0.8 group contained *Salmonella* in faeces. All isolates corresponded to serotype Rissen except for one retrieved from a faecal sample of a STD pig (Table 5.2). At a serological level, the Lac-Formic-0.8 group had a lower prevalence (12/30, 40%, $CI_{95\%}$: 23.2%-59.2%) ($p < 0.05$) at the end of the study than the STD group (42/60, 70%, $CI_{95\%}$: 50.4%-84.6%). Bacteriological and serological results obtained at the slaughterhouse are shown in Table 5.3.

Table 5.3. Experiment 2: Effect of the administration of an unacidified standard diet (STD), an acidified diet with 0.8% of formic acid (Formic-0.8) or 0.8% of 50%:50% lactic-formic acids (Lac-Formic-0.8) for 8 and 9 weeks in two herds (Herd I and Herd II) upon *Salmonella* carriage in faeces and mesenteric lymph nodes and on seroprevalence as determined by sampling at the slaughterhouse

	Positive/tested (proportion)*		
	Group		
	Formic-0.8	Lac-Formic-0.8	STD
Herd I			
Faeces	5/30 (16.6)	5/30 (16.6)	4/30 (13.3)
Mesenteric lymph nodes	1/30 (3.3)	2/30 (6.6)	2/30 (6.6)
Serology (ELISA)	26/30 (86.6) ^{a,b}	20/30 (66.6) ^b	28/30 (93.3) ^a
Herd II			
Faeces	2/30 (6.6) ^a	0/30 (0.0) ^a	11/30 (36.6) ^b
Mesenteric lymph nodes	1/30 (3.3) ^a	1/30 (3.3) ^a	8/30 (26.6) ^b
Serology (ELISA)	16/30 (53.3) ^{a,b}	12/30 (40) ^b	21/30 (70) ^a
Totals			
Faeces	7/60 (11.6) ^{a,b**}	5/60 (8.3) ^{a,b**}	15/60 (25.0) ^a
Mesenteric lymph nodes	2/60 (3.3) ^a	3/60 (5.0) ^a	10/60 (16.6) ^b
Serology (ELISA)	42/60 (70) ^{a**}	32/60 (53.3) ^b	49/60 (81.6) ^a

*Proportions with different superscripts are statistically different ($p < 0.05$) while those with the same superscript letter are similar

Overall, in the sum of both herds, a significantly lower *Salmonella* seroprevalence ($p=0.001$) was observed in pigs fed on the Lac-Formic-0.8 diet (32/60, 53.3%, $CI_{95\%}$: 40.1%-66.1%) compared to the animals fed on the STD diet (49/60, 81.6%, $CI_{95\%}$: 69.1%-90.0%). Thus, animals receiving this treatment were less likely to be seropositive (Relative Risk=0.65, $CI_{95\%}$: 0.50-0.85). Also, a trend was noticed for Lac-Formic-0.8 diet compared to Formic-0.8 group ($p<0.06$). No differences regarding carcass weights were observed between groups.

5.4. Discussion

One of the key points for controlling carcass contamination is to assure that pigs delivered to the slaughterhouse are free of *Salmonella* or at least, that the prevalence of carriers among incoming pigs is low. However, circulation of *Salmonella* is common in the finishing stages of pig production (Berends et al., 1996; Davies et al., 1999; Funk et al., 2001) which suggests that interventions in that critical period can be helpful to reduce the proportion of carrier pigs reaching the slaughterhouse. The addition of organic acids to diets for pigs has been reported to be effective for preventing the colonization of the gastrointestinal tract of pigs by pathogenic bacteria (Jensen et al., 2003) and therefore, this may be an efficient method for *Salmonella* control.

In the present study two experiments were done in order to evaluate the efficacy of acidification strategies applied during the whole growing period or shortly during last weeks of the finishing period. Results showed that addition of a relatively high dose (1.2%) of lactic and formic acid (50:50) during the whole growing period had a significant impact on the reduction of *Salmonella* carriers reaching the slaughterhouse regarding lymph node carriage. These carrier animals can become active faecal shedders of *Salmonella* due to the stress associated to transport and lairage and may contribute to the spread of the infection to other animals (Hurd et al., 2001). Moreover, contaminated lymph nodes, together with contaminated intestines, can be one of the main sources of carcass contamination during the evisceration process (Berends et al., 1996; Botteldoorn et al., 2003). The fact that all pigs remained seronegative (except three in the STD group) suggests that infections took place very

late during the finishing period, but before arriving to the slaughterhouse since most positives corresponded to lymph nodes. Thus, while control pigs probably became infected and developed a carrier state before seroconversion, treated animals remained uninfected or, if so, did not develop lymph node carriage. Nielsen et al. (1995) showed that seroconversion takes place between 7 and 30 days after the onset of the infection and thus, our pigs should have become infected between 21 and 24-25 weeks of age.

Considering the cost of a prolonged treatment with acids in this first trial (about 2.0 € per pig), which account for approximately an additional 5% per gained Kg of body weight, we designed a second trial in order to evaluate the effect of lower dosages (0.8%) during a shorter period (8-9 weeks). These changes represented a reduction from a cost of 2.0 €/fattened pig to a more affordable one of 0.8 €/fattened pig (lactic plus formic acids).

Results of the second trial showed that acidification of feed, particularly with the combination of lactic and formic acid, was efficient to reduce *Salmonella* seroprevalence in both farms, indicating that this strategy prevented the spread of the infection. However, reduction in the proportion of *Salmonella* carriers either in mesenteric lymph nodes or in faeces was only evident in one herd. One possible interpretation for this fact is that pigs in Herd I could have become infected before the administration of the acidified feed and developed a carrier state that was not affected by the treatment. As a matter of fact, in Herd I starting prevalence was higher than in Herd II where differences in the isolation rates between groups were significant. There are evidences that lymph node carriage can persist as long as 28 weeks after exposure to *Salmonella* (Wood et al., 1989). Under this scenario, the efficacy of the reduction of bacteriologically positive animals by treatment with organic acids will be enhanced by an early starting of the treatment.

5.5. Conclusions

Taking together, our results support that the addition of acids in feed during all the fattening period would be effective to reduce the spread of *Salmonella* in pig farms.

However, the practical application of this strategy will depend on the economic feasibility. Lowering the doses and the periods of administration of the acids can reduce costs but this savings in the costs may have an impact in the efficacy if the prevalence at the start of the administration is already high.

5.6. References

- Berends, B. R., H. A. Urlings, J. M. Snijders, and F. van Knapen. 1996. Identification and quantification of risk factors in animal management and transport regarding *Salmonella* spp. in pigs. *Int. J. Food Microbiol.* 30:37-53.
- Botteldoorn, N., M. Heyndrickx, N. Rijpens, K. Grijspeerdt, and L. Herman. 2003. *Salmonella* on pig carcasses: positive pigs and cross contamination in the slaughterhouse. *J. Appl. Microbiol.* 95:891-903.
- Canibe, N., S. H. Steien, M. Øverland, and B. B. Jensen. 2001. Effect of K-diformate in starter diets on acidity, microbiota, and the amount of organic acids in the digestive tract of piglets, and on gastric alterations. *J. Anim. Sci.* 79:2123-2133.
- Canibe, N., O. Højberg, S. Højsgaard, and B. B. Jensen. 2005. Feed physical form and formic acid addition to the feed affect the gastrointestinal ecology and growth performance of growing pigs. *J. Anim. Sci.* 83:1287-1302.
- Davies, P. R., J. A. Funk, and W. E. M. Morrow. 1999. Fecal shedding of *Salmonella* by a cohort of finishing pigs in North Carolina. *Swine Health Prod.* 7:231-234.
- Funk, J. A., P. R. Davies, and M. A. Nichols. 2001. Longitudinal study of *Salmonella* enterica in growing pigs reared in multiple-site swine production systems. *Vet. Microbiol.* 83:45-60.
- Hald, T., D. Vose, H. C. Wegener, and T. Koupeev. 2004. A Bayesian approach to quantify the contribution of animal-food sources to human salmonellosis. *Risk Anal.* 24:255-269.
- Hansen, C. F. 2004. Effect of feed form, potato protein concentrate, dried sugar beet pulp and zinc gluconate on *Salmonella* gastrointestinal conditions and performance in finishers. Thesis Dissertation. The Royal Veterinary and Agricultural University, Copenhagen, Denmark.

- Hurd, H. S., J. D. McKean, I. V. Wesley, and L. A. Karriker. 2001. The effect of lairage on *Salmonella* isolation from market swine. *J. Food Prot.* 64:939-944.
- Jensen, B.B., O. Højberg, L. L. Mikkelsen, S. Hedeman, and N. Canibe. 2003. Enhancing intestinal function to treat and prevent intestinal disease. Proceedings of the 9th International Symposium on Digestive Physiology in Pigs, Alberta, Canada, 103-119.
- Jorgensen, L., J. Dahl, and A. Wingstrand. 1999. The effect of feeding pellets, meal and heat treatment on the salmonella-prevalence in finishing pigs. Proceedings of the 3th International Symposium on the Epidemiology and Control of *Salmonella* in Pork, Washington DC, USA, 308-312.
- Jorgensen, L., H. D. Kjærsgaard, H. Wachamann, B. Jensen, and K. Knudsen. 2001. Effect of wheat bran and wheat:barley ratio in pelleted feed on *Salmonella* prevalence and productivity of finishers. Proceedings of the 4th International Symposium on the Epidemiology and Control of *Salmonella* and Other Foodborne Pathogens in Pork, Leipzig, Germany, 112-114.
- Kjeldsen, N., and J. Dahl. 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 3th International Symposium on the Epidemiology and Control of *Salmonella* in Pork, Washington DC, USA, 313-316.
- Laurinen, P. A., H. B. Siljander-Rasi, T. B. Karhunen, M. A. Alaviuhkola, M. A. Näsi, and K. A. Tuppi. 2000. Effects of different grinding methods and particle size of barley and wheat on pig performance and digestibility. *Anim. Feed Sci. Tech.* 83:1-16.
- Maribo, H., L. E. Olsen, B. B. Jensen, and N. Miquel. 2000. Combination of lactic acid and formic acid and benzoic acid to piglets. Danish Bacon and Meat Council, N° 490, Copenhagen, Denmark.
- Nielsen, B., D. Baggesen, F. Bager, J. Haugegaard, and P. Lind. 1995. The serological response to *Salmonella* serovars typhimurium and infantis in experimentally infected pigs. The time course followed with an indirect anti-LPS ELISA and bacteriological examinations. *Vet. Microbiol.* 47:205-218.
- Steinbach, G., and M. Hartung. 1999. Attempt to estimate the share of human *Salmonella* infections, which are attributable to *Salmonella* originating from swine. *Berl. Munch. Tierarztl. Wochenschr.* 112:296-300.

- van der Wolf, P. J., W. B. Wolbers, A. R. Elbers, H. M. van der Heijden, J. M. Koppen, W. A. Hunneman, F. W. van Schie, and M. J. Tielen. 2001a. Herd level husbandry factors associated with the serological *Salmonella* prevalence in finishing pig herds in The Netherlands. *Vet. Microbiol.* 78:205-219.
- van der Wolf, P. J., F. W. van Schie, A. R. Elbers, B. Engel, H. M. van der Heijden, W. A. Hunneman, and M. J. Tielen. 2001b. Administration of acidified drinking water to finishing pigs in order to prevent *Salmonella* infections. *Vet. Q.* 23:121-125.
- van Winsen R.L., L. J. Lipman, S. Biesterveld, B. Urlings, J. Snijders, and F. van Knapen. 2001. Mechanism of *Salmonella* reduction in fermented pig feed. *J. Sci. Food Agric.* 81:342-346.
- Wood, R. L., A. Pospischil, and R. Rose. 1989. Distribution of persistent *Salmonella typhimurium* infection in internal organs of swine. *Am. J. Vet. Res.* 50:1015-1117.

Capítol 6

**EVALUATION OF CRITICAL POINTS FOR *SALMONELLA*
CONTAMINATION IN PIG ABATTOIRS**

International Journal of Food Microbiology
(under revision)

Abstract

The aim of the present study was to determine the presence of *Salmonella* and to evaluate the possible sources of contaminations throughout the slaughter process in three commercial pig abattoirs. Samples from the slaughterhouse environment (lairage pens, equipment and tools) and from slaughtered animals (rectal contents and carcasses from the same pigs at different stages of the slaughtering process) were collected in different days and at three separate times and analyzed. In total, 297 environmental samples, 360 rectal samples and 1,080 swabs of carcasses were processed. In all abattoirs, *Salmonella* contamination was common in the environment; in particular in lairage pen samples (72.2%). Regarding other environmental samples, slaughterhouses B and C had a higher proportion of positive results compared to slaughterhouse A ($p < 0.05$). These two abattoirs received the highest proportion of *Salmonella* carrier pigs. In all abattoirs, *Salmonella* was isolated from the environment before the beginning of the slaughtering operations. Prevalence of carriers and the proportion of contaminated carcasses after evisceration and before chilling differed considerably between abattoirs ($p < 0.01$) being higher in slaughterhouses B and C compared to abattoir A. Globally, contamination was lower after polishing of carcasses, increased after evisceration and decreased before chilling of the carcasses. In all instances, serotypes Typhimurium, Derby and Rissen were the most frequently isolated. In most cases there was no evidence that carrier pigs were the immediate source of contamination for the corresponding carcasses and, most often (85% of the cases), the presence of *Salmonella* could be attributed to environmental contamination cycles. Taking together, the results show that contamination of carcasses is a complex process influenced by the pressure of infection represented by carrier pigs, the hygienic measures established and the control of environmental sources of contamination.

6.1. Introduction

Salmonellosis is one of the major causes of foodborne enteric disease worldwide. The most common sources of infection for humans are contaminated eggs and poultry meat, but pork meat and pork meat-based products have been also associated to some salmonellosis outbreaks (Narain and Lofgren, 1989; Maguire et al., 1993; Wegener and Baggesen, 1996; Mølbak et al., 1999; Buchholz et al., 2005; Noel et al., 2006). For Western countries it has been determined that the proportion of cuts and retail-ready pork contaminated with *Salmonella* range from 5% to 40% (Berends et al., 1998b; Duffy et al., 2001). Other studies attributed to these products the origin of 10% and 15% of human cases of salmonellosis in Europe (Berends et al., 1998a; Hald et al., 2004).

Contamination of pig carcasses at the slaughterhouse is one of the key factors for the presence of *Salmonella* in retail-ready pig meat. It is thought that the proportion of *Salmonella*-positive animals arriving to the slaughterhouse and the extent of cross-contaminations from the slaughterhouse environment will determine the risk of carcass contamination (Borch et al., 1996). The proportion of contaminations attributable to the environment or originated in the same pig is under debate. Thus, Berends et al. (1997) reported that about 70% of carcass contaminations resulted from carrier pigs whereas Botteldoorn et al. (2004) reported that the main source of contamination was the slaughterhouse environment. In any case, there is an agreement about the fact that if the slaughter procedures were developed with absolute efficiency, the proportion of contaminated carcasses would substantially decrease.

The present study was aimed to determine the frequency and distribution of *Salmonella* contaminations throughout the slaughter process, and to evaluate the possible sources of the contamination of carcasses in three pig abattoirs of Catalonia, Spain.

6.2. Material and methods

6.2.1. Slaughterhouses and slaughtering processes

Three commercial pig slaughterhouses (A, B and C) located in Catalonia (Spain) were investigated. These slaughterhouses processed approximately 350, 650 and 450 pigs per hour, respectively; were located in the same area of Catalonia and, were representative of medium to big slaughterhouses of this region, one of the main pig producing zones of Europe with a six million pigs census.

Slaughter operations and procedures were similar in all abattoirs except for the scalding. Briefly, animals were kept initially (up to two hours) in clean lairage pens; then, animals were stunned by means of carbon dioxide and transferred into the “dirty area” of the slaughterhouse where they were immediately exsanguinated. In slaughterhouse A, exsanguinated animals were scalded using water vapor while in slaughterhouse B pigs were immersed in a scalding tank containing water at $61\pm 1^{\circ}\text{C}$. In slaughterhouse C, exsanguinated pigs were pre-scalded using water vapor and then were also immersed in a scalding tank ($61\pm 1^{\circ}\text{C}$). In all cases, scalded carcasses were then dehaired, singed, scrapped away and polished using rotating brushes. After polishing, carcasses were moved into a separate “clean area”. There, carcasses were debunged by mechanical sucking up of the faeces from the rectum. The abdomen was opened and evisceration and pluck removal were done by hand. Splitting of carcasses was done by means of automated carcass splitters (two splitters in slaughterhouse B and one in slaughterhouses A and C). Carcasses were then trimmed and cleaned by cold water spraying in order to remove bone remains and blood clots. Finally, washed carcasses were weighed and transferred to the chilling area.

6.2.2. Sampling design

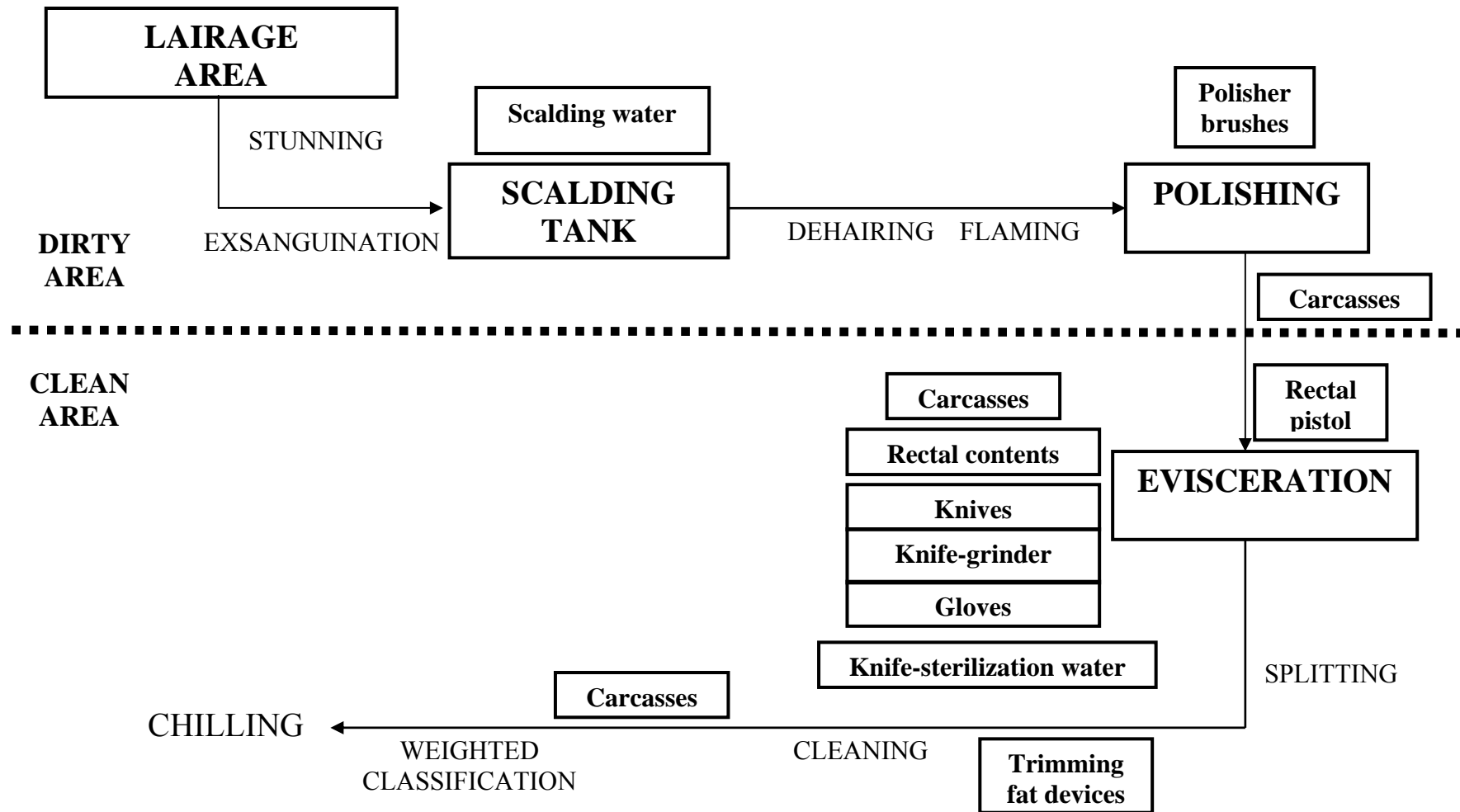
In each slaughterhouse, sampling was repeated in four different days. In a given working day environmental samples were taken at three separate times: before the beginning of slaughter, one hour later and 3-4 hours later. From now on, these sampling times will be designated as T1, T2 and T3, respectively. Environmental sampling was done at the lairage areas after cleaning of pens, from the slaughterline equipment (scalding water, polishing brushes, evisceration tools and trimming fat

devices) and from gloves of the personnel working at the evisceration area. Polishing brushes were only sampled at T1.

