

**UNIVERSIDAD DE CÓRDOBA
FACULTAD DE VETERINARIA**

DEPARTAMENTO DE SANIDAD ANIMAL

ESTUDIO DE EVALUACIÓN Y MEJORA DE LA SANIDAD Y SEGURIDAD

ALIMENTARIA DEL GANADO PORCINO IBÉRICO

- SEGUIMIENTO DE *SALMONELLA* EN LA CADENA DE PRODUCCIÓN -

Manuela Hernández García

Tesis Doctoral

Córdoba, 22 de Noviembre de 2013

TITULO: *Estudio de evaluación y mejora de la sanidad y seguridad alimentaria del ganado porcino ibérico -seguimiento de salmonella en la cadena de producción-*

AUTOR: *Manuela Hernández García*

© Edita: Servicio de Publicaciones de la Universidad de Córdoba. 2013
Campus de Rabanales
Ctra. Nacional IV, Km. 396 A
14071 Córdoba

www.uco.es/publicaciones
publicaciones@uco.es

La realización de los estudios incluidos en esta Tesis Doctoral ha sido posible gracias al proyecto “SANIBERICO: Evaluación y mejora de la sanidad y seguridad alimentaria del cerdo ibérico” cofinanciado por la Corporación Tecnológica de Andalucía (referencia 08/222) y el Centro para el Desarrollo Tecnológico Industrial (CDTI; referencia IDI-20090414).

UNIVERSIDAD DE CÓRDOBA
FACULTAD DE VETERINARIA



ESTUDIO DE EVALUACIÓN Y MEJORA DE LA SANIDAD Y SEGURIDAD

ALIMENTARIA DEL GANADO PORCINO IBÉRICO

- SEGUIMIENTO DE *SALMONELLA* EN LA CADENA DE PRODUCCIÓN -

**Tesis presentada por la Licenciada en Veterinaria Dña. Manuela Hernández García
para optar al Grado de Doctor por la Universidad de Córdoba**

**Departamento de Sanidad Animal
Córdoba, 22 de Noviembre de 2013**



TÍTULO DE LA TESIS: Estudio de evaluación y mejora de la sanidad y seguridad alimentaria del ganado porcino ibérico - Seguimiento de *Salmonella* en la cadena de producción -

DOCTORANDO/A: Manuela Hernández García

INFORME RAZONADO DEL/DE LOS DIRECTOR/ES DE LA TESIS

(se hará mención a la evolución y desarrollo de la tesis, así como a trabajos y publicaciones derivados de la misma).

El trabajo presentado por la doctoranda Dña. Manuela Hernández García, Licenciada en Veterinaria, reúne las condiciones y calidad científica necesarias para optar al Grado de Doctor en Veterinaria. Fruto del trabajo desarrollado por la doctoranda se han publicado tres artículos en revistas indexadas en el Journal of Citation Reports, pertenecientes al primer cuartil, que constituyen el cuerpo de esta Tesis Doctoral. Asimismo, a partir del trabajo desarrollado por la doctoranda se han publicado diferentes artículos de divulgación y numerosas comunicaciones a congresos de ámbito nacional e internacional.

Esta Tesis Doctoral está enfocada en la evaluación de la sanidad y seguridad alimentaria en el cerdo ibérico, con especial atención al caso de *Salmonella* spp. Estos estudios se consideran de gran trascendencia tanto para el sector del porcino ibérico, ya que sientan una base científica a partir de la cual se pueden mejorar distintos aspectos de la sanidad y seguridad alimentaria en este ganado, como para el sector del porcino a nivel mundial, ya que puede utilizarse como modelo de sistemas de explotación más respetuosos con el bienestar animal, como son los sistemas extensivos o ecológicos.

Por todo ello, se autoriza la presentación de la tesis doctoral.

Córdoba, 15 de Octubre de 2013

Firma del/de los director/es

Fdo.: Rafael J. Astorga Márquez

Fdo.: Jaime Gómez-Laguna

La vida está llena de obstáculos; de mayor o menor dificultad pero todos tienen en común que deben superarse, te caerás y te levantarás y continuarás al siguiente, pararse o lamentarse solo alargan el tiempo de recuperación, la superación nos hace fuerte y nos dota de herramientas para continuar, la vida es maravillosa y hay que vivirla, recordad que no estáis solos y que siempre nos acompañan los que se van ...

(Teresa Domínguez Pérez, 2013)

Esta tesis está dedicada a esas mujeres fuertes, madres coraje que me acompañan y son mi fuente de energía: mis abuelas Manuela Sola Narváez, Luisa Borlan Narváez y mi bisabuela

Manuela Narváez,...

ÍNDICE

| | |
|---|-----|
| 1. INTRODUCCIÓN | 9 |
| 2. OBJETIVOS..... | 33 |
| 3. ESTUDIOS..... | 37 |
| 4. CONCLUSIONES | 85 |
| 5. RESUMEN | 89 |
| 7. ANEXO: PERSPECTIVAS, ENFOQUE FUTURO..... | 101 |
| 8. OTRAS APORTACIONES CIENTIFICAS | 111 |
| 9. INDICIOS DE CALIDAD (FACTOR DE IMPACTO)..... | 115 |
| 10. AGRADECIMIENTOS | 119 |

1. INTRODUCCIÓN

- Aproximación al sistema de producción del cerdo ibérico.
- Situación actual de la producción porcina: el papel del cerdo ibérico en la producción porcina española
- Mercado internacional de la producción porcina española
- Sanidad Animal y Seguridad Alimentaria en el cerdo ibérico
- *Salmonella* y Salmonelosis.

APROXIMACIÓN AL SISTEMA DE PRODUCCIÓN DEL CERDO IBÉRICO

La producción del cerdo ibérico en pureza está ligada a la dehesa mediante un régimen de explotación en extensivo, basada en un largo periodo de crianza, y un aprovechamiento de los recursos naturales durante al menos un periodo de dos meses. Este sistema de explotación le permite a los animales gozar de un alto estatus de bienestar animal a costa de descuidar las medidas de bioseguridad, ya que es frecuente el contacto con otras especies animales, tanto domésticas (p.e. ganado vacuno u ovino) como silvestres (p.e. ciervos, jabalíes, aves silvestres), lo que facilita la circulación y transmisión de diferentes patógenos entre estas especies animales (Funk y Gebreyes, 2004; Astorga et al., 2010).

El cerdo Ibérico se sacrifica de forma tradicional a pesos elevados y con una edad mínima entorno a los 12 meses (López-Bote et al., 2000). El ciclo productivo del cerdo ibérico abarca los periodos de cría, crecimiento y cebo. En este ciclo desempeña un papel primordial la época de parto de las cerdas, ya que esto va a condicionar el tipo de cebo al que serán destinados los animales durante el periodo de engorde. En las explotaciones se diseña un adecuado calendario de cubriciones para asegurar tres parideras al año (partos en diciembre, en marzo y en junio) (Ventanas, 2001), lo que generan los 4 tipos de alimentación en los que se han comercializado hasta ahora los productos derivados del cerdo ibérico (según Real Decreto 1469/2007, de 2 de noviembre, por el que se aprueba la norma de calidad para la carne, el jamón, la paleta y la caña de lomos ibéricos).

Tabla 1. Diagrama del ciclo productivo del cerdo ibérico en función del momento de las parideras.

| FASE | PARTOS | CRIO | CRECIMIENTO | CEBO |
|----------------------|------------|------------|------------------|-------------|
| Montanera | jun-agosto | sept-enero | feb-nov | dic-marzo |
| Recebo | sept-dic | dic-marzo | abril-dic | enero-mayo |
| Cebo en campo | marzo-mayo | junio-sept | octubre- febrero | marzo-junio |
| Peso (kg) | 15 | 55 | 100 | 150 |
| Edad (meses) | 2 | 7 | 12 | 14 |

De acuerdo con el RD 1469/2007, en función de la alimentación suministrada al animal en el periodo inmediatamente anterior al sacrificio se distinguen las siguientes clasificaciones:

1. De bellota o terminado en montanera: animales que se destinan al sacrificio inmediatamente después del aprovechamiento exclusivo de bellotas, hierba y demás recursos naturales de la dehesa. Estos animales entran en montanera con 8-12 meses y un peso medio comprendido entre 92 y 115 kg, permaneciendo un mínimo de dos meses en montanera con una puesta de peso de al menos 46 kg. Estos animales se producen en otoño-invierno y se sacrifican durante los tres primeros meses del año.
2. De recebo o terminado en recebo: animales que después de reponer un mínimo de peso en montanera su cebo es completado mediante el aporte de piensos para alcanzar el peso adecuado para el su sacrificio. Al menos un 30% de la alimentación ha tenido que ser en montanera. Se corresponde con los animales sacrificados en primavera a partir del mes de marzo.
3. De cebo de campo: animales que completan su alimentación mediante una estancia mínima en campo, previa a su sacrificio, de 60 días, durante la cual también recibirán una alimentación a base de pienso. Suelen sacrificarse antes de la montanera si empieza la otoñada o al inicio del verano.
4. De cebo: animales cuya alimentación hasta alcanzar el peso de sacrificio se basa en pienso y que presenta una edad mínima al sacrificio de 10 meses. Normalmente, se corresponde con animales explotados en regímenes intensivos.

SITUACIÓN ACTUAL DE LA PRODUCCIÓN PORCINA: EL PAPEL DEL CERDO IBÉRICO EN LA PRODUCCIÓN PORCINA ESPAÑOLA

Actualmente China representa la mitad de la producción porcina mundial, seguida de los 27 Estados miembro de la Unión Europea (UE-27), Estados Unidos (EEUU) y Brasil. La producción en la UE-27 es de 152 millones de cerdos y de unos 23 millones de toneladas de peso en canal lo

que la convierten en el segundo mayor productor de carne de cerdo del mundo, después de China, y también en el mayor exportador. De este modo, la UE tiene una autosuficiencia de alrededor del 110%, y exporta alrededor del 12% de su producción total de porcino. Los principales destinos de exportación son Rusia y el este de Asia, en particular China¹.

Dentro de la UE, los principales países productores son por orden de importancia Alemania, España y Francia, que de manera conjunta representan la mitad del total de sacrificios de porcino de la UE¹. España ocupa el segundo puesto en cuanto a número de cabezas de porcino se refiere (con más de 25 millones de cabezas), así como en cuanto a la producción de carne de porcino (con más de 3 millones de toneladas de carne), siendo sólo superado por Alemania en ambos aspectos (Marquer, 2010). En este sentido, desde una perspectiva global, debe tenerse en cuenta que España ocupa una posición preferente en la producción porcina internacional, siendo la cuarta productora mundial, sólo por detrás de China y EEUU, fuera de Europa, y por detrás de Alemania, dentro de la UE.

Dentro del sector cárnico español la carne de cerdo es la más importante, representando cerca del 60% de la producción cárnica nacional, con un crecimiento sostenido y positivo en la última década, con la excepción de 2009. Según los resultados de la encuesta de ganado porcino de la Secretaría General de Estadística del Ministerio de Agricultura, Alimentación y Medio Ambiente (MAGRAMA) de mayo de 2012 las regiones de Cataluña, Aragón y Castilla y León concentran (de mayor a menor número de cabezas) la mayor parte de la cabaña porcina nacional (entorno al 67%). En cuanto a número de cabezas le siguen las comunidades de Murcia, Castilla-La Mancha y Andalucía, que representan entorno al 20% del censo porcino nacional (Diéguez, 2013) (Fig. 1).

¹ http://ec.europa.eu/agriculture/pigmeat/index_en.htm

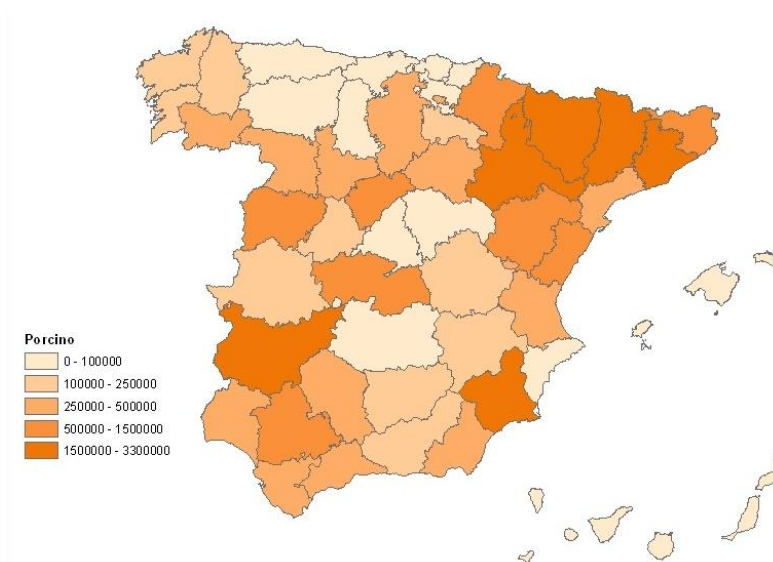


Fig. 1. Concentración de la producción total de ganado porcino en España acorde al número de cabezas sacrificadas (Fuente: adaptada a partir de datos del MAGRAMA).

Se estima que el 10% de la producción nacional, aproximadamente 2.500.000 de cabezas, corresponde a un sistema extensivo, es decir, a producción de cerdo ibérico en la dehesa. Como se muestra en el mapa las explotaciones de ganado porcino ibérico se encuentran concentradas en la zona suroeste de la geografía nacional coincidiendo con las áreas de dehesa (Fig. 2).

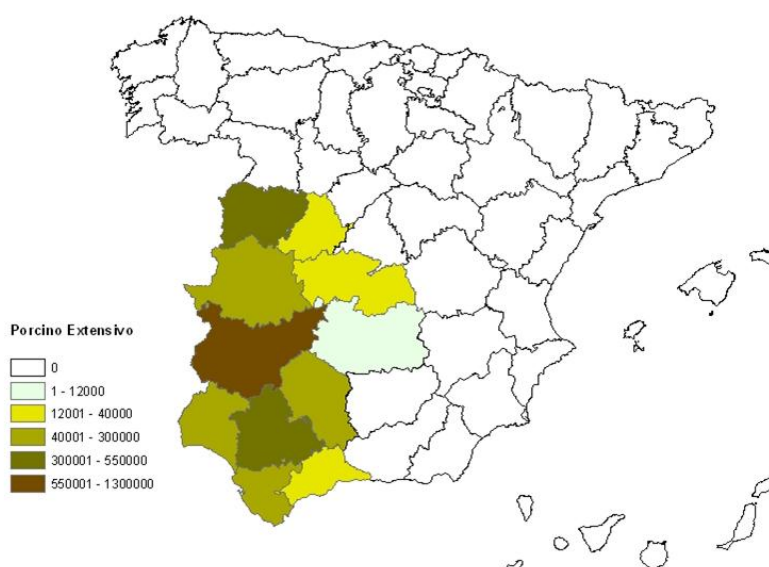


Fig. 2. Concentración de las explotaciones ganaderas dedicadas a la producción de ganado porcino ibérico en España (Fuente: adaptada a partir de datos del MAGRAMA).

De este modo, el ganado de porcino ibérico en España se concentra en las comunidades autónomas de Extremadura, Andalucía y Castilla y León, y en menor medida en Castilla-La Mancha.

Mientras que Castilla y León está a la cabeza en la producción y comercialización de cerdo ibérico, principalmente asociado a la comercialización de cerdo ibérico cruzado de cebo (781.016 canales), Andalucía lidera la producción de cerdos ibéricos puros de bellota (60.835 canales) (Diéguez, 2013). No obstante, no hay que olvidar que la producción de porcino ibérico ha sufrido una drástica disminución en los últimos cinco años asociada a la crisis económica global, la crisis del precio de las materias primas, y en el caso del ibérico puro, la competencia con el ibérico cruzado de cebo, lo que ha hecho que hayan disminuido de manera significativa los precios de los productos derivados del ibérico en este periodo (Fig. 3).

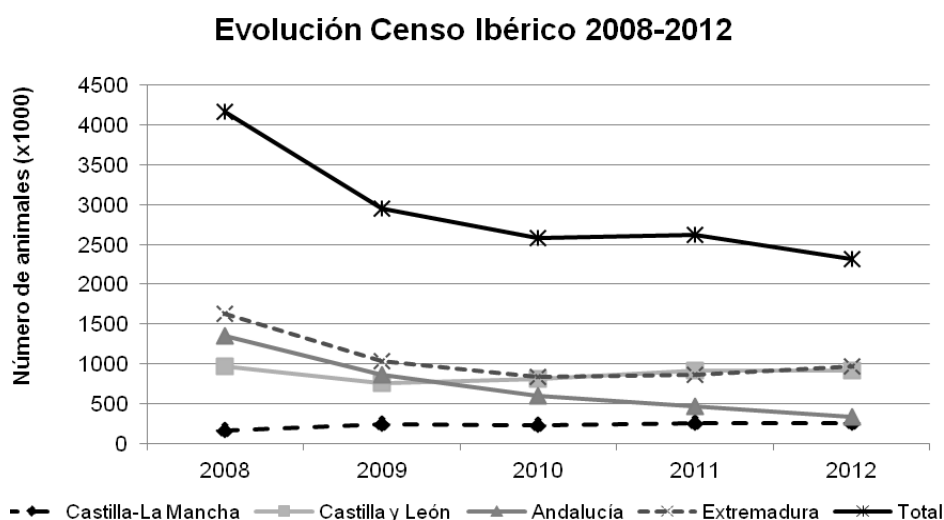


Fig. 3. Evolución del censo del ganado porcino ibérico en España durante los años 2008 a 2012 (Fuente: Datos obtenidos del RIBER². Elaboración propia).

MERCADO INTERNACIONAL DE LA PRODUCCIÓN PORCINA ESPAÑOLA

Según el informe Líneas Estratégicas para la Internacionalización del Sector Agroalimentario (MAGRAMA, 2013) el sector cárnico es el primer sector exportador de la industria alimentaria española, habiéndose incrementado las exportaciones españolas en un

² <http://www.magrama.gob.es/es/alimentacion/temas/calidad-agroalimentaria/calidad-comercial/mesa-del-iberico/riber-publico/buscador-censo-de-animales/>

170% en valor y en un 143% en volumen entre los años 2000-2011. Dentro del sector cárnico, la partida de carne de porcino es la que tiene más peso con una tasa de autoabastecimiento del 140% (MAGRAMA, 2013), siendo España el cuarto productor de carne de porcino a nivel mundial y el segundo a nivel de la UE-27 (Marquer, 2010).

La producción cárnica porcina está bien posicionada en la exportación en lo que se refiere a productos de alta calidad (*delicatesen* o *gourmet*) con un mercado europeo asentado y que comienza a abrir sus fronteras fuera de la UE. Las exportaciones de estos productos de calidad representan el 32% del conjunto del mercado exterior español, y se encuentran reforzadas por la agrupación de los industriales bajo denominaciones de calidad específicas, como las Denominaciones de Origen Protegidas (DOPs) y las Especialidades Tradicionales Garantizadas (ETGs) a las que pertenecen el 47% de los productores. Entre el 75 y el 85% del valor de las exportaciones tiene como destino la UE-27, estando en auge las exportaciones a otros países como Rusia, China, Japón, Corea del Sur, Polonia, EEUU, México y/o Brasil (MAGRAMA, 2013).

Estas grandes economías fuera de las fronteras de la Unión Europea, como EEUU, Japón y China, son destinos emergentes para las exportaciones de los productos del cerdo ibérico. No obstante, es importante que la industria del ibérico tenga en cuenta una serie de condicionantes como la diferente cultura de consumo, las barreras comerciales (p.e. sanitarias, arancelarias, etc.) o las limitaciones por mayores exigencias reglamentarias que las establecidas en la normativa europea (p.e. documentación exigida, reconocimiento exclusivo a una serie de establecimientos de elaboración, certificados sanitarios, etc.) para que consiga consolidar sus exportaciones en el mercado exterior.

Actualmente existe una preocupación creciente del consumidor por aspectos como el bienestar animal o la seguridad alimentaria, áreas en las que es necesario un mayor grado de tecnificación y profesionalización de la industria porcina, y en especial del sector del cerdo ibérico, tanto para conocer mejor las cualidades de sus productos como para responder a estas demandas de los consumidores, lo que contribuiría a la expansión de su mercado tanto a nivel nacional como internacional.

SANIDAD ANIMAL Y SEGURIDAD ALIMENTARIA EN EL CERDO IBÉRICO

La explotación del ganado porcino ibérico en el ecosistema de la dehesa, donde se realiza la montanera, condiciona que los animales se vean expuestos continuamente a múltiples factores ambientales que favorecen la diseminación de patógenos, y sobre los cuales no resulta fácil actuar (Astorga et al., 2010). En este tipo de producción extensiva (o semiextensiva en algunos casos) tiene mucha influencia el estrecho contacto de los animales entre sí, con el medio y con otras especies animales, siendo frecuente la presencia de roedores, animales peridomésticos e incluso animales salvajes (jabalíes, zorros, aves silvestres) en los alrededores, que juegan un importante papel en la epidemiología de diferentes patógenos como *Salmonella* spp., *Campylobacter* spp., *Brucella* spp., Aujeszky, Peste Porcina Clásica (PPC), Peste Porcina Africana (PPA), Tuberculosis, etc. (Astorga et al., 2010).

Muchas de estas enfermedades, que tienen carácter zoonótico, pueden cursar de forma inaparente o subclínica en los animales teniendo sin embargo una importante repercusión en los ámbitos de la salud pública, por lo que es muy importante conocer la situación actual de infección frente a alguno de estos patógenos y los factores de riesgo o puntos críticos asociados a estas enfermedades en todos y cada uno de los distintos eslabones de la cadena, así como la interrelación existente entre estas diferentes fases mediante la coordinación de una serie de acciones en las explotaciones animales, el matadero y la industria cárnica.

Como objetivo sanitario de primera necesidad, las explotaciones de cerdo ibérico deberían de aspirar a ser libres de las enfermedades de declaración obligatoria (p.e. enfermedad de Aujeszky), así como a controlar de manera eficaz otras patologías de mayor impacto en el ganado porcino ibérico (p.e. *Pasteurella multocida*, PCV2, *Erysipelothrix rhusiopathiae*, *Ascaris suum*). Este hecho diferenciador supondría un grado de excelencia sanitaria en este ganado.

Los planes de mejora de la sanidad animal y de la seguridad alimentaria del cerdo ibérico, en todas sus variedades de explotación (bellota, recebo, cebo en campo o cebo), deberían contar con una serie de medidas fundamentales de actuación (Astorga et al., 2010).

❖ En el ámbito de la Sanidad Animal:

1. Detección de las patologías más frecuentes y de los déficits de producción en las explotaciones de cerdo ibérico.
2. Elaboración y planificación de programas sanitarios de medicina preventiva que garanticen el estatus sanitario y la rentabilidad ganadera.
3. Implementación de medidas de bioseguridad, así como protocolos de verificación de estas medidas, acordes con los distintos tipos de explotación ganadera del cerdo ibérico, que optimicen los resultados a medio-largo plazo.
4. Creación de núcleos de ganado selecto para la obtención de reproductoras en los distintos niveles de explotación (reposición controlada y certificada).