Samples of slaughtered pigs were taken in two sampling rounds corresponding to T2 and T3 as mentioned above. For each round, 15 pigs were followed up throughout the slaughterline. To do this, every fifth pig was marked at the end of the “dirty area” after polishing the body surface. Once identified, the corresponding intestines were collected at the evisceration area. Thus, from these marked pigs, rectal samples were collected and carcasses were examined by swabbing at three process stages: after polishing, after evisceration and before chilling. Figure 6.1 summarizes the sampling design.

In a subsequent assay, slaughterhouse B was selected to simulate the effect of a lack of logistic slaughter. Two farms (F1 and F2) were selected for the assay. F1 had a seroprevalence of 55% of positive market-age pigs as determined by previous ELISA assays examining 20 pigs per batch. F2 had always been serologically negative. A batch of 225 pigs from F1 and a second batch of 170 pigs from F2 were transported to the slaughterhouse the same day. F1 animals were scheduled to be slaughtered just at the starting of the operations of the slaughterhouse. Thus, all machinery was clean and no other pigs had been slaughtered on that same day. F2 pigs were scheduled to be slaughtered immediately after F1 pigs. The last 38 pigs of F1 entering the slaughterline and the first 36 F2 pigs entering the slaughterline were sampled for contamination of carcasses and faecal carriage of *Salmonella*. Sampling methods are explained below. Blood samples were also taken to be examined by ELISA (Salmonella Covalent Mix-ELISA, Svanova Biotech AB, Uppsala, Sweden). Environmental samples from the evisceration area (knives, knife-grinders, gloves and knife-sterilization water) were also taken (n=17).

Figure 6.1. Schematic floor diagram of the slaughterhouses with indication of the sampling points (in bold and in squares) where *Salmonella* contamination was investigated



6.2.3. Methods of sampling

Most environmental samples and carcasses samples were collected by a swabbing technique performed with a sterile cellulose acetate swab in Amies medium. Samples of lairage areas were collected by swabbing the edges of the floor in empty and clean pens (approximately a strip of 40 x 5 cm). From scalding tanks as well as from the sterilization devices for the evisceration knives samples of 100 ml of water were collected in sterile recipients. Samples from the polishing equipment and trimming devices were taken by swabbing a surface area of approximately 20 cm². Evisceration knives and knife-grinders were swabbed twice from the tip until the base. Sampling of the gloves of slaughterhouse personnel was carried out by swabbing the whole palms of the worker's hands (left and right).

Rectal samples were taken in the slaughterline immediately after removal of the intestines. About 25 g of faeces were collected by emptying the rectal content in to a sterile plastic recipient. For carcasses, four sites (ham, belly, jowl and back) were rubbed firmly with the same sterile swab. An area about 100 cm² of the ham (inner and outer parts), belly and jowl of each carcass was swabbed while the back was swabbed over the largest possible area. After swabbing, swabs were placed again into their individual container with Amies medium.

Samples were kept refrigerated and transferred as soon as possible to the laboratory where they were processed.

6.2.4. *Salmonella* isolation procedures

Microbiological analyses were done using a pre-enrichment step in buffered peptone-water (BPW, Oxoid). Faecal contents were homogenized and seeded at a 1:10 ration in BPW. For carcasses and environmental samples, swabs were resuspended with 100 ml of BPW. Water samples were mixed with BPW at a ratio 1:9 (25 ml:225 ml). All samples were incubated at 37°C for 18-24 h. After incubation, the pre-enrichment broth was vortexed and 0.1 ml was transferred to 10 ml of Rappaport-Vassiliadis enrichment broth (RV, Oxoid) and incubated at 42°C for 48 h. Enrichment broths were streaked onto Xylose Lysine Tergitol-4 Agar (XLT4, Difco) and plates were incubated at 37°C for 24 h. Suspect *Salmonella* colonies on XLT4 were further

identified by means of API 20E (bioMérieux). Finally, *Salmonella* isolates were serotyped according to the modified Kauffmann-White-LeMinor scheme at the Spanish National Reference Centre for Animal Salmonellosis (Algete, Madrid).

6.2.5. Statistical analyses

Differences for the number of isolations between sampling rounds and slaughterhouses were determined by a χ^2 test using Epi-Info 2002 (Dean et al., 2002).

6.3. Results

The overall proportion of isolations from environmental samples was similar for all three slaughterhouses and ranged from 21.6% in slaughterhouse A (19/88, CI_{95%}: 13.8%-31.9%) to 27.8% in slaughterhouse B (27/97, CI_{95%}: 19.4%-38.0%). Table 6.1 summarizes these results. The highest proportion of isolations came from lairage areas where 70.8%-75% of the samples were positive. In the other sampling points, contamination was sporadic. Thus polishing brushes were mainly negative except for slaughterhouse B; rectal pistols were only positive in slaughterhouses A and C and samples from evisceration tools were positive at least once in each slaughterhouse. Gloves of the personnel working at the evisceration area were contaminated occasionally with *Salmonella* in all abattoirs. Regarding environmental samples excluding lairage pens, pairwise comparisons of slaughterhouses B and C showed that the two later (B and C) had a significantly higher proportion of contaminated samples ($p < 0.05$). Besides lairage pens, in all slaughterhouses, *Salmonella* was isolated from the environment before the beginning of the slaughtering operations (7.5%, 6/80): one sample from rectal pistol in slaughterhouse A; one sample from water of evisceration knife-sterilization devices, one sample from personnel gloves and one sample from polishing brushes in slaughterhouse B; two samples from water of evisceration knife-sterilization devices in slaughterhouse C. When isolation results were compared by time at which samples were taken and slaughterhouse, no differences were noticeable regarding the time of sample collection; namely, before, during or at late operating time in abattoirs A and B. A trend for an increased rate of environmental isolations

was observed in slaughterhouse C. Thus, of 11 samples taken at T1 only two were positive; at T2, 3 out of eleven were positive and 6/11 at T3 ($p=0.07$).

A total of 360 pigs were followed all throughout the slaughterline. Of them, 15.5% (56/360, $CI_{95\%}$: 12.0%-19.7%) were faecal carriers of *Salmonella*. However, prevalence of carriers differed considerably between abattoirs being higher ($p<0.01$) in slaughterhouses B and C (23.3% and 21.6%, respectively) than in slaughterhouse A (1.6%). In samples collected from carcasses, only one was found to be contaminated after the polishing stage (slaughterhouse C). For all slaughterhouses, contamination rates increased after evisceration and, finally, decreased before chilling. Differences among slaughterhouses were also detected in eviscerated carcasses, being lower ($p<0.01$) in slaughterhouse A (2.5%, 3/120) than in slaughterhouse B (10.0%, 12/120) and slaughterhouse C (20.8%, 25/120). Before chilling, the proportion of contaminated carcasses were also lower ($p<0.01$) in slaughterhouse A (1.6%, 2/120) than in slaughterhouse B (5.8%, 7/120) and slaughterhouse C (12.5%, 15/120). Except for slaughterhouse A, where *Salmonella* isolation rate was always very low, the proportion of contaminated carcasses before chilling was always lower than the proportion of carrier pigs ($p<0.05$). However, only 5 of the 24 (20.8%) carcasses that were positive before chilling had the same *Salmonella* serotype detected on the same carcass at the evisceration stage. Results obtained from pigs and pig carcasses are shown in Table 6.2.

There was a poor association between a given positive animal and the contaminated carcasses. Only six of out 40 (15%) and four of out 24 (16.6%) of the positive carcasses at the evisceration stage and before chilling, respectively, corresponded with pigs carrying *Salmonella* in their intestinal contents. Thus, almost 85% of the contaminated carcasses did not correspond to infected pigs. In particular, the serotypes of 70% of all *Salmonella* isolates obtained from positive carcasses after evisceration matched the serotypes found in evisceration tools sampled immediately after the carcasses.

Table 6.1. Isolation of *Salmonella* from environmental samples of each slaughterhouse

Slaughterhouse A					
Sample type	Sampling day				Total (%)
	Day 1	Day 2	Day 3	Day 4	
Scalding tank	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.A.
Polishing brushes	0/1	0/1	0/1	0/1	0/4 (0)
Rectal pistol	0/3	0/3	0/3	1/3	1/12 (8.3)
Evis. knives	0/3	0/3	0/3	0/3	0/12 (0)
Evis. knife-grinder	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.A.
Evis. gloves	1/3	0/3	0/3	0/3	1/12 (8.3)
Evis. knife-sterilization	0/3	0/3	0/3	0/3	0/12 (0)
Trimming fat devices	0/3	0/3	0/3	0/3	0/12 (0)
Total (%) (excluding lairage)	1/16 (6.2)	0/16 (0)	0/16 (0)	1/16 (6.2)	2/64 (3.1)
Lairage pens	5/6	4/6	2/6	6/6	17/24 (70.8)
Total (%)	6/22 (27.3)	4/22 (18.2)	2/22 (9.1)	7/22 (31.8)	19/88 (21.6)

Slaughterhouse B					
Sample type	Sampling day				Total (%)
	Day 1	Day 2	Day 3	Day 4	
Scalding tank	0/3	0/3	0/3	0/3	0/12 (0)
Polishing brushes	0/1	1/1	0/1	0/1	1/4 (25.0)
Rectal pistol	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.A.
Evis. knives	2/3	1/3	0/3	0/3	3/12 (25.0)
Evis. knife-grinder	N.D.	2/3	0/3	0/3	2/9 (22.2)
Evis. gloves	2/3	1/3	0/3	0/3	3/12 (25.0)
Evis. knife-sterilization	1/3	0/3	0/3	0/3	1/12 (8.3)
Trimming fat devices	0/3	0/3	0/3	0/3	0/12 (0)
Total (%) (excluding lairage)	5/16 (31.2)	5/19 (26.3)	0/19 (0)	0/19 (0)	10/73 (13.7)
Lairage pens	6/6	5/6	5/6	1/6	17/24 (70.8)
Total (%)	11/22 (50.0)	10/25 (40.0)	5/25 (20.0)	1/25 (4.0)	27/97 (27.8)

Slaughterhouse C					
Sample type	Sampling day				Total (%)
	Day 1	Day 2	Day 3	Day 4	
Scalding tank	0/3	0/3	0/3	0/3	0/12 (0)
Polishing brushes	0/1	0/1	0/1	0/1	0/4 (0)
Rectal pistol	0/3	0/3	1/3	0/3	1/12 (8.3)
Evis. knives	0/3	0/3	1/3	0/3	1/12 (8.3)
Evis. knife-grinder	0/3	0/3	1/3	1/3	2/12 (16.6)
Evis. gloves	1/3	0/3	0/3	2/3	3/12 (25.0)
Evis. knife-sterilization	0/3	1/3	3/3	0/3	4/12 (33.3)
Trimming fat devices	0/3	0/3	0/3	0/3	0/12 (0)
Total (%) (excluding lairage)	1/22 (4.5)	1/22 (4.5)	6/22 (27.3)	3/22 (13.6)	11/88 (12.5)
Lairage pens	3/6	5/6	5/6	5/6	18/24 (75.0)
Total (%)	4/28 (14.3)	6/28 (21.4)	11/28 (39.3)	8/28 (28.6)	29/112 (25.9)

Evis.: Evisceration; N.D.: Not done; N.A.: Not applicable

Table 6.2. Isolation of *Salmonella* from pigs and pig carcasses

		Samples			
		Pigs	Carcasses		
Sampling day	Faecal contents	After polishing	After evisceration	Before chilling	
Slaughterhouse A	Day 1	1/30	0/30	1/30	1/30
	Day 2	0/30	0/30	0/30	0/30
	Day 3	1/30	0/30	1/30	1/30
	Day 4	0/30	0/30	1/30	0/30
	Total (%)	2/120 (1.6)	0/120 (0)	3/120 (2.5)	2/120 (1.6)
	CI _{95%}	0.3%-6.4%	0.1%-3.9%	0.6%-7.7%	0.3%-6.4%
Slaughterhouse B	Day 1	2/30	0/30	8/30	1/30
	Day 2	5/30	0/30	1/30	0/30
	Day 3	17/30	0/30	2/30	6/30
	Day 4	4/30	0/30	1/30	0/30
	Total (%)	28/120 (23.3)	0/120 (0)	12/120 (10.0)	7/120 (5.8)
	CI _{95%}	16.3%-32.1%	0.1%-3.9%	5.5%-17.2%	2.6%-12.0%
Slaughterhouse C	Day 1	8/30	0/30	1/30	1/30
	Day 2	4/30	1/30	7/30	3/30
	Day 3	6/30	0/30	2/30	5/30
	Day 4	8/30	0/30	15/30	6/30
	Total (%)	26/120 (21.6)	1/120 (0.8)	25/120 (20.8)	15/120 (12.5)
	CI _{95%}	14.8%-30.2%	0.04%-5.2%	14.1%-29.4%	7.4%-20.1%
Total (%)		56/360 (15.5)	1/360 (0.3)	40/360 (11.1)	24/360 (6.6)
CI _{95%}		12.0%-19.7%	0.02%-1.8%	8.1%-14.9%	4.3%-9.8%

CI_{95%} = Confidence Interval 95%

In Table 6.3 are presented the distribution of *Salmonella* serotypes isolated from animals, environment and carcasses. Typhimurium, Derby and Rissen were the most prevalent serotypes in all samples in all slaughterhouses except for slaughterhouse A, where *Salmonella* Derby was not isolated. From carcasses only a few different serotypes were isolated, whereas many different serotypes were found in animals and in lairage pens.

Analysis of the animals from F1 and F2 used to simulate the lack of a logistic slaughter showed that for F1 80% of the examined pigs were seropositive while for F2 none of the animals had *Salmonella* antibodies. Regarding faecal carriage, *Salmonella* was found in the rectal contents of 18.4% (7/38) of F1 animals while only one out of 36 F2 pigs was positive ($p < 0.05$). Microbiological examination of carcasses resulted in two positive samples for F1 pigs and none for F2 pigs. None of the environmental samples was positive.

Table 6.3. Serotype distribution and number (between brackets) of *Salmonella* isolates from environment and in animals and carcasses samples. In bold, serotypes isolated from carcasses also being recovered from carrier pigs and the environment (lairage areas excluded)

Pigs	Slaughterhouse A				Slaughterhouse B				Slaughterhouse C				
	Sampling day				Sampling day				Sampling day				
	Day 1	Day 2	Day 3	Day 4	Day 1	Day 2	Day 3	Day 4	Day 1	Day 2	Day 3	Day 4	
Faecal contents	Typ (1)		1,4 (1)		Typ (2)	Ago (3) Typ (1) Rid (1)	Typ (4) Der (12) 4,12 (1)	Typ (1) Bre (2) 4,12 (1)		Ris (7) Der (1)	Typ (3) Ris (1)	Der (4) Ris (1) 4,12 (1)	Typ (5) Ris (2) Liv (1)
Environment													
Lairage pens	Ris (2) Typ (3) Ana (1)	Typ (4)	Typ (1) 1,4 (1)	Wien (3) Ris (1) Typ (2)	Typ (4) Ris (2)	Typ (2) Der (3)	Kap (4) Typ (1)	Man (1)	Ris (1) Der (2)	Typ (5)	Der (4) Typ (1)	Ris (2) Der (1) Typ (1) Bran (1)	
Polishing brushes						Typ (1)							
Rectal pistol				Ris (1)								Der (1)	
Evisceration knives					4,5 (1) Ris (1)	Typ (1)						Der (1)	
Evisceration knife-grinder						Typ (1) Bran (1)					Der (1)	Der (1)	
Evisceration gloves	Ana (1)				1,4,5 (1) Typ (1)	Typ (1)			Ris (1)			Ris (1) Typ (1)	
Evisceration drain water					Typ (1)					Typ (1)	Bran (2) Ris (1)		
Carcasses													
After polishing										Typ (1)			
After evisceration	Ris (1)		Ris (1)	Typ (1)	Ris (8)	Typ (1)	Typ (1) Der (1)	Bre (1)	Ris (1)	Typ (5) Ris (2)	Ris (2)	Ris (10) Typ (5)	
Before chilling	Ris (1)		Ris (1)		Ris (1)		Der (6)		Ris (1)	Typ (2) Sch (1)	1,4 (2) 1,4,5 (2) 4,5 (1)	Ris (4) Typ (2)	

Serotypes of *Salmonella*: Ago (Agona); Ana (Anatum); Bran (Brandenburg); Bre (Bredeney); Der (Derby); Kap (Kapemba); Liv (Livingstone); Man (Manchester); Rid (Rideau); Ris (Rissen); Typ (Typhimurium); Sch (Schwarzengrund); 1,4 (1,4,12:i:-); 4,5 (4,5,12:i:1,2); 1,4,5 (1,4,5,12:i:-); 4,12 (4,12:i:1,2)

6.4. Discussion

The results of this study show that *Salmonella* contamination is common at several points of the slaughterline but may differ among abattoirs and also between days of sampling. Differences in the slaughter capacity and hygiene procedures, and the different origin of incoming animals, may explain variations among different studies (Käsbohrer et al., 2000; Giovannacci et al., 2001; Swanenburg et al., 2001a; Bouvet et al., 2003).

Lairage pens are the point by which pigs enter the slaughterhouse. In our case, we sampled those pens just after the cleaning of these facilities. The high proportion of positive samples in lairage pens (about 70%-75%) indicates that hygienic practices in this area need to be clearly improved. Interestingly, no differences were seen between slaughterhouses although one received a low proportion of infected pigs while the others received a significantly higher proportion of *Salmonella* positive animals. In our opinion, results obtained in lairage pens also suggest a cumulative effect of an insufficient cleaning and disinfection. Since pigs can be infected from the environment and excretion can start as early as two or three hours after the first contact with the bacteria (Hurd et al., 2001; Loynachan et al., 2004; Boughton et al., 2005b), lairage areas may be an important source of contamination for the slaughterline (Swanenburg et al., 2001b; Rostagno et al., 2003; Boughton et al., 2005a; Vieira-Pinto et al., 2006).

Regarding the environmental contamination of the slaughterhouse (other than lairage areas), our results showed that salmonella isolations are fairly common but can be highly variable between slaughterhouses and sampling days. Interestingly, slaughterhouses B and C, that received the highest proportion of infected animals, also had the highest proportion of positive environmental samples. Moreover, the fact that some environmental samples were already positive even before starting the slaughtering process points out to the need for the implementation of more efficient disinfection procedures as well as for the application of monitoring systems to verify the performance of the disinfection. Our results do not enlighten the matter of

whether or not environmental contamination increases with the operation time since no significant trend was observed in slaughterhouses A and B. In all the examined slaughterhouses, the slaughterline stopped briefly every two hours for changing knives and a rapid maintenance of the line. Taking into account this, it is logical to think that those brief stops also help to somewhat contain the spread of contamination in the environment.

The low number of contaminated carcasses found after the polishing shows that scalding, singeing and polishing processes were either effective to reduce the level of surface *Salmonella* contamination or, at least, do not substantially contribute to contaminate the carcasses although in one occasion we found one carcass and one sample from the polisher brushes to be salmonella-positive at this stage. As reported by others (Davies et al., 1999; Bolton et al., 2003; Pearce et al., 2004), *Salmonella* survival in the scalding tank may be reduced using scalding temperatures of $\geq 61^{\circ}\text{C}$ but carcasses can be recontaminated also during the polishing operations (Davies et al., 1999; Swanenburg et al., 2001a; Hald et al., 2003).

In our study, carcass contamination increased significantly after evisceration in all slaughterhouses. This finding has been reported before (Saide-Albornoz et al., 1995; Davies et al., 1999; Pearce et al., 2004; Vieira-Pinto et al., 2006). When the belly is opened and intestines are removed there is a risk of accidental ruptures of the intestine wall and of intestine contents spreading over the carcass and equipment. If contamination is not removed from hands, knives and other equipment used, *Salmonella* will be transferred to other carcasses at the evisceration stage. We did not systematically record the percentage of intestine ruptures, but when recorded it ranged from 2% to 8%. Thus, the evisceration stage can be considered a critical control point for the slaughter process.

After the evisceration area, a slight decrease in the frequency of positive carcasses was observed in carcasses sampled before chilling. This reduction may be related to the removal of residual contamination during the spraying of the carcasses at the end of the processing line in order to remove bone dust and blood clots (Saide-Albornoz

et al., 1995). Nevertheless, the effectiveness of this practice is under discussion (Rivas et al., 2000). Interestingly, the coincidence between results of carcass contamination at the post-evisceration stage and the pre-chilling stage was low (21%), indicating that, possibly, at least two cycles of contamination exist, one originating in the evisceration area and a second environmental one in the pre-chilling stage.

Interestingly, only in about 15%-16% of the cases, a contaminated carcass corresponded to a faecal carrier pig. It has been a common thought to consider that carrier pigs are the main source of carcass contamination (Fedorka-Cray et al., 1994; Borch et al., 1996; Berends et al., 1997). However, in our case, and in agreement with the results of other researchers (Wonderling et al., 2003; Botteldoorn et al., 2004) it seems that the environment was the main source of carcass contamination. As a matter of fact, 70% of the positive carcasses at the evisceration point were contaminated by the same serotypes isolated from the evisceration tools. Also, the fact that contamination rates of the carcasses at the end of the slaughterline were equal or lower than the prevalence of carrier pigs entering the slaughterline, suggest that accurate hygienic procedures can be effective to minimize the contamination directly originated from incoming pigs (Davies et al., 1999; Swanenburg et al., 2001a; Korsak et al., 2003; Keenlside et al., 2005).

In our simulation of a lack of a logistic slaughter we did not find any negative effect of the sequential slaughter of a highly infected batch of animals before the killing of a negative one upon the carcass contamination of the latter. In our opinion, this lack of cross-contamination can be explained by the fact that no environmental samples were found to be contaminated that day. In other words, our results suggest that the transfer of the contamination pig-to-pig is probably scarce while the transfer of contamination from pig-to environment-to pig is probably more important, at least under the conditions of our study.

6.5. Conclusions

Taking together, our results indicate that in the frame of our study, the most part of the carcass contamination is likely to be originated from environmental contamination. However, environmental contamination seems to depend on the input of infected pigs entering the slaughterline. In consequence, to reduce the rates of carcass contamination it would be needed to implement more strict and careful cleaning and disinfection procedures at the slaughterhouse. Nevertheless, the efficiency of these procedures may be hampered if a reduction in the prevalence of infected pigs is not achieved. According to our results, particular attention should be paid to the evisceration stage.

6.6. References

- Berends, B. R., F. van Knapen, J. M. Snijders, and D. A. Mossel. 1997. Identification and quantification of risk factors regarding *Salmonella* spp. on pork carcasses. *Int. J. Food Microbiol.* 36:199-206.
- Berends, B. R., F. van Knapen, D. A. Mossel, S. A. Burt, and J. M. Snijders. 1998a. Impact on human health of *Salmonella* spp. on pork in The Netherlands and the anticipated effects of some currently proposed control strategies. *Int. J. Food Microbiol.* 44:219-229.
- Berends, B. R., F. van Knapen, D. A. Mossel, S. A. Burt, and J. M. Snijders. 1998b. *Salmonella* spp. on pork at cutting plants and at the retail level and the influence of particular risk factors. *Int. J. Food Microbiol.* 44:207-217.
- Bolton, D. J., R. Pearce, J. J. Sheridan, D. A. McDowell, and I. S. Blair. 2003. Decontamination of pork carcasses during scalding and the prevention of *Salmonella* cross-contamination. *J. Appl. Microbiol.* 94:1036-1042.
- Borch, E., T. Nesbakken, and H. Christensen. 1996. Hazard identification in swine slaughter with respect to foodborne bacteria. *Int. J. Food Microbiol.* 30:9-25.
- Botteldoorn, N., L. Herman, N. Rijpens, and M. Heyndrickx. 2004. Phenotypic and molecular typing of *Salmonella* strains reveals different contamination sources in two commercial pig slaughterhouses. *Appl. Environ. Microbiol.* 70:5305-5314.

- Boughton, C., N. Leonard, J. Egan, B. K. Markey, and G. Kelly. 2005a. Contamination of the lairage of a pork abattoir with *Salmonella* species. Proceedings of the 6th International Symposium on the Epidemiology and Control of Foodborne Pathogens in Pork, California, USA, 42-45.
- Boughton, C., N. Leonard, J. Egan, B. K. Markey, and G. Kelly. 2005b. Infection of pigs following exposure to contaminated pen floors. Proceedings of the 6th International Symposium on the Epidemiology and Control of Foodborne Pathogens in Pork, California, USA, 61-64.
- Bouvet, J., C. Bavai, R. Rossel, A. Le Roux, M. P. Montet, and C. Mazuy. 2003. Evolution of pig carcass and slaughterhouse environment contamination by *Salmonella*. *Revue Méd. Vét.* 154:775-779.
- Buchholz, U., B. Brodhun, S. O. Brockmann, C. M. Dreweck, R. Prager, H. Tschape, and A. Ammon. 2005. An outbreak of *Salmonella* Munchen in Germany associated with raw pork meat. *J. Food Prot.* 68:273-276.
- Davies, R. H., I. M. McLaren, and S. Bedford. 1999. Observations on the distribution of salmonella in a pig abattoir. *Vet. Rec.* 145:655-661.
- Dean, A. D., J. A. Dean, A. H. Burton and, R. C. Dicker. 2002. Epi-info version 2002: a word-processing, database, and statistics program for epidemiology on microcomputers. USD Incorporated, Stone Mountain, Georgia.
- Duffy, E. A., K. E. Belk, J. N. Sofos, G. R. Bellinger, A. Pape, and G. C. Smith. 2001. Extent of microbial contamination in United States pork retail products. *J. Food Prot.* 64:172-178.
- Fedorka-Cray, P. J., S. C. Whipp, R. E. Isaacson, N. Nord, and K. Lager. 1994. Transmission of *Salmonella typhimurium* to swine. *Vet. Microbiol.* 41:333-344.
- Giovannacci, I., S. Queguiner, C. Ragimbeau, G. Salvat, J. L. Vendevre, V. Carlier, and G. Ermel. 2001. Tracing of *Salmonella* spp. in two pork slaughter and cutting plants using serotyping and macrorestriction genotyping. *J. Appl. Microbiol.* 90:131-147.
- Hald, T., A. Wingstrand, M. Swanenburg, A. Von Altrock, and B. M. Thorberg. 2003. The occurrence and epidemiology of *Salmonella* in European pig slaughterhouses. *Epidemiol. Infect.* 131:1187-1203.

- Hald, T., D. Vose, H. C. Wegener, and T. Koupeev. 2004. A Bayesian approach to quantify the contribution of animal-food sources to human salmonellosis. *Risk Anal.* 24:255-269.
- Hurd, H. S., J. K. Gailey, J. D. McKean, and M. H. Rostagno. 2001. Rapid infection in market-weight swine following exposure to a *Salmonella* Typhimurium-contaminated environment. *Am. J. Vet. Res.* 62:1194-1197.
- Käsbohrer, A., D. Protz, R. Helmuth, K. Nockler, T. Blaha, F. J. Conraths, and L. Geue. 2000. *Salmonella* in slaughter pigs of German origin: an epidemiological study. *Eur. J. Epidemiol.* 16:141-146.
- Keenlside, J., G. Gensler, R. King, M. E. McFall, and L. Goonewardene. 2005. Prevalence and relatedness of *Salmonella* spp. in a Canadian abattoir. Proceedings of the 6th International Symposium on the Epidemiology and Control of Foodborne Pathogens in Pork, California, USA, 38-41.
- Korsak, N., B. Jacob, B. Groven, G. Etienne, B. China, Y. Ghafir, and G. Daube. 2003. *Salmonella* contamination of pigs and pork in an integrated pig production system. *J. Food Prot.* 66:1126-1133.
- Loynachan, A. T., J. M. Nugent, M. M. Erdman, and D. L. Harris. 2004. Acute infection of swine by various *Salmonella* serovars. *J. Food Prot.* 67:1484-1488.
- Maguire, H. C., A. A. Codd, V. E. Mackay, B. Rowe, and E. Mitchell. 1993. A large outbreak of human salmonellosis traced to a local pig farm. *Epidemiol. Infect.* 110:239-246.
- Mølbak, K., D. L. Baggesen, F. M. Aarestrup, J. M. Ebbesen, J. Engberg, K. Frydendahl, P. Gerner-Smidt, A. M. Petersen, and H. C. Wegener. 1999. An outbreak of multidrug-resistant, quinolone-resistant *Salmonella enterica* serotype typhimurium DT104. *N. Engl. J. Med.* 341:1420-1425.
- Narain, J. P., and J. P. Lofgren. 1989. Epidemic of restaurant-associated illness due to *Salmonella newport*. *South. Med. J.* 82:837-840.
- Noel, H., M. Dominguez, F. X. Weill, A. Brisabois, C. Duchazeaubeneix, A. Kerouanton, G. Delmas, N. Pihier, and E. Couturier. 2006. Outbreak of *Salmonella enterica* serotype Manhattan infection associated with meat products, France, 2005. *Eurosurveill* 11, 270-273.

- Pearce, R. A., D. J. Bolton, J. J. Sheridan, D. A. McDowell, I. S. Blair, and D. Harrington. 2004. Studies to determine the critical control points in pork slaughter hazard analysis and critical control point systems. *Int. J. Food Microbiol.* 90:331-339.
- Rivas, T., J. A. Vizcaino, and F. J. Herrera. 2000. Microbial contamination of carcasses and equipment from an Iberian pig slaughterhouse. *J. Food Prot.* 63:1670-1675.
- Rostagno, M. H., H. S. Hurd, J. D. McKean, C. J. Ziemer, J. K. Gailey, and R. C. Leite. 2003. Preslaughter holding environment in pork plants is highly contaminated with *Salmonella enterica*. *Appl. Environ. Microbiol.* 69:4489-4494.
- Saide-Albornoz J. J., C. L. Knipe, E. A. Murano, and G. W. Beran. 1995. Contamination of Pork Carcasses during Slaughter, Fabrication, and Chilled Storage. *J. Food Prot.* 58:993-997.
- Swanenburg, M., H. A. Urlings, J. M. Snijders, D. A. Keuzenkamp, and F. van Knapen. 2001a. *Salmonella* in slaughter pigs: prevalence, serotypes and critical control points during slaughter in two slaughterhouses. *Int. J. Food Microbiol.* 70:243-254.
- Swanenburg, M., H. A. Urlings, D. A. Keuzenkamp, and J. M. Snijders. 2001b. *Salmonella* in the lairage of pig slaughterhouses. *J. Food Prot.* 64:12-16.
- Vieira-Pinto, M., R. Tenreiro, and C. Martins. 2006. Unveiling contamination sources and dissemination routes of *Salmonella* sp. in pigs at a Portuguese slaughterhouse through macrorestriction profiling by pulsed-field gel electrophoresis. *International Journal of Food Microbiology* 110, 77-84.
- Wegener, H. C., and D. L. Baggesen. 1996. Investigation of an outbreak of human salmonellosis caused by *Salmonella enterica* ssp. *enterica* serovar Infantis by use of pulsed field gel electrophoresis. *Int. J. Food Microbiol.* 32:125-131.
- Wonderling, L., R. Pearce, F. M. Wallace, J. E. Call, I. Feder, M. Tamplin, and J. B. Luchansky. 2003. Use of pulsed-field gel electrophoresis to characterize the heterogeneity and clonality of *Salmonella* isolates obtained from the carcasses and feces of swine at slaughter. *Appl. Environ. Microbiol.* 69:4177-4182.

Capítol 7

DISCUSSIÓ GENERAL

Els diferents estudis que conformen aquesta tesi doctoral han estat realitzats en una empresa del sector porcí de Catalunya. A partir del seu interès en conèixer la situació de la infecció per *Salmonella* en el conjunt de les seves granges i escorxadors associats i, alhora, poder disposar d'una sèrie d'eines per al seu control, es va plantejar la realització d'un seguit d'estudis, dels quals, el primer va ser la determinació de la prevalença de *Salmonella* i dels principals factors de risc associats a aquesta infecció en les seves granges. Posteriorment es varen valorar mesures per a reduir-ne la prevalença i, per últim, es va determinar la importància i els circuits de la contaminació per *Salmonella* en els escorxadors.

Prevalença, factors de risc i distribució de la infecció per Salmonella en un sistema de producció porcina de Catalunya

Del nostre estudi es desprèn que existia una elevada presència de *Salmonella* (97,7%) en les explotacions d'engreix estudiades i que a més, en les granges positives, la disseminació de la infecció també era elevada. Tot i que cal ser prudent a l'hora de fer comparacions, es pot suposar que la situació observada en aquesta empresa no difereix gaire de la d'altres empreses del sector. A tall d'exemple, en un altre estudi realitzat recentment a Catalunya i a més gran escala, el 77% dels engreixos estudiats resultaren positius serològicament (Mejía *et al.*, 2006). Així doncs, es pot pensar que les circumstàncies que afecten aquesta elevada prevalença en el nostre sistema de producció estudiat tampoc han de variar gaire de les d'altres estructures de producció de Catalunya.

Cal remarcar però, que si prenem com a referència altres països europeus, la nostra situació estaria força allunyada de la dels països nòrdics en els quals varen iniciar-se programes de control fa bastants anys. Per exemple, quan l'any 1995 Dinamarca va implementar el seu programa en el porcí, la classificació de les explotacions daneses era la següent: 93,7% en el nivell 1 (<10% de seroprevalença); 3,9% en el nivell 2 (11%-50%) i 2,3% en el nivell 3 (>50%). Aquesta comparació de dades fa pensar que, en el cas del sistema de producció estudiat, i molt probablement també en el de Catalunya, les primeres mesures haurien d'anar dirigides a una reducció de la

prevalença dins les granges orientada amb objectius a mig-llarg termini. Amb aquesta finalitat, l'examen dels factors de risc per a la disseminació del patogen dins les explotacions pot ser una determinació útil.

En base als resultats obtinguts de l'anàlisi de les enquestes realitzat, els sistemes de maneig tot dins/tot fora sembla que podrien ser elements de contenció de la infecció dins les granges. Aquests sistemes, basats en un maneig dels animals per lots entre els quals s'apliquen procediments de neteja i desinfecció dels corrals, no permeten el contacte entre animals de diferents edats i redueixen de forma genèrica la transmissió de patògens en les explotacions. Tot i que aquest resultat és força lògic, serveix com a indicació d'una possible forma d'afrontar el control de *Salmonella* i que al mateix temps, podria ser eficient per al control d'altres patògens. Per tant, el seguiment d'un maneig tot dins/tot fora podria ser una pràctica relativament fàcil d'aplicar en un marc general de millora de la bioseguretat de les granges estudiades. Així mateix, els dos altres factors que en el nostre estudi han estat relacionats amb seroprevalences elevades, la mortalitat i l'existència de roba de recanvi neta en la granja, també semblen indicar aspectes de bioseguretat.

En general, el gran nombre d'estudis realitzats al voltant de l'epidemiologia de *Salmonella* han permès identificar molts altres factors de risc associats amb una major presència del patogen en les explotacions. El fet que en el nostre estudi només dos factors van resultar significatius tindria relació probablement, amb el propi disseny de l'estudi. De fet, el número total de granges seleccionat només permetia detectar aquells factors de risc que tinguessin una associació considerable en termes de risc relatiu i per tant, d'altres paràmetres que podrien ser rellevants, però de menor magnitud, no s'haurien pogut detectar.

En una segona part d'aquest primer estudi, vàrem determinar l'evolució de la infecció per *Salmonella* en un sistema de múltiples fases, que constituïa la segona tipologia de granges de les que disposava l'empresa. Aquest seguiment va permetre observar que, si bé les reproductores presenten un elevat nivell de seroprevalença, la infecció dels animals té lloc principalment durant la fase d'engreix una vegada ja desapareguts els

anticossos calostrals. A més, el percentatge d'animals excretors en les estimacions bacteriològiques puntuals realitzades va ser escàs. Aquests resultats indicarien d'una banda, que els anticossos materns juguen un cert paper de protecció i, en segon lloc, que existeixen molt possiblement altres cicles d'infecció independents de les mares. En estudis anteriors, Mejía *et al.* (2006) ja van observar que els serotips més freqüents aïllats en reproductores no necessàriament coincidien amb els dels engreixos.

En vistes dels resultats i a mode de recomanació, el següent pas a seguir en aquest sistema de producció hauria de ser el d'aplicar una sèrie de mesures de control en el conjunt de les explotacions d'engreix basades en els factors de risc prèviament identificats i amb l'objectiu a mig termini de reduir els nivells de prevalença. En la nostra opinió, aquesta seria l'aproximació de control de *Salmonella* més realista, ja que un objectiu de control basat en l'erradicació de la infecció resultaria en aquests moments inviable.

Efecte de l'administració d'una dieta acidificada sobre la prevalença per Salmonella en porcs d'engreix

A més a més de l'aplicació de mesures relacionades amb aspectes d'higiene, bioseguretat i maneig a les explotacions, determinades estratègies d'alimentació, com per exemple l'administració de productes que augmentin la concentració d'àcids orgànics en el budell (Jorgensen *et al.*, 1999; Jensen *et al.*, 2003; Hansen, 2004; Canibe *et al.*, 2005), poden resultar efectives per al control de la infecció en els animals. En el nostre cas, vam avaluar l'efectivitat de l'addició directa d'àcids orgànics en l'aliment. Segons els nostres resultats, l'administració durant tot el període d'engreix d'un pinso amb un nivell d'inclusió d'àcids orgànics de l'1,2% (0,6% d'àcid fòrmic i 0,6% àcid làctic), va reduir considerablement la proporció d'animals portadors de *Salmonella* en ganglis limfàtics que van arribar a l'escorxadador. Quedava evident doncs, l'eficàcia d'aquesta aproximació al control. Malgrat tot, l'elevat cost econòmic que pot suposar aquesta estratègia d'alimentació (entre 1 i 2 € per animal) podria limitar-ne la seva aplicació pràctica i per tant, feia necessari que es plantegessin altres opcions que, tenint una eficàcia acceptable, fossin econòmicament

més rendibles. L'opció més lògica i simple era valorar l'efecte de reduir la dosi i la durada del tractament.

En el segon experiment realitzat, l'ajustament tant de la dosi d'àcids afegits al pinso (0,8%) com de les setmanes d'administració (últimes 7-8 setmanes) va resultar en una disminució dels nivells de seroprevalença per *Salmonella* dels animals. Per contra, només en una granja va observar-se una disminució de la proporció d'animals portadors en femtes o en ganglis. D'aquests resultats se'n poden extreure diverses conclusions o hipòtesis. La primera és que aquestes dosis reduïdes bloquejarien la disseminació de la infecció. S'hauria de determinar, però, i això quedaria per a estudis posteriors, si aquest efecte s'aconsegueix perquè s'evita que els animals que entren en contacte amb la salmonel·la s'infectin o és degut a la disminució de la càrrega microbiana eliminada pels porcs ja infectats, o bé si es produeixen ambdues circumstàncies simultàniament. La segona hipòtesi i que fa referència a l'efecte parcial que es va observar sobre el percentatge de portadors a l'escorxador; en altres paraules, el per què en una de les granges s'observà un efecte positiu i en l'altre no, podria ser degut a que una part dels animals de la primera granja s'hagueren infectat prèviament a l'administració del pinso acidificat, desenvolupant per tant, un estat de portador que no es veuria afectat pel tractament. De fet, el nivell de seroprevalença d'aquesta explotació a l'inici de l'administració de les dietes era superior que en l'altra granja.