❖ En el ámbito de la Salud pública:

1. Determinar la prevalencia de zoonosis de especial interés para la salud pública (p.e. salmonelosis, listeriosis, tuberculosis, brucelosis, campilobacteriosis, triquinelosis, toxoplasmosis, echinococosis, cisticercosis), evaluando su presencia y difusión en la cabaña de cerdo ibérico.
2. Establecer las bases para el diseño de programas de mejora de la sanidad animal y de la seguridad alimentaria en el ganado porcino ibérico basado en la valoración del manejo pre-sacrificio de los animales, realización de estudios epidemiológicos descriptivos de potenciales agentes zoonóticos, aplicación de planes análisis de peligros y puntos críticos de control (APPCC) y establecimiento de Códigos de Buenas Prácticas de Higiene en toda la cadena alimentaria.

La nueva estrategia comunitaria en sanidad animal 2007-2013, incorpora entre sus objetivos algunos de estos aspectos; de este modo, se pretende promover la sanidad animal mediante la prevención o la reducción de la incidencia de determinadas enfermedades animales, con el objetivo de garantizar un elevado nivel de salud pública y de seguridad alimentaria,

reduciendo al mínimo la incidencia de los riesgos biológicos y químicos para los seres humanos³. La sanidad animal se considera un factor clave para el desarrollo de la ganadería, y es de vital trascendencia tanto para la salud pública como para la economía nacional, así como para el mantenimiento y conservación de la diversidad de especies animales. Para la salud pública, por la posible transmisión de enfermedades de los animales al hombre, y por los efectos nocivos que para éste puede provocar la utilización de determinados productos con el fin de aumentar la productividad animal. Para la economía nacional, no sólo por las pérdidas directas que la enfermedad produce en las explotaciones afectadas, sino también por las pérdidas indirectas que originan las restricciones que se pueden producir en los mercados interior y exteriores para los animales afectados y sus productos, determinando la utilización de importantes recursos del Estado y, en casos extremos, pudiendo llegar a adquirir proporciones cuyas consecuencias bien pudieran ser calificadas de catastróficas.

El control de las enfermedades animales, y en particular de aquellas enfermedades e infecciones/infestaciones transmisibles directa o indirectamente entre animales y seres humanos (zoonosis) se hace imprescindible. La actual legislación comunitaria y nacional sobre Higiene de los alimentos y Sanidad Animal (EC 2004a, 2004b, 2004c) confiere una gran importancia a la protección de la salud humana frente a las zoonosis. Los resultados de los sistemas de recopilación de datos sobre estas enfermedades, indican que ciertos agentes zoonóticos, concretamente del género *Salmonella* y del género *Campylobacter*, son los causantes de la mayor parte de casos de estas enfermedades zoonóticas (Fig. 4) (EFSA, 2008, 2009, 2013).

La Agencia Europea de Seguridad Alimentaria (EFSA) publica anualmente su informe sobre fuentes y tendencias sobre zoonosis, agentes zoonóticos y resistencia a los antimicrobianos. La importancia de las zoonosis como infecciones en las personas no depende sólo de su incidencia en la población. La gravedad de estas infecciones y la mortalidad son factores importantes a tener en consideración. Por ejemplo, a pesar del relativamente bajo número de casos causados por VTEC (*Escherichia coli* verotoxigénico), *Equinococcus* o

³ http://ec.europa.eu/food/animal/diseases/strategy/docs/animal_health_strategy_es.pdf

Trichinella, comparado con el número de casos de campilobacteriosis o salmonelosis, estas infecciones se consideran importantes debido a la gravedad de los procesos y los índices de mortalidad resultantes (Fig. 4) (EFSA, 2013).

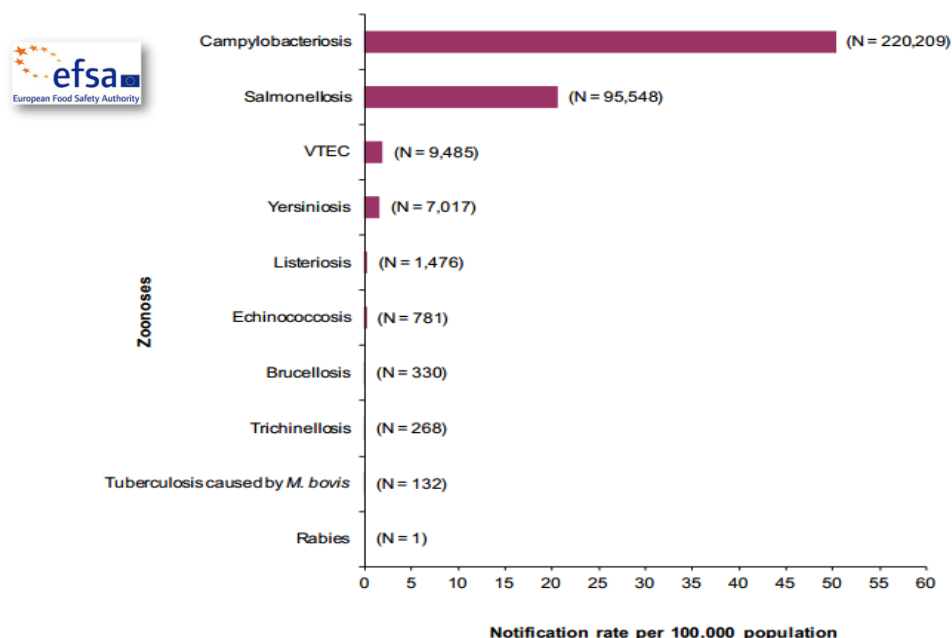


Figura 4. Notificación de casos confirmados de agentes zoonóticos en la UE en el último año registrado, 2011 (Fuente: EFSA, 2013)

Estos datos ponen de manifiesto la necesidad de mejorar los sistemas existentes de control de agentes zoonóticos específicos, con el fin de obtener datos suficientes sobre las principales zoonosis que se puedan armonizar entre todos los Estados Miembros, para que los datos recogidos sean fácilmente comparables. La Directiva 2003/99/CE, sobre la vigilancia de zoonosis y agentes zoonóticos (traspuesta a nuestro ordenamiento jurídico por el Real Decreto 1940/2004), trata de asegurar la adecuada vigilancia de las zoonosis, agentes zoonóticos y la resistencia a los antimicrobianos, así como la debida investigación epidemiológica de los brotes de enfermedades transmitidas por los alimentos, de forma que pueda recogerse en la Comunidad la información necesaria para evaluar las tendencias y las fuentes pertinentes. Para alcanzar esos objetivos, los Estados Miembros deben establecer programas de vigilancia y control específicos que se llevarán a cabo en la fase o fases de la cadena alimentaria más apropiada

según el agente zoonótico en cuestión; es decir: a) a nivel de la producción primaria, y/o b) en las demás fases de la cadena alimentaria, incluidos los alimentos y los piensos.

Se considerarán objeto de vigilancia, las zoonosis y agentes zoonóticos que se mencionan en el anexo de dicha Directiva, algunos de forma obligatoria y otros cuando la situación epidemiológica de un Estado miembro lo justifique (Fig. 5).



Figura 5. Principales agentes zoonóticos de origen porcino

El sector cárnico es uno de los sectores principales dentro del área agroalimentaria, y en concreto, la producción de cárnico-curados tradicionalmente realizada en Andalucía tiene una especial relevancia a nivel nacional (Garrido-Varo y De Pedro, 2007). Estos productos, principalmente embutidos y jamón curado, son muy valorados y están ligados a nuestra cultura y tradición, y generalmente son productos de gran calidad adquiridos por un elevado número de consumidores (Ventanas, 2001). La tendencia actual por consumir productos con garantías de calidad y seguridad, justifica las actuaciones encaminadas a mejorar el estatus sanitario de los animales y/o la seguridad alimentaria de los productos cárnicos, lo que resulta de gran interés para el fortalecimiento de la industria alimentaria. Asimismo, el interés y la necesidad creciente de apertura por parte de las empresas a nuevos mercados internacionales, más allá de los límites de

la UE, hacen que, en el caso de las industrias cárnicas, se apliquen nuevos y estrictos controles sanitarios destinados a satisfacer los requerimientos de los países destino de estos productos.

Todos estos avances en la industria cárnica suponen un valor añadido, persiguiendo un único objetivo “*la obtención de alimentos sanos y seguros, con un componente organoléptico inmejorable y listos para consumir*”. De este modo, surge la necesidad entre los ganaderos de cerdo ibérico y las empresas agroalimentarias del sector de conocer la situación sanitaria en la que se encuentran con el objetivo de implementar nuevos métodos que permitan reducir o eliminar la prevalencia de patógenos en la cadena de producción con dos objetivos fundamentales: (1) asegurar unos niveles óptimos de sanidad animal y seguridad alimentaria, lo que conlleva una garantía de seguridad de los productos y la apertura a nuevos mercados internacionales; (2) mejorar sus parámetros productivos y por tanto el rendimiento económico de sus empresas.

SALMONELLA Y SALMONELOSIS

El género Salmonella: características generales

Salmonella es un género de bacterias perteneciente a la Familia *Enterobacteriaceae*, Orden *Enterobacteriales* y Clase y Protobacteria (Garrity et al., 2004). Los miembros del género *Salmonella* son bacilos gram-negativos, anaerobios facultativos (en su mayoría), no productores de endosporas ni cápsula (excepto la especie *S. Typhi*) y móviles por la presencia de flagelos peritricos (a excepción del serotipo Gallinarum y de las variantes inmóviles de otros serotipos).

En la actualidad y pese a los avances en técnicas filogenéticas basadas en la secuenciación, la nomenclatura y clasificación de las bacterias englobadas en el género *Salmonella* continúa siendo muy controvertida. Aunque no está oficialmente reconocido por el Comité Internacional de Taxonomía Bacteriana (ICBT), dentro del género se distinguen dos especies *S. enterica* y *S. bongori*. Estas dos especies están divididas a su vez en 7 subespecies (Popoff y Le Minor, 1987) que se diferencian entre sí mediante técnicas de hibridación ADN/ADN

o por sus propiedades bioquímicas (Farmer III, 2003). Dentro de la especie *S. enterica* se agrupan las subespecies *enterica* (subsp. I), *salamae* (subsp. II), *arizonae* (subsp. IIIa), *diarizonae* (subsp. IIIb), *houtenae* (subsp. IV) e *indica* (subsp. VI). La última clasificación de *Salmonella* mantiene la subsp. "V" para aquellos serovares incluidos en la especie *S. bongori* (Popoff y Le Minor, 1987; Brenner et al., 2000; Grimont y Weill, 2007).

Aunque recientemente se ha propuesto una nueva especie en el género, *Salmonella subterranea* (Shelobolina et al., 2004), el análisis de secuencia de su ADN ribosómico 16S mostró una gran similitud con el de *Salmonella bongori* y *Enterobacter cloacae* y dicha especie no ha sido tomada en cuenta en la última actualización de la taxonomía de *Salmonella* publicada por Grimont y Weill (2007).

Cada subespecie a su vez, está conformada por diversos serotipos, habiéndose identificado hasta la fecha más de 2500. De este modo, *S. enterica* subsp. *enterica* (o subgrupo I) se divide en cinco serogrupos: A, B, C, D y E; comprendiendo cada serogrupo múltiples serovariedades o serotipos.

Los serotipos más frecuentemente aislados en el cerdo a partir de nódulos linfáticos mesentéricos en la UE son *S. Typhimurium* (40 %), *S. Derby* (14.62 %) y *S. Rissen* (5.8 %) (Baggesen et al., 1996; Van der Wolf et al., 1999; Rowe et al., 2003; Nollet et al., 2005; EFSA, 2008; Argüello et al., 2013). En España, *S. Typhimurium* (25.6%) y *S. Derby* (11.5%) son los principales serotipos aislados a partir de cerdos criados en sistemas intensivos (EFSA, 2008; EFSA, 2009).

Salmonellosis: dimensión global de un problema común

La salmonelosis es una enfermedad de carácter zoonótico que se presenta en todo el mundo y cuya vigilancia constituye un problema de índole internacional. En su control contribuyen instituciones como la FAO, la OMS o la OIE (Organización Mundial de la Sanidad Animal). La salmonelosis, al igual que otras enfermedades zoonóticas, han sido definidas como problemas multisectoriales, siendo médicos y veterinarios quienes sin duda deben responsabilizarse de la

coordinación de equipos en sus actuaciones sobre los animales y su entorno, así como de la prevención de la enfermedad en el hombre. La salmonelosis puede transmitirse al hombre por tres vías fundamentales: (i) a través de alimentos (toxiinfección alimentaria); (ii) por el manejo de animales en granjas o manipulación de canales en mataderos; y (iii) por el contacto con mascotas (reptiles, roedores y aves exóticas).

Una vez que se produce la infección por *Salmonella* spp., la bacteria se multiplica e invade la mucosa intestinal, donde elabora enterotoxina y citotoxina, toxinas que destruyen las células epiteliales. Tras un periodo de incubación de 8-48 horas, los síntomas más llamativos son: fiebre, dolor abdominal, espasmos, diarrea, náuseas, y vómitos, que suelen persistir 2-5 días, pero que pueden prolongarse varias semanas. La mayoría de los adultos se recuperan, pero la pérdida abundante de líquidos puede causar complicaciones o incluso la muerte en niños, pacientes con enfermedad concomitante (p.e. diabetes) o personas y ancianos inmunodeprimidos, que pueden requerir hospitalización y terapia antimicrobiana sistémica. Los datos de la EFSA informan de un total de 62 casos mortales durante el año 2010 asociados al consumo de productos de origen animal (salmonelosis zoonótica) (EFSA, 2012).

La actual legislación comunitaria y nacional sobre Higiene de los alimentos y Sanidad Animal, concede una gran importancia a la protección de la salud humana frente a las zoonosis. En el marco de las estrategias recogidas en el Libro Blanco de Seguridad Alimentaria, la Comisión Europea ha impulsado un plan para controlar o limitar este grupo de infecciones en los alimentos de origen animal. El resultado fue la publicación del Reglamento 2160/2003 del Parlamento Europeo, sobre el control de *Salmonella* y otros agentes zoonóticos específicos transmitidos por los alimentos (EC, 2003). Este Reglamento fija como punto de partida la necesidad de mejorar los sistemas actuales de control de agentes zoonóticos específicos, abarcando toda la cadena alimentaria “*desde la granja a la mesa*”.

La OMS estima que en todo el mundo se producen anualmente más de 1 billón de casos de salmonelosis por serotipos no específicos del hombre (no tifoideas) (Bronze y Greenfield, 2005; Chimalizeni et al., 2010); aunque estos datos no son más que aproximaciones, debido a

que muchos casos no se comunican y por tanto no se declaran oficialmente. En EEUU se notifican unos 45.000 casos anuales, pero la realidad es que pueden llegar hasta 2 ó 3 millones (CDC, 2003). La EFSA y el Centro Europeo para la Prevención y control de Enfermedades (ECDC) en sus últimos datos publicados referidos al año 2011, informan de una incidencia de 95.548 casos descritos (tasa de incidencia anual 20,7 casos por 100.000 habitantes) (EFSA, 2013); destacando que éstos han ido descendiendo gradualmente desde 2004. Esta tendencia a nivel europeo también ha sido observada en los datos referentes a España, si bien la evolución no siempre se mantiene y el número de casos aumenta en años puntuales (Fig. 6). A pesar de ello, la salmonelosis permanece como la primera causa de zoonosis alimentaria declarada en la Unión Europea, seguida de *Campylobacter* spp. (Fig. 4).

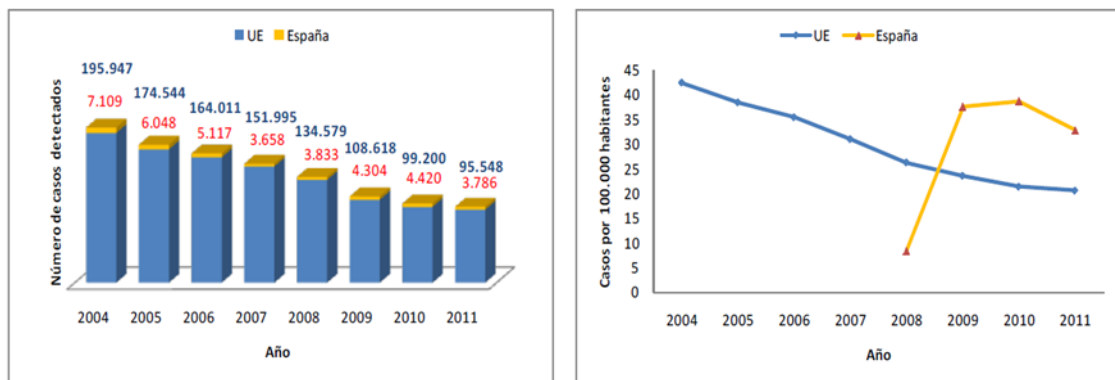


Figura 6. Número de casos declarados de salmonelosis humana entre los años 2004 y 2011 en la UE y España; tendencia de nº de casos por 100.000 habitantes reportados por la EFSA en la Unión Europea entre 2004 y 2011 (datos de España desde 2008) (Fuente: EFSA).

El éxito de los programas de control de *Salmonella* en avicultura ha tenido como consecuencia que la proporción relativa de casos debidos al consumo de carne de cerdo se haya visto incrementada y sea, en el momento actual, la segunda fuente más frecuente de salmonelosis humana tras el consumo de huevos (26.9% vs 43.8% de los casos de salmonelosis humana, respectivamente) (Pires et al., 2011). Previamente, la UE dirigió diferentes estudios para determinar los valores basales de prevalencia frente a esta infección en el ganado porcino, tanto en animales de cebo como en reproductores. La prevalencia media de la UE fue del 10.8% en cerdos de cebo y del 28.7% en hembras reproductoras, siendo España el Estado miembro en el

que se observó la prevalencia más alta tanto en animales de cebo (29%, a partir de muestras de nódulos linfáticos mesentéricos) como en reproductores (64%, a partir de muestras de heces tomadas en granja) (EFSA, 2008; EFSA, 2009).

Impacto económico de la salmonelosis

El impacto económico de la salmonelosis porcina es doble. Por una parte hay que tener en cuenta las pérdidas directas que la enfermedad causa a los productores del sector mientras que, por otro lado, se encuentran los costes asociados al problema de salud pública como causa de toxiinfecciones alimentarias (Argüello, 2013).

La principal pérdida económica asociada a la infección por *Salmonella* spp. para el productor porcino radica en una merma de los parámetros productivos, ya que la gran mayoría de las infecciones por *Salmonella* en el ganado porcino son asintomáticas. Por otro lado, es frecuente encontrar asociación entre *Salmonella* y otros patógenos digestivos que sí tienen un mayor impacto clínico sobre el animal como *Brachyspira hyodysenteriae* o *Lawsonia intracellularis*, dando lugar al denominado complejo entérico porcino (Carvajal et al., 2012). Las principales pérdidas económicas por *Salmonella* spp. se producen a nivel de la industria alimentaria asociada como consecuencia de la detección de *Salmonella* en la carne de cerdo lo que limita su comercialización, sobre todo hacia mercados del exterior (Argüello, 2013).

De acuerdo a la Organización Mundial de la Salud (OMS), la salmonelosis humana causa importantes pérdidas económicas, ligadas básicamente al estudio del origen de casos y brotes así como a su tratamiento. Los costes incluyen los tratamientos recibidos, las pérdidas laborales y la repercusión que puede tener sobre la industria alimentaria (Socket, 1991). Se calcula que los costes anuales asociados a la enfermedad en personas ascienden a 600 millones de euros en la UE de los cuales 90 millones de euros son costes indirectos atribuibles al consumo de carne de cerdo contaminada (FCC Consortium, 2010).

Control de la salmonelosis y su papel en la línea de sacrificio porcina

El control de la salmonelosis se basa en dos pilares fundamentales: la reducción de los niveles de prevalencia en los animales y la protección de la infección en el hombre. En las granjas las actuaciones encaminadas a mejorar la higiene y la bioseguridad, el control de la recontaminación de los piensos, así como la aplicación de determinadas estrategias alimentarias, contribuyen eficazmente a minimizar la presencia de *Salmonella*. Por otra parte, evitar la toxiinfección alimentaria a partir de productos de origen animal requiere una higiene rigurosa en el procesado tecnológico, culinario y de distribución de los alimentos, así como de la intervención del veterinario en el control sanitario de los alimentos y la gestión de la seguridad alimentaria. En este sentido, la actuación del veterinario abarca también el control sanitario en el transporte y espera de los animales previo al sacrificio, así como en el faenado de las canales en el matadero y el procesado de piezas cárnicas en la sala de despiece.

La transmisión de *Salmonella* del cerdo a las personas se puede originar a través de la contaminación de la carne de cerdo por determinados serotipos (Typhimurium, Rissen, Derby). En un alto porcentaje de casos esta contaminación ocurre en la línea de sacrificio o faenado donde el procesamiento de las canales constituye el principal factor de riesgo para que *Salmonella* penetre en la cadena alimentaria. Sin embargo, la vía alimentaria no constituye la única posibilidad de infección cerdo-persona; diversos autores han descrito casos de salmonelosis humana asociados al contacto directo con cerdos infectados en granjas o con canales contaminadas (Molback et al., 1999; Schiellerup et al., 2001; Hendriksen et al., 2004).

Las salmonelas excretadas por las heces contaminan la piel y anejos y por extensión los productos derivados de la cadena alimentaria. Si estos productos son consumidos directamente, sin un tratamiento térmico previo, la toxiinfección estará asegurada. En los mataderos los procesos iniciales de faenado en la línea de sacrificio contribuyen significativamente a la contaminación final de la canal, especialmente si el agua de escaldado se encuentra contaminada; por ello se recomienda asegurar una elevada temperatura del agua de escaldado (62 °C), y aplicar un apropiado protocolo de limpieza y

desinfección de los equipos de lavado, al menos una vez al día, con el fin de reducir los potenciales niveles de contaminación (Hald et al., 2003).

Por tanto, sólo los programas de control integrado que tengan en cuenta simultáneamente la granja y el matadero, incluyendo eslabones como el transporte, el reposo o el sacrificio, tienen posibilidades de tener éxito.