Amb tot, els nostres estudis indiquen que l'administració d'una dieta acidificada durant tot l'engreix resulta efectiva per a reduir la transmissió de *Salmonella* entre els animals. La limitació tant de la dosi com del període d'administració es contempla com una opció alternativa per a minimitzar l'impacte econòmic d'aquesta pràctica. No obstant, l'inconvenient principal de reduir les setmanes d'administració es troba en que al no cobrir tota la fase d'engreix, el nivell d'infecció dels animals en el moment de la seva aplicació podria condicionar la seva eficàcia. En el cas de granges de cicle tancat, la realització de seroperfils podria ajudar a determinar el moment en el què s'inicia la circulació de *Salmonella* en els engreixos i permetria aproximar el

moment de l'administració d'aquestes dietes, ajustant per tant, els costos associats a aquesta estratègia.

Avaluació dels punts crítics per a la contaminació de Salmonella en escorxadors de porcí

En tota la cadena de producció de la carn, l'escorxador és el nexe d'unió entre la granja i el consumidor. Segons les dades bibliogràfiques disponibles, els cicles de contaminació a l'escorxador es descriuen com a complexos i es veuen influenciats tant per la proporció d'animals portadors que hi arriben com per les característiques de processament de les canals i en general, per la higiene de tot el procés. Per aquest motiu, resulta difícil en moltes ocasions establir el nivell de participació de cadascun d'aquests elements en la proporció final de canals contaminades (Botteldoorn *et al.*, 2004). Segons els nostres resultats, en els escorxadors que hem estudiat, l'impacte de l'ambient de l'escorxador en la contaminació final de les canals és superior al que prèviament havien considerat alguns autors (Borch *et al.*, 1996; Berends *et al.*, 1997). De fet, la major part de la contaminació de les canals va originar-se a partir de l'ambient que envolta el processat a l'escorxador, donat que només un 15% de les canals positives resultaren contaminades pel mateix serotip del qual n'era portador l'animal sacrificat. Aquest fet és indicatiu de la presència de cicles de contaminació purament ambientals. Emperò, aquesta contaminació ambiental guardava relació amb la proporció de portadors que rebia l'escorxador.

Dels nostres resultats semblaria que, en realitat, el cicle de contaminacions és doble i es troba interconnectat. D'una banda, l'ambient és la principal font de contaminació, però alhora, la càrrega microbiana ambiental depèn de l'entrada d'animals portadors. D'aquesta forma, la contínua arribada de porcs positius contribuiria a la formació de cicles de contaminació procedents de l'ambient de l'escorxador i que tindrien més importància en la contaminació de les canals que la via originada pels mateixos animals. En conseqüència, un control efectiu de la contaminació de les canals implicaria tant una millora considerable de les pràctiques higièniques realitzades a l'escorxador, com una reducció de l'arribada d'animals portadors que podria

aconseguir-se aplicant mesures de control en les granges. A més, l'ordenació dels sacrificis segons l'estatus de positivitat de la granja d'origen, pràctica que es porta a terme a Dinamarca i Irlanda (Annex I), també podria ser una mesura útil; sempre i quan els nivells de prevalença a les explotacions ho permetessin. A més, el fet que s'aïllés *Salmonella* abans de l'inici de la jornada de treball, i que la gran majoria de corrals d'espera estiguessin contaminats, remarca la necessitat que s'apliquin eficients procediments de monitorització i de control de la higiene per tal de poder reduir el grau de contaminació a l'escorxador i d'aquesta manera, limitar les contaminacions de les canals.

En conjunt, va aïllar-se *Salmonella* en diferents mostres de l'ambient de tots tres escorxadors, tot i que la proporció de mostres positives va resultar considerable en punts com els corrals d'espera i l'àrea d'evisceració. En concret, i atenent a la dinàmica de la contaminació de les canals, caldria considerar l'evisceració de les canals com el punt de control crític més important. Per una banda, va ser l'etapa a partir de la qual s'observà un major increment en el nombre de canals contaminades i per l'altra, va trobar-se una elevada coincidència entre els serotips identificats a les canals i els que s'havien aïllat posteriorment als estris d'evisceració utilitzats. Tanmateix, si bé un dels principals focus de *Salmonella* es troba a l'àrea d'evisceració, la poca coincidència entre els serotips aïllats en les canals post-evisceració i els que es van trobar en les canals al final de la línia de processat suggereix l'existència d'una segona via de contaminació originada al llarg de les etapes prèvies a l'oreig. La prevenció d'ambdós cicles de contaminació ambiental resulta bàsic per a la reducció de *Salmonella* a l'escorxador.

Com a punt final i en quan a les implicacions que se'n deriven de la present tesi, caldria afegir que el control de la salmonel·losi porcina possiblement requereix la implicació de tots els participants de la cadena de producció. Com s'ha comentat anteriorment, la interconnexió existent entre l'entrada d'animals portadors de *Salmonella* a la cadena de sacrifici i la formació de cicles de contaminació ambientals a l'escorxador fa necessària l'aplicació de mesures d'intervenció en ambdues etapes. És molt probable que si es reduís el nivell d'infecció dels animals a les explotacions i,

ahora, es milloressin les pràctiques d'higiene realitzades durant el sacrifici i el processat de les canals, els escorxadors podrien actuar com a un efectiu tallafocs i limitar d'aquesta manera, el percentatge de canals contaminades que arriben a les sales de desfer.

Capítol 8

CONCLUSIONS

Els resultats obtinguts en aquesta tesi permeten concloure que en el sistema de producció estudiat:

1. L'estudi serològic realitzat mostra una prevalença per *Salmonella* molt elevada, tant pel que respecta a la proporció de granges com a la proporció d'animals positius. Aquest resultat indica que, en l'estructura de producció estudiada, l'objectiu de control més realista és l'aplicació de mesures destinades a reduir la prevalença fins a nivells que puguin ser considerats acceptables.
2. De l'anàlisi de les enquestes epidemiològiques se'n desprèn que els sistemes de producció de flux continu podrien anar lligats a la difusió de *Salmonella* en les explotacions estudiades. La correcció d'aquest factor, juntament amb l'aplicació d'altres pautes de control podria tenir un impacte favorable en la reducció de la prevalença.
3. L'administració d'un pinso acidificat (1,2% d'àcid fòrmic i àcid làctic) durant tot el període d'engreix es mostra efectiva per a reduir la proporció d'animals portadors de *Salmonella* en ganglis limfàtics. Tot i la seva eficàcia, l'elevat cost que suposa podria limitar-ne la seva aplicació pràctica, essent necessari un ajust en quan a la dosi i al període d'administració.
4. La incorporació al pinso d'una barreja d'àcids fòrmic i làctic al 0,8% durant les darreres setmanes de l'engreix contribueix a la reducció de la seroprevalença per *Salmonella* en les explotacions, però només té un efecte parcial en la reducció del nombre d'animals portadors en ganglis. El nivell d'infecció dels animals en el moment de l'aplicació del tractament podria condicionar l'eficàcia d'aquesta pràctica d'alimentació. Tot i això, aquesta mesura de control podria resultar efectiva per a reduir inicialment els nivells de prevalença en aquelles granges amb una elevada proporció d'animals positius.

5. Els resultats obtinguts en l'estudi dels diferents escorxadors indiquen que la majoria de les contaminacions per *Salmonella* de les canals tenen un origen ambiental. A més, la freqüència d'aïllaments procedents de l'ambient sembla estar relacionada amb la proporció d'animals portadors que entra en la cadena de sacrifici. En conseqüència, el control de les contaminacions de les canals ha de basar-se tant en la millora de la higiene del procés de sacrifici, com en la reducció de la prevalença de portadors en granja.

6. La dinàmica observada de la contaminació de les canals suggereix que un dels principals focus de *Salmonella* es troba a l'àrea d'evisceració i, probablement, existeix una segona via de contaminació que té lloc al llarg de les etapes prèvies a l'oreig. La prevenció d'ambdós cicles de contaminació resultarà bàsic per al control de *Salmonella* a l'escorxador.

BIBLIOGRAFIA

(referències citades a la introducció, la revisió bibliogràfica
i la discussió general)

- Aho, M. 1992. Problems of *Salmonella* sampling. Int. J. Food Microbiol. 15:225-235.
- Akkina, J. E., A. T. Hogue, F. J. Angulo, R. Johnson, K. E. Petersen, P. K. Saini, P. J. Fedorka-Cray, and W. D. Schlosser. 1999. Epidemiologic aspects, control, and importance of multiple-drug resistant *Salmonella* Typhimurium DT104 in the United States. J. Am. Vet. Med. Assoc. 214:790-798.
- Alban, L. and L. L. Sørensen. 2005. *Salmonella* in caecal-content and on carcass: individual correlations. Proceedings of the 6th International Symposium on the Epidemiology and Control of Foodborne Pathogens in Pork, California, USA, 27-30.
- Andersen, J. K., R. Sorensen, and M. Glensbjerg. 1991. Aspects of the epidemiology of *Yersinia enterocolitica*: a review. Int. J. Food Microbiol. 13:231-237.
- Anderson, E. S., L. R. Ward, M. J. De Saxe, and J. D. H. De Sa. 1977. Bacteriophage-typing designations *Salmonella typhimurium*. J. Hyg. 78:297-300.
- Anderson, M. E., H. E. Huff, H. D. Naumann, R. T. Marshall, J. Damare, R. Jonhston, and M. Pratt. 1987. Evaluation of swab and tissue excision methods for recovering microorganisms from washed and sanitized beef carcasses. J. Food Prot. 50:741-743.
- Anderson, R. C., S. A. Buckley, T. R. Callaway, K. J. Genovese, L. F. Kubena, R. B. Harvey, and D. J. Nisbet. 2001. Effect of sodium chlorate on *Salmonella typhimurium* concentrations in the weaned pig gut. J. Food Prot. 64:255-258.
- Anderson, R. C., M. E. Hume, K. J. Genovese, T. R. Callaway, Y. S. Jung, T. S. Edrington, T. L. Poole, R. B. Harvey, K. M. Bischoff, and D. J. Nisbet. 2004. Effect of drinking-water administration of experimental chlorate ion preparations on *Salmonella enterica* serovar Typhimurium colonization in weaned and finished pigs. Vet. Res. Commun. 28:179-189.
- Asai, T., S. Fujii, T. Osumi, Y. Otagiri, T. Namimatsu, and S. Sato. 2002. Isolation and serological survey of *Salmonella* in pigs in Japan. J. Vet. Med. Sci. 64:1011-1015.
- Bager, F., and J. Petersen. 1991. Sensitivity and specificity of different methods for the isolation of *Salmonella* from pigs. Acta Vet. Scand. 32:473-481.
- Baggesen, D. L., H. C. Wegener, F. Bager, H. Stege, and J. Christensen. 1996. Herd prevalence of *Salmonella enterica* infections in Danish slaughter pigs determined by microbiological testing. Prev. Vet. Med. 26:201-213.

- Baggesen, D. L., and F. M. Aarestrup. 1998. Characterisation of recently emerged multiple antibiotic-resistant *Salmonella enterica* serovar typhimurium DT104 and other multiresistant phage types from Danish pig herds. *Vet. Rec.* 143:95-97.
- Bahnson, P. B., P. J. Fedorka-Cray, N. Mateus-Pinella, F. M. Franssen, J. Grass, and J. T. Gray. 2001. Herd level risk for *Salmonella* culture positive status in slaughtered pigs. Proceedings of the 4th International Symposium on the Epidemiology and Control of *Salmonella* in Pork, Leipzig, Germany, 244-249.
- Bahnson, P. B., J. Y. Kim, R. M. Weigel, G. Y. Miller, and H. F. Troutt. 2005. Associations between on-farm and slaughter plant detection of *Salmonella* in market-weight pigs. *J. Food Prot.* 68:246-250.
- Bahnson, P. B., P. J. Fedorka-Cray, S. R. Ladely, and N. E. Mateus-Pinilla. 2006a. Herd-level risk factors for *Salmonella enterica* subsp. *enterica* in U.S. market pigs. *Prev. Vet. Med.* 76:249-262.
- Bahnson, P. B., C. Snyder, and L. M. Omran. 2006b. *Salmonella enterica* in superficial cervical (prescapular) and ileocecal lymph nodes of slaughtered pigs. *J. Food Prot.* 69:925-927.
- Bansal, N. S., V. Gray, and F. McDonell. 2006. Validated PCR assay for the routine detection of *Salmonella* in food. *J. Food Prot.* 69:282-287.
- Barber, D. A., P. B. Bahnson, R. Isaacson, C. J. Jones, and W. B. Wolbers. 2002. Distribution of *Salmonella* in swine production ecosystems. *J. Food Prot.* 65:1861-1868.
- BEC (Butlletí Epidemiològic de Catalunya), 2005. Resum de les malalties de declaració obligatòria a Catalunya durant l'any 2004. Volum XXVI. Generalitat de Catalunya. Departament de Salut. <http://www.gencat.net/salut/depsan/units/sanitat/html/ca/publicacions/spbec.htm>
- Belœil, P. A., E. Eveno, P. Gerault, P. Fravallo, V. Rose, N. Rose, and F. Madec. 1999. An exploratory study about contamination of pens of finishing pigs by ubiquitous *Salmonella*. Proceedings of the 3rd International Symposium on the Epidemiology and Control of *Salmonella* in Pork. Washington DC, USA, 101-104.
- Belœil, P. A., C. Chauvin, K. Proux, N. Rose, S. Queguiner, E. Eveno, C. Houdayer, V. Rose, P. Fravallo, and F. Madec. 2003. Longitudinal serological responses to *Salmonella*

- enterica* of growing pigs in a subclinically infected herd. *Prev. Vet. Med.* 60:207-226.
- Benito, Y., C. Pin, M. L. Marin, M. L. Garcia, M. D. Selgas, and C. Casas. 1997. Cell surface hydrophobicity and attachment of pathogenic and spoilage bacteria to meat surfaces. *Meat Sci.* 45:419-425.
- Berends, B. R., H. A. Urlings, J. M. Snijders, and F. van Knapen. 1996. Identification and quantification of risk factors in animal management and transport regarding *Salmonella* spp. in pigs. *Int. J. Food Microbiol.* 30:37-53.
- Berends, B. R., F. van Knapen, J. M. Snijders, and D. A. Mossel. 1997. Identification and quantification of risk factors regarding *Salmonella* spp. on pork carcasses. *Int. J. Food Microbiol.* 36:199-206.
- Berends, B. R., F. van Knapen, D. A. Mossel, S. A. Burt, and J. M. Snijders. 1998. *Salmonella* spp. on pork at cutting plants and at the retail level and the influence of particular risk factors. *Int. J. Food Microbiol.* 44:207-217.
- Besser, T. E., C. C. Gay, J. M. Gay, D. D. Hancock, D. Rice, L. C. Pritchett, and E. D. Erickson. 1997. Salmonellosis associated with *S typhimurium* DT104 in the USA. *Vet. Rec.* 140:75.
- Blankenship, L. C., J. S. Bailey, N. A. Cox, N. J. Stern, R. Brewer, and O. Williams. 1993. Two-step mucosal competitive exclusion flora treatment to diminish salmonellae in commercial broiler chickens. *Poult. Sci.* 72:1667-1672.
- Bolton, D. J., R. A. Pearce, J. J. Sheridan, I. S. Blair, D. A. McDowell, and D. Harrington. 2002. Washing and chilling as critical control points in pork slaughter hazard analysis and critical control point (HACCP) systems. *J. Appl. Microbiol.* 92:893-902.
- Bolton, D. J., R. Pearce, J. J. Sheridan, D. A. McDowell, and I. S. Blair. 2003. Decontamination of pork carcasses during scalding and the prevention of *Salmonella* cross-contamination. *J. Appl. Microbiol.* 94:1036-1042.
- Borch, E., T. Nesbakken, and H. Christensen. 1996. Hazard identification in swine slaughter with respect to foodborne bacteria. *Int. J. Food Microbiol.* 30:9-25.

- Botteldoorn, N., M. Heyndrickx, N. Rijpens, K. Grijspeerdt, and L. Herman. 2003. *Salmonella* on pig carcasses: positive pigs and cross contamination in the slaughterhouse. *J. Appl. Microbiol.* 95:891-903.
- Botteldoorn, N., L. Herman, N. Rijpens, and M. Heyndrickx. 2004. Phenotypic and molecular typing of *Salmonella* strains reveals different contamination sources in two commercial pig slaughterhouses. *Appl. Environ. Microbiol.* 70:5305-5314.
- Boughton, C., F. C. Leonard, J. Egan, G. Kelly, P. O'Mahony, B. K. Markey, and M. Griffin. 2004. Prevalence and number of *Salmonella* in irish retail pork sausages. *J. Food Prot.* 67:1834-1839.
- Boughton, C., N. Leonard, J. Egan, B. K. Markey, and G. Kelly. 2005a. Contamination of the lairage of a pork abattoir with *Salmonella* species. *Proceedings of the 6th International Symposium on the Epidemiology and Control of Foodborne Pathogens in Pork, California, USA*, 42-45.
- Boughton, C., N. Leonard, J. Egan, B. K. Markey, and G. Kelly. 2005b. Infection of pigs following exposure to contaminated pen floors. *Proceedings of the 6th International Symposium on the Epidemiology and Control of Foodborne Pathogens in Pork, California, USA*, 61-64.
- Bouvet, J., C. Bavai, R. Rossel, A. Le Roux, M. P. Montet, and C. Mazuy. 2003. Evolution of pig carcass and slaughterhouse environment contamination by *Salmonella*. *Revue Méd. Vét.* 154:775-779.
- Buchholz, U., B. Brodhun, S. O. Brockmann, C. M. Dreweck, R. Prager, H. Tschape, and A. Ammon. 2005. An outbreak of *Salmonella* Munchen in Germany associated with raw pork meat. *J. Food Prot.* 68:273-276.
- Bush, E. J., B. Wagner, P. J. Fedorka-Cray. 1999. Risk factors associated with shedding of *Salmonella* by U.S. finishing hogs. *Proceedings of the 3rd International Symposium on the Epidemiology and Control of Salmonella in Pork. Washington DC, USA*, 106-108.
- Canibe, N., S. H. Steien, M. Øverland, and B. B. Jensen. 2001. Effect of K-diformate in starter diets on acidity, microbiota, and the amount of organic acids in the digestive tract of piglets, and on gastric alterations. *J. Anim. Sci.* 79:2123-2133.

- Canibe, N., and B. B. Jensen. 2003. Fermented and nonfermented liquid feed to growing pigs: effect on aspects of gastrointestinal ecology and growth performance. *J. Anim. Sci.* 81:2019-2031.
- Canibe, N., O. Højberg, S. Højsgaard, and B. B. Jensen. 2005. Feed physical form and formic acid addition to the feed affect the gastrointestinal ecology and growth performance of growing pigs. *J. Anim. Sci.* 83:1287-1302.
- Carstensen, B., and J. Christensen. 1998. Herd size and sero-prevalence of *Salmonella enterica* in Danish swine herds: a random-effects model for register data. *Prev. Vet. Med.* 34:191-203.
- Casey, P. G., D. Butler, G. E. Gardiner, M. Tangney, P. Simpson, P. G. Lawlor, C. Stanton, R. P. Ross, C. Hill, and G. F. Fitzgerald. 2004. *Salmonella* carriage in an Irish pig herd: correlation between serological and bacteriological detection methods. *J. Food Prot.* 67:2797-2800.
- CDC (Centers for Disease Control and Prevention), 2005. *Salmonella* Surveillance: Annual Summary, 2004. Atlanta, Georgia: US Department of Health and Human Services, Centers for Disease Control and Prevention. <http://www.cdc.gov/ncidod/dbmd/philsdata/Salmonella.htm>
- CDC (Centers for Disease Control and Prevention), 2006. Preliminary FoodNet Data on the Incidence of Infection with Pathogens Transmitted Commonly Through Food - 10 States, United States, 2005. *Morbidity and Mortality Weekly Report*, 55: 392-395. <http://www.cdc.gov/mmwr>
- Champagne, M. J., A. Ravel, and D. Daignault. 2005. A comparison of sample weight and culture methods for the detection of *Salmonella* in pig feces. *J. Food Prot.* 68:1073-1076.
- Chang, V. P., E. W. Mills, and C. N. Cutter. 2003. Reduction of bacteria on pork carcasses associated with chilling method. *J. Food Prot.* 66:1019-1024.
- Cherrington, C. A., and in't V. Huis. 1993. Comparison of classical isolation protocols with a 24 h screen to detect viable salmonellas in faeces. *J. Appl. Bacteriol.* 75:65-68.
- Chiu, C. H., and J. T. Ou. 1996. Rapid identification of *Salmonella* serovars in feces by specific detection of virulence genes, *invA* and *spvC*, by an enrichment broth culture-multiplex PCR combination assay. *J. Clin. Microbiol.* 34:2619-2622.

- Christensen, J., D. L. Baggesen, V. Soerensen, and B. Svensmark. 1999. *Salmonella* level of Danish swine herds based on serological examination of meat-juice samples and *Salmonella* occurrence measured by bacteriological follow-up. *Prev. Vet. Med.* 40:277-292.
- Christensen, J., D. L. Baggesen, B. Nielsen, and H. Stryhn. 2002. Herd prevalence of *Salmonella* spp. in Danish pig herds after implementation of the Danish *Salmonella* Control Program with reference to a pre-implementation study. *Vet. Microbiol.* 88:175-188.
- Cornell, J., and K. R. Neal. 1998. Protracted outbreak of *Salmonella typhimurium* definitive phage type 170 food poisoning related to tripe, 'pig bag', and chitterlings. *Commun. Dis. Public Health* 1:28-30.
- Coulson, J. C., J. Butterfield, and C. Thomas. 1983. The herring gull *Larus argentatus* as a likely transmitting agent of *Salmonella montevideo* to sheep and cattle. *J. Hyg. (Lond)* 91:437-443.
- Creus, E., F. Baucells, J. F. Perez, and E. Mateu. 2004. *Salmonella* contamination in swine feeds and feed ingredients. Proceedings of the 18th International Pig Veterinary Society Congress, Hamburg, Germany, 676.
- Crouse, J. D., M. E. Anderson, and H. D. Naumann. 1988. Microbial decontamination and weight of carcass beef as affected by automated washing pressure and length of spray. *J. Food Prot.* 51:471-474.
- Cruchaga, S., A. Echeita, A. Aladuena, J. Garcia-Pena, N. Frias, and M. A. Usera. 2001. Antimicrobial resistance in salmonellae from humans, food and animals in Spain in 1998. *J. Antimicrob. Chemother.* 47:315-321.
- Crump, J. A., P. M. Griffin, and F. J. Angulo. 2002. Bacterial contamination of animal feed and its relationship to human foodborne illness. *Clin. Infect. Dis.* 35:859-865.
- Curiale, M. S., V. Gangar, and C. Gravens. 1997. VIDAS enzyme-linked fluorescent immunoassay for detection of *Salmonella* in foods: collaborative study. *J. AOAC Int.* 80:491-504.
- D'Aoust, J. Y., and A. M. Sewell. 1986. Slow rehydration for detection of *Salmonella* spp. in feeds and feed ingredients. *Appl. Environ. Microbiol.* 51:1220-1223.

- Dahl, J., A. Wingstrand, D. L. Baggesen, and B. Nielsen. 1996. Spread of *Salmonella* in pens and between pens. Proceedings of the 14th International Pig Veterinary Society Congress, Bologna, Italy, 172.
- Dahl, J., A. Wingstrand, B. Nielsen, and D. L. Baggesen. 1997. Elimination of *Salmonella typhimurium* infection by the strategic movement of pigs. *Vet. Rec.* 140:679-681.
- Davies, P. R., W. E. Morrow, F. T. Jones, J. Deen, P. J. Fedorka-Cray, and J. T. Gray. 1997a. Risk of shedding *Salmonella* organisms by market-age hogs in a barn with open-flush gutters. *J. Am. Vet. Med. Assoc.* 210:386-389.
- Davies, P. R., W. E. Morrow, F. T. Jones, J. Deen, P. J. Fedorka-Cray, and I. T. Harris. 1997b. Prevalence of *Salmonella* in finishing swine raised in different production systems in North Carolina, USA. *Epidemiol. Infect.* 119:237-244.
- Davies, P. R., F. G. E. M. Bovee, J. A. Funk, W. E. M. Morrow, F. T. Jones, and J. Deen. 1998. Isolation of *Salmonella* serotypes from feces of pigs raised in a multiple-site production system. *J. Am. Vet. Med. Assoc.* 212:1925-1929.
- Davies, P. R., J. A. Funk, and W. E. M. Morrow. 2000a. Fecal shedding of *Salmonella* by gilts before and after introduction to a swine breeding farm. *Swine Health Prod.* 8:25-29.
- Davies, P. R., P. K. Turkson, J. A. Funk, M. A. Nichols, S. R. Ladely, and P. J. Fedorka-Cray. 2000b. Comparison of methods for isolating *Salmonella* bacteria from faeces of naturally infected pigs. *J. Appl. Microbiol.* 89:169-177.
- Davies, P. R., H. H. Scott, J. A. Funk, P. J. Fedorka-Cray, and F. T. Jones. 2004. The role of contaminated feed in the epidemiology and control of *Salmonella enterica* in pork production. *Foodborne Pathog. Dis.* 1:202-215.
- Davies, R. H., and C. Wray. 1997. Distribution of *Salmonella* contamination in ten animal feedmills. *Vet. Microbiol.* 57:159-169.
- Davies, R. H., I. M. McLaren, and S. Bedford. 1999. Observations on the distribution of salmonella in a pig abattoir. *Vet. Rec.* 145:655-661.
- Davies, R. H., S. Bedford, and S. Shankster. 2001. Enhanced culture techniques for the detection of *Salmonella*. *Vet. Rec.* 148:539-540.

- Davies, R. H., P. J. Heath, S. M. Coxon, and A. R. Sayers. 2003. Evaluation of the use of pooled serum, pooled muscle tissue fluid (meat juice) and pooled faeces for monitoring pig herds for *Salmonella*. *J. Appl. Microbiol.* 95:1016-1025.
- de Frutos C., A. Herrero, J.L. Ayala and B. Fernandez. 2005. Análisis de los serotipos de *Salmonella* spp. aislados durante los años 2002, 2003 y 2004 por los laboratorios de Sanidad Animal en España. *Bol. Epidemiol. Semanal (España)* 13:133-144.
- de la Torre, E., D. Zapata, M. Tello, W. Mejía, N. Frias, F. J. Garcia Pena, E. M. Mateu, and E. Torre. 2003. Several *Salmonella enterica* subsp. *enterica* serotype 4,5,12:i:- phage types isolated from swine samples originate from serotype typhimurium DT U302. *J. Clin. Microbiol.* 41:2395-2400.
- Decisió núm. 2006/668/CE, de la Comissió, de 29 de setembre de 2006, relativa a una ajuda financera de la comunitat per a un estudi de referència sobre la prevalença de *Salmonella* en porcs d'engreix que es portarà a terme en els Estats membres (DOUE L 275, de 6.10.2006, pàg. 51).
- del Pozo Saenz, E., V. Leyva Castillo, O. Pérez Rodriguez, and M. Reyes Torres. 2001. Serotipos de *Salmonella* aisladas en pienso para gallinas ponedoras. *Rev. Cubana Alimentación* 15:26-30.
- Delpech, V., J. McAnulty, and K. Morgan. 1998. A salmonellosis outbreak linked to internally contaminated pork meat. *Aust. N. Z. J. Public Health* 22:243-246.
- Dickson, J. S., and M. E. Anderson. 1992. Microbiological decontamination of food animal carcasses by washing and sanitizing systems: a review. *J. Food Prot.* 55:133-144.
- Directiva 2003/99/CE, del Parlament Europeu i del Consell, de 17 de novembre de 2003, sobre la vigilància de les zoonosis i els agents zoonòtics i per la qual es modifica la Decisió 90/424/CEE, del Consell, i es deroga la Directiva 92/117/CEE, del Consell (DOUE L325, de 12.12.2003, pàg. 31).
- Dorsa, W. J., C. N. Cutter, and G. R. Siragusa. 1996. Evaluation of six sampling methods for recovery of bacteria from beef carcass surfaces. *Lett. Appl. Microbiol.* 22:39-41.
- Duffy, E. A., K. E. Belk, J. N. Sofos, G. R. Bellinger, A. Pape, and G. C. Smith. 2001. Extent of microbial contamination in United States pork retail products. *J. Food Prot.* 64:172-178.

- Dusch, H., and M. Altwegg. 1995. Evaluation of five new plating media for isolation of *Salmonella* species. *J. Clin. Microbiol.* 33 :802-804.
- Echeita A., A. Aladueña, R. Gonzalez-Sanz, R. Diez, M. De la Fuente, F. Cerdán, M. Arroyo and R. Gutierrez. 2005a. Análisis de las cepas de *Salmonella* spp aisladas de muestras clínicas de origen humano en España. Años 2002 y 2003 (I). *Bol. Epidemiol. Semanal (España)*. 73-76.
- Echeita A., A. Aladueña, R. Gonzalez-Sanz, R. Diez, M. De la Fuente, F. Cerdán, M. Arroyo and R. Gutierrez. 2005b. Análisis de las cepas de *Salmonella* spp aisladas de muestras clínicas de origen humano en España. Años 2002 y 2003 (II). *Bol. Epidemiol. Semanal (España)*. 85-88.
- EFSA, 2006. The Community Summary Report on Trends and Sources of Zoonoses, Zoonotic Agents, Antimicrobial Resistance and Foodborne Outbreaks in the European Union in 2005. *The EFSA Journal*, 94.
- Eld, K., A. Gunnarsson, T. Holmberg, B. Hurvell, and M. Wierup. 1991. *Salmonella* isolated from animals and feedstuffs in Sweden during 1983-1987. *Acta Vet. Scand.* 32:261-277.
- Ellerbroek, L. I., J. F. Wegener, and G. Arndt. 1993. Does spray washing of lamb carcasses alter bacterial surface contamination. *J. Food Prot.* 56:432-436.
- Epling, L. K., J. A. Carpenter, and L. C. Blankenship. 1993. Prevalence of *Campylobacter* spp. and *Salmonella* spp. on pork carcasses and the reduction effected by spraying with lactic acid. *J. Food Prot.* 56:536-537,540.
- Farzan, A., R. M. Friendship, C. E. Dewey, K. Warriner, C. Poppe, and K. Klotins. 2006. Prevalence of *Salmonella* spp. on Canadian pig farms using liquid or dry-feeding. *Prev. Vet. Med.* 73:241-254.
- Feder, I., J. C. Nietfeld, J. Galland, T. Yearly, J. M. Sargeant, R. Oberst, M. L. Tamplin, and J. B. Luchansky. 2001. Comparison of cultivation and PCR-hybridization for detection of *Salmonella* in porcine fecal and water samples. *J. Clin. Microbiol.* 39:2477-2484.
- Fedoraka-Cray, P. J., S. C. Whipp, R. E. Isaacson, N. Nord, and K. Lager. 1994. Transmission of *Salmonella typhimurium* to swine. *Vet. Microbiol.* 41:333-344.

- Fedorka-Cray, P. J., L. C. Kelley, T. J. Stabel, J. T. Gray, and J. A. Laufer. 1995. Alternate routes of invasion may affect pathogenesis of *Salmonella typhimurium* in swine. *Infect. Immun.* 63:2658-2664.
- Fedorka-Cray, P. J., D. L. Harris, and S. C. Whipp. 1997a. Using isolated weaning to raise salmonella-free swine. *Vet. Med.* 92:375-382.
- Fedorka-Cray, P. J., A. Hogg, J. T. Gray, K. Lorenzen, J. Velásquez and P. Von Behren. 1997b. Feed and feed trucks as sources of *Salmonella* contamination in swine. *Swine Health Prod.* 5:189-193.
- Fedorka-Cray, P. J., J. S. Bailey, N. J. Stern, N. A. Cox, S. R. Ladely, and M. Musgrove. 1999. Mucosal competitive exclusion to reduce *Salmonella* in swine. *J. Food Prot.* 62:1376-1380.
- Fedorka-Cray, P. J. 2000. *Salmonella* in Domestic Animals. Wray C., Wray A. (eds) CABI Publishing, Reino Unido, 191–207.
- Feldhusen, F., B. Woltering, and R. Fries. 1992. Bacteriological composition of pigskin surfaces during cold storage at various degrees of relative humidity. *Int. J. Food Microbiol.* 15:185-190.
- Funk, J. A., P. R. Davies, and M. A. Nichols. 2000. The effect of fecal sample weight on detection of *Salmonella enterica* in swine feces. *J. Vet. Diagn. Invest.* 12:412-418.
- Funk, J. A., P. R. Davies, and M. A. Nichols. 2001. Longitudinal study of *Salmonella enterica* in growing pigs reared in multiple-site swine production systems. *Vet. Microbiol.* 83:45-60.
- Funk, J. A. 2003. Pre-harvest food safety diagnostics for *Salmonella* serovars. Part 1: Microbiological culture. *Swine Health Prod.* 11:87-90.
- Funk, J. A., and W. A. Gebreyes. 2004. Risk factors associated with *Salmonella* prevalence on swine farms. *Swine Health Prod.* 12:246-251.
- Gebreyes, W. A., P. R. Davies, P. K. Turkson, W. E. Morrow, J. A. Funk, and C. Altier. 2004a. *Salmonella enterica* serovars from pigs on farms and after slaughter and validity of using bacteriologic data to define herd *Salmonella* status. *J. Food Prot.* 67:691-697.

- Gebreyes, W. A., S. Thakur, P. R. Davies, J. A. Funk, and C. Altier. 2004b. Trends in antimicrobial resistance, phage types and integrons among *Salmonella* serotypes from pigs, 1997-2000. *J. Antimicrob. Chemother.* 53:997-1003.
- Genovese, K. J., R. C. Anderson, R. B. Harvey, T. R. Callaway, T. L. Poole, T. S. Edrington, P. J. Fedorka-Cray, and D. J. Nisbet. 2003. Competitive exclusion of *Salmonella* from the gut of neonatal and weaned pigs. *J. Food Prot.* 66:1353-1359.
- Gill, C. O., and J. Bryant. 1993. The presence of *Escherichia coli*, *Salmonella* and *Campylobacter* in pig carcass dehairing equipment. *Food Microbiol.* 10:337-344.
- Gill, C. O., J. C. McGinnis, J. Bryant, and B. Chabot. 1995. Decontamination of commercial, polished pig carcasses with hot water. *Food Microbiol.* 12:143-149.
- Gill, C. O., D. Bedard, and T. Jones. 1997. The decontaminating performance of a commercial apparatus for pasteurizing polished pig carcasses. *Food Microbiol.* 14:71-79.
- Gill, C. O., and T. Jones. 2000. Microbiological sampling of carcasses by excision or swabbing. *J. Food Prot.* 63:167-173.
- Gill, C. O., M. Badoni, and J. C. McGinnis. 2001. Microbiological sampling of meat cuts and manufacturing beef by excision or swabbing. *J. Food Prot.* 64:325-334.
- Gill, C. O., and C. Landers. 2004. Proximate sources of bacteria on boneless loins prepared from routinely processed and detained carcasses at a pork packing plant. *Int. J. Food Microbiol.* 97:171-178.
- Giovannacci, I., S. Queguiner, C. Ragimbeau, G. Salvat, J. L. Vendevre, V. Carlier, and G. Ermel. 2001. Tracing of *Salmonella* spp. in two pork slaughter and cutting plants using serotyping and macrorestriction genotyping. *J. Appl. Microbiol.* 90:131-147.
- Goldbach, S. G., and L. Alban. 2006. A cost-benefit analysis of *Salmonella*-control strategies in Danish pork production. *Prev. Vet. Med.* 77:1-14.
- Goren, E., W. A. de Jong, P. Doornenbal, J. P. Koopman, and H. M. Kennis. 1984. Protection of chicks against salmonella infection induced by spray application of intestinal microflora in the hatchery. *Vet. Q.* 6:73-79.

- Gouws, P. A., M. Visser, and V. S. Brozel. 1998. A polymerase chain reaction procedure for the detection of *Salmonella* spp. within 24 hours. *J. Food Prot.* 61:1039-1042.
- Grafanakis, E., L. Leontides, and C. Genigeorgis. 2001. Seroprevalence and antibiotic sensitivity of serotypes of *Salmonella* enterica in Greek pig herds. *Vet. Rec.* 148:407-411.
- Hald, T. 2001. *Salmonella* in Pork –Epidemiology, Control and the Public Health Impact. Tesi doctoral. Royal Veterinary and Agricultural University. Copenhagen, Denmark.
- Hald, T., A. Wingstrand, M. Swanenburg, A. Von Altrock, and B. M. Thorberg. 2003. The occurrence and epidemiology of *Salmonella* in European pig slaughterhouses. *Epidemiol. Infect.* 131:1187-1203.
- Hald, T., D. Vose, H. C. Wegener, and T. Koupeev. 2004. A Bayesian approach to quantify the contribution of animal-food sources to human salmonellosis. *Risk Anal.* 24:255-269.
- Hamilton, D., J. Bobbit, J. Dahl, K. Coates, S. Lester, and A. Pointon. 2000. Risk factors for within herd *Salmonella* infection of pigs in Australia. Proceedings of the 16th International Pig Veterinary Society Congress, Melbourne, Australia, 204.
- Hansen, C. F., L. Jorgensen, J. Dahl, and N. Kjeldsen. 1999. Effect of formic acid in drinking water on the incidence of *Salmonella* in growing-finishing pigs. Proceedings of the 3rd International Symposium on the Epidemiology and Control of *Salmonella* in Pork, Washington DC, USA, 299-300.
- Hansen, C. F., L. L. Mikkelsen, K. E. Bach Knudsen, and B. Jensen. 2003. The stomach acts as a barrier against *Salmonella* in pigs fed a meal diet. Proceedings of the 5th International Symposium on the Epidemiology and Control of *Salmonella* in Pork, Heraklion-Grete, Greece, 130-132.
- Hansen, C. F. 2004. Effect of feed form, potato protein concentrate, dried sugar beet pulp and zinc gluconate on *Salmonella* gastrointestinal conditions and performance in finishers. Tesi doctoral. The Royal Veterinary and Agricultural University. Copenhagen.
- Harris, I. T., P. J. Fedorka-Cray, J. T. Gray, L. A. Thomas, and K. Ferris. 1997. Prevalence of *Salmonella* organisms in swine feed. *J. Am. Vet. Med. Assoc.* 210:382-385.