Referencias

- Argüello H., 2013. Salmonelosis porcina en España: factores de riesgo en reproductores, estrategias de control en cerdos de cebo y la importancia del sacrificio. Tesis Doctoral. Universidad de León.
- Argüello H., Sørensen G., Carvajal A., Baggesen D.L., Rubio P., Pedersen K. 2013. Prevalence, serotypes and resistance patterns of *Salmonella* in Danish pig production. *Res Vet Sci.* 95:334-342.
- Astorga R.J., Gómez-Laguna J., Moreno P., Hernández M., Carrasco L., 2010. 'Sanidad animal en el cerdo ibérico'. En: Especial "Solo cerdo ibérico 25 Aniversario" Tomo II, Sanidad. Pág. 128-135. Edita AECERIBER. ISBN 84-930710-0-5.
- Baggesen D.L., Wegener H.C., Bager F., Stege H., Christensen J. 1996. Herd prevalence of *Salmonella enterica* infections in Danish slaughter pigs determined by microbiological testing. *Prev Vet Med.* 26: 201-213.
- Brenner F.W., Villar R.G., Angulo F.J., Tauxe R., Swaminathan B., 2000. *Salmonella* nomenclature. *J Clin Microbiol.* 38: 2465-2467.
- Bronze M.S., Greenfield R.A., (Ed.), 2005. *Biodefence Principles and Pathogenshorizon bioscience.*
- Carvajal A., Argüello H., Costillas S., Álvarez-Ordoñez A., Garcia M., Rubio P., 2012. Complejo entérico porcino: Principales infecciones digestivas en la transición y el cebo. *Suis.* 90: 14-20
- Censos ganaderos de ibérico: RIBER (Registro informativo de organismos independientes de control del ibérico) <http://www.magrama.gob.es/es/alimentacion/temas/calidad-agroalimentaria/calidad-comercial/mesa-del-iberico/riber-publico/buscador-censo-de-animales/>
- Centers for Disease Control and Prevention (CDC), 2003. Preliminary FoodNet data on the incidence of foodborne illnesses — selected sites, United States, 2002. *MMWR Morb Mortal Wkly Rep* 52:340–3.
- Chimalizeni Y., Kawaza K., Molyneux E., 2010. The epidemiology and management of non typhoidal salmonella infections. *Adv Exp Medic Biol* 659:33-46.

Directiva 2003/99/CE del Parlamento europeo y del Consejo, de 17 de noviembre de 2003, sobre la vigilancia de las zoonosis y los agentes zoonóticos y por la que se modifica la Decisión 90/424/CEE del consejo y se deroga la Directiva 92/117/CEE del Consejo.

EFSA, 2008. Report of the Task Force on Zoonoses Data Collection on the analysis of the baseline survey on the prevalence of *Salmonella* in slaughter pigs, Part A, *EFSA J.* 135: 1-111.

EFSA, 2009. Analysis of the baseline survey on the prevalence of *Salmonella* in holdings with breeding pigs in the EU, 2008 - Part A: *Salmonella* prevalence estimates. *EFSA J.* 7: 1377

EFSA, 2012. The European Union Summary Report on Trends and Sources of Zoonoses, Zoonotic Agents and Food-borne Outbreaks in 2010; *EFSA J.* 2012;10:2597

EFSA, 2013. The European Union Summary Report on Trends and Sources of Zoonoses, Zoonotic Agents and Food-borne Outbreaks in 2010; *EFSA J.* 2013,11; 3129

European Commission, 2003. Regulation (EC) No. 2160/2003 of the European Parliament and of the Council on the control of *Salmonella* and other specified food-borne zoonotic agents.

European Commission, 2004a. Regulation (EC) No 852/2004 of the European Parliament and of the Council of 29 April 2004 on the hygiene of foodstuffs.

European Commission, 2004b. Regulation (EC) No 853/2004 of the European Parliament and of the Council of 29 April 2004 laying down specific hygiene rules for on the hygiene of foodstuffs.

European Commission, 2004c. Regulation (EC) No 854/2004 of the European Parliament and of the Council of 29 April 2004 laying down specific rules for the organisation of official controls on products of animal origin intended for human consumption.

European Commission, 2005. Regulation (EC) No 1003/2005 of 30 June 2005 implementing Regulation (EC) No 2160/2003 as regards a Community target for the reduction of the prevalence of certain salmonella serotypes in breeding flocks of *Gallus gallus* and amending Regulation (EC) No 2160/2003. *O J EU.* 170: 1-12.

European Commission, 2006. Commission Decision of 29 September 2006 concerning a financial contribution from the Community towards a baseline survey on the prevalence of *Salmonella* in slaughter pigs to be carried out in the Member States. *O J EU.* 275: 51-61.

FCC Consortium, 2010. Analysis of the costs and benefits of setting a target for the reduction of *Salmonella* in slaughter pigs. 1-198.

Funk J., Gebreyes W.A., 2004. Risk factors associated with salmonella prevalence on swine farms. *J Swine Health Manag* 12: 246–251.

Garrido-Varo, A., De Pedro E., 2007. The role of Near-Infrared Spectroscopy in verifying label information in agro-forestry products. En "Handbook of Near-Infrared Analysis. (Third Edition)

- Eds. D. A. Burns and E. W. Ciurczak. Publish. CRC Press. Taylor & Francis Group. London UK ISBN 978-0-8493-7393-0.
- Garrity G.M., Bell J.A., Liburn T.G., 2004. Taxonomic outline of Prokariotes Bergey's Manual of Systematic Bacteriology. 2nd Edition. Release 5.0. *Springer-Verlag*, New-York. Pags: 79-122.
- Grimont P.A.D., Weill F.X., 2007. Antigenic formulae of the *Salmonella* serovars. 9th Ed., Institut Pasteur Paris; pp. 166.
- Hald T., Wingstrand A., Swanenburg M., Von Altröck A., Thorberg B.M., 2003. The occurrence and epidemiology of *Salmonella* in European pig slaughterhouses. *Epidemiol Infect.* 131: 1187-203.
- Hendrikson S., 2004. Animal –to-Human Transmission of *Salmonella* Typhimurium DT104A Variant. *Emerg Infect Dis.* (www.cdc.gov/eid).
- Líneas Estratégicas para la Internacionalización del Sector Agroalimentario / mayo 2013. MAGRAMA.
- López Bote C.J., Fructuoso G., Mateos G.G., 2000. Sistemas de producción porcina y calidad de la carne. El cerdo ibérico. En: XVI Curso de Especialización FEDNA: Avances en Nutrición y Alimentación animal. P.G. Rebollar, C. de Blas y G.G. Mateos (eds). Madrid. pp: 77-111
- Molbak K., Lau B.D., Moller A.F., Munk J.E., Engberg J., Frydendahl K., Gernee P., Munk A., Wegener H.C., 1999. An outbreak of multidrug resistant, quinolone-resistant *Salmonella enterica* serotype Typhimurium DT104. *The New England J Med.* 341: 1420-1425.
- Nollet N., Houf K., Dewulf J., De Kruif A., De Zutter L., Maes D., 2005. *Salmonella* in sows: a longitudinal study in farrow-to-finish pig herds. *Vet Res.* 36: 645-656.
- Pires S.M., Knegt L., Hald T., 2011. Estimation of the relative contribution of different food and animal sources to human *Salmonella* infections in the European Union. EFSA-Q-2010-00685.
- Popoff M.Y., Le Minor L., 1987. Antigenic formulas of the *Salmonella* serovars 7th edition, WHO Collaborating centre for Reference and Research on *Salmonella*. Institut Pasteur, Paris.
- Real Decreto 1469/2007, de 2 de noviembre, por el que se aprueba la norma de calidad para la carne, el jamón, la paleta y la caña de lomo ibéricos. BOE 264, pp.45087-45104.
- Real Decreto 1940/2004 de 27 de septiembre, sobre la vigilancia de las zoonosis y los agentes zoonóticos. B.O.E. nº 237 de 1/X/04.
- Rowe T.A., Leonard F.C., Kelly G., Lynch P.B., Egan J., Quirke A.M., Quinn P.J., 2003. *Salmonella* serotypes present on a sample of Irish pig farms. *Vet Rec* 153:453-456.

- Schiellerup, P., Abdul-Redha, R.J., Baggesen, D.L., Andersen, S.L., Sandva, D., 2001. Five cases of gastroenteritis with multiresistant *Salmonella enterica* serovar Typhimurium DT104 related to farm animals in Denmark. *Ugeskr Laeger*. 163: 5677.
- Shelobolina E.S., Sullivan S.A., O'Neill K.R., Nevin K.P., Lovley D.R., 2004. Isolation, characterization, and U(VI)-reducing potential of a facultatively anaerobic, acid-resistant Bacterium from Low-pH, nitrate- and U(VI)-contaminated subsurface sediment and description of *Salmonella subterranea* sp. nov. *Appl Environ Microbiol*. 70: 2959-2965.
- Socket P.N., 1991. The economic implications of human salmonella infection. *J Appl Bacteriol*. 71: 289-295.
- Van der Wolf P.J., Bongers J.H., Elbers A.R., Franssen F.M., Hunneman W.A., van Exsel A.C., Tielen M.J., 1999. *Salmonella* infections in finishing pigs in The Netherlands: bacteriological herd prevalence, serogroup and antibiotic resistance of isolates and risk factors for infection. *Vet Microbiol*. 67: 263-275.
- Ventanas J., 2001. Tecnología del jamón Ibérico: de los sistemas tradicionales a la explotación racional del sabor y el aroma. Edita Mundi Prensa Libros. 2001. 512 páginas.
- http://ec.europa.eu/agriculture/pigmeat/index_en.htm (accedida el 15 de octubre de 2013)
- http://ec.europa.eu/food/animal/diseases/strategy/docs/animal_health_strategy_es.pdf (accedida el 15 de octubre de 2013)

2. OBJETIVOS

El **objetivo general** de esta Tesis Doctoral es la evaluación y mejora del estatus sanitario de la cabaña del cerdo ibérico, así como de su cadena alimentaria.

Los **objetivos específicos** planteados son:

1. Evaluar la seroprevalencia y difusión de infecciones/infestaciones de especial interés para la salud pública (brucelosis, salmonelosis, toxoplasmosis, triquinelosis) en la cabaña de cerdo ibérico. Publicación: "A serological survey of *Brucella* spp., *Salmonella* spp., *Toxoplasma gondii* and *Trichinella* spp., in Iberian fattening pigs reared in free-range systems".
2. Determinar la prevalencia de *Salmonella* spp. en la cabaña de cerdo ibérico, identificando los principales serotipos y fagotipos implicados así como sus perfiles de resistencia antimicrobiana. Publicación: "Prevalence and antimicrobial susceptibility of *Salmonella* infections in free-range pigs".
3. Determinar la prevalencia de *Salmonella* spp. en camiones, corrales de espera, línea de sacrificio y despiece a lo largo de la cadena de sacrificio del matadero de cerdo ibérico y caracterizar genéticamente los aislados obtenidos para determinar la contaminación potencial de las canales. Publicación: "*Salmonella* prevalence and characterization in a free-range pig processing plant: Tracking in trucks, lairage, slaughter line and quartering".

3. ESTUDIOS

- I. **A serological survey of *Brucella* spp., *Salmonella* spp., *Toxoplasma gondii* and *Trichinella* spp. in Iberian fattening pigs reared in free-range systems.**

- II. **Prevalence and antimicrobial susceptibility of *Salmonella* infections in free-range pigs.**

- III. ***Salmonella* prevalence and characterization in a free-range pig processing plant: Tracking in trucks, lairage, slaughter line and quartering**



A SEROLOGICAL SURVEY OF *BRUCELLA* SPP., *SALMONELLA* SPP., *TOXOPLASMA GONDII* AND *TRICHINELLA* SPP. IN IBERIAN FATTENING PIGS REARED IN FREE-RANGE SYSTEMS

M. Hernández , J. Gómez-Laguna, C. Tarradas, I. Luque, R. García-Valverde, L. Reguillo and R.J. Astorga

Publicado en *Transboundary and Emerging Diseases*, (2013) doi:10.1111/tbed.12049

A SEROLOGICAL SURVEY OF *BRUCELLA* SPP., *SALMONELLA* SPP., *TOXOPLASMA GONDII* AND *TRICHINELLA* SPP. IN IBERIAN FATTENING PIGS REARED IN FREE-RANGE SYSTEMS

M. Hernández ^{1,*}, J. Gómez-Laguna ^{1,*}, C. Tarradas ², I. Luque ², R. García-Valverde ¹, L. Reguillo ² and R.J. Astorga ²

¹ CICAP - Agrifood Research Centre, Ctra. De la Canaleja s/n, 14400 Pozoblanco, Córdoba, Spain

² Animal Health Department, Veterinary Faculty, University of Cordoba, Campus Universitario de Rabanales, Campus de Excelencia Internacional Agroalimentario, CeIA3, 14071 Córdoba, Spain

* These authors contributed equally to this work.

Summary

Zoonotic agents such as *Brucella* spp., *Salmonella* spp., *Toxoplasma gondii* and *Trichinella* spp., all considered high risk zoonotic pathogens by the European Food Safety Agency (EFSA), may cause no symptoms of infection in free-range pigs yet still have a significant public health impact. A serological survey was therefore performed to determine the history of occurrence of these pathogens in such pigs in southern Spain. A total of 709 serum samples were collected at abattoir from pigs from 79 farms, and analysed for specific antibodies against the above pathogens using commercially available ELISA kits. Encysted *Trichinella* spp. larvae were also sought following the artificial digestion method of diaphragm pillar muscle. The results showed *Salmonella* spp. to be widely distributed among the sampled herds (73.42%, 95% confidence interval [CI₉₅] 65.6-81.78), and *Toxoplasma gondii* to be present in over half (58.23%, CI₉₅ 47.33-69.07). The seroprevalence of *Brucella* spp. was very low (3.8%, CI₉₅ 0.18-7.42) and antibodies against *Trichinella* spp. were not detected. No encysted *Trichinella* spp. larvae were microscopically detected.

Keywords: free-range pigs; zoonoses; *Salmonella*; *Brucella*; *Toxoplasma gondii*; seroprevalence.

Introduction

Consumers demand safe pork products from pigs maintained under good animal welfare conditions. However, ensuring food safety can be difficult when pigs are reared in outdoor systems due to their close contact with wild animals (Funk and Grebeyes, 2004). Data from the World Health Organization (WHO) indicate that, in the last 10 years, about 75% of human diseases has been related to the presence of pathogens in products from animal origin (EFSA-ECDC, 2011).

Pork is the most consumed meat per capita in Europe, followed by poultry and beef. Pigs, however, pose potential zoonotic risks due to their carriage of bacterial and other pathogens, including *Brucella* spp. (401 human cases in 2009 in the European Union Member States, EU-MS), *Salmonella* spp. (108,614 human cases in 2009 in the EU-MS), *Toxoplasma gondii* (1,259 human cases in 2009 in the EU-MS) and *Trichinella* spp. (748 human cases in 2009 in the EU-MS). All these pathogens are considered high zoonotic risk agents by the European Food Safety Authority (EFSA-ECDC, 2011). Transmission to humans occurs via contact with infected animals or contaminated tissue, or through the ingestion of contaminated products. This paper reports a serological survey to determine exposure to these pathogens in Iberian pigs reared in free-range systems in Spain. Encysted *Trichinella* spp. larvae were also sought by the artificial digestion reference method.

Materials and Methods

Animal sampling

Seven hundred and nine Iberian fattening pigs belonging to 79 herds finished on family-run, free-range farms in southern Spain (Andalusia) were randomly sampled during 2008 and 2009. The examined animals belonged to a total population of 300 herds with an average of 200 finishing pigs per herd. Between October and March (minimum 60 days) all animals fed only on the natural

forage they could find (e.g., acorns, roots, etc.). All weighed 92-115 kg (8-12 months of age) at the start of this period (the minimum average weight gain was 46 kg). Before this finishing period, all were raised under the same free-range system, but were provided compound feed. All the studied farms belonged to the same stockbreeding cooperative. This cooperative has its own abattoir that adheres to all European regulations regarding slaughtering practices (Council Directive 93/119/EEC).

Blood and muscle samples (from the diaphragm pillars) were collected on six dates with a mean interval of nine days (December 2008 to March 2009). An average of 13 herds were sampled on each date. The sample size required to estimate prevalence of antibodies was determined using Win Episcope v.2.0 software on the basis of the number of samples required for a previous unknown prevalence, assuming a 95% level of confidence and an accepted error of 9%.

Serological analysis

Blood samples were collected into Vacutainer tubes (Becton Dickinson, Plymouth, United Kingdom) from 5-10 pigs per herd at the abattoir. Serum was harvested and frozen at -70 °C until testing for specific antibodies against *Salmonella* spp., *Brucella* spp., *Trichinella* spp. and *Toxoplasma gondii* using commercial ELISA kits following the manufacturers' instructions (Table 1).

Artificial digestion

Muscle samples from the diaphragm pillars were subjected to pooled artificial digestion using the magnetic stirrer method (European Commission regulation EC-2075/2005). Encysted *Trichinella* spp. larvae were then sought microscopically. Briefly, one hundred grams pooled samples (taken from a stock prepared from 1 g of the diaphragm pillar of each animal studied) were chopped in a

blender, added to a digestion fluid (1% hydrochloric acid solution + 1% pepsin in tap water) and stirred using a magnetic stirrer for 30-60 min at 44-46 °C. The digest was allowed to settle for 15–20 min and the upper two-thirds of the fluid were decanted. The remaining fluid and deposit were poured through a 355 µm mesh into a conical flask and allowed to settle for 15–20 min. The maximum possible quantity of supernatant fluid was aspirated without disturbing the sediment. The latter was then washed with warm (37 °C) tap water and allowed to settle in this water for another 15–20 min. The washed sediment was then transferred to a 50 ml tube, allowed to settle, and a final 10 ml sediment volume aspirated. These samples were then poured into a gridded Petri dish and examined for encysted *Trichinella* larvae using a dissecting microscope (x15–40 magnification).

Results

Specific serum antibodies against Salmonella spp., Brucella spp. and Toxoplasma gondii

Antibodies against *Salmonella* spp. were detected in 148/709 pigs (20.9% individual prevalence; 95% confidence interval, CI₉₅ 17.9-23.8%) from 58/79 herds (73.4% herd prevalence; CI₉₅ 65.6-81.8%), ranging from 10% to 90% positive pigs/herd (median = 25%) , when a cut-off optical density (OD) % of 40 was used. In addition, antibodies against *Salmonella* spp. were detected in 309/709 pigs (43.58% individual prevalence; CI₉₅ 39.93-47.23%) from 74/79 herds (93.67% herd prevalence; CI₉₅ 88.30-99.04%), ranging from 10% to 100% positive pigs/herd (median = 40%) , when a cut-off OD% of 20 was used. Antibodies against *Toxoplasma gondii* were detected in 192/709 pigs (27.1% individual prevalence; CI₉₅ 23.9-30.4%) from 46/79 herds (58.2% herd prevalence; CI₉₅ 47.33-69.07%), with 10% to 100% positive pigs/herd (median = 40%) (Table 1). Antibodies against *Brucella* spp. were detected in 6/709 pigs (0.9% individual prevalence; CI₉₅ 0.2-1.5%) from 3/79 herds (3.8% herd prevalence; CI₉₅ 0.2-7.4), with 2/10 pigs positive on two farms and 4/10 pigs positive on the third positive farm.

Serum antibodies against Trichinella spp. and direct detection of encysted Trichinella spp. larvae

Antibodies against *Trichinella* spp. were detected in 3/709 pigs (0.4% individual prevalence; CI₉₅ 0.1-1.2%) from 3/79 herds (3.8% herd prevalence; CI₉₅ 0.2-7.4; 1/10 positive animals per positive farm). However, the artificial digestion test returned negative results for all the sampled animals, as did a second ELISA test using a kit from another manufacturer (Table 1).

Table 1. Prevalence of free-range herds and pigs seropositive for *Brucella* spp., *Salmonella* spp., *Toxoplasma gondii* and *Trichinella* spp.

| Infectious agent | Detection kit | Number of positive samples (% prevalence) | |
|--------------------------|---|--|-------------------|
| | | Herds (n = 79) | Pigs (n = 709) |
| <i>Salmonella</i> spp. | SalmotypePig Screen+E, Labor Diagnostik Leipzig (Leipzig, Germany) (cut-off >40%) | 58 (73.4) | 148 (20.9) |
| | (cut-off >20%) | 74 (93.67) | 309 (43.58) |
| <i>Toxoplasma gondii</i> | ID Screen Toxoplasmosis Indirect, IDVet Innovative Diagnostics (Montpellier, France) (cut-off >50%) | 46 (58.23) | 192 (27.1) |
| <i>Brucella</i> spp. | Ingezim Brucella Porcina, Ingenasa (Madrid, Spain) (cut-off >40%) | 3 (3.80) | 6 (0.85) |
| <i>Trichinella</i> spp. | ELISA1: PrioCheck Trichinella Ab, Prionics (Madrid, Spain) (cut-off >15%) | 3 (3.80) | 3 (0.42) |
| | ELISA2: ID Screen Trichinella Indirect, IDVet Innovative Diagnostics (Montpellier, France) (cut-off >50%) | 0 (0.0) | 0 (0.0) |
| | Artificial digestion of muscle | 0 (0.0) | 0 (0.0) |

Discussion

For cut-offs OD% of 40 and 20 (*Salmonella* antibody detection), the herd prevalence determined for *Salmonella* spp. was 73.4% and 93.67%, and the individual prevalence 20.9% and 43.58%, respectively. A cut-off OD% of 40 is a “convenient cut-off” when a moderate to high seroprevalence of *Salmonella* spp. is expected, while a cut-off OD% of 20 is of interest when the seroprevalence is expected to be negligible (Alban et al., 2002). Although the inter-annual variability should be taken into account, previous studies have reported similar values in pigs reared in intensive units in northern Spain and in the same region as that examined in the present

study (using a cut-off OD% of 40) (Mejía et al., 2006; Pérez-Barrios et al., 2010). In this sense, our group recently reported a similar prevalence for *Salmonella* spp. (isolated from the ileocolic lymph nodes) in pigs in indoor and outdoor systems, but with differences in the main serovars isolated (Gómez-Laguna et al., 2010).

Seropositivity for *Toxoplasma gondii* has been documented in pigs worldwide, indicating them to be frequently exposed to this protozoan parasite (García-Bocanegra et al., 2010; Veronesi et al., 2010). A previous study reported a 15.1-20.0% seroprevalence for *Toxoplasma gondii* in intensively-reared herds in Andalusia (García-Bocanegra et al., 2010). All-in-all-out production systems, cleaning measures, the age of the animals, the control of rodents and cats, and the methods used to dispose of carcasses have all been related to differences in *Toxoplasma gondii* seroprevalence (García-Bocanegra et al., 2010; Veronesi et al., 2010). The high prevalence of anti-*Toxoplasma gondii* antibodies observed in the present study may be related to factors such as the presence of reservoirs of infection (wild animals, rodents), moderate winter temperatures, contaminated water sources and pig ‘wallows’ in the environment (Funk and Gebreyes, 2004; Callaway et al., 2005; Beral et al., 2012; Deksne and Kirjušina, 2012).

Generally, porcine brucellosis has a low prevalence in domestic pigs, although it can be higher in South America and Southeast Asia (OIE, 2009b). In the present study, antibodies against *Brucella* spp. were only detected in six animals from three herds. A higher seroprevalence of *Brucella suis* is reported in feral pigs and wild boars, and has been linked to brucellosis in people who hunt them and handle material taken from them (Starnes et al., 2004; Muñoz et al., 2010; Wu et al., 2012).