- Harris, I. T. 2003. Serologic basis for assessment of subclinical *Salmonella* infection in swine. *Swine Health Prod.* 11:247-251.
- Helms, M., S. Ethelberg, and K. Mølbak. 2005. International *Salmonella* Typhimurium DT104 infections, 1992-2001. *Emerg. Infect. Dis.* 11:859-867.
- Henzler, D. J., and H. M. Opitz. 1992. The role of mice in the epizootiology of *Salmonella* enteritidis infection on chicken layer farms. *Avian Dis.* 36:625-631.
- Hoorfar, J., and A. V. Mortensen. 2000. Improved culture methods for isolation of *Salmonella* organisms from swine feces. *Am. J. Vet. Res.* 61:1426-1429.
- Hurd, H. S., W. D. Schlosser, and E. D. Ebel. 1999. The effect of intermittent shedding on prevalence estimation in populations. Proceedings of the 3rd International Symposium on the Epidemiology and Control of *Salmonella* in Pork, Washington DC, USA, 60-65.
- Hurd, H. S., J. K. Gailey, J. D. McKean, and M. H. Rostagno. 2001a. Rapid infection in market-weight swine following exposure to a *Salmonella* Typhimurium-contaminated environment. *Am. J. Vet. Res.* 62:1194-1197.
- Hurd, H. S., J. D. McKean, I. V. Wesley, and L. A. Karkiker. 2001b. The effect of lairage on *Salmonella* isolation from market swine. *J. Food Prot.* 64:939-944.
- Hurd, H. S., J. D. McKean, R. W. Griffith, I. V. Wesley, and M. H. Rostagno. 2002. *Salmonella enterica* infections in market swine with and without transport and holding. *Appl. Environ. Microbiol.* 68:2376-2381.
- Hurd, H. S., J. D. McKean, R. D. Griffith, and M. H. Rostagno. 2004. Estimation of the *Salmonella enterica* prevalence in finishing swine. *Epidemiol. Infect.* 132:127-135.
- Hurd, H. S., J. K. Gailey, J. D. McKean, and R. W. Griffith. 2005. Variable abattoir conditions affect *Salmonella enterica* prevalence and meat quality in swine and pork. *Foodborne. Pathog. Dis.* 2:77-81.
- Isaacson, R. E., L. D. Firkins, R. M. Weigel, F. A. Zuckermann, and J. A. DiPietro. 1999. Effect of transportation and feed withdrawal on shedding of *Salmonella* Typhimurium among experimentally infected pigs. *Am. J. Vet. Res.* 60:1155-1158.

- Israelsen, M., I. D. Hasen, and E. Jacobsen. 1996. Don't grow *Salmonella* in the pellet cooler. *Feed Intern.* 17:34-38.
- Jensen, B. B., O., Højberg, L. L. Mikkelsen, S. Hedeman, and N. Canibe. 2003. Enhancing intestinal function to treat and prevent intestinal disease. 9th International Symposium on Digestive Physiology in Pigs, Alberta, Canada, (1):103-119.
- Jones, F. T., and K. E. Richardson. 2004. *Salmonella* in commercially manufactured feeds. *Poult. Sci.* 83:384-391.
- Jorgensen, L., J. Dahl, and A. Wingstrand. 1999. The effect of feeding pellets, meal and heat treatment on the salmonella-prevalence in finishing pigs. Proceedings of the 3rd International Symposium on the Epidemiology and Control of *Salmonella* in Pork, Washington DC, USA, 308-312.
- Jorgensen, L., H. D. Kjærsgaard, H. Wachamann, B. Jensen, and B. Knudsen. 2001. Effect of pelleting and use of lactic acid in feed on *Salmonella* prevalence and productivity in weaners. Proceedings of the 4th International Symposium on the Epidemiology and Control of *Salmonella* in Pork, Leipzig, Germany, 109-111.
- Juven, B. J., N. A. Cox, J. S. Bailey, J. E. Thompson, O. W. Charles, and J. V. Schutze. 1984. Recovery of *Salmonella* from artificially contaminated poultry feed in non-selective and selective broth media. *J. Food Prot.* 47:299-302.
- Käsbohrer, A., D. Protz, R. Helmuth, K. Nöckler, T. Blaha, F. J. Conraths, and L. Geue. 2000. *Salmonella* in slaughter pigs of German origin: an epidemiological study. *Eur. J. Epidemiol.* 16:141-146.
- Keenlside, J., G. Gensler, R. King, M. E. McFall, and L. Goonewardene. 2005. Prevalence and relatedness of *Salmonella* spp. in a Canadian abattoir. Proceedings of the 6th International Symposium on the Epidemiology and Control of Foodborne Pathogens in Pork, California, USA, 38-41.
- Kelley, K. W. 1980. Stress and immune function: a bibliographic review. *Ann. Rech. Vet.* 11:445-478.
- Kephart, K. B., and E. W. Mills. 2005. Effect of withholding feed from swine before slaughter on carcass and viscera weights and meat quality. *J. Anim. Sci.* 83:715-721.

- Kjeldsen, N. and J. Dahl. 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 3rd International Symposium on the Epidemiology and Control of *Salmonella* in Pork, Washington DC, USA, 313-316.
- Kluge, H., J. Broz, and K. Eder. 2006. Effect of benzoic acid on growth performance, nutrient digestibility, nitrogen balance, gastrointestinal microflora and parameters of microbial metabolism in piglets. *J. Anim Physiol Anim. Nutr. (Berl)* 90:316-324.
- Knarreborg, A., N. Miguel, T. Granli, and B. B. Jensen. 2002. Establishment and application of an in vitro methodology to study the effects of organic acids on coliform and lactic acid bacteria in the proximal part of the gastrointestinal tract of piglets. *Animal Feed Sci. Technol.* 99:131-140.
- Köfer, J., U. Kleb, and P. Pless. 2006. The Styrian *Salmonella* Monitoring Programme for pork production. *J. Vet. Med. B Infect. Dis. Vet. Public Health* 53:209-212.
- Korsak, N., G. Daube, Y. Ghafir, A. Chahed, S. Jolly, and H. Vindevogel. 1998. An efficient sampling technique used to detect four foodborne pathogens on pork and beef carcasses in nine Belgian abattoirs. *J. Food Prot.* 61:535-541.
- Korsak, N., B. Jacob, B. Groven, G. Etienne, B. China, Y. Ghafir, and G. Daube. 2003. *Salmonella* contamination of pigs and pork in an integrated pig production system. *J. Food Prot.* 66:1126-1133.
- Kranker, S., J. Dhal, and A. Wingstrand. 2001. Bacteriological and serological examination and risk factor analysis of *Salmonella* occurrence in sow herds, including risk factors for high *Salmonella* seroprevalence in receiver finishing herds. Proceedings of the 4th International Symposium on the Epidemiology and Control of *Salmonella* in Pork, Leipzig, Germany, 230-236.
- Kranker, S., L. Alban, J. Boes, and J. Dahl. 2003. Longitudinal study of *Salmonella enterica* serotype Typhimurium infection in three danish farrow-to-finish swine herds. *J. Clin. Microbiol.* 41:2282-2288.
- Lampel, K. A., P. A. Orlandi, and L. Kornegay. 2000. Improved template preparation for PCR-based assays for detection of food-borne bacterial pathogens. *Appl. Environ. Microbiol.* 66:4539-4542.

- Laurinen, P. A., H. B. Siljander-Rasi, T. B. Karhunen, M. A. Alaviuhkola, M. A. Näsi, and K. A. Tuppi. 2000. Effects of different grinding methods and particle size of barley and wheat on pig performance and digestibility. *Anim. Feed Sci. Tech.* 83:1-16.
- Lázaro, N. S., A. Tibana, and E. Hofer. 1997. *Salmonella* spp. in Healthy Swine and in Abattoir Environments in Brazil. *J. Food Prot.* 60:1029-1033.
- Le Minor, L. and M. Y. Popoff. 1987. Request for an opinion. Designation of *Salmonella enterica* sp. nov. Rev., as the type and only species of the genus *Salmonella*. *Int. J. Syst. Bacteriol.* 37:465-468.
- Leontides, L. S., E. Grafanakis, and C. Genigeorgis. 2003. Factors associated with the serological prevalence of *Salmonella enterica* in Greek finishing swine herds. *Epidemiol. Infect.* 131:599-606.
- Letellier, A., S. Messier, J. Pare, J. Menard, and S. Quessy. 1999. Distribution of *Salmonella* in swine herds in Quebec. *Vet. Microbiol.* 67:299-306.
- Letellier, A., S. Messier, L. Lessard, and S. Quessy. 2000. Assessment of various treatments to reduce carriage of *Salmonella* in swine. *Can. J. Vet. Res.* 64:27-31.
- Letellier, A., E. Guevremont, G. Beauchamp, S. D'Allaire, S. Fournaise, C. Poppe, T. Sanderson, and S. Quessy. 2005. Risk factors, at slaughter, associated with presence of *Salmonella* on hog carcasses in Canada. Proceedings of the 6th International Symposium on the Epidemiology and Control of Foodborne Pathogens in Pork, California, USA, 31-34.
- Lever, M. S., and A. Williams. 1996. Cross-infection of chicks by airborne transmission of *Salmonella enteritidis* PT4. *Lett. Appl. Microbiol.* 23:347-349.
- Liebana, E., L. Garcia-Migura, C. Clouting, F. A. Clifton-Hadley, M. Breslin, and R. H. Davies. 2003. Molecular fingerprinting evidence of the contribution of wildlife vectors in the maintenance of *Salmonella* Enteritidis infection in layer farms. *J. Appl. Microbiol.* 94:1024-1029.
- Lin, C. K., and H. Y. Tsen. 1996. Use of two 16S DNA targeted oligonucleotides as PCR primers for the specific detection of *Salmonella* in foods. *J. Appl. Bacteriol.* 80:659-666.

- Llewellyn, L. J., M. R. Evans, and S. R. Palmer. 1998. Use of sequential case-control studies to investigate a community *Salmonella* outbreak in Wales. *J. Epidemiol. Community Health* 52:272-276.
- Lo Fo Wong, D. M. 2001. Epidemiology and control options of *Salmonella* in European pig herds. Tesi doctoral. Royal Veterinary and Agricultural University. Copenhagen, Denmark.
- Lo Fo Wong, D. M., J. Dahl, H. Stege, P. J. van der Wolf, L. Leontides, A. Von Altrock, and B. M. Thorberg. 2004a. Herd-level risk factors for subclinical *Salmonella* infection in European finishing-pig herds. *Prev. Vet. Med.* 62:253-266.
- Lo Fo Wong, D. M., J. Dahl, A. Wingstrand, P. J. van der Wolf, A. A. von, and B. M. Thorberg. 2004b. A European longitudinal study in *Salmonella* seronegative- and seropositive-classified finishing pig herds. *Epidemiol. Infect.* 132:903-914.
- Löfstrom, C., R. Knutsson, C. E. Axelsson, and P. Radstrom. 2004. Rapid and specific detection of *Salmonella* spp. in animal feed samples by PCR after culture enrichment. *Appl. Environ. Microbiol.* 70:69-75.
- Loynachan, A. T., J. M. Nugent, M. M. Erdman, and D. L. Harris. 2004. Acute infection of swine by various *Salmonella* serovars. *J. Food Prot.* 67:1484-1488.
- Maciorowski, K. G., P. Herrera, F. T. Jones, S. D. Pillai, and S. C. Ricke. 2006. Cultural and Immunological Detection Methods for *Salmonella* spp. in Animal Feeds - A Review. *Vet. Res. Commun.* 30:127-137.
- Mafu, A. A., R. Higgins, M. Nadeau, and G. Cousineau. 1989. The incidence of *Salmonella*, *Campylobacter* and *Yersinia enterocolitica* in swine carcasses and the slaughterhouse environment. *J. Food Prot.* 52:642-645.
- Maguire, H. C., A. A. Codd, V. E. Mackay, B. Rowe, and E. Mitchell. 1993. A large outbreak of human salmonellosis traced to a local pig farm. *Epidemiol. Infect.* 110:239-246.
- Malmqvist, M., K. G. Jacobsson, P. Haggblom, F. Cerenius, L. Sjoland, and A. Gunnarsson. 1995. *Salmonella* isolated from animals and feedstuffs in Sweden during 1988-1992. *Acta Vet. Scand.* 36:21-39.

- Malorny, B., A. Schroeter, and R. Helmuth. 1999. Incidence of quinolone resistance over the period 1986 to 1998 in veterinary *Salmonella* isolates from Germany. *Antimicrob. Agents Chemother.* 43:2278-2282.
- Mallinson, E. T., R. G. Miller, C. E. de Rezende, K. E. Ferris, J. deGraft-Hanson, and S. W. Joseph. 2000. Improved plating media for the detection of *Salmonella* species with typical and atypical hydrogen sulfide production. *J. Vet. Diagn. Invest.* 12:83-87.
- Massó R., and J. Oliva. 1997. Technical evaluation of an automated analyser for the detection of *Salmonella enterica* in fresh meat products. *Food Control* 8:99-103.
- Mattick, K. L., R. A. Bailey, F. Jorgensen, and T. J. Humphrey. 2002. The prevalence and number of *Salmonella* in sausages and their destruction by frying, grilling or barbecuing. *J. Appl. Microbiol.* 93:541-547.
- McChesney, D. G., G. Kaplan, and P. Gardner. 1995. FDA survey determines *Salmonella* contamination. *Feedstuffs* 67:20-24.
- McGlone, J. J., J. L. Salak, E. A. Lumpkin, R. I. Nicholson, M. Gibson, and R. L. Norman. 1993. Shipping stress and social status effects on pig performance, plasma cortisol, natural killer cell activity, and leukocyte numbers. *J. Anim. Sci.* 71:888-896.
- McKinley, G. A., D. J. Fagerberg, C. L. Quarles, B. A. George, D. E. Wagner, and L. D. Rollins. 1980. Incidence of salmonellae in fecal samples of production swine and swine at slaughter plants in the United States in 1978. *Appl. Environ. Microbiol.* 40:562-566.
- Mead, P. S., L. Slutsker, V. Dietz, L. F. McCaig, J. S. Bresee, C. Shapiro, P. M. Griffin, and R. V. Tauxe. 1999. Food-related illness and death in the United States. *Emerg. Infect. Dis.* 5:607-625.
- Mejía, W., D. Zapata, E. Mateu, and M. Martín. 2005a. Lack of specificity of a combination of Rappaport-Vassiliadis broth and XLT4 agar for the isolation of salmonellae from pig faeces. *Vet. Rec.* 156:150-151.
- Mejía, W., J. Casal, E. Mateu, and M. Martín. 2005b. Comparison of two commercial ELISAs for the serological diagnosis of salmonellosis in pigs. *Vet. Rec.* 157:47-48.

- Mejía, W., J. Casal, D. Zapata, G. J. Sanchez, M. Martín, and E. Mateu. 2006. Epidemiology of salmonella infections in pig units and antimicrobial susceptibility profiles of the strains of *Salmonella* species isolated. *Vet. Rec.* 159:271-276.
- Michanie, S., F. L. Bryan, P. Alvarez, A. B. Olivo, and A. Paniagua. 1988. Critical control points for foods prepared in households whose members had either alleged typhoid fever or diarrhea. *Int. J. Food Microbiol.* 7:123-134.
- Mikkelsen, L. L., P. J. Naughton, M. S. Hedemann, and B. B. Jensen. 2004. Effects of physical properties of feed on microbial ecology and survival of *Salmonella enterica* serovar Typhimurium in the pig gastrointestinal tract. *Appl. Environ. Microbiol.* 70:3485-3492.
- Millemann, Y., M. C. Lesage, E. Chaslus-Dancla, and J. P. Lafont. 1995. Value of plasmid profiling, ribotyping, and detection of IS200 for tracing avian isolates of *Salmonella typhimurium* and *S. enteritidis*. *J. Clin. Microbiol.* 33:173-179.
- Miller M.F., Carr M.A., Bawcom B.D., Ramsey C.B., and Thompson L.D. 1997. Microbiology of pork carcasses from pigs with differing origins and feed withdrawal times. *J. Food Prot.* 60:242-245.
- Mølbak, K., D. L. Baggesen, F. M. Aarestrup, J. M. Ebbesen, J. Engberg, K. Frydendahl, P. Gerner-Smidt, A. M. Petersen, and H. C. Wegener. 1999. An outbreak of multidrug-resistant, quinolone-resistant *Salmonella enterica* serotype typhimurium DT104. *N. Engl. J. Med.* 341:1420-1425.
- Morgan, I. R., F. L. Krautil, and J. A. Craven. 1987. Effect of time in lairage on caecal and carcass salmonella contamination of slaughter pigs. *Epidemiol. Infect.* 98:323-330.
- Morris, C. A., L. M. Lucia, J. W. Savell, and G. R. Acuff. 1997. Trisodium Phosphate Treatment of Pork Carcasses. *J. Food Sci.* 62:402-403.
- Morrow, W. E., P. R. Davies, T. See, J. Eisemann, K. Zering, S. Kihlstrom, and K. Karli. 1999. Prevalence of *Salmonella* spp. in the faeces on farm and ceca at slaughter for a cohort of finishing pigs. *Proceedings of the 3rd International Symposium on the Epidemiology and Control of Salmonella in Pork*, Washington DC, USA, 156-157.
- Morrow, W. E., M. T. See, J. H. Eisemann, P. R. Davies, and K. Zering. 2002. Effect of withdrawing feed from swine on meat quality and prevalence of *Salmonella* colonization at slaughter. *J. Am. Vet. Med. Assoc.* 220:497-502.

- Mousing, J., P. T. Jensen, C. Halgaard, F. Bager, N. Feld, B. Nielsen, J. P. Nielsen, and S. Bech-Nielsen. 1997a. Nation-wide *Salmonella enterica* surveillance and control in Danish slaughter swine herds. *Prev. Vet. Med.* 29:247-261.
- Mousing, J., J. Kyrval, T. K. Jensen, B. Aalbaek, J. Buttenschon, B. Svensmark, and P. Willeberg. 1997b. Meat safety consequences of implementing visual postmortem meat inspection procedures in Danish slaughter pigs. *Vet. Rec.* 140:472-477.
- Mroz, Z. 2003. Antibiotic Growth Promoters for Pigs. 9th International Symposium on Digestive Physiology in Pigs, Alberta, Canada, (1):267-293.
- Muirhead, S. 1995. FDA survey shows low salmonella level in feed. *Feedstuffs* 67, 1-5.
- Narain, J. P., and J. P. Lofgren. 1989. Epidemic of restaurant-associated illness due to *Salmonella newport*. *South. Med. J.* 82:837-840.
- Nesbakken, T., E. Nerbrink, O. J. Rotterud, and E. Borch. 1994. Reduction of *Yersinia enterocolitica* and *Listeria* spp. on pig carcasses by enclosure of the rectum during slaughter. *Int. J. Food Microbiol.* 23:197-208.
- Nielsen, B., D. Baggesen, F. Bager, J. Haugegaard, and P. Lind. 1995. The serological response to *Salmonella* serovars typhimurium and infantis in experimentally infected pigs. The time course followed with an indirect anti-LPS ELISA and bacteriological examinations. *Vet. Microbiol.* 47:205-218.
- Nielsen, B., L. Ekeroth, F. Bager, and P. Lind. 1998. Use of muscle fluid as a source of antibodies for serologic detection of *Salmonella* infection in slaughter pig herds. *J. Vet. Diagn. Invest.* 10:158-163.
- Nietfeld, J. C., I. Feder, T. T. Kramer, D. Schoneweis, M. M. Chengappa. 1998. Preventing *Salmonella* infection in pigs with offsite weaning. *Swine Health Prod.* 6:27-32.
- Noel, H., M. Dominguez, F. X. Weill, A. Brisabois, C. Duchazeaubeneix, A. Kerouanton, G. Delmas, N. Pihier, and E. Couturier. 2006. Outbreak of *Salmonella enterica* serotype Manhattan infection associated with meat products, France, 2005. *Eurosurveillance* 11, 270-273.
- Nollet, N., D. Maes, L. De Zutter, L. Duchateau, K. Houf, K. Huysmans, H. Imberechts, R. Geers, A. de Kruif, and J. van Hoof. 2004. Risk factors for the herd-level

- bacteriologic prevalence of *Salmonella* in Belgian slaughter pigs. *Prev. Vet. Med.* 65:63-75.
- Nollet, N., K. Houf, J. Dewulf, L. Duchateau, L. De Zutter, A. de Kruif, and D. Maes. 2005a. Distribution of salmonella strains in farrow-to-finish pig herds: a longitudinal study. *J. Food Prot.* 68:2012-2021.
- Nollet, N., K. Houf, J. Dewulf, K. A. De, Z. L. De, and D. Maes. 2005b. *Salmonella* in sows: a longitudinal study in farrow-to-finish pig herds. *Vet. Res.* 36:645-656.
- O'Connor, A. M., J. D. McKean, J. H. Beary, and S. L. Brockus. 2006. Prevalence of exposure to *Salmonella* spp in finishing swine marketed in Iowa. *Am. J. Vet. Res.* 67:829-833.
- Oliveira, S. D., C. R. Rodenbusch, M. C. Ce, S. L. Rocha, and C. W. Canal. 2003. Evaluation of selective and non-selective enrichment PCR procedures for *Salmonella* detection. *Lett. Appl. Microbiol.* 36:217-221.
- Oliveira, C. J., L. F. Carvalho, S. A. Fernandes, A. T. Tavechio, and F. J. Domingues. 2005. Prevalence of pigs infected by *Salmonella* Typhimurium at slaughter after an enterocolitis outbreak. *Int. J. Food Microbiol.* 105:267-271.
- Oliveira, C. J., L. F. Carvalho, and T. B. Garcia. 2006. Experimental airborne transmission of *Salmonella* Agona and *Salmonella* Typhimurium in weaned pigs. *Epidemiol. Infect.* 134:199-209.
- Olsen, A. M., T. Jensen, J. Dahl, and H. Christensen. 2001. Reduction in level of *Salmonella* on swine carcasses after slaughter without splitting the head. *Proceedings of the 4th International Symposium on the Epidemiology and Control of Salmonella in Pork*, Leipzig, Germany, 124-126.
- On, S. L., and D. L. Baggesen. 1997. Determination of clonal relationships of *Salmonella typhimurium* by numerical analysis of macrorestriction profiles. *J. Appl. Microbiol.* 83:699-706.
- Oosterom, J., R. Dekker, G. J. de Wilde, F. Kempen-de Troye, and G. B. Engels. 1985. Prevalence of *Campylobacter jejuni* and *Salmonella* during pig slaughtering. *Vet. Q.* 7:31-34.

- Östling, C. E., and S. E. Lindgren. 1993. Inhibition of enterobacteria and *Listeria* growth by lactic, acetic and formic acids. *J. Appl. Bacteriol.* 75:18-24.
- Øverland, M., T. Granli, N. P. Kjos, O. Fjetland, S. H. Steien, and M. Stokstad. 2000. Effect of dietary formates on growth performance, carcass traits, sensory quality, intestinal microflora, and stomach alterations in growing-finishing pigs. *J. Anim. Sci.* 78:1875-1884.
- Pala, T. R., and A. Sevilla. 2004. Microbial contamination of carcasses, meat, and equipment from an Iberian pork cutting plant. *J. Food Prot.* 67:1624-1629.
- Palumbo, S. A., P. Klein, J. Capra, S. Eblen, and A. J. Miller. 1999. Comparison of excision and swabbing sampling methods to determine the microbiological quality of swine carcass surfaces. *Food Microbiol.* 16:459-464.
- Papenbrock, S., K. Stemme, G. Amtsberg, J. Verspohl, and J. Kamphues. 2005. Investigations on prophylactic effects of coarse feed structure and/or potassium diformate on the microflora in the digestive tract of weaned piglets experimentally infected with *Salmonella* Derby. *J. Anim Physiol Anim. Nutr. (Berl)* 89:84-87.
- Partanen, K., and Z. Mroz. 1999. Organic acids for performance enhancement in pig diets. *Nutr. Res. Rev.* 12:117-145.
- Pearce, R. A., D. J. Bolton, J. J. Sheridan, D. A. McDowell, I. S. Blair, and D. Harrington. 2004. Studies to determine the critical control points in pork slaughter hazard analysis and critical control point systems. *Int. J. Food Microbiol.* 90:331-339.
- Pearce, R. A., and D. J. Bolton. 2005. Excision vs sponge swabbing - a comparison of methods for the microbiological sampling of beef, pork and lamb carcasses. *J. Appl. Microbiol.* 98:896-900.
- Penalver, P., B. Huerta, C. Borge, R. Astorga, R. Romero, and A. Perea. 2005. Antimicrobial activity of five essential oils against origin strains of the Enterobacteriaceae family. *A. P. M. I. S.* 113:1-6.
- Pepperell, R., C. A. Reid, S. N. Solano, M. L. Hutchison, L. D. Walters, A. M. Johnston, and S. Buncic. 2005. Experimental comparison of excision and swabbing microbiological sampling methods for carcasses. *J. Food Prot.* 68:2163-2168.

- Peralta, B., M. Martín, E. Mateu, and S. Martín. 2004. The in vitro effect of pH, volatile fatty acids and their combinations on *Salmonella* Typhimurium and *Salmonella* Cholerasuis. Proceedings of the 18th International Pig Veterinary Society Congress, Hamburg, Germany, 678.
- Proux, K., C. Houdayer, F. Humbert, R. Cariolet, V. Rose, E. Eveno, and F. Madec. 2000. Development of a complete ELISA using *Salmonella* lipopolysaccharides of various serogroups allowing to detect all infected pigs. *Vet. Res.* 31:481-490.
- Quessy, S., A. Letellier, and E. Nadeau. 1999. Risk factor associated with the presence of *Salmonella* in swine herds in Quebec. Proceedings of the 3rd International Symposium on the Epidemiology and Control of *Salmonella* in Pork, Washington DC, USA, 165-168.
- Quessy, S., E. Guevremont, G. Beauchamp, S. D'Allaire, S. Fournaise, C. Poppe, T. Sanderson, and A. Letellier. 2005. Risk factors associated with presence of *Salmonella* in pigs in Canada. Proceedings of the 6th International Symposium on the Epidemiology and Control of Foodborne Pathogens in Pork, California, USA, 16-18.
- Rajic, A., J. Keenlside, M. E. McFall, A. E. Deckert, A. C. Muckle, B. P. O'Connor, K. Manninen, C. E. Dewey, and S. A. McEwen. 2005. Longitudinal study of *Salmonella* species in 90 Alberta swine finishing farms. *Vet. Microbiol.* 105:47-56.
- Rajkowski, K. T., S. Eblen, and C. Laubauch. 1998. Efficacy of washing and sanitizing trailers used for swine transport in reduction of *Salmonella* and *Escherichia coli*. *J. Food Prot.* 61:31-35.
- Reeves, M. W., G. M. Evins, A. A. Heiba, B. D. Plikaytis, and J. J. Farmer. 1989. Clonal nature of *Salmonella typhi* and its genetic relatedness to other salmonellae as shown by multilocus enzyme electrophoresis, and proposal of *Salmonella bongori* comb. nov. *J. Clin. Microbiol.* 27:313-320.
- Reglament (CE) núm. 178/2002 del Parlament Europeu i del Consell, de 28 de gener de 2002, pel qual s'estableixen els principis i els requisits generals de la legislació alimentària, es crea l'Autoritat Europea de Seguretat Alimentària i es fixen procediments relatius a la seguretat alimentària (DOUE L31, d'1.02.2002, pàg. 1).

- Reglament (CE) núm. 2160/2003 del Parlament Europeu i del Consell, de 17 de novembre de 2003, sobre el control de salmonel·la i altres agents zoonòtics específics transmesos pels aliments (DOUE L325, de 12.12.2003, pàg. 1).
- Reglament (CE) núm. 854/2004 del Parlament Europeu i del Consell, de 29 d'abril de 2004, pel qual s'estableixen normes específiques per a l'organització de controls oficials dels productes d'origen animal adreçats al consum humà (DOUE L139, de 30.4.2004, pàg. 206).
- Reglament (CE) núm. 2073/2005 de la Comissió, de 15 de novembre de 2005, relatiu als criteris microbiològics aplicables als productes alimentosos (DOUE L338, de 22.12.2005, pàg. 1).
- Ricci, A., P. Vio, V. Cibin, M. Mancin, S. Amato, L. Barco, and S. Marangon. 2005. Foodborne Pathogens Monitoring in Pigs in the Veneto Region of Italy. Proceedings of the 6th International Symposium on the Epidemiology and Control of *Salmonella* and other foodborne pathogens in Pork, California, USA, 19-23.
- Rivas, T., J. A. Vizcaino, and F. J. Herrera. 2000. Microbial contamination of carcasses and equipment from an Iberian pig slaughterhouse. *J. Food Prot.* 63:1670-1675.
- Rossen, L., P. Norskov, K. Holmstrom, and O. F. Rasmussen. 1992. Inhibition of PCR by components of food samples, microbial diagnostic assays and DNA-extraction solutions. *Int. J. Food Microbiol.* 17:37-45.
- Rostagno, M. H., H. S. Hurd, J. D. McKean, C. J. Ziemer, J. K. Gailey, and R. C. Leite. 2003. Preslaughter holding environment in pork plants is highly contaminated with *Salmonella enterica*. *Appl. Environ. Microbiol.* 69:4489-4494.
- Rostagno, M. H., J. K. Gailey, H. S. Hurd, J. D. McKean, and R. C. Leite. 2005. Culture methods differ on the isolation of *Salmonella enterica* serotypes from naturally contaminated swine fecal samples. *J. Vet. Diagn. Invest.* 17:80-83.
- Roth, F. X. 2000. Ácidos orgánicos en nutrición porcina: eficacia y modo de acción. XVI Curso de especialización FEDNA (Fundación Española para el Desarrollo de la Nutrición Animal), Expoaviga, Barcelona, 171-181.
- Rowe, T. A., F. C. Leonard, G. Kelly, P. B. Lynch, J. Egan, A. M. Quirke, and P. J. Quinn. 2003. *Salmonella* serotypes present on a sample of Irish pig farms. *Vet. Rec.* 153:453-456.

- Saide-Albornoz J. J., C. L. Knipe, E. A. Murano, and G. W. Beran. 1995. Contamination of pork carcasses during slaughter, fabrication, and chilled storage. *J. Food Prot.* 58:993-997.
- Sandberg, M., P. Hopp, J. Jarp, and E. Skjerve. 2002. An evaluation of the Norwegian *Salmonella* surveillance and control program in live pig and pork. *Int. J. Food Microbiol.* 72:1-11.
- Sarwari, A. R., L. S. Magder, and P. Levine. 2001. Serotype distribution of *Salmonella* isolates from food animals after slaughter differs from that of isolates found in humans. *J. Infect. Dis.* 183:1295-1299.
- Schwartz, K. J. 1999. Diseases of swine 8th Edition, Straw, B., S. D'Allaire, W. Mengeling, and D., Taylor (Eds.) Blackwell Science Ltd., Oxford. 535-551.
- Sharpe, A. N., C. Isigidi Bin Kingombe, P. Watney, L. J. Parrington, I. Dudas, and M. P. Diotte. 1996. Efficient Nondestructive Sampler for Carcasses and Other Surfaces. *J. Food Prot.* 59:757-763.
- Shelobolina, E. S., S. A. Sullivan, K. R. O'Neill, K. P. Nevin, and D. R. Lovley. 2004. Isolation, characterization, and U(VI)-reducing potential of a facultatively anaerobic, acid-resistant Bacterium from low-pH, nitrate- and U(VI)-contaminated subsurface sediment and description of *Salmonella subterranea* sp. nov. *Appl. Environ. Microbiol.* 70:2959-2965.
- Silva, L. E., C. Gotardi, P. Schwarz, P. Mostardeiro, R. Vizzotto, J. D. Kich, and M. I. Cardoso. 2003. *Salmonella* infection in a multiple-site swine production system in Brazil. Proceedings of the 5th International Symposium on the Epidemiology and Control of *Salmonella* in Pork, Heraklion-Grete, Greece, 250-252.
- Simonsen, B., F. L. Bryan, J. H. B. Christian, T. A. Roberts, R. B. Tompkin, and J. H. Silliker. 1987. Prevention and control of food-borne salmonellosis through application of hazard analysis critical control point (HACCP). *Int. J. Food Microbiol.* 4:227-247.
- Skovgaard, N., S. G. Christensen, and A. W. Gulistani. 1985. Salmonellas in Danish pigs: a comparison of three isolation methods. *J. Hyg. (Lond)* 95:69-75.

- Smith, M. G. 1992. Destruction of bacteria on fresh meat by hot water. *Epidemiol. Infect.* 109:491-496.
- Smulders, F. J., and G. G. Greer. 1998. Integrating microbial decontamination with organic acids in HACCP programmes for muscle foods: prospects and controversies. *Int. J. Food Microbiol.* 44:149-169.
- Sofos, J. N., and G. C. Smith. 1998. Nonacid meat decontamination technologies: model studies and commercial applications. *Int. J. Food Microbiol.* 44:171-188.
- Sørensen, L. L., L. Alban, B. Nielsen, and J. Dahl. 2004. The correlation between *Salmonella* serology and isolation of *Salmonella* in Danish pigs at slaughter. *Vet. Microbiol.* 101:131-141.
- Stathopoulou E., C. Genigeorgis, and C. Panoulis. 2003. *Salmonella enterica* in pork: Prevalence in the environment, carcasses and by-products in the slaughterhouse of a vertically integrated company (2001-2002). Proceedings of the 5th International Symposium on the Epidemiology and Control of *Salmonella* in Pork, Heraklion-Grete, Greece, 297-298.
- Steg, H., J. Christensen, J. P. Nielsen, D. L. Baggesen, C. Enoe, and P. Willeberg. 2000. Prevalence of subclinical *Salmonella enterica* infection in Danish finishing pig herds. *Prev. Vet. Med.* 44:175-188.
- Suh, D. K., and J. C. Song. 2005. Prevalence of *Lawsonia intracellularis*, *Brachyspira hyodysenteriae* and *Salmonella* in swine herds. *J. Vet. Sci.* 6:289-293.
- Swanenburg, M., H. A. Urlings, D. A. Keuzenkamp, and J. M. Snijders. 2001a. *Salmonella* in the lairage of pig slaughterhouses. *J. Food Prot.* 64:12-16.
- Swanenburg, M., H. A. Urlings, J. M. Snijders, D. A. Keuzenkamp, and F. van Knapen. 2001b. *Salmonella* in slaughter pigs: prevalence, serotypes and critical control points during slaughter in two slaughterhouses. *Int. J. Food Microbiol.* 70:243-254.
- Swanenburg, M., P. J. van der Wolf, H. A. Urlings, J. M. Snijders, and F. van Knapen. 2001c. *Salmonella* in slaughter pigs: the effect of logistic slaughter procedures of pigs on the prevalence of *Salmonella* in pork. *Int. J. Food Microbiol.* 70:231-242.
- Tenover, F. C., R. D. Arbeit, R. V. Goering, P. A. Mickelsen, B. E. Murray, D. H. Persing, and B. Swaminathan. 1995. Interpreting chromosomal DNA restriction patterns

- produced by pulsed-field gel electrophoresis: criteria for bacterial strain typing. J. Clin. Microbiol. 33:2233-2239.
- Thornton, H. 1974. So-called scalding-water lungs in slaughtered pigs. Vet. Rec. 94:72-73.
- Threlfall, E. J. 2002. Antimicrobial drug resistance in *Salmonella*: problems and perspectives in food- and water-borne infections. FEMS Microbiol. Rev. 26:141-148.
- Usera, M. A., A. Aladueña, R. Diaz, M. De la Fuente, P. Cerdán, R. Gutierrez, and A. Echeita. 2000a. Análisis de las cepas de *Salmonella* spp. aisladas de muestras clínicas de origen humano en España en el año 1999 (I). Bol. Epidemiol. Semanal (España) 8:45-48.
- Usera, M. A., A. Aladueña, R. Diaz, M. De la Fuente, P. Cerdán, R. Gutierrez, and A. Echeita. 2000b. Análisis de las cepas de *Salmonella* spp. aisladas de muestras clínicas de origen no humano en España en el año 1999. Bol. Epidemiol. Semanal (España) 8:133-144.
- Usera, M. A., A. Aladueña, R. Diaz, M. De la Fuente, P. Cerdán, R. Gutierrez, and A. Echeita. 2001a. Análisis de las cepas de *Salmonella* spp. aisladas de muestras clínicas de origen no humano en España en el año 2000. Bol. Epidemiol. Semanal (España) 9:281-288.
- Usera, M. A., A. Aladueña, R. Diaz, M. De la Fuente, P. Cerdán, M. Arroyo, R. González, R. Gutierrez, and A. Echeita. 2001b. Análisis de las cepas de *Salmonella* spp. aisladas de muestras clínicas de origen humano en España en el año 2000 (I). Bol. Epidemiol. Semanal (España) 9:221-224.
- Usera, M. A., A. Aladueña, R. Diaz, M. De la Fuente, P. Cerdán, R. Gutierrez, and A. Echeita. 2003. Análisis de las cepas de *Salmonella* spp. aisladas de muestras de origen humano en España en el año 2001. Bol. Epidemiol. Semanal (España) 11:133-144.
- Uyttendaele, M., K. Vanwildemeersch, and J. Debevere. 2003. Evaluation of real-time PCR vs automated ELISA and a conventional culture method using a semi-solid medium for detection of *Salmonella*. Lett. Appl. Microbiol. 37:386-391.
- Valdezate, S., M. Arroyo, R. González-Sanz, R. Díaz, A. Aladueña, P. Cerdán, R. Gutierrez, M. De la Fuente, M. A. Usera, and A. Echeita. 2003. Análisis de las cepas de

- Salmonella* spp. aisladas de muestras de origen no humano en España en el año 2002. Bol. Epidemiol. Semanal (España) 11:217-220.
- Van, I. F., V. Fievez, B. J. de, F. Pasmans, A. Martel, F. Haesebrouck, and R. Ducatelle. 2004. Microencapsulated short-chain fatty acids in feed modify colonization and invasion early after infection with *Salmonella enteritidis* in young chickens. Poul. Sci. 83:69-74.
- Van, I. F., F. Boyen, I. Gantois, L. Timbermont, L. Bohez, F. Pasmans, F. Haesebrouck, and R. Ducatelle. 2005. Supplementation of coated butyric acid in the feed reduces colonization and shedding of *Salmonella* in poultry. Poul. Sci. 84:1851-1856.
- van der Gaag, M., H. W. Saatkamp, and R. B. M. Huirne. 2001. Elicitation of expert knowledge on dynamics of *Salmonella* infections and contamination in the pork chain. Proceedings of the 4th International Symposium on the Epidemiology and Control of *Salmonella* in Pork, Leipzig, Germany, 259-261.
- van der Heijden, H. M. 2001. First international ring trial of ELISAs for *Salmonella*-antibody detection in swine. Berl. Munch. Tierarztl. Wochenschr. 114:389-392.
- van der Wolf, P. J., J. H. Bongers, A. R. Elbers, F. M. Franssen, W. A. Hunneman, A. C. van Exsel, and M. J. Tielen. 1999. *Salmonella* infections in finishing pigs in The Netherlands: bacteriological herd prevalence, serogroup and antibiotic resistance of isolates and risk factors for infection. Vet. Microbiol. 67:263-275.
- van der Wolf, P. J., W. B. Wolbers, A. R. Elbers, H. M. van der Heijden, J. M. Koppen, W. A. Hunneman, F. W. van Schie, and M. J. Tielen. 2001a. Herd level husbandry factors associated with the serological *Salmonella* prevalence in finishing pig herds in The Netherlands. Vet. Microbiol. 78 :205-219.
- van der Wolf, P. J., A. R. Elbers, H. M. van der Heijden, F. W. van Schie, W. A. Hunneman, and M. J. Tielen. 2001b. *Salmonella* seroprevalence at the population and herd level in pigs in The Netherlands. Vet. Microbiol. 80:171-184.
- van der Wolf, P. J., D. M. Lo Fo Wong, W. B. Wolbers, A. R. Elbers, H. M. van der Heijden, F. W. van Schie, W. A. Hunneman, P. Willeberg, and M. J. Tielen. 2001c. A longitudinal study of *Salmonella enterica* infections in high-and low-seroprevalence finishing swine herds in The Netherlands. Vet. Q. 23:116-121.