Three animals tested positive for *Trichinella* spp. based on ELISA, but no positive results were returned by the artificial digestion reference method. Although ELISA provides a rapid means of

detecting specific antibodies, false negatives and/or false positives can be returned, associated with either a delayed onset of the antibody response or the type and quality of the antigen employed. A previous report describes the specificity of the PrioCheck *Trichinella* Ab ELISA test to be 99.5-99.8% (Frey et al., 2009). Earlier studies have showed a detection limit of ELISA of 0.01 larvae per gram of tissue (OIE, 2009a), whereas artificial digestion results in a detection limit of approximately 3 larvae per gram of tissue when only 1 g of muscle sample per pig is examined (Forbes and Gajadhar, 1999). Although in our study the discrepancy in the results between both techniques cannot be clarified, the World Organisation for Animal Health recommend the use of serological tests in surveillance assays, but direct detection methods for individual carcass inspection (OIE, 2009a).

Antibodies against all the pathogens examined in this study have previously been detected in wild boars, with similar seroprevalence trends observed (Ruiz-Fons et al., 2006; Montagnaro et al., 2010; Boadella et al., 2012). Measures to control the contact between domestic and wild pigs should be encouraged.

The seroprevalence of *Salmonella* spp. and *Toxoplasma gondii* were high in the present work, whereas that of *Brucella* spp. was low and no antibodies against *Trichinella* spp. were detected. Our study measures specific antibodies against selected pathogens but does not isolate them, making not feasible to guarantee an association between the high seroprevalence observed with the presence of these organisms in meat products.

In conclusion, despite *Brucella* spp. and *Trichinella* spp. are pathogens with impact on public health, the low seroprevalence values recorded in our study point out a low risk of infection associated to the examined population. On the contrary, a higher risk of infection posed by

Salmonella spp. and/or *Toxoplasma gondii* might be expected from the targeted population of this study due to their high seroprevalence, which suggests that control measures should be adopted to minimise their farm-to-fork transmission.

Conflict of interest statement

None of the authors has any financial or personal relationships that could inappropriately influence or bias the content of the paper.

Acknowledgements

This work was funded by the Andalusian Government (ISC, Counselling; Saniberico project reference 08/222) and the Centre for the Development of Industrial Technology (CDTI reference IDI-20090414). The authors thank Dr. A. Maldonado (Epidemiology Unit, Animal Health Department, Veterinary Faculty, University of Córdoba) for help with statistical methods.

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.
- Beral, M., S. Rossi, D. Aubert, P. Gasqui, M.E. Terrier, F. Klein, I. Villena, D. Abrial, E. Gilot-Fromont, C. Richomme, J. Hars, and E. Jourdain, 2012: Environmental factors associated with the seroprevalence of *Toxoplasma gondii* in wild boars (*Sus scrofa*), France. *Ecohealth*. Df.
- Boadella, M., J.A. Barasona, E. Pozio, V. Montoro, J. Vicente, C. Gortázar, and P. Acevedo, 2012: Spatiotemporal trends and risk factors for *Trichinella* species infection in wild boar (*Sus scrofa*) populations of central Spain: A long-term study. *Int. J. Parasitol.* 42, 739-745.
- Callaway, T.R., J.L. Morrow, A.K. Johnson, J.W. Dailey, F.M. Wallace, E.A. Wagstrom, J.J. McGlone, A.R. Lewis, S.E. Dowd, T.L. Poole, T.S. Edrington, R.C. Anderson, K.J. Genovese, J.A. Byrd, R.B. Harvey, and D.J. Nisbet, 2005: Environmental prevalence and persistence of *Salmonella* spp. in outdoor swine wallows. *Foodborne Pathog. Dis.* 2, 263-273.
- Deksne, G., and M. Kirjušina, 2012: Seroprevalence of *Toxoplasma gondii* in domestic pigs (*Sus scrofa domestica*) and wild boars (*Sus scrofa*) in Latvia. *J. Parasitol.* Sdg.

EC-2075/2005: Official Journal of the European Union. COMMISSION REGULATION (EC) No 2075/2005 of 5 December 2005 laying down specific rules on official controls for *Trichinella* in meat. L338/60-L338/82.

EFSA-ECDC, 2011: The European Union Summary Report on Trends and Sources of Zoonoses, Zoonotic Agents and Food-borne Outbreaks in 2009. EFSA Journal 9, 2090.

Forbes, L.B., and A.A. Gajadhar, 1999: A validated *Trichinella* digestion assay and an associated sampling and quality assurance system for use in testing pork and horse meat. J. Food Prot. 62,1308-1313.

Frey, C., P. Buholzer, R. Beck, A. Marinculic, A. Raeber, B. Gottstein, and M. Shuppers, 2009: Evaluation of a new commercial enzyme-linked immunosorbent assay for the detection of porcine antibodies against *Trichinella* spp. J. Vet. Diagn. Invest. 21, 692-697.

Funk, J., and W.A. Grebeyes, 2004: Risk factors associated with *Salmonella* prevalence on swine farms. J. Swine Health Prod. 12, 246-251.

Gamble, H.R., 1996: Detection of trichinellosis in pigs by artificial digestion and enzyme immunoassay. J. Food Prot. 59, 295-298.

García-Bocanegra, I., M. Simon-Grifé, J.P. Dubey, J. Casal, G.E. Martín, O. Cabezón, A. Perea, and S. Almería, S., 2010: Seroprevalence and risk factors associated with *Toxoplasma gondii* in domestic pigs from Spain. Parasitol. Int. 59, 421-426.

Gómez-Laguna, J., M. Hernández, E. Creus, A. Echeita, J. Otal, S. Herrera-León, and R.J. Astorga, 2010: Prevalence and antimicrobial susceptibility of *Salmonella* infections in free-range pigs. Vet. J. 190, 176-178.

Mejía, W., J. Casal, D. Zapata, G.J. Sánchez, M. Martín, and E. Mateu, 2006: Epidemiology of *Salmonella* infections in pig units and antimicrobial susceptibility profiles of the strains of *Salmonella* species isolated. Vet. Rec. 159, 271-276.

Montagnaro, S., S. Sasso, L. De Martino, M. Longo, V. Iovane, G. Ghiurmino, G. Pisanelli, D. Nava, L. Baldi, and U. Pagnini, 2010: Prevalence of antibodies to selected viral and bacterial pathogens in wild boar (*Sus scrofa*) in Campania Region, Italy. J. Wildl. Dis. 46, 316-319.

Muñoz, P.M., M. Boadella, M. Arnal, M.J. de Miguel, M. Revilla, D. Martínez, J. Vicente, P. Acevedo, A. Oleaga, F. Ruiz-Fons, C.M. Marín, J.M. Prieto, J. de la Fuente, M. Barral, M. Barberán, D.F. de Luco, J.M. Blasco, and C. Gortázar, 2010: Spatial distribution and risk factors of Brucellosis in Iberian wild ungulates. BMC Infect. Dis. 10, 46.

OIE, 2009a: Manual of diagnostic tests and vaccines for terrestrial animals. Volume 1. Part 2. Chapter 2.1.16 Trichinellosis, p.344-352.

OIE, 2009b: Manual of diagnostic tests and vaccines for terrestrial animals. Volume 2. Part 2. Chapter 2.8.5 Porcine Brucellosis, p.1-7.

Pérez-Barrios, F., C. Borge, R.J. Astorga, I. García-Bocanegra, A. Carbonero, A. Arenas, A. Perea, 2010: Seroprevalence and risk factors of *Salmonella* spp. in swine farms from Southern Spain. In: 13th International Symposium on *Salmonella* and Salmonellosis, Saint Malo, France, p. 259.

Ruiz-Fons, F., J. Vicente, D. Vidal, U. Höfle, D. Villanúa, C. Gauss, J. Segalés, S. Almería, V. Montoro, and C. Gortázar, 2006: Seroprevalence of six reproductive pathogens in European wild boar (*Sus scrofa*) from Spain: the effect on wild boar female reproductive performance. *Theriogenology* 65, 731-743.

Starnes, C.T., R. Talwani, J.A. Horvath, W.A. Duffas, and C.S. Bryan, 2004: Brucellosis in two hunt club members in South Carolina. *J. S. C. M. Assoc.* 100, 113-115.

Veronesi, F., D. Ranucci, R. Branciarri, D. Miraglia, R. Mammoli, and D.P. Fioretti, 2011: Seroprevalence and risk factors for *Toxoplasma gondii* infection on finishing swine reared in the Umbria region, central Italy. *Zoonoses Public Health* 58, 178-184.

Wu, N., C. Abril, A. Thomann, E. Grosclaude, M.G. Doherr, P. Boujon, and M.P. Ryser-Degiorgis, 2012: Risk factors for contacts between wild boar and outdoor pigs in Switzerland and investigations on potential *Brucella suis* spill-over. *BMC Vet. Res.* 8, 116



**PREVALENCE AND ANTIMICROBIAL SUSCEPTIBILITY OF SALMONELLA
INFECTIONS IN FREE-RANGE PIGS**

J. Gómez-Laguna, M. Hernández, E. Creus, A. Echeita, J. Otal, S. Herrera-León and R. J.
Astorga

Publicado en *The Veterinary Journal*, 190 (2011), 176-178

PREVALENCE AND ANTIMICROBIAL SUSCEPTIBILITY OF SALMONELLA INFECTIONS IN FREE-RANGE PIGS

Jaime Gómez-Laguna ^{a, 1, *}, Manuela Hernández ^{b, 1}, Eva Creus ^{c, 2}, Aurora Echeita ^d, Julio Otal ^e, Silvia Herrera-León ^d, Rafael J. Astorga ^a

^a Animal Health Department, Faculty of Veterinary Medicine, University of Córdoba, Spain

^b CICAP, Pozoblanco, Córdoba, Spain

^c PigChamp Pro Europa, Segovia, Spain

^d National Reference Laboratory of Salmonella (LNRSSSE), Madrid, Spain

^e Animal Production Department, Faculty of Veterinary Medicine, University of Murcia, Spain

¹ These authors contributed equally to this paper.

Abstract

An epidemiological study of the prevalence of salmonella infection 67 free-range pig herd in southern Spain is reported. Microbiological assessment was performed on ileocolic lymph nodes collected at slaughter according to ISO 6579:2002 procedures. Overall, 33% of the herds were found to be infected and the prevalence of positive pigs was 5.3%. Salmonella serotypes most frequently detected were *S. Anatum* and Typhimurium, although uncommon serotypes such as *S. Hessarek* and *S. Mikawasima* were also isolated. All isolates were tested against 16 antimicrobials and exhibited resistance to streptomycin (46%), tetracycline (30%), sulphonamides (25%) and ampicillin (23%). Multi-drug resistance, defined as resistance to ≥ 4 antimicrobials, was 36%. This study provides useful new information relating to the prevalence, identity and antimicrobial resistance patterns of salmonella infection in free-range pigs, information that will contribute to informed debate on the merits of such farming methods.

Keywords: Salmonella; Free-range; Serotypes; Pig; Antimicrobial resistance

Introduction

In Spain, Iberian pigs of 8 – 12 months old and 92 – 115 kg bodyweight are typically finished in free-range systems between October and March, typically averaging a weight gain of 46 kg over this period. The biosecurity of such welfare-friendly production systems can be compromised due to close contact between pigs, their environment and feral animals (Funk and Gebreyes, 2004). The capacity of *Salmonella* spp. to persist in the environment may facilitate the infection of wild birds, rodents and/or arthropods species, which may in turn contribute to the subsequent transmission of these pathogens to domestic animals (Singer et al., 1977; Funk and Gebreyes, 2004).

In intensive pig production systems, factors such as use of pelleted feed, high stocking density and herd size and lack of control of vectors that transmit the organism, have been associated with an increased prevalence of salmonella infection (Funk and Gebreyes, 2004; García-Feliz et al., 2009). However, such increased infection prevalence has also been reported in pigs reared in free-range systems (van der Wolf et al., 2001). The objective of this study was to determine the prevalence of salmonella infection in pigs reared in free-range systems, as well as the distribution of serotypes, phage types and antimicrobial resistance patterns.

Materials and Methods

A total of 67 free-range herds were randomly selected from a total of 122 farms incorporating approximately 16,000 animals in Cordoba province in southern Spain (Andalusian Agriculture Concealing, SIGGAN data system 2010⁴) and sampled during 2008 and 2009. Sample size was assessed by Win Episcopo (version 2.0) software on the basis of

⁴ See: <https://ws128.juntadeandalucia.es/agriculturaypesca/adsg/>

the number of samples required to determine a previously unknown prevalence. A 95% confidence level and 8% accepted error were assumed and confidence intervals of prevalence calculated.

Twelve pigs/herd (total of 804 animals) were randomly selected and one or two ileocolic lymph nodes (1 g of lymph node /pig) were collected/pig at slaughter. These samples were cultured individually following the ISO 6579:2002 protocol on the day of sampling. Colonies identified as *Salmonella* spp. were transferred to tripticase soy agar plates (Difco, Becton Dickinson) for phenotype characterisation (sero- and phage typing) by agglutination techniques. Phagotyping was only carried out on *S. Typhimurium* serotypes.

Forty three isolates were tested against 16 antimicrobials using the Kirby-Baier method on Müeller-Hinton agar. This agar contained: ampicillin (10 µg/disk), ceftiofur (30 µg/disk), ceftriaxone (30 µg/disk), cephotaxime (30 µg/disk), nalidixic acid (30 µg/disk), enrofloxacin (5 µg/disk), ciprofloxacin (5 µg/disk), gentamicin (10 µg/disk), streptomycin (10 µg/disk), neomycin (30 µg/disk), apramycin (15 µg/disk), sulphonamide compounds (200 µg/disk), trimethoprim-sulphamethoxazole (1.25 and 23.75 µg/disk), chloramphenicol (30 µg/disk), florphenicol (30 µg/disk) and tetracycline (30 µg/disk) (Oxoid). An *E. coli* ATCC 25922 reference strain was used as a quality control. Isolates were classified as susceptible, intermediate or resistant according to The Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI, M100-S15/2005; M31-A3/2008). Isolates resistant to >4 antimicrobials were considered multi-drug resistant (MDR).

Table 1. *Salmonella* serotypes isolated from 804 free-range pigs in southern Spain.

| Serotypes | Number of isolates | Phage types (number of isolates) |
|--------------|--------------------|--|
| Anatum | 24 | |
| Typhimurium | 10 | <i>S</i> 4,5+,12:i:1,2 / U302 (1), U311 (1), 193 (1), 195 (1), 203 (1) Var. 4,5-,12:i:1,2 / 40 (1), 195 (2), RDNC ^a (1), NT ^b (1) |
| Muenchen | 4 | |
| Goldcoast | 1 | |
| Derby | 1 | |
| Newport | 1 | |
| Mikawasima | 1 | |
| Hessarek | 1 | |
| Total | 43 | |

^aRDNC, reacted but did not conform.

^bNT, isolates not typed.

Results

Salmonella spp. were isolated from 5.3% (43/804) of the pigs and from 33% (22/67; CI, 25.4 - 40.6) of the herds. Forty three isolates of *S. enterica* were made and 8 different salmonella serotypes found (Table 1). A unique, specific serotype was found in 19/22 herds but in three herds, two different serotypes were detected, i.e. *S. Typhimurium* and *S. Anatum*, and *S. Muenchen* and *S. Goldcoast*, respectively. Phage typing revealed a wide range of DT types among the *S. Typhimurium* (U302, U311, 193, 195, 203) and *S. Typhimurium* var. Copenhagen (4,12:i:1,2) (40, 195, PNR, NT) isolates (Table 1). The antimicrobial resistance study found that 58% (25/43) of the isolates were resistant or of intermediate susceptibility and 42% (18/43) fully susceptible to the 16 antimicrobials assessed (Table 2). Thirteen of the twenty-five isolates were resistant to one or two antimicrobials, whereas nine isolates (36%), mostly the *Typhimurium* serotype, were MDR.

Table 2. Antimicrobial susceptibility of *salmonella* isolates and breakpoints, zone diameter (mm), from 804 free-range pigs in southern Spain.

| Antimicrobial | Susceptible (%) | Intermediate (%) | Resistant (%) |
|------------------------|--------------------|------------------|--------------------|
| Ampicillin (A) | 76.8 (≥ 17) | 0 (14-16) | 23.2 (≤ 13) |
| Ceftiofur (Eft) | 100 (≥ 21) | 0 (18-20) | 0 (≤ 17) |
| Ceftriaxone (Cro) | 100 (≥ 21) | 0 (14-20) | 0 (≤ 13) |
| Cephotaxime (Ctx) | 100 (≥ 23) | 0 (15-22) | 0 (≤ 14) |
| Nalidixic acid (Na) | 81.4 (≥ 19) | 11.7 (14-18) | 6.9 (≤ 13) |
| Enrofloxacin (Enr) | 100 (≥ 23) | 0 (17-22) | 0 (≤ 16) |
| Ciprofloxacin (Cip) | 100 (≥ 21) | 0 (16-20) | 0 (≤ 15) |
| Gentamicin (Cn) | 97.7 (≥ 15) | 0 (13-14) | 2.3 (≤ 12) |
| Streptomycin (S) | 25.5 (≥ 15) | 28 (12-14) | 46.5 (≤ 11) |
| Neomycin (N) | 65.1 (≥ 17) | 18.6 (15-16) | 16.3 (≤ 14) |
| Apramycin (Apr) | 86 (≥ 15) | 11.7 (13-14) | 2.3 (≤ 12) |
| Sulphonamides (S3) | 69.8 (≥ 17) | 4.7 (13-16) | 25.5 (≤ 12) |
| Trimethoprim- | | | |
| Sulphametoxazole (Sxt) | 88.4 (≥ 16) | 0 (11-15) | 11.6 (≤ 10) |
| Chloramphenicol (C) | 88.4 (≥ 18) | 2.3 (13-17) | 9.3 (≤ 12) |
| Florfenicol (Ffc) | 86 (≥ 22) | 11.7 (19-21) | 2.3 (≤ 18) |
| Tetracycline (T) | 51.2 (≥ 19) | 18.6 (15-18) | 30.2 (≤ 14) |

Breakpoints taken from The Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI) documents M100-S15/2005 and M31-A3/2008.

Discussion

This study found a 5.3% individual animal prevalence of salmonella infection, with 33% of herds containing at least one infected animal. Rubio et al. (2008), reported an individual prevalence of 24.2% in feedlot pigs in northwest Spain, whereas van der Wolf et al. (2001) found a higher salmonella seroprevalence in free-range than in intensive systems. Although several factors have been associated with salmonella infection in intensive systems (Funk and Gebreyes, 2004; García-Feliz et al., 2009), the high incidence of reservoirs of infection such as birds, rodents and water supplies in the environment, as well as the existence of pig

‘wallows’ likely contribute to the infection transmission in free-range settings (Funk and Gebreyes, 2004; Callaway et al., 2005).

Whereas *S. Rissen*, *S. Derby* and *S. Typhimurium* are the serotypes most commonly isolated from pigs in feedlots (Astorga et al., 2007), the current study found that *S. Anatum* and *S. Typhimurium* were the serotypes most commonly recovered from animals reared in free-range systems. Furthermore, the uncommonly found serotypes *S. Hessarek* and *S. Mikawasima* were cultured in our study. *S. Hessarek* has occasionally been isolated from foxes and wild birds (Singer et al., 1977; Handeland et al., 2008), and *S. Mikawasima* has been found in freshwater reservoirs (Polo et al., 1999), and is associated to food-borne disease (Kaneko et al., 2007). The results of the present study suggest free-range pigs may be a further potential source of these uncommon serotypes.

Salmonella phagetype 104b is the phagetype most frequently associated with feedlot pigs (Astorga et al., 2007). Our study found a much more diverse range of phagetypes in these free-range animals. Moreover, our finding that free-range pig herds were often infected with two different salmonella serotypes was not unexpected (Schwartz, 1999).

Conclusions

Although the herd prevalence of salmonella infection was similar in free-range and feedlot pigs, isolates from free-range animals had lower levels of resistance and higher levels of susceptibility to antimicrobials (Astorga et al., 2006). In our study, 36% of the isolates were MDR, contrasting with the results of a previous study that found that 64% of isolates from feedlot pigs were MDR (Astorga et al., 2006). These differences may relate to the overuse of antimicrobials in intensive production systems (Mellon et al., 2001). In summary, the current

study provides useful new information relating to the prevalence, identity and antimicrobial resistance patterns of salmonella infection in free-range pigs, information that will contribute to informed debate on the merits of such farming methods.

Conflict of interest statement

None of the authors of this paper has a financial or personal relationship with other people or organisations that could inappropriately influence or bias the content of the paper.

Acknowledgement

This work was supported The Andalusian Technologic Corporation, Innovation, Science and Education Counselling, Andalusian Government, Spain (Project reference: 400325).

References

Astorga, R.J., Tümmers, C., Valdezate, S., Tarradas, C., Huerta, C., Borge, C., Perea, A., 2006. Multidrug resistant salmonella strains isolated from slaughtered pigs in Spain. 13S International Symposium on Salmonella and Salmonellosis, Saint-Maló, France, p.179.

Astorga, R.J., Tümmers, C., Echeita, A., Maldonado, A., Carbonero, A., Arenas, A., 2007. Surveillance and antimicrobial resistance of salmonella strains isolated from slaughtered pigs in Spain. *Journal of Food Protection* 70, 1502-1506.

Callaway, T.R., Morrow, J.L., Johnson, A.K., Dailey, J.W., Wallace, F.M., Wagstrom, E.A., McGlone, J.J., Lewis, A.R., Dowd, S.E., Poole, T.L., Edrington, T.S., Anderson, R.C., Genovese, K.J., Byrd, J.A., Harvey, R.B., Nisbet, D.J., 2005. Environmental prevalence and persistence of *Salmonella* spp. in outdoor swine wallows. *Foodborne Pathogens and Disease* 2, 263-273.

Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI), 2005. Performance Standards for Antimicrobial Disk and Dilution Susceptibility Tests for Enterobacteriaceae; Approved Standard. M100-S15. Vol 25, nº 1.

Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI), 2008. Performance Standard for Antimicrobial Disk and Dilution Susceptibility Test for Bacterial isolated from Animals. Approved Standard-Third Edition. M31-A3, Vol 28, nº 8.

Funk, J., Grebeyes, W.A., 2004. Risk factors associated with salmonella prevalence on swine farms. *Journal of Swine Health and Management*. 12, 246–251.

García-Feliz, C., Carvajal, A., Collazos, J.A., Rubio, P., 2009. Herd-level risk factors for faecal shedding of *Salmonella enterica* in Spanish fattening pigs. *Preventive Veterinary Medicine* 91, 130-136.

Handeland, K., Nesse, L.L., Lillehaug, A., Vikøren, T., Djønnne, B., Bergsjø, B., 2008. Natural and experimental *Salmonella typhimurium* infections in foxes (*Vulpes vulpes*). *Veterinary Microbiology* 132, 129-134.

Kaneko, M., Noda, H., Ohnuma, M., 2007. Serovars and epidemiological properties of salmonella isolated from patients with sporadic diarrhoea in Yamanashi prefecture during the last 22 years (1985-2006). *Kansenshogaku Zasshi* 81, 394-402.

Mellon, M., Benbrook, C., Benbrook, K.L., 2001. Using antimicrobials in livestock. In: *Hogging It: Estimates of Antimicrobial Abuse in Livestock*, UCS Publications, Cambridge, MA, USA, pp. 11-14.

Polo, F., Figueras, M.J., Inza, I., Sala, J., Fleisher, J.M., Guarro, J., 1999. Prevalence of salmonella serotypes in environmental waters and their relationships with indicator organisms. *Antonie Van Leeuwenhoek* 75, 285-292.

Rubio, P., 2008. Salmonelosis: el próximo reto. *Diálogos del cerdo Ibérico*, Fregenal de la Sierra, Badajoz, Spain.

Schwartz, K.J., 1999. Salmonellosis. In: *Diseases of Swine*, Straw, B.E., D'Allaire, S., Mengeling, W.L., Taylor, D.J., (Eds.) eighth ed., Iowa State University Press, Ames, Iowa, USA, pp. 535-551.

Singer, N., Weissman, Y., Yom-Tov, Y., Marder, U., 1977. Isolation of *Salmonella hessarek* from starlings (*Sturnus vulgaris*). *Avian Diseases* 21, 117-119.

van der Wolf, P.J., Elbers, A.R., van der Heijden, H.M., van Schie, F.W., Hunneman, W.A., Tielens, M.J., 2001. Salmonella seroprevalence at the population and herd level in pigs in The Netherlands. *Veterinary Microbiology* 80, 171-184.



**SALMONELLA PREVALENCE AND CHARACTERIZATION IN A FREE-RANGE
PIG PROCESSING PLANT: TRACKING IN TRUCKS, LAIRAGE, SLAUGHTER
LINE AND QUARTERING**

M. Hernández, J. Gómez-Laguna, I. Luque, S. Herrera-León, A. Maldonado, L. Reguillo and
R.J. Astorga

Publicado en *International Journal of Food Microbiology*, 162 (2013), 48-54

SALMONELLA PREVALENCE AND CHARACTERIZATION IN A FREE-RANGE PIG PROCESSING PLANT: TRACKING IN TRUCKS, LAIRAGE, SLAUGHTER LINE AND QUARTERING

Manuela Hernández ^{a,1}, Jaime Gómez-Laguna ^{a,1,*}, Inmaculada Luque ^b, Silvia Herrera-León ^c, Alfonso Maldonado ^b, Lucía Reguillo ^b, Rafael J. Astorga ^b

^a CICAP Agrifood Research Center, 14400 Pozoblanco, Córdoba, Spain

^b Animal Health Department, Veterinary Medicine Faculty, University of Cordoba, 14071 Córdoba, Spain

^c National Center of Microbiology, Institute of Health Carlos III, Madrid, Spain

¹ Both authors contributed equally to this work

Abstract

New consumer tendencies are focused on products derived from systems which allow both a high animal welfare conditions together with a high food safety level. However, sometimes animal welfare regulations make the adoption of adequate bio-security measures difficult, representing a barrier for animal health and food safety. Thus the aim of this study was to determine the prevalence of *Salmonella* at different points of the pig slaughtering process (Trucks, Lairage, Slaughter line and Quartering, TLSQ) from pigs reared in free-range systems. From eight samplings a total of 126 *Salmonella* isolates out of 1160 different samples were recovered (10.86%). The highest percentage of isolates were detected at the points of pre-scalding (29/80, 36.25%), trucks (13/56, 23.21%), caecal contents (17/80, 21.25%), tonsils (14/80, 17.50%), ileocaecal lymph nodes (13/80, 16.25%) and lairage (9/64, 14.06%). Furthermore, eighteen isolates were obtained from different environmental samples from slaughter line and quartering plant (knives and surface of tables) (5.63%) and three isolates at the quartering plant samples (ham, shoulder and loin) (3.75%). Fourteen different serotypes were isolated: Bredeney, Rissen, Derby, Typhimurium, Montevideo, Israel,

Anatum, Emek, Monophasic *Salmonella* Typhimurium (mST), Choleraesuis, Durban, Kentucky, London and Sandiego. *S.* Typhimurium phage types U311, 193, 104b and UT were identified. Moreover, mST strain was phage typed as U311. From TLSQ1, TLSQ2 and TLSQ4, different strains of *S.* Derby, *S.* Rissen and *S.* Bredeney serotypes were isolated from pig and environmental samples, pointing to a potential cross contamination. Molecular typing (Pulsed-field gel electrophoresis, PFGE) of these strains confirmed the cross contamination. In the remaining samplings, different serotypes were obtained in each sampled point of the chain, assuming that the isolated serotypes belonged to different epidemiological origins. Our results show the isolation of different serotypes of *Salmonella* spp. from both pigs and environmental samples, which constitutes a great risk for the contamination of pork from free-range pigs both prior and post slaughter. These data support the intensification of the cleaning and disinfection in the pre-slaughter environment (i.e. trucks, lairage), especially when a higher workload is present, as well as the inclusion of new strategies to decrease or eliminate the risk of *Salmonella* spp. infection or recontamination from the environment in pork from organic or eco-friendly systems.

Keywords: Free-range pig; *Salmonella*; Truck; Lairage; Slaughter line; Quartering.

Introduction

Salmonella is considered as the second most important foodborne pathogen worldwide, just after *Campylobacter* spp., and is commonly recovered from poultry and pigs and their products in the European Union (EFSA, 2011). Focusing on pig and pork production, Spain occupies second place in both pig and pork production and is considered as the highest pork consumer between the 27 member states of Europe (Marquer, 2010).

Pigs may acquire *Salmonella* infection from different sources at the final stages of the pig production with transport and lairage identified as critical points. At these points, stress factors may induce carrier pigs to shed the pathogen at a higher rate and increase the susceptibility of *Salmonella*-free pigs to infection (Hurd et al., 2002; Mannion et al., 2008; Dorr et al., 2009). Therefore, several authors have pointed out the significant role of the lairage in *Salmonella* dissemination (Vieira-Pinto et al., 2006; Duggan et al., 2010; Busser et al., 2011; Kirchner et al., 2011). In addition, cross contamination with environmental *Salmonella* serotypes may occur on the slaughter line or during quartering and play a critical role in *Salmonella* contamination of pork products. In this sense, the molecular tracking of *Salmonella* isolates throughout the pig production chain represents a suitable tool to determine the cross contamination between the environment and the pig carcass (Busser et al., 2011).

Modern consumer concerns are focused on products derived from organic and eco-friendly pig rearing systems, which are gaining increased importance in the swine industry. These rearing systems usually allow a better quality of animal welfare conditions but this comes at a cost to biosecurity due to their close contact with wild animals (Funk and Grebeyes, 2004), which might have implications in food safety. Interestingly, similar values of *Salmonella* prevalence at herd and individual levels have been reported in pigs reared as in indoor as in outdoor systems, but with significant differences among the *Salmonella* serovars isolated (Gómez-Laguna et al., 2011). In this sense, it is needed to carry our studies to assess the impact of free-range rearing systems on pork production. Taking into account that different *Salmonella* serotypes may be isolated from the farm and the slaughterhouse, the aims of the present study were to determine the prevalence of *Salmonella* spp. in Trucks, Lairage, Slaughter line and Quartering (TLSQ) along a free-range pig production plant and to

genetically characterize the *Salmonella* isolates recovered in order to determine carcass contamination.

Material and Methods

Sampling

During 2009 and 2010 a systematic sampling from eight different free-range pig production units was carried out (TLSQ1 to TLSQ8 assays). Ten fattening pigs per herd were sampled. The traceability for each pig was strictly followed along the abattoir. Six different stages of the production chain and different samples were tested in each TLSQ assay (Table 1): i) trucks at its arrival to the abattoir and after cleaning and disinfection (*floor, walls, ceiling, mat and entrance ramp*); ii) lairage, prior entry of the pigs (cleaned and disinfected) and just after departure to slaughter (dirty) (*floor, walls, drinking nipple, and drainage*); iii) ten pig carcasses per herd at five different stages (*pre-scalding, post-scalding, post-flaming, post-evisceration and post-washed*) of slaughter-dressing (carcass swabs collected from each pig by swabbing a 100 cm² area of ham, back, and shoulder); iv) tonsils, ileocaecal lymph nodes and caecal contents; v) environmental samples (*scalding and sterilization water, knives and axes from the slaughter line; sterilization water, tables, knives and mesh gloves from quartering environment*); vi) quartering samples (*ham, shoulder and loin*).

At this abattoir only free-range pigs were slaughtered coinciding always with the time frame from September to June next year. During this working periods a systematic cleaning and disinfection protocol was carried out following each slaughtering. From June to September, meanwhile no slaughter was performed, a more exhaustive and meticulous cleaning and disinfection protocols of the abattoir were carried out, including the dismantling of the equipments.

Salmonella isolation and identification

All samples were collected into sterile container or plastic bag with sponges and transported from the slaughterhouse to the laboratory to be processed on the same day according to ISO 6579: 2002 procedure for *Salmonella* culture and isolation.

Truck, lairage, carcass and environmental samples were collected into sterile container (for feces, tonsils, ileocaecal lymph nodes or meat samples) and/or with sponges (for swabs from carcasses and surfaces) into plastic bags, diluted 1 in 10 in buffered peptone water (Oxoid, Deutschland GmbH, Wesel, Germany) and incubated 24 h at 37 °C. Sterile dehydrated sampling sponges were pre-moistened with 10 ml of peptone water and the targeted surface was swabbed by using an overlapping 'S' pattern to cover the entire surface. Then, 90 ml of peptone water were added into the plastic bag containing the sponge and incubated 24 h at 37 °C. Fecal samples (25 g per sample) from each sampling stage (trucks and lairage) were diluted in 225 ml of peptone water, homogenized using a Stomacher (IUL-Instruments, Spain) for 1 min and incubated at 37 °C for 24 h. In addition, fecal samples from cecum (25 g per pig) were collected after slaughtering and processed as described above. Tonsils and ileocaecal lymph nodes were collected in the slaughterhouse from 10 pigs per examined herd. Tonsils and ileocaecal lymph nodes were collected from each pig at slaughter (1 g per organ) and after decontamination by flaming were diluted in 9 ml peptone water and incubated at 37 °C for 24 h. At quartering, twenty five grams of three different meat pieces (ham, shoulder and loin) were taken aseptically, diluted in 225 ml of buffered peptone water, and homogenized for 1 min and incubated at 37 °C for 24 h.

For the selective enrichment, 100 µl (x3) of pre-enriched broth was transferred onto

Rappaport-Vassiliadis Medium Semisolid Modified (MSRV) (Oxoid) and incubated at 42 °C, carrying out two readings at 24 and 48 h, according to ISO 6579:2002. Subsequently, a double culturing on Xylose lysine deoxycholate agar (XLD) and *Salmonella* Chromogenic agar base (CM1007, Oxoid) (37 °C, 24 h) was carried out. Presumptive *Salmonella* isolates were biochemically confirmed by lysine iron agar (Difco, Becton Dickinson, Barcelona, Spain), Kligler's iron agar (Oxoid), and motility indole ornithine agar (Difco, Becton Dickinson). When confirmed, these isolates were stored at - 80 °C on Microbank beads (Pro-Lab Diagnostics, Quimigranel S.A., Spain) until typing.

Salmonella Typing

Salmonella isolates were typed by means of agglutination techniques using commercially available antisera (Statens Serum Institut, Denmark), and a Phage's panel provided by the International Reference Laboratory of Phage typing (Colindale, London, England). All these procedures were specifically carried out at the National Center of Microbiology (Institute of Health Carlos III, Madrid, Spain).

The Pulsed-Field Gel Electrophoresis (PFGE) technique was performed as outlined by the PulseNet protocol (<http://www.pulsenetinternational.org/protocols/Pages/default.aspx>) by using CHEF-DRIII System (Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA, USA). Pulse ramping was from 2.2 to 63.8 s over 20 hours. The PFGE patterns were analyzed by means of InfoQuest FP software version 4.5 (Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA, USA). Clustering of patterns was done by the unweighted-pair group method with arithmetic averaging and the Dice coefficient. The Dice similarity coefficient was used with optimization and position tolerance setting of 0.5 and 1.5%. Only strains with an indistinguishable profile were considered to represent a single clone.

Statistical analysis

A descriptive study was initially carried out at the different sampled stages of the pig slaughtering process (truck, lairage, slaughter line, tonsils, lymph nodes, caecal contents, environmental samples and quartering) and the 95% confidence interval (CI₉₅) was assessed by means of the software Winepi (Veterinary Medicine Faculty, University of Zaragoza, Spain). Following, a transversal observational analysis was performed comparing the different phases examined from the pig entry till the quartering plant to determine the role of each phase as a protection or as a risk factor (Odds Ratio/CI₉₅, and χ^2 estimate, Winepi); results with a *P* value ≤ 0.05 were considered as statistically significant.

Results

Salmonella prevalence at each stage of the production chain

A total of 126 *Salmonella* isolates from 1160 different samples (10.86%) were recovered. The highest percentage of isolates was detected at the point of pre-scalding (29/80, 36.25%; CI₉₅ 32.87-39.53), trucks (13/56, 23.21%; CI₉₅ 12.16-34.26), caecal contents (17/80, 21.25%; CI₉₅ 12.25-30.15), tonsils (14/80, 17.50%; CI₉₅ 9.13-25.82), ileocaecal lymph nodes (13/80, 16.25%; CI₉₅ 8.13-24.27) and lairage (9/64, 14.06%; CI₉₅ 5.55-22.57) (Table 1). For the remaining sampling points examined (pig and abattoir), the number of isolates recovered was low (7/80, 2/80, 0/80 and 1/80 positive samples in post-scalding, post-flaming, post-evisceration and post-washed stages, respectively), of note however were 18 isolates obtained from different environmental samples (knives and surface of tables) (5.63%; CI₉₅ 3.08-8.12) and 3 isolates in the quartering plant samples (ham, shoulder and loin) (3.75%; CI₉₅ 1.28-10.45) (Table 1). The highest number of isolates was obtained either coinciding either with the highest workload at the abattoir, when more than 400 pigs were slaughtered, or with months with warmer temperatures (i.e. June).

Table 1. Number of *Salmonella* isolates and prevalence (%) in each TLSQ (Trucks, Lairage, Slaughter line and Quartering) assay in the examined free-range pig processing plant (TLSQ1 to TLSQ8 assays)

| TLSQ | Date of sampling | Abattoir workload ^a | T1 | T2 | L1 | L2 | S1 | S2 | S3 | S4 | S5 | To | Ln | C | E | Q | Total |
|------------------------------------|------------------|--------------------------------|-------|-------|-------|------|-------|------|------|------|------|-------|-------|-------|------|------|--------------|
| 1 | June 2009 | 291 | 2 | 1 | 2 | 0 | 11 | 0 | 0 | 0 | 0 | 2 | 6 | 7 | 2 | 0 | 33 |
| 2 | January 2010 | 1056 | 2 | 0 | 0 | 1 | 3 | 0 | 0 | 0 | 0 | 6 | 6 | 4 | 0 | 1 | 23 |
| 3 | February 2010 | 1073 | 0 | 0 | 3 | 0 | 0 | 0 | 2 | 0 | 0 | 0 | 0 | 2 | 8 | 1 | 16 |
| 4 | March 2010 | 530 | 1 | 1 | 0 | 1 | 4 | 6 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 1 | 8 | 1 | 23 |
| 5 | April 2010 | 361 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 1 | 1 | 0 | 1 | 0 | 0 | 3 |
| 6 | May 2010 | 192 | 0 | 3 | 0 | 0 | 5 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 1 | 0 | 0 | 9 |
| 7 | June 2010 | 401 | 1 | 1 | 0 | 0 | 6 | 1 | 0 | 0 | 0 | 5 | 1 | 1 | 0 | 0 | 16 |
| 8 | October 2010 | 341 | 1 | 0 | 1 | 1 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 3 |
| Total of <i>S.</i> isolates | - | - | 7 | 6 | 6 | 3 | 29 | 7 | 2 | 0 | 1 | 14 | 13 | 17 | 18 | 3 | 126 |
| Total of samples | - | - | 24 | 32 | 32 | 32 | 80 | 80 | 80 | 80 | 80 | 80 | 80 | 80 | 320 | 80 | 1160 |
| Prevalence (%) | - | - | 29.17 | 18.75 | 18.75 | 9.38 | 36.25 | 8.75 | 2.50 | 0.00 | 1.25 | 17.50 | 16.25 | 21.25 | 5.63 | 3.75 | 10.86 |

^a Abattoir workload shows the total number of pig carcasses slaughtered the day that sampling was carried out.

T1, truck prior cleaning and disinfection; T2, truck after cleaning and disinfection; L1, lairage prior entry of the pigs (cleaned and disinfected); L2, lairage after exit of the pigs; Slaughter line (carcasses samples): S1 (pre-scalding), S2 (post-scalding), S3 (post-flaming), S4 (post-evisceration), S5 (post-washing); To, tonsils; Ln, ileocaecal lymph nodes; C, caecal contents; E, environmental samples from slaughter line and quartering plant; Q, quartering samples (ham, shoulder and loin).

Salmonella serotypes isolated from each TLSQ

From trucks, lairage, environmental and pig samples the distribution of serotypes and phage types was as follow (Tables 2 and 3): Bredeney (37 strains), Rissen (35), Derby (25), Typhimurium (11), Montevideo (4), Israel (4), Anatum (2), Emek (2), Monophasic *Salmonella* Typhimurium (mST) (1), Choleraesuis v. Kunzendorf. (1), Durban (1), Kentucky (1), London (1) and Sandiego (1). *S.* Typhimurium phage types U311 (8 strains), 193 (1), 104b (1) and UT (1) were identified. Monophasic strain belonged to U311 phage type.

Table 2. *Salmonella* serotypes isolated along the pig slaughtering process in the examined free-range pig abattoir and processing plant (assays TLSQ1 to TLSQ8).

| Sample type | Positive (n)/ Tested (n) | Serotypes and Phage types (n) |
|-----------------------|-----------------------------|---|
| Trucks | 13/56 | |
| <i>T1</i> | 7/24 | Derby (2); Rissen (2), Typhimurium U311 (1); Kentucky (1); Montevideo (1) |
| <i>T2</i> | 6/32 | Montevideo (3); Rissen (1); Typhimurium 104b (1); Sandiego (1) |
| Lairage | 9/64 | |
| <i>L1</i> | 6/32 | Derby (2); Typhimurium U311 (2); Choreasuis (1); Bredeney (1) |
| <i>L2</i> | 3/32 | Derby (1); Rissen (1); mST U311 (1) |
| Slaughter line | 83/640 | |
| <i>S1</i> | 29/80 | Bredeney (17); Typhimurium U311 (5), NT (1); Derby (2); Anatum (2); Rissen (1); London (1) |
| <i>S2</i> | 7/80 | Bredeney (6); Derby (1) |
| <i>S3</i> | 2/80 | Rissen (2) |
| <i>S4</i> | 0/80 | - |
| <i>S5</i> | 1/80 | Rissen (1) |
| <i>To</i> | 14/80 | Rissen (7); Israel (4); Derby (2); Durban (1) |
| <i>Ln</i> | 13/80 | Derby (6); Rissen (6); Bredeney (1) |
| <i>C</i> | 17/80 | Derby (7); Rissen (5); Bredeney (3); Emek (2) |
| Quartering | 3/80 | Rissen (1); Typhimurium 193 (1); Bredeney (1) |
| Environment | 18/320 | |
| <i>Es</i> | 9/128 | Rissen (5); Derby (2); Bredeney (2) |
| <i>Eq</i> | 9/192 | Bredeney (6); Rissen (3) |

T1, trucks prior cleaning and disinfection; T2, trucks after cleaning and disinfection; L1, lairage prior entry of the pigs; L2, lairage after exit of the pigs; S1, pre-scalding; S2, post-scalding; S3, post-chilling; S4, post-evisceration; S5, post-washing; To, tonsils; Ln, ileocaecal lymph nodes; C, caecal contents; Q, quartering samples (ham, shoulder and loin); Es, Environment slaughter line (scald and sterilization water, knives and axes); Eq, Environment quartering (sterilization water, tables, knives and mesh gloves).

The phenotypic characterization was carried out on the 126 selected isolates from TLSQ1 to TLSQ8. In three assays (TLSQ1, TLSQ2 and TLSQ4) *S. Derby*, *S. Rissen* and *S. Bredeney*, respectively, were isolated from both pig and environmental samples (Table 3). In the remaining assays (TLSQ3, TLSQ5, TLSQ6, TLSQ7 and TLSQ8), different serotypes were obtained from each sampled point of the pig slaughtering process (trucks, lairage, slaughter line or quartering) (Table 3).

PFGE and phylogenetic analysis

PFGE was used to characterise the genotype of *Salmonella* serotype strains when the same *Salmonella* serotype was isolated from pig and environmental samples in a TLSQ sampling (TLSQ1 ‘Derby’, TLSQ2 ‘Rissen’ and TLSQ4 ‘Bredeney’). PFGE-XbaI showed different pulsotypes (PFPs) or genotypes (Fig. 1). TLSQ1 ‘Derby’ strains showed three different genotypes: **PFP₁**, with nine strains from pig samples (pre-scalding, S1; tonsils, To; lymph nodes, Ln; and caecal content, C) and slaughter line environment (Es); **PFP₂**, eleven from trucks, lairage, and pig samples (Ln, C); **PFP₃**, two from lairage and pig samples (C); among the three PFPs a genetic similarity coefficient value range of 45-100% was obtained. TLSQ2 ‘Rissen’ strains showed four different genotypes: **PFP₄**, sixteen from trucks, quartering and pig samples (To, Ln, C); **PFP₅**, one from pig samples (Ln); **PFP₆**, one from pig samples (S1) and **PFP₇**, one from pig samples (C). A genetic similarity coefficient value range of 86.6-100% was obtained. Finally, TLSQ4 ‘Bredeney’ strains showed an indistinguishable genotype, **PFP₈**.

Table 3. Salmonella serotypes and sample source in the examined free-range pig processing plant (1/3).

| TLSQ | Sample type | Positive (n)/ Tested (n) | Serotypes and Phage types (n) |
|-----------|----------------------|-----------------------------|---|
| 1 | Trucks | 3/7 | |
| | <i>T1</i> | 2/3 | Derby (2) |
| | <i>T2</i> | 1/4 | Rissen (1) |
| | Lairage | 2/8 | |
| | <i>L1</i> | 2/4 | Derby (2) |
| | <i>L2</i> | 0/4 | - |
| | Slaughterline | 26/80 | |
| | <i>S1</i> | 11/10 | Bredeney (8); Anatum (2); Derby (1) |
| | <i>S2</i> | 0/10 | - |
| | <i>S3</i> | 0/10 | - |
| | <i>S4</i> | 0/10 | - |
| | <i>S5</i> | 0/10 | - |
| | <i>To</i> | 2/10 | Derby (2) |
| | <i>Ln</i> | 6/10 | Derby (6) |
| | <i>C</i> | 7/10 | Derby (7) |
| | Quartering | 0/10 | - |
| | Environment | 2/40 | |
| <i>Es</i> | 2/16 | Derby (2) | |
| <i>Eq</i> | 0/24 | - | |
| 2 | Trucks | 2/7 | |
| | <i>T1</i> | 2/3 | Rissen (1); Typhimurium U311 (1) |
| | <i>T2</i> | 0/4 | - |
| | Lairage | 1/8 | |
| | <i>L1</i> | 0/4 | - |
| | <i>L2</i> | ¼ | Monophasic 4,5,12:i:- U311 (1) |
| | Slaughterline | 19/80 | |
| | <i>S1</i> | 3/10 | Rissen (1); Typhimurium U311 (1), NT (1) |
| | <i>S2</i> | 0/10 | - |
| | <i>S3</i> | 0/10 | - |
| | <i>S4</i> | 0/10 | - |
| | <i>S5</i> | 0/10 | - |
| | <i>To</i> | 6/10 | Rissen (6) |
| | <i>Ln</i> | 6/10 | Rissen (6) |
| | <i>C</i> | 4/10 | Rissen (4) |
| | Quartering | 1/10 | Rissen (1) |
| | Environment | 0/40 | |
| <i>Es</i> | 0/16 | - | |
| <i>Eq</i> | 0/24 | - | |
| 3 | Trucks | 0/7 | |
| | <i>T1</i> | 0/3 | - |
| | <i>T2</i> | 0/4 | - |
| | Lairage | 3/8 | |
| | <i>L1</i> | 3/4 | Typhimurium U311 (2); Choleraesuis var. kuzendorf (1) |
| | <i>L2</i> | 0/4 | - |
| | Slaughterline | 4/80 | |
| | <i>S1</i> | 0/10 | - |
| | <i>S2</i> | 0/10 | - |
| | <i>S3</i> | 2/10 | Rissen (2) |
| | <i>S4</i> | 0/10 | - |
| | <i>S5</i> | 0/10 | - |
| | <i>To</i> | 0/10 | - |
| | <i>Ln</i> | 0/10 | - |
| | <i>C</i> | 2/10 | Emek (2) |
| | Quartering | 1/10 | Typhimurium 193 (1) |
| | Environment | 8/40 | |
| <i>Es</i> | 5/16 | Rissen (5) | |
| <i>Eq</i> | 3/24 | Rissen (3) | |

| TLSQ | Sample type | Positive (n)/ Tested (n) | Serotypes and Phage types (n) |
|-----------|-----------------------------------|-----------------------------|-------------------------------|
| 4 | Trucks | 2/7 | |
| | <i>T1</i> | 1/3 | Kentucky (1) |
| | <i>T2</i> | 1/4 | Montevideo (1) |
| | Lairage | 1/8 | |
| | <i>L1</i> | 0/4 | - |
| | <i>L2</i> | 1/4 | Rissen (1) |
| | Slaughterline | 11/80 | |
| | <i>S1</i> | 4/10 | Bredeney (4) |
| | <i>S2</i> | 6/10 | Bredeney (6) |
| | <i>S3</i> | 0/10 | - |
| | <i>S4</i> | 0/10 | - |
| | <i>S5</i> | 0/10 | - |
| | <i>To</i> | 0/10 | - |
| | <i>Ln</i> | 0/10 | - |
| | <i>C</i> | 1/10 | Bredeney (1) |
| | Quartering Environment | 1/10 8/40 | Bredeney (1) |
| | <i>Es</i> | 2/16 | Bredeney (2) |
| <i>Eq</i> | 6/24 | Bredeney (6) | |
| 5 | Trucks | 0/7 | |
| | <i>T1</i> | 0/3 | - |
| | <i>T2</i> | 0/4 | - |
| | Lairage | 0/8 | |
| | <i>L1</i> | 0/4 | - |
| | <i>L2</i> | 0/4 | - |
| | Slaughterline | 3/80 | |
| | <i>S1</i> | 0/10 | - |
| | <i>S2</i> | 0/10 | - |
| | <i>S3</i> | 0/10 | - |
| | <i>S4</i> | 0/10 | - |
| | <i>S5</i> | 1/10 | Rissen (1) |
| | <i>To</i> | 1/10 | Rissen (1) |
| | <i>Ln</i> | 0/10 | - |
| | <i>C</i> | 1/10 | Rissen (1) |
| | Quartering Environment | 0/10 0/40 | - |
| | <i>Es</i> | 0/16 | - |
| <i>Eq</i> | 0/24 | - | |
| 6 | Trucks | 3/7 | |
| | <i>T1</i> | 0/3 | - |
| | <i>T2</i> | 3/4 | Montevideo (2); Sandiego (1) |
| | Lairage | 0/8 | |
| | <i>L1</i> | 0/4 | - |
| | <i>L2</i> | 0/4 | - |
| | Slaughterline | 6/80 | |
| | <i>S1</i> | 5/10 | Bredeney (5) |
| | <i>S2</i> | 0/10 | - |
| | <i>S3</i> | 0/10 | - |
| | <i>S4</i> | 0/10 | - |
| | <i>S5</i> | 0/10 | - |
| | <i>To</i> | 0/10 | - |
| | <i>Ln</i> | 0/10/10 | - |
| | <i>C</i> | 0/10 | Bredeney (1) |
| | Quartering Environment | 0/40 | - |
| | <i>Es</i> | 0/16 | - |
| <i>Eq</i> | 0/24 | - | |

| TLSQ | Sample type | Positive (n)/ Tested (n) | Serotypes and Phage types (n) |
|-----------|----------------------|-----------------------------|---|
| 7 | Trucks | 2/7 | |
| | <i>T1</i> | 1/3 | Montevideo (1) |
| | <i>T2</i> | 1/4 | Typhimurium 104b (1) |
| | Lairage | 0/8 | |
| | <i>L1</i> | 0/4 | - |
| | <i>L2</i> | 0/4 | - |
| | Slaughterline | 14/80 | |
| | <i>S1</i> | 6/10 | Typhimurium U311 (4); London (1); Derby (1) |
| | <i>S2</i> | 1/10 | Derby (1) |
| | <i>S3</i> | 0/10 | - |
| | <i>S4</i> | 0/10 | - |
| | <i>S5</i> | 0/10 | - |
| | <i>To</i> | 5/10 | Israel (4); Durban (1) |
| | <i>Ln</i> | 1/10 | Bredeney (1) |
| | <i>C</i> | 1/10 | Bredeney (1) |
| | Quartering | 0/10 | - |
| | Environment | 0/40 | - |
| <i>Es</i> | 0/16 | - | |
| <i>Eq</i> | 0/24 | - | |
| 8 | Trucks | 1/7 | |
| | <i>T1</i> | 1/3 | Rissen (1) |
| | <i>T2</i> | 0/4 | - |
| | Lairage | 2/8 | |
| | <i>L1</i> | 1/4 | Bredeney (1) |
| | <i>L2</i> | 1/4 | Derby (1) |
| | Slaughterline | 0/80 | |
| | <i>S1</i> | 0/10 | - |
| | <i>S2</i> | 0/10 | - |
| | <i>S3</i> | 0/10 | - |
| | <i>S4</i> | 0/10 | - |
| | <i>S5</i> | 0/10 | - |
| | <i>To</i> | 0/10 | - |
| | <i>Ln</i> | 0/10 | - |
| | <i>C</i> | 0/10 | - |
| | Quartering | 0/10 | - |
| | Environment | 0/40 | - |
| <i>Es</i> | 0/16 | - | |
| <i>Es</i> | 0/24 | - | |

T1, trucks prior cleaning and disinfection; T2, trucks after cleaning and disinfection; L1, lairage prior entry of the pigs (cleaned and disinfected); L2, lairage after exit of the pigs; S1, pre-scalding; S2, post-scalding; S3, post-flaming; S4, post-evisceration; S5, post-washing; To, tonsils; Ln, ileocaecal lymph nodes; C, caecal contents; Q, quartering samples (ham, shoulder and loin); Es, Environment slaughter line (scald and sterilization water, knives and axes); Eq, Environment quartering (sterilization water, tables, knives and mesh gloves).

Dice (Opt:0.80%) (Tol:1.5%-1.5%) (H=0.0% S=0.0%) [0.0%-100.0%]
 PFGE-XbaI PFGE-XbaI

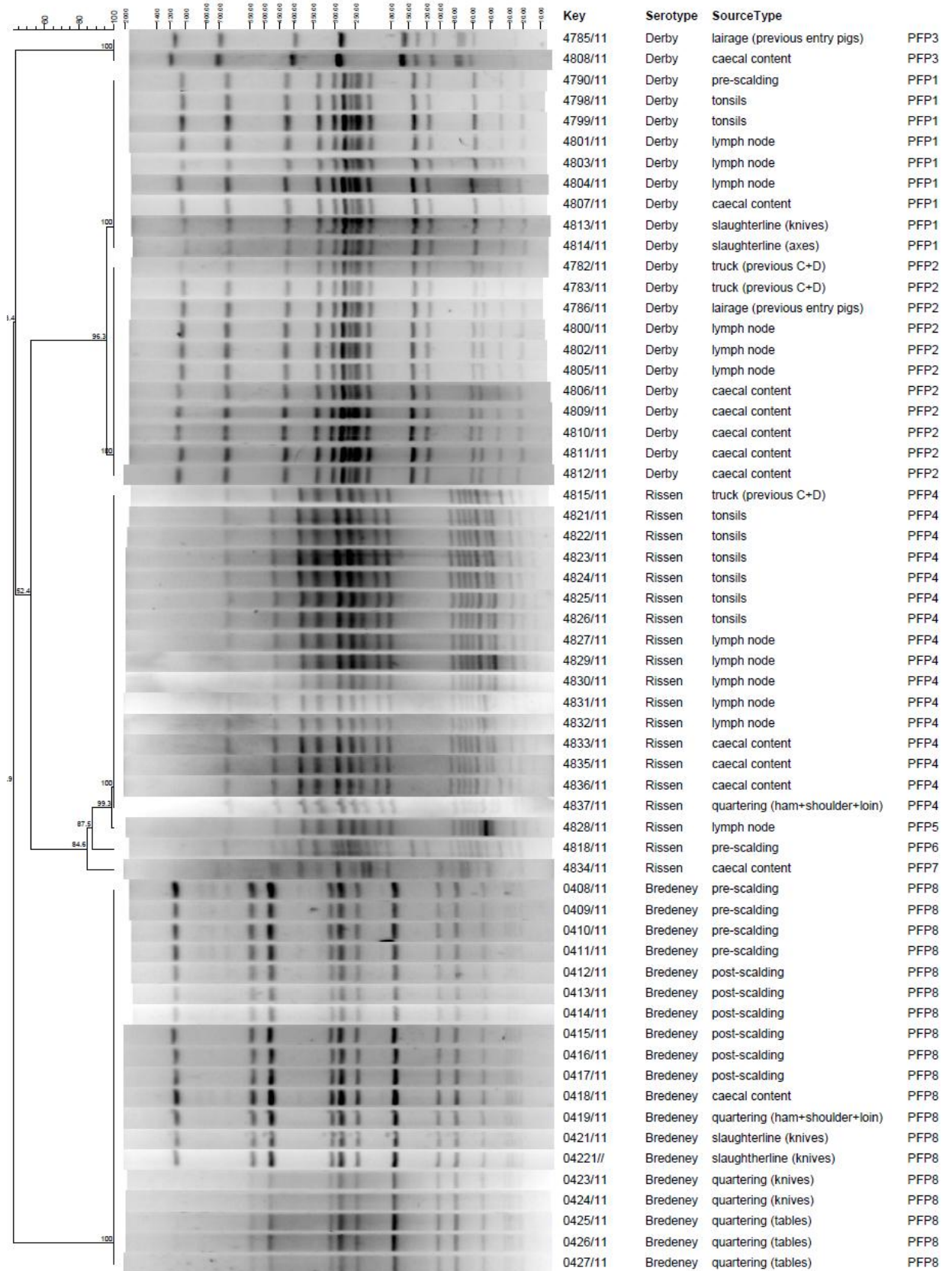


Fig. 1. Dendrogram. Pulsed field gel electrophoresis (PFGE) profiles of *Salmonella* Derby, Rissen and Bredeney strains (TLSQ1, 2 and 4 assays) showing genetic similarity index among isolates from truck, lairage, slaughter line carcasses and environment, tonsils, ileocaecal lymph nodes, ileocacecal contents, and quartering samples.

Statistical analysis results

Statistical analysis results showed that scalding was a protection factor in the chain. The comparative statistical analysis between pre- and post-scalding detected an Odds Ratio of 0.3583 (CI₉₅ 0.142-0.905) being χ^2 4.95 (p 0.025). The remaining phases of the slaughter line chain showed no statistical correlation (no protection factor).

On the other hand, the comparative study in trucks (OR 0.56 CI₉₅ 0.511-6.288, χ^2 0.83, p 0.36) and lairage (OR 2.23 CI₉₅ 0.506-9.834, χ^2 3.97, p 0.04) showed no statistical association between cleaning and disinfection practices and isolation of *Salmonella*.

Discussion

Our results confirm the potential role of transport, lairage and slaughter line for contamination of pig carcasses in the pre- and post-slaughter environment. Cross-contamination in the slaughter line has been reported as an important source of *Salmonella* contamination for pig carcasses (Swanenburg et al., 2001).

In the present study, several uncommon serotypes and phage types were obtained from carcass and environment samples (Montevideo, Israel, Emek, Durban, Kentucky and Sandiego). Interestingly, these serotypes are different from those previously recovered from pigs reared in intensive and outdoor systems from the same geographical area (Astorga et al., 2007; Gómez-Laguna et al., 2011). In addition, *S. Typhimurium* phage types U311, 193,

104b and UT were identified, and mST strain was phage typed as U311. Contrary, Kirchner et al (2011) detected U302 and U288 as the most frequent phage types isolated from pig abattoirs. Moreover, phage types 104, 193 and 120 are frequently isolated in human cases of salmonellosis (Anon, 2008). Whereas common phage types, such as 104 or 193, were obtained in our study from pork meat from free-range pigs pointing to a role on the common outbreaks of human *Salmonella*, the uncommon serotypes and phage types recovered might have an impact on the consumer's health, with especial attention to immunosuppressed patients.

Others studies have reported differences in *Salmonella* serotypes and prevalence between farms and slaughterhouses (Hurd et al., 2002), suggesting that the transport and lairage may represent relevant risk factors in pigs at slaughter. In Spain, Argüello et al. (2011) reported significantly higher scores in a study carried out in two pig slaughterhouses and cutting plants where meat from finishing pigs reared in intensive farms was processed. These authors found that the prevalence at the lairage level prior to the entry of pigs was 39.4% compared with a level of 18.75% observed in our study. In the slaughter line, a prevalence of 33.3% and 58.3% was recorded at the post-evisceration point in the two slaughterhouses examined by Argüello et al. (2011), whereas no *Salmonella* was isolated in the present study. Nonetheless, the results obtained in our study highlight the prevalence of 29% found at the pre-scalding point. Furthermore, in our study different *Salmonella* serotypes were isolated in trucks and lairage (18.75%) after cleaning and disinfection, pointing out that the procedures followed for cleaning and disinfection were not efficient to eliminate this pathogen.

Mannion et al. (2010) reported the role of transport, lairage and slaughter line equipment in the dissemination of *Salmonella* in pigs in the pre- and post-slaughter environments. In this

study, the prevalence of *Salmonella* both in the total number of isolates obtained as well as in pig samples was similar than that observed in the present study (16.8% vs 10.9%, and 8.5% vs 11.9, respectively). However, marked differences were observed in the prevalence in the environmental samples (40% vs 5.63% in the present study). These results highlight pigs as a source of *Salmonella*, however, the environment can also play a minor role in cross contamination of pig carcasses as was found in our study compared to others.

However, from TLSQ1, TLSQ2 and TLSQ4 *S. Derby*, *S. Rissen* and *S. Bredeney* serotypes, respectively, were isolated '*from trucks to quartering*', or '*from slaughter line to quartering*', pointing to a potential cross contamination between environmental and pig samples. This cross contamination was confirmed by means PFGE-XbaI for the three TLSQs. Pulsotypes from TLSQ1 and TLSQ2 showed same clones or genotypes for *S. Derby* and *S. Rissen* in tonsil, ileocaecal lymph node and/or caecal content of the same pig, highlighting pigs as a carrier with the ability to contaminate multiple contacts (Kich et al., 2011). Several authors have described as the presence of *Salmonella* in the intestinal tract of pigs represents an increased risk for carcass contamination since it is also associated with the presence of the pathogen in tonsils (Blaha et al., 1997; Vieria Pinto et al., 2006).

In this sense, Hurd et al. (2001) showed that after 2 hours of oral ingestion *Salmonella* may be detected in mesenteric lymph nodes. In our research the waiting time prior to slaughter was approximately of 15-20 hours, suggesting potential cross contamination of animals during holding. This hypothesis was confirmed by detection of the same clone in lairage (prior to cleaning and disinfection), trucks (previous cleaning and disinfection), and in tonsils, lymph nodes and/or caecal contents of the same pigs in TLSQ1 (PFP₂, PFP₃) and TLSQ2 (PFP₄), suggesting a cross contamination from transport or lairage to pigs or

viceversa (Kirchner et al., 2011). Moreover, in PFP₁ (TLSQ1), the same clone was isolated from tonsils, lymph nodes and/or caecal contents and from environmental samples, but not from lairage or trucks samples, which support the hypothesis of a cross contamination from pigs to the environment.

PFGE-XbaI from TLSQ4 showed an indistinguishable banding pattern for all the strains analysed (PFP₈) pointing to the same epidemiological origin and confirming cross contamination between pre-scalding to quartering. The lack of isolation of the same *Salmonella* clone from pig samples, such as tonsils, lymph nodes or caecal contents, suggests that a contaminated environment might be the responsible for the cross contamination in this assay. In the remaining TLSQ assays different serotypes were obtained from each stage sampled (trucks, lairage, slaughter line or quartering), assuming that the serotypes isolated at the different stages of the pig slaughtering process belonged to different epidemiological origins.

Hald et al. (2003) investigated the occurrence of *Salmonella* in 12 pig slaughterhouses from five European countries, detecting a higher prevalence during the warmer months as well as increased environmental contamination as the slaughter day progressed. The polishing and pluck removal processes were found to contribute significantly to the total carcass contamination, especially if the scalding water is also contaminated. These authors recommended ensuring sufficiently high temperatures of scalding water (62 °C) and appropriate cleaning and disinfection protocols of the polishing equipment at least once a day in order to reduce the level of carcass contamination. In agreement with Hald et al. (2003), a higher number of *Salmonella* isolates was obtained in the present study when the workload was higher and/or in the warmer months (i.e. June), which points out the necessity of

implementing the cleaning and disinfection protocols during these periods. Moreover, scalding acted as a protection factor in our study, being the temperature of the scalding water controlled at the abattoir in a daily basis to maintain within the range 59-62 °C by a thermal probe.

European regulations require the use of disinfection equipment in the slaughterhouse with a water temperature of at least at 82 °C. Heres et al. (2011), reported an alternative system called Inspexx[®]200, containing peracetic acid and peroctanoic, which was able to significantly reduce bacterial contamination of knives and was also significantly faster than hot water. Other interventions which may help to reduce the incidence of *Salmonella* in the process have been suggested in order to control or minimize the threat of salmonellosis associated with pork products. Among them, the installation of hot water showers at 80 °C or showers with chlorinated water with added organic acids, have also been reported as useful in the treatment of pig carcasses contaminated with *S. Typhimurium* (Kich et al., 2011). Preliminary results from our research group have also showed that tertiary and quaternary ammonium as well as polyenzyme solutions may be helpful to diminish *Salmonella* prevalence at the abattoir when used to disinfect cutting materials or surfaces (data not published). In addition, ozonated water has been proposed as an effective alternative to chlorinated water to control aerobic flora contamination before entry of pig carcasses to the quartering room (Quessy et al., 2011).

Conclusion

This study showed the isolation of different serotypes of *Salmonella* spp. from both pigs and environmental samples, which constitutes a great risk for the contamination of pork from free-range pigs both prior and post slaughter. These data support the conclusion that, for

Salmonella spp. Hazard Analysis and Critical Control Points (HACCP) at the pig slaughterhouse must include the cleaning and disinfection for trucks and lairage, an intensive cleaning and disinfection programs in the pre-slaughter environment as well as the inclusion of new chemical agents or treatments which allow decreasing or eliminating the risk of *Salmonella* spp. infection or recontamination from the environment. Moreover these measures should be strengthening when a higher workload is present in the slaughterhouse.

Acknowledgements

The authors acknowledge the financial support from Andalusia Government (ISC, Counseling) (SANIBERICO Research Project, Ref. 08/222), and Centre for the Development of Industrial Technology, CDTI (Ref. IDI-20090414).

References

Anon, 2008. Chapter 2. Reports of *Salmonella* in livestock and humans. In: *Salmonella* in livestock production in GB. ISBN 1-8995-1332-9. Available at: http://vla.defra.gov.uk/reports/rep_salm_rep08.htm (accessed 12 June 2012).

Argüello, H., Rubio, P., Carvajal, A., 2011. Occurrence and epidemiology of *Salmonella enterica* in two slaughterhouses and cutting plants in Spain. In: Proceedings of the 9th International Conference on the Epidemiology and Control of biological, chemical and physical hazards in pigs and pork – Safepork, Maastrich, The Netherlands, pp. 118-121.

Astorga, R.J., Echeita, A., Maldonado, A., Valdezate, S., Carbonero, A., Aladueña, A., Arenas, A., 2007. Surveillance and antimicrobial resistance of *Salmonella* strains isolated from slaughtered pigs in Spain. *Journal of Food Protection* 70, 1502-1506.

Blahe, T., Solano-Aguilar, G, Pigoan, C., 1997. The early colonization pattern of *Salmonella* Typhimurium in pigs after oral intake. In: Proceedings of the 2nd International Conference on the Epidemiology and Control of biological, chemical and physical hazards in pigs and pork – Safepork, Copenhagen, Denmark, pp. 71-73.

Busser, De E.V., Maes, D., Houf, K., Dewulf, J., Imberechts, H., Bertrand, S., Zutter De L., 2011. Detection and characterization of *Salmonella* in lairage, on pig carcasses and intestines in five slaughterhouses. *International Journal of Food Microbiology* 145, 279-286.

Dorr, P.M., Tadesse, D.A., Zewde, B.M., Fry, P., Thakur, S., Gebreyes, W.A., 2009. Longitudinal study on *Salmonella* dispersion and the role of environmental contamination in commercial swine production systems. *Applied and Environmental Microbiology* 75, 1478-1486.

Duggan, S.J., Mannion, C., Prendergast, D.M., Leonard, N., Fanning, S., Gonzales-Barron, U., Egan, J., Butler, F., Duffy, G., 2010. Tracking the *Salmonella* status of pigs and pork from lairage through the slaughter process in the Republic of Ireland. *Journal of Food Protection* 73, 2148-2160.

EFSA, 2011. The European Union Summary Report on Trends and Sources of Zoonoses, Zoonotic Agents and Food-borne outbreaks in the European Union in 2009. *EFSA Journal* 9, 2009.

Funk, J., Grebeyes, W.A., 2004. Risk factors associated with *Salmonella* prevalence on swine farms. *Journal of Swine Health Production* 12, 246-251.

Gómez-Laguna, J., Hernández, M., Creus, E., Echeita, A., Otal, J., Herrera-León, S., Astorga, R.J., 2011. Prevalence and antimicrobial susceptibility of *Salmonella* isolates from pigs reared in free-range system. *The Veterinary Journal* 190, 176-178.

Hald, T. Wingstrand, A., Swanenburg, M., von Altrock, A., Thorberg, B.M., 2003. The occurrence and epidemiology of *Salmonella* European slaughterhouses. *Epidemiology and Infection* 131, 1187-1203.

Heres, L., Verkaar, E., 2011. Alternative method for knife disinfection with INSPEXX 200 is more efficient than 82 °C water. IN: Proceedings of the 9th International Conference on the Epidemiology and Control of biological, chemical and physical hazards in pigs and pork – Safepork, Maastrich, The Netherlands, pp. 151-154.

Hurd, H. S., Gailey, J.K., McKean, J.D., Rostagno, M.H. 2001. Experimental rapid infection in market swine following exposure to a *Salmonella* contaminated environment. *Berliner und Münchener tierärztliche Wochenschrift* 114, 382-384.

Hurd, H.S., McKean, J.D., Griffith, R.W., Wesley, I.V., Rostagno, M.H., 2002. *Salmonella enterica* infections in market swine and without transport and holding. *Applied and Environmental Microbiology* 68, 2376-2381.

ISO 6579:2002/Amendment 1: 2007: Appendix D. Detection of *Salmonella* spp. in animal faeces and in environmental samples from the primary production stage.

Kich, J., Pissetti, C., Cardoso, M., Coldebella, A., Nogueira, M., Ferraz, S.M., 2011. Effect of different treatments on swine carcasses surface contamination with *Salmonella*

Typhimurium. In: Proceedings of the 9th International Conference on the Epidemiology and Control of biological, chemical and physical hazards in pigs and pork – Safepork, Maastrich, The Netherlands, pp. 278.

Kirchner, M., Marier, E., Miller, A., Snow, L., McLaren, I., Davies, R.H., Clifton-Hadley, F.A., Cook, A.J.C., 2011. Application of variable number of tandem repeat analysis to track *Salmonella enterica* spp. *enterica* serovar Typhimurium infection of pigs reared on three British farms through the production cycle to the abattoir. *Journal of Applied Microbiology* 11, 960-970.

Mannion, C., Egan, J., Lynch, B.P., Fanning, S., Leonard, N., 2008. An investigation into the efficacy of washing trucks following the transportation of pigs - a *Salmonella* perspective. *Foodborne Pathogens and Disease* 5, 261-271.

Mannion, C., Fanning, J., McLernon, J., Lendrum, L., Gutierrez, M., Duggan, S., Furphy, C., Egan, J., 2010. The role of transport, lairage and slaughterline equipment in the dissemination of *Salmonella* spp. in pigs in the pre- and post-slaughter environments in the Republic of Ireland. In: Proceedings of the I3S International Symposium *Salmonella* and Salmonellosis, Saint-Malo, France, pp. 245-248.

Marquer, P., 2010. Pig farming in the EU, a changing sector. In: *Statistics in focus*. Eurostat.

Quessy, S., Larivière-Gauthier, G., Fravallo, P., Fournaise, S., Letellier A., 2011. Evaluation of ozonated water as a microbiological risk mitigation option in pork production. In: Proceedings of the 9th International Conference on the Epidemiology and Control of biological, chemical and physical hazards in pigs and pork – Safepork, Maastrich, The Netherlands, pp. 298-300.

Swanenburg, M., Van der Wolf, P.J., Urlings, H.A.P., Snijders, J.M.A., Van Knapen, F., 2001. *Salmonella* in slaughter pigs: the effect of logistic slaughter procedures of pigs on the prevalence of *Salmonella* in pork. *International Journal of Food Microbiology* 70, 231-24

Vieira-Pinto, M., Tenreiro, R., Martins, C., 2006. Unveiling contamination sources and dissemination routes of *Salmonella* spp. in pigs at a Portuguese slaughterhouse through macrorestriction profiling by pulsed-field gel electrophoresis. *International Journal of Food Microbiology* 110, 77-84.

4. CONCLUSIONES

A continuación se destacan las principales *conclusiones* obtenidas a partir de cada uno de los estudios publicados en esta Tesis Doctoral:

1. Estudio I: “A serological survey of *Brucella* spp., *Salmonella* spp., *Toxoplasma gondii* and *Trichinella* spp., in Iberian fattening pigs reared in free-range systems”
 - Nuestro estudio detecta un **alto riesgo de infección frente a *Salmonella* spp. y *Toxoplasma gondii***, debido a la alta seroprevalencia hallada en la población muestreada (73.4% y 58.2%, respectivamente), lo que sugiere que deberían adoptarse medidas de control para minimizar su potencial transmisión de la granja a la mesa. Por el contrario, los bajos niveles de circulación detectados frente a ***Brucella* spp. y *Trichinella* spp.** (3.8% y negativa, respectivamente), patógenos con elevado peligro para la salud pública, indican que estos microorganismos representan **un bajo riesgo de infección para la población.**

2. Estudio II: “Prevalence and antimicrobial susceptibility of *Salmonella* infections in free-range pigs”
 - La **prevalencia de infección por *Salmonella* spp.** en las explotaciones muestreadas (33%) es **similar a la observada previamente en sistemas intensivos** en la misma zona geográfica, aunque **los serotipos identificados son diferentes** a los comúnmente aislados en los sistemas intensivos, detectándose serotipos poco comunes procedentes de especies silvestres (p.e. Mikawasima, Hessarek, Muenchen).
 - Los **niveles de resistencias antimicrobianas (MDR)** en los serotipos aislados en las explotaciones de cerdo ibérico muestreadas son **sensiblemente menores** a las evidenciadas en sistemas productivos intensivos (36% vs 64%).

3. Estudio III: “*Salmonella* prevalence and characterization in a free-range pig processing plant: Tracking in trucks, lairage, slaughter line and quartering”

- El aislamiento de genotipos idénticos de *Salmonella* spp. a partir, tanto de muestras de origen animal como de muestras ambientales, pone de manifiesto la existencia de **contaminación cruzada** y el riesgo de contaminación de la carne procedente del cerdo ibérico tanto en el ambiente pre- como post-sacrificio.
- Los puntos de mayor contaminación por *Salmonella* spp. en el matadero de cerdo ibérico son el transporte (23.21%), los corrales (14.06%) y las muestras de origen animal (contenido fecal, 21.25%; tonsilas, 17.50%; nódulos linfáticos ileocólicos, 16.25%). El **escaldado** es un **factor de protección** frente a la contaminación por *Salmonella* spp. (36.25% vs 8.75%),
- El Análisis de Peligros y Puntos Críticos de Control (APPCC) para *Salmonella* spp. en porcino ibérico debe incluir estrictos protocolos de **limpieza y desinfección de transporte y corrales de espera** y del ambiente pre-sacrificio, así como la inclusión de nuevos agentes químicos o equipamientos que controlen y eviten la contaminación o recontaminación ambiental y la contaminación cruzada.

5. RESUMEN

Aunque las enfermedades de carácter zoonótico pueden cursar de forma inaparente o subclínica en los animales, éstas tienen una importante repercusión en el ámbito de la salud pública. Este aspecto es de especial interés en sistemas de producción extensivos en los que los animales domésticos están en contacto tanto con otros animales domésticos como con especies silvestres, favoreciendo la circulación de patógenos entre ellos. Entre estos patógenos cabe destacar las infecciones por *Brucella* spp. y *Salmonella* spp. y las infestaciones por *Toxoplasma gondii* y *Trichinella* spp., todas ellas consideradas de alto riesgo zoonótico por la Agencia Europea de Seguridad Alimentaria (EFSA). Por esta razón, hemos realizado un estudio serológico que permita conocer de forma indirecta la presencia y difusión de estos agentes en el cerdo Ibérico. Durante el bienio 2008-2009 recopilamos un total de 709 sueros procedentes de 79 explotaciones de cerdo Ibérico. Los sueros obtenidos fueron analizados mediante kits comerciales de ELISA para la detección de anticuerpos específicos frente a los patógenos nombrados con anterioridad. La presencia de larvas enquistadas de *Trichinella* spp. fue analizada mediante la técnica de digestión artificial a partir de los músculos de los pilares del diafragma. Los resultados obtenidos en nuestro estudio permiten concluir que la infección por *Salmonella* spp. (73.42%, intervalo de confianza del 95% [IC₉₅] 65.6-81.78), y la infestación por *Toxoplasma gondii* (58.23%, IC₉₅ 47.33-69.07) están ampliamente difundidas en las granjas y animales analizados, a diferencia de *Brucella* spp. y *Trichinella* spp. que presentaron una escasa prevalencia (3.8%, IC₉₅ 0.18-7.42; y 0%, respectivamente). No se observó ninguna larva de *Trichinella* spp. enquistada.

Debido a la elevada seroprevalencia detectada frente a *Salmonella* spp., se realizó un segundo estudio orientado a determinar la prevalencia de *Salmonella* spp., y los principales serotipos, fagotipos y patrones de resistencia antimicrobiana en cerdos ibéricos criados en la dehesa. Para ellos, un total de 804 nódulos linfáticos ileocólicos procedentes de tantos animales de 67 explotaciones se analizaron siguiendo el método descrito en la norma ISO 6579:2002. Los resultados mostraron una baja prevalencia individual (5.3% animales positivos), aunque un 33 por ciento de las explotaciones resultaron infectadas (22/67). Los

serotipos más frecuentemente detectados fueron Anatum y Typhimurium, aislándose también serotipos “atípicos” como Muenchen, Hessarek y Mikawasima. Todos los serotipos fueron analizados frente a un panel de 16 antimicrobianos y presentaron resistencia frente a estreptomicina (49%), tetraciclina (30%), sulfonamida (25%) y ampicilina (23%). El porcentaje de cepas multirresistentes (MDR \geq 4) también fue reducido (36%). El estudio comparativo con los resultados obtenidos previamente en cerdo blanco, muestran estrechas similitudes en los datos prevalencia aunque diferencias significativas en los serotipos, fagotipos y resistencias antimicrobianas.

Las nuevas tendencias del consumidor están orientadas al consumo de productos derivados de sistemas de producción que favorezcan el bienestar animal a la vez que un alto nivel de seguridad alimentaria. No obstante, las normativas aplicadas en bienestar animal a veces dificultan las medidas de bioseguridad a implantar en las granjas, representando una barrera entre la sanidad animal y la seguridad alimentaria. Así, el objeto del tercer estudio de esta Tesis Doctoral consistió en determinar la prevalencia de *Salmonella* spp. en diferentes puntos de la cadena de sacrificio del cerdo ibérico, desde el transporte al matadero, incluyendo los corrales de espera y toda la línea de sacrificio, hasta el despiece. Se realizaron 8 muestreos a partir de los cuales se obtuvieron 126 muestras positivas a *Salmonella* spp. de un total de 1160 (10.86%). Los porcentajes de aislamientos más altos se detectaron en los puntos de pre-escaldado (29/80; 36.25%), transporte (13/56; 23.21%), heces (117/80; 21.25%), tonsilas (14/80; 17.50%), nódulos linfáticos ileocólicos (13/80; 16.25%) y corrales (9/64; 14.06%). Sin embargo, 18 aislamientos se obtuvieron a partir de muestras ambientales tanto en la línea de sacrificio como en la sala de despiece (cuchillos y superficies de contacto directo) (5.63%) y 3 aislamientos a partir de muestras de carne en el despiece (lomo, jamón y paleta) (3.75%). Un total de 14 serotipos diferentes fueron identificados (Bredeney, Rissen, Derby, Typhimurium, Montevideo, Israel, Anatum, Emek, S. Typhimurium monofásica (mST), Choleraesuis, Durban, Kentucky, London y San Diego). Asimismo, los fagotipos U311, 193, 104b y UT de S. Typhimurium fueron identificados. Diferentes cepas de S. Derby, S. Rissen y S. Bredeney fueron aisladas a

partir de muestras de origen animal y ambientales en 3 de los 8 muestreos realizados, apuntando a una potencial contaminación cruzada, la cual fue confirmada mediante la caracterización molecular de las cepas mediante técnica de campo pulsado (PFGE, *Pulsed-Field Gel Electrophoresis*). En los muestreos restantes se obtuvieron diferentes serotipos a lo largo de la cadena de producción, asumiendo que los serotipos aislados presentaban diferentes orígenes epidemiológicos.

Nuestros resultados muestran que los aislamientos de diferentes serotipos de *Salmonella* spp. a partir tanto de los animales como de las muestras ambientales constituyen un elevado riesgo de contaminación de la carne del cerdo ibérico tanto en el ambiente pre- como post-sacrificio. Estos datos apoyan la necesaria intensificación en las labores de limpieza y desinfección en el ambiente previo al sacrificio (transporte y corrales de espera), en especial cuando existe una mayor carga de trabajo, así como incluir nuevas estrategias para reducir o eliminar el riesgo de infección o recontaminación con *Salmonella* spp. de la carne de cerdo procedente de sistemas de explotación extensivos o ecológicos.

6. SUMMARY

Zoonotic agents such as *Brucella* spp., *Salmonella* spp., *Toxoplasma gondii* and *Trichinella* spp., all considered high risk zoonotic pathogens by the European Food Safety Agency (EFSA), may cause no symptoms of infection in free-range pigs yet still have a significant public health impact. A serological survey was therefore performed to determine the history of occurrence of these pathogens in such pigs in southern Spain. A total of 709 serum samples were collected at abattoir from pigs from 79 farms, and analysed for specific antibodies against the above pathogens using commercially available ELISA kits. Encysted *Trichinella* spp. larvae were also sought following the artificial digestion method of diaphragm pillar muscle. The results showed *Salmonella* spp. to be widely distributed among the sampled herds (73.42%, 95% confidence interval [CI₉₅] 65.6-81.78), and *Toxoplasma gondii* to be present in over half (58.23%, CI₉₅ 47.33-69.07). The seroprevalence of *Brucella* spp. was very low (3.8%, CI₉₅ 0.18-7.42) and antibodies against *Trichinella* spp. were not detected. No encysted *Trichinella* spp. larvae were microscopically detected.

Due to the high seroprevalence detected against *Salmonella* spp., an epidemiological study was carried out to determine the prevalence of *Salmonella* spp. infection, as well as the distribution of serovars, phage types and antimicrobial resistance patterns, in pigs reared in free-range systems in southern Spain. A total of 804 animals belonging to 67 free-range pig herds in southern Spain were sampled. Microbiological assessment was performed on ileocolic lymph nodes collected at slaughter according to ISO 6579:2002 procedures. Overall, 33% of the herds were found to be infected and the prevalence of positive pigs was 5.3%. *Salmonella* serotypes most frequently detected were *S. Anatum* and *Typhimurium*, although uncommon serotypes such as *S. Muenchen*, *S. Hessarek* and *S. Mikawasima* were also isolated. All isolates were tested against 16 antimicrobials and exhibited resistance to streptomycin (46%), tetracycline (30%), sulphonamides (25%) and ampicillin (23%). Multi-drug resistance, defined as resistance to ≥ 4 antimicrobials, was 36%. The comparison of these results with those previously obtained from pigs reared in intensive

systems shows similar prevalence but significant differences in serotypes, phage types and antimicrobial resistance pattern.

New consumer tendencies are focused on products derived from systems which allow both a high animal welfare conditions together with a high food safety level. However, sometimes animal welfare regulations make the adoption of adequate bio-security measures difficult, representing a barrier for animal health and food safety. Thus the aim of the third study of this PhD Thesis was to determine the prevalence of *Salmonella* at different points of the pig slaughtering process (Trucks, Lairage, Slaughter line and Quartering, TLSQ) from pigs reared in free-range systems. From eight samplings a total of 126 *Salmonella* isolates out of 1160 different samples were recovered (10.86%). The highest percentage of isolates were detected at the points of pre-scalding (29/80, 36.25%), trucks (13/56, 23.21%), caecal contents (17/80, 21.25%), tonsils (14/80, 17.50%), ileocaecal lymph nodes (13/80, 16.25%) and lairage (9/64, 14.06%). Furthermore, eighteen isolates were obtained from different environmental samples from slaughter line and quartering plant (knives and surface of tables) (5.63%) and three isolates at the quartering plant samples (ham, shoulder and loin) (3.75%). Fourteen different serotypes were isolated: Bredeney, Rissen, Derby, Typhimurium, Montevideo, Israel, Anatum, Emek, Monophasic *Salmonella* Typhimurium (mST), Choleraesuis, Durban, Kentucky, London and Sandiego. *S.* Typhimurium phage types U311, 193, 104b and UT were identified. Moreover, mST strain was phage typed as U311. From TLSQ1, TLSQ2 and TLSQ4, different strains of *S.* Derby, *S.* Rissen and *S.* Bredeney serotypes were isolated from pig and environmental samples, pointing to a potential cross contamination. Molecular typing (Pulsed-field gel electrophoresis, PFGE) of these strains confirmed the cross contamination. In the remaining samplings, different serotypes were obtained in each sampled point of the chain, assuming that the isolated serotypes belonged to different epidemiological origins. Our results show the isolation of different serotypes of *Salmonella* spp. from both pigs and environmental samples, which constitutes a great risk for the contamination of pork from free-range pigs both prior and post slaughter. These data support the intensification of the cleaning and disinfection in the pre-

slaughter environment (i.e. trucks, lairage), especially when a higher workload is present, as well as the inclusion of new strategies to decrease or eliminate the risk of *Salmonella* spp. infection or recontamination from the environment in pork from organic or eco-friendly systems.

7. ANEXO: PERSPECTIVAS, ENFOQUE FUTURO

Con este apartado, se pretende de manera esquemática describir una propuesta de acción para la mejora del futuro sanitario del sector ibérico tomando como referentes los resultados evidenciados en esta tesis doctoral y la experiencia de la doctoranda en el sector sanitario de la cadena de producción de los productos cárnicos elaborados con carne de cerdo ibérico.

Es una propuesta personal, muy discutible por el resto de profesionales pero puede sentar un pequeño precedente para un gran proyecto de país.

Análisis DAFO del sector ganadero porcino ibérico:

Este estudio ha evidenciado los siguientes aspectos:

| DEBILIDADES | FORTALEZAS |
|---|---|
| Diferencias en el perfil de serotipado de <i>Salmonella spp.</i> | Sistema tradicional extensivo o semiextensivo. |
| Contacto con animales domésticos y silvestres, que actúan como vectores que dificultan el control de patógenos. | Baja resistencia a antibióticos. |
| El ecosistema es variable, la climatología afecta directamente a los aprovechamientos de la dehesa y el resultado final del cebo. | Población controlada que representa el 10 % de la cabaña de porcino. |
| Escaso grado de tecnificación del sector. | |
| AMENAZAS | OPORTUNIDADES |
| Estado de crisis mundial | La carne de cerdo ibérico tiene mayor precio que la del cerdo blanco. |
| Los precios elevados de las materias primas | Productos <i>delicatessen</i> (jamón, lomo, paleta). |
| Las exportaciones precisan de medidas sanitarias más estrictas. | Exportaciones en auge, el mercado internacional demanda estos productos de calidad. |
| El consumidor no está debidamente informado de las calidades de los productos del cerdo ibérico. | La PAC 2014 con la cuota verde garantiza o apoya los sistemas auto-sostenibles |
| Exigencias de los consumidores desde el punto de vista de garantías de seguridad alimentaria. | |

Nuestra propuesta ante este análisis es la mejora sanitaria del ganado porcino a través de la implantación integral de un programa de vigilancia y control frente a *Salmonella* spp. Países con programas de erradicación como Suecia, Finlandia y Noruega han alcanzado una prevalencia muy baja de *Salmonella* spp. en cerdos, mientras que en otros países europeos con mayor número de ganado y con mayor industrialización se ha optado

por programas de vigilancia y control que reduzcan al máximo el riesgo para la salud pública como sería el caso de Dinamarca, Irlanda, Gran Bretaña, Alemania y Holanda (Argüello, 2013).

Teniendo en cuenta la importancia económica que representa el ganado porcino para Europa, España y Andalucía en particular, así como la creciente preocupación del consumidor por tener acceso a productos de calidad que garanticen la seguridad alimentaria, España podría poner en marcha su programa de control en el ganado porcino ibérico optando por incluir toda la cadena productiva desde la ganadería hasta el producto en la mesa.

A modo de ejemplo este Programa para ganado ibérico debería abordar las siguientes fases:

1. Actuaciones en las explotaciones:

Partiendo de la premisa que no proponemos un programa de erradicación integral de la *Salmonella* en ganado porcino, ya que la tolerancia 0 no se pueda aplicar a todo el sistema, se podría comenzar con el control y vigilancia, aplicando las medidas necesarias para alcanzar un control eficaz que minimice o reduzca el peligro.

Las primeras actuaciones irían encaminadas a conocer el riesgo de infección por *Salmonella* spp., para lo que se analizarían por un lado los animales, a partir de muestras de sueros y contenidos fecales, y por otro lado el ambiente de las explotaciones (p.e. comederos, aguas, alimentación).

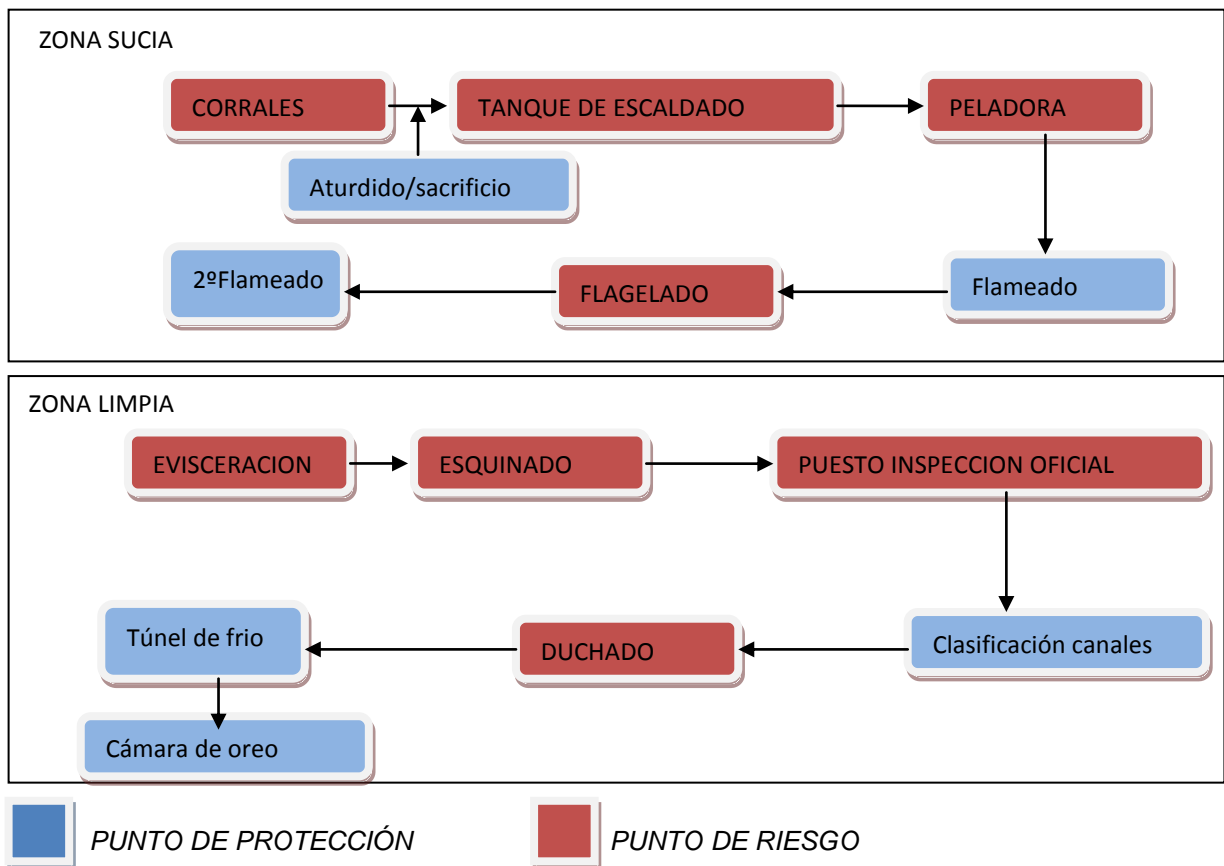
Según los riesgos detectados se plantearían actuaciones, entre las cuales se barajaría el uso de acidificantes u otros aditivos, bien en piensos o en el agua de bebida, así como el uso de autovacunas que permitirían el desarrollo de defensas en el animal de manera específica frente al germen en cuestión minimizando el uso de tratamientos antibióticos, lo que a su vez ayudaría a evitar la aparición de bioresistencias que afecten a la población humana (De Busser et al., 2013).

El ganadero debe entender que es el primer eslabón de la producción y el industrial debe comprender que su producto depende de este control. Esto conduciría a que el

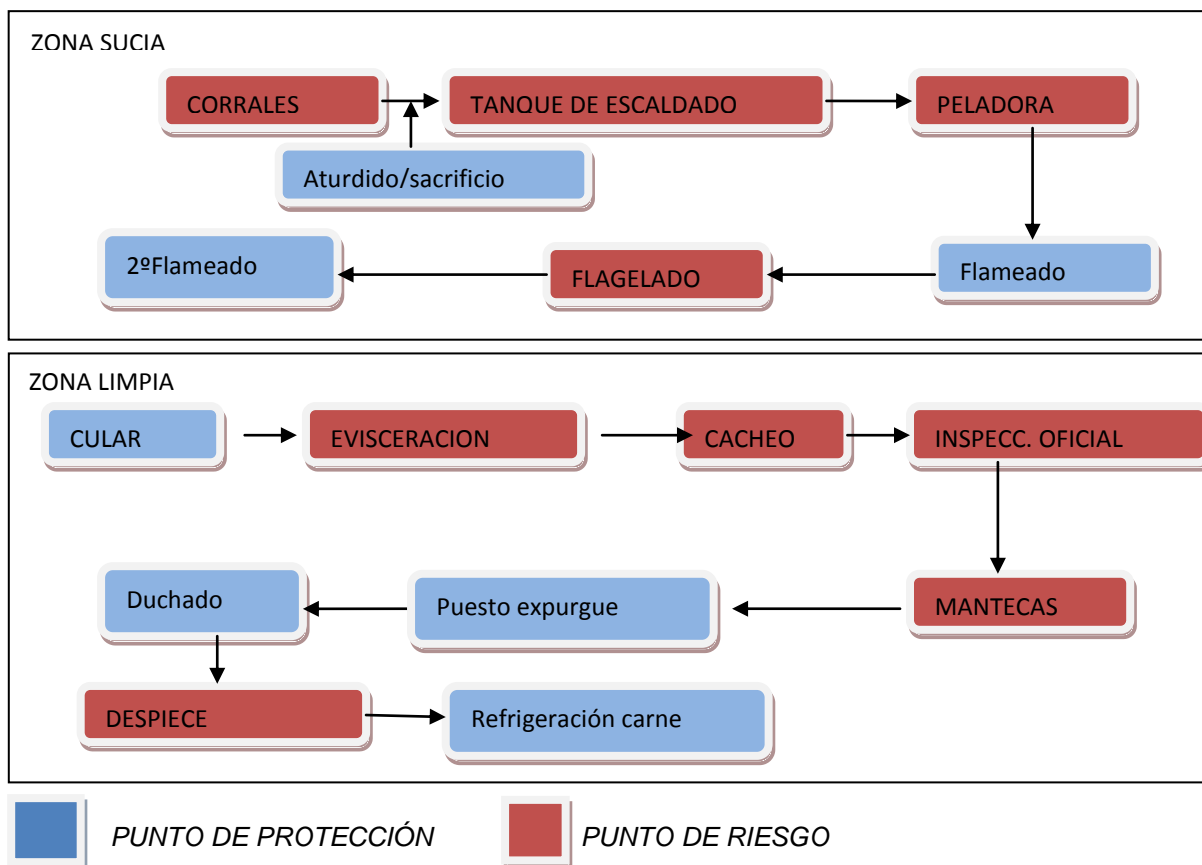
industrial se comprometa a realizar un “pago por calidad”, a pagar un precio mayor por animales procedentes de ganaderías en control, ya que es beneficioso para el sistema. De esta misma forma se conseguiría que el consumidor sea fiel y confíe en los productos de alta calidad y esté dispuesto a pagar un precio superior por ellos.

Llegado a este punto las actuaciones se continuarían en los procesos industriales. A continuación se adjunta un breve diagrama comparando un matadero de cerdo blanco con un matadero de cerdo ibérico, donde se evidencian los puntos de mayor riesgo y los puntos de protección que eliminan este riesgo.

Matadero de Cerdo Blanco



Matadero de Cerdo Ibérico



2. Actuaciones en transporte y corrales de espera:

El siguiente eslabón es el transporte y los corrales de espera que no sólo tienen un efecto directo en la calidad de la carne sino en el éxito de las medidas y procedimientos de control aplicado en el matadero para evitar la contaminación cruzada. Si tenemos los mejores rebaños controlados, pero los medios de transporte o las instalaciones no están debidamente higienizados el programa sanitario fracasará. Los mataderos deben aplicar medidas de limpieza y desinfección programadas según los riesgos de las instalaciones, establecer unos protocolos estrictos de higienización de los camiones de transporte. El matadero debe disponer de productos químicos y útiles necesarios para que los transportistas aseguren la correcta desinfección de sus vehículos.

Los corrales de espera deben estar diseñados para garantizar una adecuada ventilación y disponer de un equipamiento adecuado para facilitar la higienización de los corrales después de cada uso incluyendo suelos, paredes, bebederos y arquetas.

Es importante que se incluyan estas instalaciones en los programas mensuales de desinsectación del establecimiento.

3. Actuaciones en la zona de sacrificio o zona sucia

Aquí se encuentra el primer punto de protección o de reducción del riesgo de contaminación. La piel del cerdo puede llegar contaminada por lo que resulta indispensable el uso de doble cuchillo en el sacrificio, asimismo, la temperatura de escaldado debe superar los 60 °C y el doble flameado de las canales ayuda a garantizar unas canales “estériles” a la entrada del faenado.

4. Actuaciones en la zona de faenado o zona limpia

La siguiente zona de actuación es el faenado, la cual debe de ser entendida como la profesionalidad de los operarios. Resulta fundamental la formación de los operarios así como sus habilidades, debiendo estar apoyados por instalaciones que persigan y aseguren la no contaminación de los útiles. En primer lugar sería necesario disponer de un equipo sellador de cular, esterilizadores a 82 °C y el número de útiles necesarios para respetar el tiempo de esterilización durante las operaciones. Estas medidas deben de ir acompañadas de la correcta desinfección e higienización de todos los útiles e infraestructuras al final de cada jornada. La formación continua y la motivación del empresario a esos operarios que asumen su trabajo como profesionales también es necesaria, así como que el operario conozca su responsabilidad en la cadena ya que cuando se entienden los peligros de las acciones realizadas en el trabajo es más sencillo hacerlas de manera correcta.

A lo largo de la cadena de sacrificio hay algunas actividades que se consideran básicas para el control de diferentes microorganismos, en especial para el caso de enterobacterias como *Salmonella* spp., y una de ellas consiste en el uso de equipamientos que ayudan a realizar el sellado del cular. Aunque estos equipos son costosos, a la larga son inversiones (y no gastos) que se rentabilizan en cada exportación de carne libre de patógenos, y que ayudan a generar una marca de calidad y confianza en los clientes. Otro punto importante es el control de la contaminación de

las canales, para lo que se requieren puestos de desvío de canales contaminadas, un encargado de expurgue así como un controlador de calidad que controle el sistema. Sería muy interesante desarrollar un sistema que ayude a detectar y corregir los fallos a lo largo de la cadena de sacrificio, ya que si el número de fallos es elevado el porcentaje de canales contaminadas o sin control es elevado y compromete la seguridad de los productos elaborados.

5. Actuaciones en el despiece

El último eslabón a considerar en el control de *Salmonella* spp. en el cerdo ibérico sería el despiece de canales no refrigeradas, teniendo en cuenta que esta situación podría considerarse de peligro al facilitar el crecimiento descontrolado de patógenos y otros gérmenes que deterioren la carne. No obstante, como se evidencia en este estudio no es así, habiendo varios factores de interés para el control en esta fase:

- Las canales tienen que llegar al despiece en las mejores condiciones sanitarias, cercanas a la esterilidad. Una canal contaminada que llega a las mesas de despiece puede contaminar una cinta o un útil y dar lugar a contaminaciones cruzadas.
- El ritmo de la cadena de despiece debe ser constante, y lo más rápido posible.
- La refrigeración de la sala de despiece se debe mantener por debajo de los 15 °C, con la finalidad no de refrigerar la carne o de mantenerla en refrigeración sino para enlentecer el crecimiento de los posibles gérmenes que hay en las instalaciones y en los útiles.
- Higienización durante el proceso, que conlleva paradas intermedias y aplicación de productos desinfectantes que no generen residuos en la carne elaborada, tanto en mesas como en útiles de corte y de protección.
- Refrigeración de la carne despiezada, de forma que a medida que se van llenando las cajas de carne éstas se vayan refrigerando de manera ordenada en cámaras de refrigeración, sin estar excesivamente apiladas. La carne se despieza alrededor de los 27-25 °C y debe alcanzar los 7 °C en un tiempo récord,

menos de 7 horas. En la medida que esto sea posible se obtendrá carne más higienizada, segura y óptima.

- La capacidad de la cámara de refrigeración debe de estar adecuada a las épocas en las que haya una mayor producción.
- La estiba de la mercancía debe garantizar que el frío circule por las cajas, las cajas deben colocarse en pallets de poca altura que permitan la circulación del aire y aprovechen todo el espacio disponible.

La carne así producida con niveles bajos de contaminación es la materia prima para elaborar los productos cárnicos en los cuales está el valor añadido de la producción de cerdo ibérico.

En la industrialización, ya sea para elaborar jamón o paleta ibérica o para elaborar embutidos, el hecho de partir de una materia prima en buenas actitudes sanitarias es fundamental, y a lo largo de este proceso de elaboración se deben adoptar una serie de medidas que ayuden a mantener la calidad sanitaria del producto, como disminuir el número de calas en los secaderos o disminuir la dosis de los conservantes, lo que permitirá a su vez obtener productos con mayor humedad, más sabrosos, más sanos, y con mejor aceptación por el consumidor.

Las exportaciones de productos cárnicos es un gran atractivo para el sector del cerdo ibérico, es necesaria para la viabilidad y continuidad de las empresas, y aunque hay que innovar en nuevos productos ante todo hay que asegurar la viabilidad e inocuidad de los productos elaborados. Las condiciones legales en materia de sanidad en los mercados internacionales son estrictas y su incumplimiento suponen pérdidas elevadas no sólo por la devolución de la mercancía sino por el impacto negativo sobre los clientes y las alertas que generan en el departamento de sanidad del país de destino, que afectan al territorio nacional, derivando la mayoría de las veces en inspecciones al servicio de Sanidad Exterior Español.

La importancia por tanto, en primer lugar del análisis de la situación sanitaria de los rebaños, y su incidencia en la carne producida, debe ser una herramienta básica para todos los industriales del sector. Con estos datos se deben elaborar el Sistema de Autocontrol de los establecimientos, incluyendo los Programas de Prerrequisitos, el APPCC y los Procedimientos Operacionales e Instrucciones Técnicas de cada puesto.

8. OTRAS APORTACIONES CIENTIFICAS

Publicaciones científicas indexadas (Journal Citation Report, JCR)

- Prevalence and antimicrobial susceptibility of *Salmonella* infections in free-range pigs. *Veterinary Journal*. 190: 176-178. 2011.
- *Salmonella* prevalence and characterization in free-range pig processing plant: Tracking in trucks, lairage, slaughter line and quartering. *International Journal of Food Microbiology*. 162 (1): 42-54. 2013.
- A serological survey for *Brucella* spp., *Salmonella* spp., *Toxoplasma gondii* and *Trichinella* spp. in fattening pigs reared in free-range systems. *Transboundary and Emerging Diseases*. DOI: 10.1111/tbed.12049. 2013.

Publicaciones científicas no indexadas (divulgación nacional)

- Estudio de prevalencia de *Salmonella* spp. en el cerdo ibérico de montanera. *SUIS*. 64: 26-33. 2010.
- Sanidad Animal en el cerdo ibérico. *Revista Sólo Cerdo Ibérico (AECERIBER)*. 24: 43-50. 2010.
- Estudio de seroprevalencia de patógenos zoonóticos en el cerdo ibérico. *SUIS*. 74: 20.28. 2011.
- Estudio de seguimiento de *Salmonella* spp. en la cadena de sacrificio del cerdo ibérico: protocolo de diagnóstico laboratorial. *Revista AVEDILA*. 62: 2-13. 2013.

Capítulos de libros

- 'Sanidad animal en el cerdo ibérico'. En: Especial 'Solo cerdo ibérico 25 Aniversario' Tomo II, Sanidad. 2010. Pág. 128-135. Edita AECERIBER. ISBN 84-930710-0-5.
- Serological study of potential zoonotic pathogens in Iberian pigs. In: *Options Méditerranéennes. Series A, Mediterranean Seminars*. Nº 101. 2012. *Proceedings of the 7th International Symposium on the Mediterranean pig*. Pag. 241-246. Edited by E.J. De Pedro and A. B. Cabezas. ISBN 2-85352-488-4.
- 'Estudio serológico de agentes patógenos potencialmente zoonóticos en el cerdo ibérico'. En: *La investigación en la Facultad de Veterinaria de la Universidad de Córdoba*. 2012. Pág. 135. Edita Decanato Facultad de Veterinaria. Universidad de Córdoba. IBERTÉCNICA. ISBN 978-84-615-8742-1.

Congresos nacionales e internacionales

- Análisis de peligros en mataderos de cerdo ibérico: estudio de prevalencia de *Salmonella*. IV Congreso Internacional 'Autocontrol y Alimentos Inocuos para proteger la salud' (KAUSAL). 5-7 mayo, Bilbao, 2010. Pag. 227.
- Serological study of potential zoonotic pathogens in Iberian pigs. 7th International Symposium on Mediterranean Pig. 14-16 octubre, Córdoba, 2010. Pag. 241-246.
- Isolation of *Salmonella* spp. in pigs during transport, lairage, slaughterline and quartering. 9th International Conference on the Epidemiological and Control of biological, chemical and physical hazards in pigs and pork (SAFEPOK). 19-22 June. Maastricht, The Netherlands, 2011. Pag. 225.
- Comparison of two commercial ELISA Kits and magnetic stirrer method for detection of *Trichinella* spp. in a pig slaughterhouse. 9th International Conference on the Epidemiological and Control of biological, chemical and physical hazards in pigs and pork (SAFEPOK). 19-22 June. Maastricht, The Netherlands, 2011. Pag. 310.
- Seguimiento de *Salmonella enterica* en la cadena de sacrificio del cerdo ibérico: protocolo de diagnóstico laboratorial. XVII Symposium anual AVEDILA, 18-19 octubre, Badajoz, 2012. Pag. 113.
- Interannual variability on seroprevalence of *Salmonella* spp. in free-range fattening pigs in South Spain. 5th European Symposium of Porcine Health Management, Edinburgh (United Kingdom), 22nd-24th May, 2013. Pag. 178.
- Tracking in trucks, lairage, slaughterline and quartering as a useful tool to study salmonella prevalence in a free-range pig processing plant. I3S international Symposium Salmonella and Salmonellosis. Saint-Malo (France), 27-29 May 2013. Pag. 275.

Informes Técnicos

- Estudio de evaluación y mejora de la sanidad animal y seguridad alimentaria del cerdo ibérico. Informe final de proyecto de investigación. Universidad de Córdoba. 30 marzo 2011. 50 pp.

9. INDICIOS DE CALIDAD (FACTOR DE IMPACTO)



INDICIOS DE CALIDAD DE LA TESIS APORTADOS POR EL DOCTORANDO

| | | | |
|--------------------|---------------------|--------------------------|--------------------|
| APELLIDOS | | NOMBRE | |
| HERNÁNDEZ GARCÍA | | MANUELA | |
| D.N.I. o PASAPORTE | TELÉFONO Fijo/Móvil | DOMICILIO | |
| 30.794.824-D | 678 587 165 | PLAZA CONDE DE GAVIA 6.1 | |
| CÓDIGO POSTAL | LOCALIDAD | PROVINCIA | CORREO ELECTRÓNICO |
| 14002 | CÓRDOBA | CÓRDOBA | mmnlhg@hotmail.com |

TÍTULO DE LA TESIS

ESTUDIO DE EVALUACIÓN Y MEJORA DE LA SANIDAD Y SEGURIDAD ALIMENTARIA DEL GANADO PORCINO IBÉRICO - SEGUIMIENTO DE *SALMONELLA* EN LA CADENA DE PRODUCCIÓN -

PROGRAMA DE DOCTORADO

BIOCIENCIAS Y CIENCIAS AGROALIMENTARIAS

ESPECIFICAR LA PUBLICACIÓN QUE APORTA COMO INDICIOS DE CALIDAD DE LA TESIS, ESTABLECIDOS EN EL . 25.a DE LAS ACTUALES NORMAS REGULADORAS DE LOS ESTUDIOS DE DOCTORADO (el Doctorando figurará como primer autor, o segundo si el director es el primero)

- Título: A serological survey for *Brucella* spp., *Salmonella* spp., *Toxoplasma gondii* and *Trichinella* spp. in fattening pigs reared in free-range systems.
- Autores (p.o. de firma): M. Hernández, J. Gómez-Laguna, C. Tarradas, I. Luque, R. García-Valverde, L. Reguillo, R.J. Astorga
- Revista (año, vol. y pag.): *Transboundary and Emerging Diseases* (2013) doi: 10.1111/tbed.12049.
- Base de Datos Internacional en la que está indexada: ISI Web of Citation
- Área temática en la Base de Datos de referencia: Veterinary Sciences
- Índice de impacto de la revista en el año de publicación del Artículo: 2,046
- Lugar que ocupa/Nº de revistas del Área temática: 10/143

- Título: Prevalence and antimicrobial susceptibility of *Salmonella* infections in free-range pigs.
- Autores (p.o. de firma): J. Gómez-Laguna, M. Hernández, E. Creus, A. Echeita, J. Otaí, S. Herrera-León, R. J. Astorga
- Revista (año, vol. y pag.): *The Veterinary Journal* (2011), 190: 176-178.
- Base de Datos Internacional en la que está indexada: ISI Web of Citation
- Área temática en la Base de Datos de referencia: Veterinary Sciences
- Índice de impacto de la revista en el año de publicación del Artículo: 2,239
- Lugar que ocupa/Nº de revistas del Área temática: 8/145

- Título: *Salmonella* prevalence and characterization in free-range pig processing plant: Tracking in trucks, lairage, slaughter line and quartering.
- Autores (p.o. de firma): M. Hernández, J. Gómez-Laguna, I. Luque, S. Herrera-León, A. Maldonado, L. Reguillo, R.J. Astorga
- Revista (año, vol. y pag.): *International Journal of Food Microbiology* (2013), 162 (1): 42-54.
- Base de Datos Internacional en la que está indexada: ISI Web of Citation
- Área temática en la Base de Datos de referencia: Food Science and Technology
- Índice de impacto de la revista en el año de publicación del Artículo: 3,425
- Lugar que ocupa/Nº de revistas del Área temática: 8/124

INTERNACIONALIZACIÓN TESIS : PRESENTA LA TESIS CON MENCIÓN INTERNACIONAL Y APORTA CONTRIBUCIONES CIENTÍFICAS NO INCLUIDAS COMO PUBLICACIONES

SOLICITA :

Sea autorizada la tramitación de la tesis doctoral, una vez que sean constatados los indicios de calidad que se adjuntan a esta solicitud.

Córdoba, a 18 de octubre de 2013

Firma del interesado,

Fdo.: Manuela Hernández García

SR/A. COORDINADOR/A DE LA COMISIÓN ACADÉMICA DEL PROGRAMA DE DOCTORADO

10. AGRADECIMIENTOS

Esta tesis es parte del trabajo de unos magníficos profesionales, y me gustaría mencionar en primer lugar a mis directores Dr. Rafael Jesús Astorga y Dr. Jaime Gómez Laguna, por su constancia y su paciencia, son los grandes motivadores necesarios para que esta tesis llegue a su fin.

En segundo lugar quiero agradecer el trabajo a los compañeros del matadero, y del laboratorio que siempre estuvieron ofreciéndome sus horas y su buen hacer, Lucia Reguillos, Vanesa de la Rosa, Francisco Javier Vioque, Eulogio Capilla y Rocio Fernández.

Esta tesis está integrada en un proyecto subvencionado por la CTA y CDTI SANIBERICO, que aportaron el soporte económico para la consecución de esta tesis y que fue posible gracias a la constancia de la Dra. Rosa M^a García en las justificaciones de este proyecto.

A su vez siempre estuvimos apoyados por la dirección de D. Miguel A. Díaz Yubero y D. Librado Carrasco.

Como todos proyectos importantes en la vida hay una parte profesional y otra emocional que debo agradecer.

En primer lugar mi familia, mi marido Ignacio, mi hija Manuela, mis padres y mis hermanas que son apoyos constantes, cuidan de la peque, te liberan, te motivan no tengo palabras para definir lo que suponen en mi vida, y como no en estos últimos meses mis fetillos que han contribuido a que sea mas emocionante si cabe el final. Y no puedo olvidar a mi tia Antonia porque aunque está mal que lo diga es mi mayor fan, haga lo que haga le parece genial.

También están los compañeros, Lourdes Sanchez que se tomo con mucha diplomacia que el mes de agosto lo tomara al completo de vacaciones, y mi queridísima y entrañable Esperanza Díaz por su apoyo incondicional de la amistad en mayúsculas para lo bueno y para lo malo siempre ahí pase lo que pase.