- van der Wolf, P. J., F. W. van Schie, A. R. Elbers, B. Engel, H. M. van der Heijden, W. A. Hunneman, and M. J. Tielen. 2001d. Administration of acidified drinking water to finishing pigs in order to prevent *Salmonella* infections. *Vet. Q.* 23:121-125.
- van Poucke, L. S. 1990. *Salmonella*-TEK, a rapid screening method for *Salmonella* species in food. *Appl. Environ. Microbiol.* 56:924-927.
- van Winsen, R. L., A. van Nes, D. Keuzenkamp, H. A. Urlings, L. J. Lipman, S. Biesterveld, J. M. Snijders, J. H. Verheijden, and F. van Knapen. 2001a. Monitoring of transmission of *Salmonella enterica* serovars in pigs using bacteriological and serological detection methods. *Vet. Microbiol.* 80:267-274.
- van Winsen R. L., L. J. Lipman, S. Biesterveld, B. Urlings, J. Snijders, and F. van Knapen. 2001b. Mechanism of *Salmonella* reduction in fermented pig feed. *J. Sc. Food Agric.* 81:342-346.
- van Winsen, R. L., D. Keuzenkamp, B. A. Urlings, L. J. Lipman, J. A. Snijders, J. H. Verheijden, and F. van Knapen. 2002. Effect of fermented feed on shedding of Enterobacteriaceae by fattening pigs. *Vet. Microbiol.* 87:267-276.
- Veldman, A., H. A. Vahl, G. J. Borggreve, and D. C. Fuller. 1995. A survey of the incidence of *Salmonella* species and Enterobacteriaceae in poultry feeds and feed components. *Vet. Rec.* 136:169-172.
- Vieira-Pinto, M., P. Temudo, and C. Martins. 2005. Occurrence of salmonella in the ileum, ileocolic lymph nodes, tonsils, mandibular lymph nodes and carcasses of pigs slaughtered for consumption. *J. Vet. Med. B Infect. Dis. Vet. Public Health* 52:476-481.
- Voogt, N., M. Raes, W. J. Wannet, A. M. Henken, and A. W. van de Giessen. 2001. Comparison of selective enrichment media for the detection of *Salmonella* in poultry faeces. *Lett. Appl. Microbiol.* 32:89-92.
- Ward, L. R., J. D. H. de Sa, and B. Rowe. 1987. A phage-typing scheme for *Salmonella enteritidis*. *Epidemiol. Infect.* 99:291-294.
- Warriss, P. D., S. N. Brown, J. E. Edwards, M. H. Anil, and D. P. Fordham. 1992. Time in lairage needed by pigs to recover from the stress of transport. *Vet. Rec.* 131:194-196.

- Wegener, H. C., and D. L. Baggesen. 1996. Investigation of an outbreak of human salmonellosis caused by *Salmonella enterica* ssp. *enterica* serovar Infantis by use of pulsed field gel electrophoresis. *Int. J. Food Microbiol.* 32:125-131.
- Wegener, H. C., T. Hald, D. M. A. Lo Fo Wong, M. Madsen, H. Korsgaard, and F. Bager. 2003. *Salmonella* control programs in Denmark. *Emerg. Infect. Dis.* 9:774-780.
- Whyte, P., G. K. Mc, J. D. Collins, and E. Gormley. 2002. The prevalence and PCR detection of *Salmonella* contamination in raw poultry. *Vet. Microbiol.* 89:53-60.
- Williams, H. 1960. The effect of feeding pigs on food naturally contaminated with salmonellae. *J. Hyg.* 58:381-389.
- Wilson, P. D., D. R. Wilson, T. F. Brocklehurst, H. P. Coleman, G. Mitchell, C. R. Waspe, S. A. Jukes, and M. M. Robins. 2003. Batch growth of *Salmonella typhimurium* LT2: stoichiometry and factors leading to cessation of growth. *Int. J. Food Microbiol.* 89:195-203.
- Wiuuff, C., B. M. Thorberg, A. Engvall, and P. Lind. 2002. Immunochemical analyses of serum antibodies from pig herds in a *Salmonella* non-endemic region. *Vet. Microbiol.* 85:69-82.
- Wonderling, L., R. Pearce, F. M. Wallace, J. E. Call, I. Feder, M. Tamplin, and J. B. Luchansky. 2003. Use of pulsed-field gel electrophoresis to characterize the heterogeneity and clonality of *Salmonella* isolates obtained from the carcasses and feces of swine at slaughter. *Appl. Environ. Microbiol.* 69:4177-4182.
- Wondra, K. J., J. D. Hancock, K. C. Behnke, R. H. Hines, and C. R. Stark. 1995. Effects of particle size and pelleting on growth performance, nutrient digestibility, and stomach morphology in finishing pigs. *J. Anim. Sci.* 73:757-763.
- Wood, R. L., A. Pospischil, and R. Rose. 1989. Distribution of persistent *Salmonella typhimurium* infection in internal organs of swine. *Am. J. Vet. Res.* 50:1015-1117.
- Yu, S. L., D. Bolton, C. Laubach, P. Kline, A. Oser, and S. A. Palumbo. 1999. Effect of dehairing operations on microbiological quality of swine carcasses. *J. Food Prot.* 62:1478-1481.
- Yu, S. L., P. H. Cooke, and S. I. Tu. 2001. Effects of chilling on sampling of bacteria attached to swine carcasses. *Lett. Appl. Microbiol.* 32:205-210.

Zhao, C., B. Ge, J. De Villena, R. Sudler, E. Yeh, S. Zhao, D. G. White, D. Wagner, and J. Meng. 2001. Prevalence of *Campylobacter* spp., *Escherichia coli*, and *Salmonella* serovars in retail chicken, turkey, pork, and beef from the Greater Washington, D.C., area. *Appl. Environ. Microbiol.* 67:5431-5436.

Zottola, E. A., and K. C. Sasahara. 1994. Microbial biofilms in the food processing industry--should they be a concern? *Int. J. Food Microbiol.* 23:125-148.

ANNEX

Annex I. Monitorització de la salmonel·losi porcina a nivell europeu

Els primers països en iniciar algun tipus de programa de monitorització i vigilància de *Salmonella* en la producció animal van ser els països nòrdics (Noruega, Suècia i Finlàndia), seguits per Dinamarca i posteriorment, el Regne Unit i Irlanda. A data d'avui, aquests són els únics països europeus on estrictament parlant s'està portant a terme un pla de control de la salmonel·losi porcina. Paral·lelament, a Holanda i a Alemanya s'estan aplicant programes de monitorització previs a la implementació d'un futur pla nacional de control i pel que fa a la resta de països europeus, diferents programes de monitorització regionals o estudis pilot s'han organitzat a Àustria i a Bèlgica.

Respecte a la situació d'Espanya, i segons la cronologia marcada pel Reglament CE núm. 2160/2003, sobre el control de la salmonel·la i altres agents zoonòtics específics transmesos pels aliments, en aquests moments es troba en marxa l'estudi nacional de prevalença de *Salmonella* en el porcí d'engreix. Aquest estudi, que consisteix en la presa de mostres de ganglis limfàtics mesentèrics a l'escorxador, va iniciar-se l'1 d'octubre de 2006 i tindrà una durada d'un any (Decisió de la Comissió núm. 2006/668/CE, de 29 de setembre de 2006). Posteriorment, i una vegada fixat un objectiu comunitari de reducció, es preveu que cap a finals de l'any 2009 o a inicis del 2010 s'iniciï un programa nacional de control.

A les Taules I.1 i I.2 es detallen els trets principals dels diferents programes de monitorització i/o vigilància de la salmonel·losi porcina que actualment s'estan portant a terme a Europa. En general, la majoria d'aquests programes segueixen un esquema similar. En primer lloc es classifiquen les explotacions segons el seu nivell de seroprevalença en tres categories (de menor a major: 1, 2 i 3) i posteriorment, s'apliquen una sèrie de mesures de control en aquelles granges amb una major seroprevalença (categories 2 i 3). En alguns dels països s'inclou a més, una ordenació dels sacrificis a l'escorxador en un procés conegut com a sacrifici logístic. Aquest és el cas de Dinamarca i d'Irlanda, on els animals procedents de les granges de nivell 3 són sacrificats per separat dels altres, ja sigui en escorxadors especials o, en el cas de compartir escorxador, en dies determinats o al final de la jornada de treball. El

processat d'aquestes canals també es realitza sota estrictes pautes d'higiene i amb la incorporació de pràctiques especials, com per exemple, la no participació del cap i el tractament de les canals amb aigua a 80°C durant 15 segons a Dinamarca o l'obligatorietat de tractar la carn de la zona del cap i els menuts a Irlanda.

A més a més, tant a Dinamarca com al Regne Unit i Irlanda, a les canals procedents de les granges amb un major nivell de seroprevalença se'ls hi aplica una deducció del seu valor a l'escorxador. A continuació es detalla el sistema de penalitzacions aplicat conjunt a cada país:

- A Dinamarca, les canals d'animals procedents de granges de nivell 2 reben una penalització del 2% del seu valor i les de nivell 3, la deducció és del 4% el primer mig any que encara es mantinguin dins el nivell 3, del 6% el segon mig any i del 8% el tercer mig any.
- El Regne Unit exclou del seu programa de qualitat (ZAP Salmonella Programme) aquelles granges que es mantinguin dins el nivell 3 durant un període consecutiu superior als 11 mesos o en el nivell 2 durant més de 17 mesos seguits.
- A Irlanda, els porcs de les granges de nivell 3 reben un certificat de categoria "no vàlid" i això significa que no es pot vendre per consum en fresc la carn del cap ni els menuts procedent d'aquests animals, excepte que estigui tractada. A més a més, l'origen de tots els garrins introduïts en una granja ha de ser d'explotacions de nivell 1.

Taula I.1. Principals característiques dels programes de monitorització i vigilància de la salmonel·losi porcina a nivell europeu

País	Data inici	Obligatori/ Voluntari (Penalització)	Iniciativa	Fases incloses	Tipus de monitorització	Material	Nº mostres granja/ període	Classificació segons seroprevalença	
								Càlculs	Categories
SUÈCIA (NORUEGA I FINLÀNDIA)*	1960	Obligatori (sí)	Pública	Selecció	Bacteriològica	GLI	6.000 / any	ND	ND
				Multiplicació		Femtes	>13.000		
				Engreix		Hisops canals	6.000 / any		
DINAMARCA	1995	Obligatori (sí)	Privada	Selecció	Serològica	Sang	10 / mes	Index (SI) ⁵ resultats darrers 3 mesos	1 (SI <40) 2 (SI 40-69) 3 (SI ≥70)
				Multiplicació	(DO%>20) ¹	(femtes) ²			
				Engreix	Serològica (DO%>20) ¹	Suc de carn (femtes) ³	60-100 / any ⁴		
						Hisops canals	5 canals / dia per escorxador		
				Garrins (destinats a granges 2 i 3)	Bacteriològica	Femtes	20 / any		
REGNE UNIT	2002	Voluntari ⁶ (sí)	Privada	Engreix	Serològica (S/P Ratio>0,25) ⁷	Suc de carn	15 / 3 mesos (3 per partida)	Mitjana resultats darrers 3 mesos	1 (<65%) 2 (65%-85%) 3 (≥85%)

Nº: Número; GLI: Ganglis Limfàtics Ileoceals; ND: No Determinat; DO: Densitat Òptica

* Noruega i Finlàndia tenen un programa similar, tot i que alguns detalls poden variar com per exemple, el número total de mostres.

¹ Fins a l'any 2001 s'utilitzà DO%>40. ² Quan l'índex de *Salmonella* (SI) ≥5 es recullen femtes dels corrals. ³ Es recullen femtes dels corrals de les explotacions de nivells 2 i 3.

⁴ Segons la quantitat d'animals que enviïn anualment a l'escorxador: 200-2.000 porcs (60 / any); 2.001-5.000 porcs (75 / any); > 5.001 porcs (100 / any).

⁵ Càlcul Índex de *Salmonella* (SI): mitjana ponderada dels resultats últims 3 mesos (3er. mes - 2on. mes - 1er. mes més recent). Ponderació granges selecció i multiplicació: (0,5 - 1,5 - 3). Ponderació engreixos: (1 - 1 - 3). ⁶ Voluntari, tanmateix obligatori si es forma part del seu programa d'Assegurament de Qualitat (ZAP *Salmonella* Programme) que cobreix el 90% de la producció nacional. ⁷ S/P Ratio (Sample to Positive Ratio)= DO mostra - DO control negatiu / DO control positiu - DO control negatiu.

Taula I.2. Principals característiques dels programes de monitorització i vigilància de la salmonel·losi porcina a nivell europeu

País	Data inici	Obligatori/ Voluntari (Penalització)	Iniciativa	Fases incloses	Tipus de monitorització	Material	Nº mostres granja / període	Classificació segons seroprevalença	
								Càlculs	Categories
IRLANDA	2003	Obligatori (sí)	Pública	Engreix	Serològica (S/P Ratio>0,25) ⁷	Suc de carn	24 / 4 mesos (72 / any)	Index ⁸ resultats darrers 12 mesos	1 (≤10) 2 (10-49) 3 (≥50)
ALEMANYA	2002	Voluntari ⁹ (no)	Privada	Engreix	Serològica (DO%>40)	Suc de carn	60 / any	Mitjana últims 60 resultats	1 (<20%) 2 (≥20%-<40%) 3 (≥40%)
HOLANDA	2005	Obligatori (no)	Privada	Engreix	Serològica (DO%>40)	Sang	12 / 4 mesos (36 / any)	Mitjana últims 36 resultats	per determinar
BÈLGICA	2005	Voluntari (no)	Pública	Engreix Selecció	Serològica (DO%>40)	Sang	12 / 4 mesos (36 / any)	per determinar	per determinar

DO:Densitat Òptica

⁷ S/P Ratio (Sample to Positive Ratio)= DO mostra - DO control negatiu / DO control positiu - DO control negatiu.

⁸ Càlcul índex de *Salmonella*: mitjana ponderada dels resultats últims 3 períodes de 4 mesos (3er. període - 2on. període - 1er. període més recent): (0,2 - 0,3 - 0,5).

⁹ Voluntari, tanmateix obligatori si es forma part del seu programa d'Assegurament de Qualitat (QS) que cobreix el 70%-75% de la producció nacional.

FONTS BIBLIOGRÀFIQUES:

Suècia: Anònim. The Swedish *Salmonella* control programmes for live animals, eggs and meat. January 1995. National Veterinary Institute, Swedish Board of Agriculture, National Food Administration.

Dinamarca: Sørensen, L., Comunicació personal. 2006. Danish Meat Association.

Regne Unit: Anònim. April 2002. ZAP *Salmonella* programme, Meat and Livestock Commission.

Irlanda: Blaha, T., Comunicació personal. 2006.

Alemanya: Anònim. September 2005. *Salmonella* monitoring and reducing program for pig meat production, QS Guideline.

Holanda: van der Wolf, P., Comunicació personal. 2006. GD Animal Health Service.

Bèlgica: Daems, A. 2005. The Belgian *Salmonella* Surveillance Programme 2005. Proceedings of the 6th International Symposium on the Epidemiology and Control of Foodborne Pathogens in Pork, California, USA, 12-13.

Annex II. Enquesta "salmonel·losi en explotacions porcines d'engreix"

Data de realització de l'enquesta: ___/___/___

Enquesta núm. ____

DADES GENERALS DE LA GRANJA

- Nom de l'explotació: _____ Responsable de la granja: _____
- Població: _____ Comarca: _____
- Veterinari: _____ Telèfon: _____
- Nombre de **persones** que treballen a la granja: _____
- Tenen algun altre tipus de bestiar dins l'explotació?
 No **Sí** Quin? _____

GRANDÀRIA DE LA GRANJA

- Núm. de places d'**engreix**: _____

INSTAL·LACIONS

Engreix	
Terra de la nau	<input type="checkbox"/> Slat/Ciment <input type="checkbox"/> Ciment <input type="checkbox"/> Palla <input type="checkbox"/> Altres, Quin?-----
Tipus de ventilació	<input type="checkbox"/> Forçada <input type="checkbox"/> Natural <input type="checkbox"/> Mixta
Densitat d'animals	Animals/Corral _____ m2 / Corral _____
Particions entre corrals	<input type="checkbox"/> Murs <input type="checkbox"/> Barrots <input type="checkbox"/> Altres. Quina?-----
Disposen de pati?	<input type="checkbox"/> Sí <input type="checkbox"/> No
Abeurador dins menjadora	<input type="checkbox"/> Sí <input type="checkbox"/> No
El pinso es dispensa de forma:	<input type="checkbox"/> Automàtica <input type="checkbox"/> Manual. Com? _____
La menjadora dels animals és de:	<input type="checkbox"/> Metall <input type="checkbox"/> Fusta <input type="checkbox"/> Plàstic <input type="checkbox"/> Altres. Quin? _____

Pel que fa als treballadors:

- Disposen de vestidors ?
 - Sí** tenen: Dutxa Rentamans Roba de recanvi Botes netes
 - Altres, Què? _____
 - No**

PRODUCCIÓ

- Quin és el percentatge habitual de mortalitat en: **Engreix** _____
- Sistema de producció:
 - Complet** **Fase 2** Núm. d'origens _____ **Fase 3** Núm. d'origens _____
 - Flux continu** ó **Tot dins, tot fora**

ALIMENTACIÓ

- El pinso utilitzat és:
 - d'origen comercial
 - d'elaboració pròpia, o preparat especialment per a nosaltres (empresa)
 - mixta -comercial i altres- (especificar) _____
- Les farines que el componen contenen:
 - Carn** **Peix**
- D'on prové l'aigua de beguda? _____
- Fan cloració de l'aigua? **Sí** : Quin sistema de cloració utilitzen? _____
_____ **No**
- Cada quan verifiquen la potabilitat de l'aigua? _____

NETEJA

Engreix	
Freqüència de neteja	
Freqüència de desinfecció	

- Quin sistema utilitzen per netejar?
 - Aigua a pressió calenta
 - Aigua a pressió freda
 - Raspall
 - Altres (especificar) _____
- Quin tipus de desinfectant fan servir (*pot utilitzar-ne el nom comercial*)? _____

- Fossa de purins: **Fossa única** **Fosses múltiples**
- El drenatge dels purins és a cel obert? **Sí** **No**

ALTRES ANIMALS

- Tenen mesures per a evitar l'entrada d'ocells a la nau? **Sí** Quines? _____
 No _____
- Realitzen plans de desratització? **Sí** Quins? _____
 En cas de raticida, quins ha utilitzat? _____
 No
- Altres animals a la granja:
 - gossos
 - gats
 - altres (especificar) _____
- Han patit anteriorment algun brot de salmonel·losi?
 - Sí** Quan de temps fa? _____
 Com es va diagnosticar? _____
 Quin tractament van usar per controlar-ho? _____
 I per quina via es va aplicar? **Pinso** **Aigua** **Injectable**
 - No**

TRACTAMENTS DE RUTINA

- Quins promotors de creixement conté l'aliment? _____
- Utilitzen pinso medicat de forma rutinària?
 - Sí** A quines edats? _____ Durant quant de temps? _____
 - No**
- Si utilitza pinso medicat, quins són els medicaments habituals que afegeixen al pinso: (Faci una descripció dels tractament rutinaris (temps, dosificació, etc.) que fa servir; *pot utilitzar-ne el nom comercial*)?
 - Deslletament: _____
 - Engreix: _____
 - Altres fases: _____

- Quan a la granja hi ha un problema respiratori quina medicació utilitza?:
 - a) Individualment: _____
 - b) En grup: _____
 Pinso **Aigua** **Injectable** **Altres** Quines? _____
- Quan a la granja hi ha un problema digestiu quina medicació utilitza?:
 - a) Individualment: _____
 - b) En grup: _____
 Pinso **Aigua** **Injectable** **Altres** Quines? _____
- Quin és el seu tractament d'elecció per problemes d'artritis? _____
 Com l'aplica? _____
 Pinso **Aigua** **Injectable** **Altres**

- Quin medicament sol usar per problemes de meningitis?
Com l'aplica?
Pinso Aigua Injectable Altres

PROTOCOL DE TREBALL

Faci una breu descripció de la seva rutina de treball diària:
