

UNIVERSITAT AUTÒNOMA DE BARCELONA
FACULTAT DE VETERINÀRIA
DEPARTAMENT DE SANITAT I D'ANATOMIA ANIMALS

**EPIDEMIOLOGÍA DE LA SALMONELOSIS PORCINA EN GRANJAS DE
CATALUÑA Y DETERMINACIÓN DE LOS FACTORES DE RIESGO DE LA
INFECCIÓN**

Tesis doctoral presentada por
Willian José Mejía Silva
Para optar al grado de Doctor

La Dra. Margarita Martín Castillo y el Dr. Enric Mateu de Antonio, profesores titulares del Departament de Sanitat i d'Anatomia Animals de la Facultat de Veterinària de la Universitat Autònoma de Barcelona,

Hacen constar:

Que el trabajo “**Epidemiología de la salmonelosis porcina en granjas de Cataluña y determinación de los factores de riesgo de la infección**”, presentado por Willian José Mejía Silva para la obtención del grado de Doctor, ha sido realizado en dicho departamento y bajo nuestra dirección.

Para que conste, firmamos la presente en Bellaterra, 25 de Septiembre de 2003.

Margarita Martín Castillo

Enric Mateu de Antonio

Esta tesis está especialmente dedicada a:

A mi esposa, Denice Isabel Zapata, muchas gracias por tú amor y paciencia.

A mis hijos Williams José y Christopher Kilian, mis dos grandes tesoros

A mis padres, Vicente Mejía y Celia Silva, gracias por sus enseñanzas

A mi hermano, Manuel Mejía

A mis abuelos, Felipe Silva y Agustina Cordero

A la memoria de, Tulio Mejía y Balbina Peña

Al todopoderoso, Dios.

Agradecimientos

En primer lugar quiero agradecer al gobierno Venezolano y a la Universidad del Zulia por el otorgamiento de la beca de estudio. También mi agradecimiento a mis coterráneos venezolano (Atilio, Armando, Gustavo, Gabriela, Maria, Aixa, Wilfido y Fanny) por su amistad y por estar presente en los buenos y malos momentos. Sobre todo, los animo a continuar adelante en sus estudios a pesar de los difíciles momentos que estamos actualmente pasando. “Ni un paso atrás”.

Por otra parte, agradecer a mis directores de tesis a la Dra. **Margarita Martín** y el Dr. **Enric Mateu**, por su amistad, orientación, paciencia, apoyo y por compartir sus conocimientos. Asimismo, quiero extender mi agradecimiento a toda la gente de infecciosas (Jordi, Elvira, Montse, Mercé y Dolo) por su amistad y siempre dispuestos ayudar y compartir sus conocimientos. También al personal técnico (Rosa, Montse, Anna Coll y Gabi) y a la siempre colaboradora y sonriente Paqui.

Por otra parte, debo agradecer a todos los becarios de infecciosas (Laila, Maria Eugenia, Chiara, Ivan, Alberto y Ana Alba) o aquellos que en su paso por la Unidad de infecciosa también tuvieron presto ayudar y hacer amena mi estancia en esta institución (Lorena, Jaime y Oriol Gallo).

También quiero expresar mi agradecimiento por su valiosa colaboración en la realización de este estudio al personal profesional y técnico que integran a las siguientes instituciones: ASSAPORC (Maite Rovira), Cooperativa Plana de Vic (Raquel Cortés, Jordi Pedró y Manel Canal), COPALME (Marisa Terré), Piensos Victoria (Anna Romagosa), Vall Companys (Albert Vidal y Montse Gine), COPAGA (Marta Jiménez), Comercial Mayol (Joan Mayá), ALBET (Emilio Revilla), Agropecuaria Torelló (Joan Falles), Centro Veterinario Manlleu (Gemma Prat), Piensos Casadesús (Jordi Verdaguer), al médico veterinario Josep Solé i Badia, al Departament de Agricultura y Ramaderia i Pesca de la Generalitat, y al Departament de Sanitat i Seguritat Social de la Generalitat.

RESUMEN

Un total de 141 granjas porcinas de Cataluña se analizaron con el fin de averiguar la prevalencia de portadores de *Salmonella* spp, caracterizar las cepas aisladas y determinar que factores pueden influir en la aparición y mantenimiento de este microorganismo en las granjas. Para ello se realizó una encuesta epidemiológica y se recogieron muestras individuales de heces de reproductoras y de los corrales de los animales de engorde. Las muestras se sembraron en caldo Rapaport-Vassiliadis y se realizaron subcultivos a las 24 y 48 horas en agar XLT4. De las colonias identificadas como *Salmonella* spp. se realizó el serotipado, fagotipado y el estudio de sensibilidad frente a 18 antimicrobianos. Por otra parte, se evaluaron serológicamente 141 unidades de engorde en la comarca de Osona y se realizó una comparación de dos ELISAs disponible comercialmente para el diagnóstico de la salmonelosis porcina. Las muestras de sangre recogidas se evaluaron mediante ELISA (Svanova Biotech, Uppsala, Suecia). Para la prueba de comparación se seleccionaron 361 (reproductoras y engordes) sueros porcinos de estatus bacteriológico conocido y se analizaron mediante el ELISA Svanova y otro ELISA comercial (Salmotype, Labor Diagnostik, Leipzig, Alemania). Los resultados de ambas pruebas se compararon mediante el valor *kappa*. Los resultados bacteriológicos permitieron clasificar 39 granjas (28,06%) con una o más muestras positivas a *Salmonella*, identificándose 17 serotipos diferentes en el total de explotaciones. De ellos, el más frecuente fue *Salmonella* Anatum en las reproductoras y *Salmonella* Typhimurium en los engordes. El 68,8% de las cepas aisladas fue resistente a las tetraciclinas, un 67,7% a la sulfamida y un 53,1% a la combinación sulfamida + trimetoprim. El 62,50% de las cepas presentó resistencia a tres o más antimicrobianos simultáneamente. Todas las cepas analizadas fueron sensibles a la ceftriaxona y a la colistina. En el análisis serológico se determinó una seroprevalencia del 77,3% de granjas positivas. Los factores epidemiológicos que se relacionaron con la presencia de portadores de *Salmonella* en las granjas de reproductoras ($p < 0,05$) fueron tener censo de hembras adultas superior a 250 cabezas, la presencia de drenajes de purines abiertos y la ausencia de métodos de control de roedores. En las granjas de engorde la presencia de otras especies de animales de abasto y el número de plazas de engorde (> 1600) fueron factores de riesgo significativos. Con respecto a la serología, dos factores se asociaron significativamente con la infección: la falta de medidas para evitar la entrada de pájaros y el uso de aguas de bebida provenientes de pozos artesanos. En la comparación de pruebas serológicas se vió una pobre concordancia ($kappa = 0,191$) entre ambos ELISAs. De estos resultados se concluye que un porcentaje considerable de granjas porcinas de Cataluña presentan animales con excreción activa de *Salmonella*, presentándose una gran variedad de serotipos con unos perfiles de multiresistencia a los antimicrobianos muy amplios. El estudio epidemiológico realizado muestra que, en los cerdos, la infección por *Salmonella* está estrechamente relacionada con factores de bioseguridad elementales.

ABSTRACT

A total of 141 pig farms of Catalonia were analysed to determine the prevalence of carriers of *Salmonella* spp. and the factors can influence the entrance and maintenance of this microorganism in the farms. To achieve these goals, an epidemiological survey was carried out. Sampling was done by collection of faecal samples of sows and pooled faecal samples in finishing pens. Faeces were inoculated in Rapaport-Vassiliadis broth and subcultures were performed onto XLT4 agar at 24 and 48 hours of incubation. Bacterial colonies suspected to be *Salmonella* were further confirmed by serotyping and phagetyping and were also tested for its susceptibility against a panel of 18 antimicrobial agents. On the other hand, 141 fattening units of Osona county were examined serologically by means of an ELISA. Three hundred and sixty-one of these serum samples were further used to compare two ELISAs commercially available for the diagnosis of swine salmonellosis by using the *kappa* value. The bacteriological analysis yielded 39 farms (28%) with one or more positives samples to *Salmonella*. The isolated strains belonged to 17 different serotypes. The most frequent was *Salmonella* Anatum in the sows and *Salmonella* Typhimurium in the fattening pigs. Antimicrobial susceptibility tests showed that the highest level of resistance was against tetracycline (68.8%), sulphonamides (67.7%) and their combination with trimethoprim (53.1%). Sixty-two percent of the strains showed resistance to three or more antimicrobial agents. None of the strains was resistant to colistin or ceftriaxone. With regards to the serological analysis, we found a seroprevalence of 77.3% of positives farms. The epidemiological factors that were related to the presence of carriers of *Salmonella* in sows ($p < 0,05$) were to have census of adult females > 250 heads, the presence of open drainages of sewage and the absence of rodent control programmes. In fattening pigs, risk factors were: the number of present pigs (> 1600) and presence of other species of livestock in the farm were significant factors of risk. In the serological study, two factors were significantly associated with the infection status: the lack of measures to avoid the entrance of birds and the use of water obtained from wells. Comparison of serological tests, showed a poor agreement ($kappa = 0.191$) between both ELISA. Of these results we can conclude that a considerable percentage of farms pig of Catalonia have animals with active excretion of *Salmonella* and that there is a great diversity of serotypes all of which can have multidrug resistance profiles. The epidemiological study showed that, in the pigs, infection by *Salmonella* is closely related to elementary factors of biosafety.

ÍNDICE	VIII
INTRODUCCIÓN	XI
1. REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA	1
1.1. Características del género <i>Salmonella</i>	1
1.1.2. Serotipos	3
1.1.3. Fagotipos	3
1.2. Salmonelosis porcina	4
1.2.1. Manifestaciones clínicas	4
1.2.2. Tratamiento	5
1.3. Epidemiología de la salmonelosis porcina	6
1.3.1. Prevalencia de <i>Salmonella</i> en los rebaños porcinos	6
1.3.2. Factores de riesgo	9
1.3.2.1. Sistemas de alimentación	9
1.3.2.2. Características de las granjas y sistemas de manejo	10
1.3.2.3. Sanidad y medidas de bioseguridad	11
1.3.3. El cerdo como reservorio de salmonelosis para las personas	12
1.4. Métodos de diagnóstico	13
1.4.1. Métodos bacteriológicos	13
1.4.1.1. Pre-enriquecimiento	14
1.4.1.2. Enriquecimiento selectivo	15
1.4.1.3. Medios selectivos sólidos	16
1.4.2. Métodos inmunoenzimáticos aplicados al diagnóstico bacteriológico	17
1.4.2.1. Métodos serológicos	17
1.4.3. Reacción en cadena de la polimerasa (PCR)	19
1.5. Resistencia a los agentes antimicrobianos en <i>Salmonella</i>	20
1.5.1. Determinación de la resistencia a los antimicrobianos	22
1.5.1.1. Método de difusión de disco en gel de agar:	
Técnica de Kirby-Bauer.	23
1.5.1.2. Pruebas de sensibilidad por métodos de dilución	24
1.5.1.2.1. Método de dilución en agar	25
1.5.1.2.2. Método de dilución por caldo (macrodilución)	25
1.5.1.2.3. Método de dilución por caldo (microdilución)	25

2. OBJETIVOS	27
3. MATERIALES Y MÉTODOS	29
3.1. Marco de la encuesta	29
3.2. Muestreo bacteriológico	29
3.2.1. Encuesta epidemiológica	31
3.3. Metodología de laboratorio	32
3.3.1. Procesamiento de las muestras de heces	32
3.3.1.1. Cultivo microbiológico	32
3.3.1.2. Pruebas de sensibilidad antimicrobiana	33
3.3.1.2.1. Método de difusión de disco	33
3.3.1.2.1.1. Preparación del inóculo	33
3.3.1.2.1.2. Lectura y validación de resultados	33
3.4. Muestreo serológico	34
3.4.1. Comarca de Osona	34
3.4.2. Procesamiento de los sueros	35
3.4.2.1. ELISA A	36
3.4.2.2. ELISA B	37
3.5. Análisis epidemiológico	38
3.5.1. Análisis de los factores de riesgo	38
3.6. Comparación de pruebas diagnósticas (ELISA A y B)	38
3.6.1. Concordancia	38
3.6.2. Análisis ROC (Receiver Operating Characteristic)	38
4. RESULTADOS	41
4.1. Cultivo microbiológico	41
4.1.1. Método bacteriológico	41
4.1.2. Muestreo previsto y realizado	41
4.1.3. Prevalencia global	43
4.1.4. Prevalencia individual	43
4.1.5. Prevalencia por unidades de reproductoras y engordes	43
4.1.5.1. Reproductoras	43
4.1.5.2. Engordes	44
4.1.6. Análisis epidemiológico	45
4.1.6.1. Unidades de reproductoras	45

4.1.6.2. Unidades de engorde (análisis bacteriológico)	45
4.1.6.3. Unidades de engorde (serología)	46
4.2. Serotipos aislados	46
4.2.1. Serogrupos detectados	49
4.3. Perfiles de antibiosensibilidad	49
4.3.1. Patrones de multirresistencia	50
4.3.2. Frecuencia de resistencia entre los serotipos	50
4.5. Estudio serológico	52
4.5.1. Comparación de pruebas diagnósticas (ELISA A y B)	53
4.5.2. Análisis ROC	54
5. DISCUSIÓN	57
5.1. Método bacteriológico	57
5.2. Prevalencia en rebaños	58
5.3. Prevalencia individual	59
5.4. Factores de riesgo	60
5.4.1. Reproductoras	60
5.4.2. Engordes	61
5.5. Serotipos	63
5.6. Perfiles de antibiosensibilidad	64
5.7. Patrones de resistencia	67
5.8. Serología	68
5.8.1. Seroprevalencia	68
5.8.2. Seroprevalencia en el rebaño	69
5.8.3. Relación entre los resultados serológicos y los serogrupos detectados en el análisis microbiológico	70
5.8.4. Comparación de pruebas diagnósticas	70
6. CONCLUSIONES	73
7. BIBLIOGRAFÍA	75
8. ANEXO 1 Encuesta epidemiológica en granjas de reproductoras.	93
9. ANEXO 2 Encuesta epidemiológica en granjas de engordes.	99

1. INTRODUCCIÓN

La salmonelosis es una de las causas más importantes de gastroenteritis en las personas (Miller *et al.*, 1995), con brotes a menudo asociados con productos de origen aviar o bovino. Sin embargo, varios autores estiman que la carne de cerdo contaminada o productos cárnicos derivados del cerdo son una importante fuente de *Salmonella* para los consumidores de estos productos si no se manipulan con los cuidados necesarios (Davies, 1999; Rajic *et al.* 2001). En Dinamarca, Holanda y Alemania, entre un 10% y 23% del total de casos de salmonelosis en las personas se pueden atribuir al consumo de carne de cerdo y de sus subproductos (Steinbach *et al.*, 1999).

La fuente más frecuente de contaminación de la carne porcina y sus subproductos son los cerdos infectados subclínicamente en las granjas, que podrían infectar a sus compañeros de corrales y a otros cerdos durante el transporte o en los corrales de espera en los mataderos (Kim *et al.* 1999; Hurd, *et al.* 2001). La Unión Europea, las autoridades nacionales y de la industria del cerdo están cada vez más interesadas en conocer la prevalencia de *Salmonella* en la población porcina. En Dinamarca y Suecia, la salmonelosis en las personas ha decrecido significativamente después de la puesta en marcha de un programa nacional de control de la infección en las explotaciones porcinas (Mousing *et al.* 1997; Wierup *et al.* 1997).

Para poder desarrollar programas eficientes y económicamente realizables, es necesario determinar los factores de riesgo asociados a la infección en las granjas porcina. Con respecto a esto, Hamilton *et al.* (2000) encontraron que, en los cerdos de engorde, el uso de alimento granulado es un factor de riesgo para la prevalencia de *Salmonella*. Funk *et al.* (2001) encontraron una asociación entre malas prácticas de higiene y de bioseguridad en las granjas con una elevada prevalencia de *Salmonella*.

Uno de los principales motivos de alarma para las autoridades sanitarias ha sido el aumento de los casos de gastroenteritis y septicemia ligados a cepas de *Salmonella* resistentes a los antimicrobianos. La Organización Mundial de la Salud (WHO 2000) ha reconocido que, si no se toman las medidas pertinentes, el siglo XXI será la era de los “súper microbios”, en la que las bacterias resistentes no podrán ser tratadas con los agentes antimicrobianos comúnmente utilizados para su control. Por lo tanto, la

monitorización de la sensibilidad antimicrobiana de todos los aislamientos de *Salmonella* ayudará a la selección de un antimicrobiano para el tratamiento de la salmonelosis clínica en el cerdo y, por otro lado, para disminuirá el riesgo de transferencia de resistencia al hombre (Threlfall *et al.* 1998; Van den Bogaard, 2000).

1. REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA

1.1. Características del género *Salmonella*.

El género *Salmonella* pertenece a la familia *Enterobacteriaceae* y su hábitat fundamental es el tracto intestinal de personas y animales. Los miembros de este género se destacan por su capacidad para infectar a un amplio rango de hospedadores.

Morfológica y bioquímicamente, este género es un grupo homogéneo de bacilos gramnegativos, anaerobios facultativos, móviles, no formadores de esporas y con flagelos peritricos. Se multiplica a temperaturas que van desde los 7°C a los 45°C y puede sobrevivir durante meses en substratos orgánicos. La inactivación se produce a pH por debajo de 5 y a temperaturas superiores a 60°C. Los desinfectantes comunes como fenoles, clorados y iodados son eficaces frente a *Salmonella*.

Las pruebas bioquímicas que se utilizan para identificar presuntivamente a los aislados de *Salmonella* son la catalasa (positiva) y la oxidasa (negativa); la fermentación de la glucosa y otros carbohidratos, con la producción usualmente de gas, la producción de sulfhídrico, la actividad lisindecarboxilasa, la capacidad de crecimiento en agar citrato de Simmons, la no producción de indol y la incapacidad de hidrólisis de la urea. Los caracteres bioquímicos generales se muestran en la tabla 1.

Algunas características de *Salmonella* se utilizan para el enriquecimiento o aislamiento selectivo o bien como indicadores para diferenciar las colonias sospechosas sobre agar. Entre estas características, destaca la resistencia a algunos colorantes como el verde brillante o verde malaquita y la resistencia al tetrationato o al selenito.

El género se encuentra incluido en el “Approved List of Bacterial Names” conteniendo cinco especies: *Salmonella arizonae*, *Salmonella choleraesuis*, *Salmonella enteritidis*, *Salmonella typhi* y *Salmonella typhimurium* (Euzéby 1997). Sin embargo, estudios de hibridación DNA-DNA (Crosa *et al.*, 1973), han demostrado que las cinco especies citadas son en realidad una única especie. En 1989, Reeves *et al.* proponen que el género *Salmonella* esté formado por dos especies: *S. enterica* y *S. bongori* y seis subespecies: *S. enterica* subesp. *enterica*, *S. enterica* subesp. *salamae*, *S. enterica*

subesp. *arizonae*, *S. enterica* subesp. *diarizonae*, *S. enterica* subesp. *houtenae*, *S. enterica* subesp. *indica*. Esta última clasificación no está aún validada oficialmente, pero es aceptada y utilizada por los especialistas; aunque el tema no está exento de polémica (Yabuuchi *et al.*, 2000).

Con el fin de agilizar la transcripción de los serotipos, Le Minor *et al.* (1987) proponen que el serotipo se referiría escribiendo en letra no cursiva e inicia con letra mayúscula, así tenemos que, *Salmonella enterica* subesp. *enterica* serotipo Typhimurium se convierte en *Salmonella* serotipo Typhimurium o simplemente *Salmonella* Typhimurium. Los serotipos pertenecientes a las otras subespecies son designados por su fórmula antigénica (Popoff *et al.*, 2003).

Tabla 1. Caracteres bioquímicos del género *Salmonella*

Prueba	Resultado	Prueba	Resultado
Adonitol	-	Glucosa	+
Dulcitol	+/-	Indol	-
Sorbitol	+	H ₂ S	+
Arabinosa	+	Gelatinasa	-
Xylosa	+	Voges-Proskauer	-
Rhamnosa	+	Rojo metilo	+
Maltosa	+	Urea	-
Salicina	-	Citrato	+ ¹
Inositol	+/-	Lisindecarboxilasa	+
Lactosa	-	Ornitindecarboxilasa	+
Sacarosa	-	Phenilalanindeaminasa	-
Manitol	+		

¹ Algunas cepas reaccionan positivamente a las 48 h

+[±]: el 90% o más de reacciones positivas

-[±]: el 90% o más de reacciones negativas

+/-: reacciones variables

1.1.2. Serotipos.

El conocimiento de la epidemiología de la salmonelosis constituye la principal herramienta para el control sanitario de esta enfermedad. El marcador epidemiológico de elección de este género es el serotipo. La serotipificación es una técnica estable, sencilla y que por su amplia utilización permite el seguimiento de los principales serotipos. Con ciertas limitaciones, pueden adscribirse distintos patrones de distribución, virulencia y resistencia a serotipos concretos de *Salmonella*, lo que constituye un elemento importante en la investigación epidemiológica.

La serotipificación permite identificar y caracterizar a los aislados del género *Salmonella* por la detección de diversos antígenos. La definición del serotipo se realiza mediante la descripción de sus antígenos de pared y flagelares (Popoff *et al.*, 2001). Los de la pared bacteriana se denominan antígenos somáticos (O) y dan lugar al serogrupo. Los antígenos de la cápsula (K, Vi) y los antígenos flagelares (H) acaban de definir el serotipo. Respecto a los antígenos flagelares, éstos pueden presentarse en dos fases, lo que define cepas bifásicas, monofásicas o afásicas si el aislado es inmóvil. La combinación de estos tres antígenos da a lugar a la identificación de más de 2500 serotipos diferentes (Popoff *et al.*, 2003). A pesar del alto poder de discriminación de este marcador, en la práctica sólo se aíslan habitualmente unos pocos serotipos.

1.1.3. Fagotipos.

La fagotipificación evalúa la sensibilidad de los aislamientos frente a un grupo seleccionado de bacteriófagos. Esta técnica permite determinar la existencia y estabilidad de biotipos, o clones epidemiológicos, en la población bacteriana y su estabilidad en la población a través de los años. Estos clones surgen como resultado de los constantes cambios (mutaciones, transferencia genética) que ocurren en la población microbiana y que dan origen a la diversidad que se observa (Davis *et al.*, 2002). En el género *Salmonella* se han desarrollado esquemas de fagotipificación para serotipos específicos, como por ejemplo, para los serotipos Typhimurium (Anderson *et al.*, 1977) y Enteritidis (Ward *et al.*, 1987).

En los últimos años, se han desarrollado otros métodos de diferenciación (entre las cepas de *Salmonella*) basados en el examen genético y que pueden poseer un poder mayor de discriminación, tales como la electroforesis de campo pulsado, el ribotipado, la ERIC-PCR, los perfiles plasmídicos, etc. Dos de las mayores ventajas de estos métodos son que no dependen de la expresión de las propiedades fenotípicas y que todas las cepas de *Salmonella* pueden ser tipificadas por la misma metodología.

1.2. Salmonelosis porcina.

La salmonelosis porcina es una infección que presenta doble importancia: sanitaria y económica. Desde el punto de vista sanitario, la presentación de un brote de salmonelosis en cualquiera de sus formas puede representar un impacto considerable en el porcentaje de bajas, especialmente en las formas septicémicas. Por otra parte, el impacto económico puede ser importante, dado que los animales supervivientes presentan retraso del crecimiento y los gastos de medicación para controlar el problema pueden ser elevados.

1.2.1. Manifestaciones clínicas.

La salmonelosis porcina es una enfermedad que afecta más frecuentemente a cerdos en fase de transición y engorde, aunque de forma más o menos esporádica. También puede observarse en animales adultos. Esta enfermedad se puede manifestar clínicamente de dos formas, septicémica y entérica.

La forma septicémica ocurre principalmente en cerdos menores de 5 meses de edad y cursa con una elevada letalidad. Las manifestaciones de la enfermedad pueden variar, pero de forma consistente se aprecia fiebre elevada, cianosis de orejas y respiración dificultosa. Dada la naturaleza sistémica de la infección, la manifestación predominante son las hemorragias diseminadas. Los animales que sobreviven a esta forma clínica quedan como portadores y pueden eliminar fecalmente la bacteria durante al menos 12 meses. Habitualmente, esta forma está causada por *Salmonella Choleraesuis*. Sin embargo, Fedorka-Cray *et al.*, (1994) describen que *Salmonella Typhimurium* puede desarrollar un cuadro septicémico en cerdos. La importancia de la salmonelosis por *Salmonella Choleraesuis* varía mucho en diferentes zonas geográficas, siendo muy poco

frecuente en Europa, al contrario de lo que sucede en los Estados Unidos, donde *Salmonella* Choleraesuis es el primer serotipo en frecuencia en el cerdo. Por ejemplo, en España su aislamiento es escaso aunque se ha descrito en un brote en jabalíes (Pérez *et al.*, 1999) y algunos casos en cerdos convencionales (Darwich *et al.* 1999, 2000; Mateu *et al.* 2002). Las razones para esta diferencia de presentación geográfica se desconocen, pero pueden estar relacionadas con prácticas de manejo (Fedorka-Cray *et al.*, 2000).

La forma entérica (enterocolitis) es más frecuente en cerdos de 6-8 semanas de edad. En adultos es más rara pero pueden existir muchos animales infectados de forma subclínica. Su curso puede ser agudo o crónico, aunque normalmente se trata de cuadros agudos. Los principales signos de la enfermedad son la fiebre elevada y la diarrea profusa. Si no se desarrolla una septicemia y el animal puede rehidratarse adecuadamente, el proceso suele ser autolimitante. La mayor parte de las bajas se producen por una deshidratación intensa o por el desarrollo de una septicemia. Los cuadros entéricos están causados principalmente por *Salmonella* Typhimurium. Presumiblemente, esto es debido a la alta capacidad infectiva de este serotipo (Fedorka-Cray *et al.*, 1994), junto a unas pobres medidas de higiene que pueden existir en las granjas, lo que permite la exposición de los animales a altas dosis del microorganismo. Los brotes pueden ser especialmente importantes si se producen en animales sin inmunidad específica previa. Sin embargo, otros serotipos (denominados por algunos autores como exóticos) pueden causar este cuadro entérico en el cerdo (Mateu *et al.*, 2002), pero no son capaces de volverse estables en los rebaños porcinos (Baggesen *et al.*, 1996). En ocasiones, cuando estos cuadros entéricos cursan de forma crónica, producen pocas manifestaciones y se sospecha de ellos por hallazgos en la necropsia tales como tiflocolitis difterioide o la presencia de constricción rectal.

1.2.2. Tratamiento.

Tanto en la forma septicémica como entérica, los objetivos del tratamiento son minimizar la gravedad de la enfermedad y prevenir la diseminación de la infección. La elección del antimicrobiano a utilizar debe estar basada en la realización de pruebas de sensibilidad de los aislamientos obtenidos en cada brote. Sin embargo, y dada la gravedad de la infección, a menudo la medicación debe iniciarse antes de que los resultados de las pruebas laboratoriales estén disponibles. En estos casos, la selección

debe estar basada en experiencias previas y en los resultados provenientes de la vigilancia epidemiológica. Normalmente, los aminoglucósidos y las cefalosporinas como el ceftiofur, suelen tener actividad frente a la mayoría de aislamientos (Schwartz, 1999). Uno de los fármacos utilizados frecuentemente en España en la prevención y tratamiento de la salmonelosis es la colistina. Este polipéptido tiene una serie de ventajas que explican su uso. En primer lugar, la frecuencia de resistencias es baja (Catchpole *et al.* 1997; Mateu *et al.* 2002). Por otra parte, el hecho de que se administre por vía oral y no se absorba en el tracto intestinal permite una dosificación fácil y da lugar a que puedan utilizarse dosis elevadas sin el peligro de reacciones adversas generadas por el producto.

En la actualidad, una dificultad en el tratamiento de la salmonelosis porcina es la aparición de cepas con múltiple resistencia a los antimicrobianos. Las resistencias más comunes son frente a las tetraciclinas, las sulfamidas y la ampicilina (Seyfarth *et al.* 1997; Gebreyes *et al.* 2000; Oliveira *et al.* 2002b). El hecho de que estos compuestos hayan sido utilizados ampliamente en la producción porcina durante los últimos 40 años hace sospechar que puede ser éste el origen de las resistencias observadas (Gebreyes *et al.*, 2000). Asimismo, se han descrito aislamientos con resistencia al trimetoprim, aminoglucósidos, ceftiofur y quinolonas (Fey, *et al.* 2000; Walker *et al.* 2000; Chiu *et al.* 2002). En España, se ha descrito la presencia de cepas de *Salmonella* aisladas de personas y animales con fenotipos resistentes a múltiples compuestos antimicrobianos. Algunos de estos aislados presentan una resistencia ampliada a la ciprofloxacina (Mateu *et al.* 1999; Darwich *et al.* 2000; Cruchaga *et al.* 2001).

1.3. Epidemiología de la salmonelosis porcina.

1.3.1. Prevalencia de *Salmonella* en los rebaños porcinos.

Los estudios de prevalencia de *Salmonella* en cerdos pueden realizarse sobre animales presentes en la granja o en el matadero. Generalmente, se selecciona el matadero debido a la comodidad y a la disponibilidad de un gran número de muestras (heces, nódulos linfáticos, etc.) Sin embargo, se ha demostrado que durante el transporte y en las áreas de espera de los mataderos, pueden producirse infecciones a partir de animales de otras granjas o de restos contaminados en las salas de espera. Asimismo, se ha observado que

el tiempo necesario para que una infección inicial de *Salmonella* en tonsila pueda alcanzar el colon y recto es de dos horas (Morrow *et al.*, 2002). Por lo tanto, muestras fecales recogidas en los mataderos podrían dar falsas estimaciones de la prevalencia dada la posibilidad de infección en el mismo corral de espera a partir de heces de animales alojados anteriormente en él (Kim *et al.* 1999; Hurd *et al.* 2001; 2002). Por el contrario, los estudios a partir de heces en granja pueden subestimar aquellos animales que siendo portadores, en el momento del muestreo no excretan la bacteria.

De los datos obtenidos a partir de la bibliografía, se puede observar una gran variación en la prevalencia bacteriológica de *Salmonella* en los rebaños porcinos de diferentes países. Así, Rowe *et al.* (2001) describen un 5,9% de prevalencia en Irlanda. Christensen *et al.* (2002) describen un 11,4% de los rebaños de engorde en Dinamarca. Van der Wolf *et al.* (1999) describen una prevalencia del 23% de rebaños holandeses. Mientras que Rajic *et al.* (2001) mencionan una prevalencia de 51,7% en Canadá. Esta amplia variación en la prevalencia puede ser debida a diferentes factores, tanto geográficos como de la forma del muestreo y del método aplicado, así como también a la técnica de cultivo. Este hecho dificulta el establecimiento de comparaciones entre los estudios.

En cuanto a la prevalencia individual de *Salmonella* en los rebaños de cerdos, se observa un comportamiento similar cuando se estudia el porcentaje de portadores subclínicos. Grafanakis *et al.* (2001) describen un 1,4% de portadores en Grecia. Stege *et al.* (2000) encontraron un 2,1% en Dinamarca y Davies (1998) describen un 12% en los Estados Unidos. Sin embargo; en Holanda Van der Wolf *et al.* (1999) describieron un 9,8% en rebaños de engorde y, en Canadá, Rajic *et al.* (2001) describieron un 14,31% de prevalencia individual. Estas diferencias en la prevalencia individual pueden ser debidas a los factores anteriormente mencionados así como a la falta de sensibilidad de los métodos bacteriológicos (Baggesen *et al.*, 1993), al carácter intermitente de la eliminación de *Salmonella* en cerdos infectados subclínicamente y al volumen de heces analizado (Davies *et al.*, 2000b).

En la actualidad, una nueva forma de determinar la prevalencia de *Salmonella* en los rebaños porcinos está basada en la detección por ELISA de anticuerpos específicos contra *Salmonella* (Mousing *et al.*, 1997). Se han realizado estudios serológicos en

diferentes partes del mundo y los valores de prevalencia obtenidos han sido variados. Así, Van der Wolf *et al.* (2001) describen en Holanda una seroprevalencia en los rebaños de engordes en 1996 y 1999 del 23,7% y 24,5% respectivamente. Mousing *et al.* (1997) mencionan una prevalencia del 47% en Dinamarca. Rajic *et al.* (2001) encontraron una prevalencia del 83,15% en Canadá. Sin embargo, Grafanakis *et al.* (2001) encontraron una prevalencia del 3,4% en Grecia y Ludewing *et al.* (2001) describen un 8,9% en Sajonia.

Las posibles causas de la variedad de los resultados descritos pueden ser diversas. En primer lugar, podrían existir diferencias en el tipo de muestras analizadas y esto podría influir en las diferencias. Al respecto, Mousing *et al.* (1997) y Nielsen *et al.* (1998) describen que el uso de jugo de carne muestra una sensibilidad relativamente baja (81% - 89%) comparada con el suero. Sin embargo, mencionan que la mayor ventaja de la utilización del jugo de carne es la facilidad de recolección e identificación. Otro factor a tener en cuenta es el punto de corte utilizado para designar a los positivos en la prueba. Mousing *et al.* (1997) describen una prevalencia del 47% con un punto de corte correspondiente a una densidad óptica (D.O.) equivalente al 40% del control positivo. Sin embargo, el 90% de los rebaños pasaron a ser positivos al utilizar una D.O. del 11%. Por lo tanto, la sensibilidad disminuye significativamente cuando el punto de corte aumenta.

Por otra parte, hay que tener en cuenta la heterogeneidad de los diferentes serotipos que podrían estar infectando los rebaños, ya que algunas cepas tienen una mayor capacidad invasiva y de diseminación (Van Winsen *et al.*, 2001), lo que podría producir respuestas humorales de diferente intensidad. Además, hay que recordar que los actuales ELISAs se elaboran a partir de LPS, por lo que son específicos de serogrupo. Finalmente, otro factor a considerar es la edad de los cerdos al muestreo, debido que cerdos seropositivos podrían negativizarse al final del engorde (Van der Wolf *et al.*, 2001).

1.3.2. Factores de riesgo.

Cualquier programa de control de la salmonelosis en porcino precisa conocer cuáles son los factores que afectan a la introducción y diseminación de la infección en una explotación. Por lo que se conoce, estos factores pueden estar relacionados con la alimentación, el manejo, la sanidad y medidas de bioseguridad

1.3.2.1. Sistemas de alimentación.

La alimentación juega un papel importante en la exposición de los cerdos a *Salmonella* en las granjas, pero también tiene un impacto sobre la fisiología individual del animal. Hamilton *et al.* (2000) encontraron en su análisis de factores de riesgo que el uso de alimento granulado en los cerdos de engorde es un factor de riesgo para incrementar la prevalencia de *Salmonella*. El fundamento de esta relación aún no se conoce totalmente aunque se piensa que radica en una modificación de la flora del sistema digestivo que puede beneficiar el desarrollo de bacterias gramnegativas como *Salmonella* (Van Winsen *et al.*, 2002). Por otra parte, Bush *et al.* (1999) describieron que la utilización de la alimentación en forma de harina tiene un efecto protector sobre la infección. Jorgensen *et al.* (2001) no encontraron diferencias significativas entre la forma de presentación del alimento (harina/granulado) pero sí comprobaron un efecto de reducción del número de muestras positivas a *Salmonella* en el grupo al cual se le agregó un 2,8% de ácido láctico en el alimento. Asimismo, se ha observado que el uso de un sistema de alimentación húmeda ejerce un efecto protector frente a la infección por *Salmonella* (Dalh *et al.* 1997; Hojberg *et al.* 2003; Canibe *et al.* 2003) y por otro lado, mejora la tasa de crecimiento y conversión de los cerdos en el engorde (Kim *et al.*, 2001). Sin embargo, otros estudios obtienen resultados discrepantes al respecto (Hamilton *et al.*, 2000).

Se han ofrecido varias explicaciones sobre la eficacia en el control de la salmonelosis de la utilización de alimento húmedo o la inclusión de ácidos orgánicos en la ración diaria de los cerdos. Los ácidos orgánicos, principalmente ácido láctico y ácido acético, disminuyen el pH del alimento hasta valores próximos a 4, a los que las enterobacterias no pueden multiplicarse. Además, los ácidos orgánicos tienen un efecto antibacteriano “per se” (Russell *et al.*, 1986). La porción no disociada de los ácidos orgánicos puede

potencialmente penetrar en la bacteria y causar una disminución del pH del medio intracelular que produzca la muerte del microorganismo.

En el caso del alimento húmedo, esta práctica lo que favorece es una fermentación natural que conduce a un aumento de la concentración de ácidos orgánicos (Dalh *et al.* 1997; Canibe *et al.* 2003). Por este motivo, los sistemas de alimentación que favorecen la proliferación de bacterias productoras de ácido láctico contribuyen a establecer una exclusión competitiva en el tracto intestinal que disminuiría la probabilidad de una colonización por *Salmonella*.

1.3.2.2. Características de las granjas y sistemas de manejo.

Un grupo de factores que parece tener una gran influencia sobre la presencia de *Salmonella* en las explotaciones son sus características de producción y manejo. Por ejemplo, Mousing *et al.* (1997) y Carstensen *et al.* (1998) describen un aumento de la seroprevalencia relacionado con el tamaño de la explotación. De hecho, este hallazgo se relacionó con el número de orígenes y las malas prácticas de limpieza y desinfección realizadas en las explotaciones grandes. Por el contrario, Van der Wolf *et al.*, (2001) describen una mayor seroprevalencia en los rebaños pequeños. Esta discrepancia puede ser debida a que el tamaño de la granja actúe como una variable de confusión que refleje la existencia de factores que actúan tanto individualmente (tipo de corral, separación entre corrales, densidad, etc.), como a nivel general de la granja (manejo de los desechos, alimentación líquida / alimentación sólida, proceso de desinfección, etc.) o en ambos (sistema todo dentro - todo fuera).

En cuanto al sistema de producción, Lo Fo Wong *et al.* (1999) describen el beneficio del sistema todo dentro-todo fuera en el control de la infección por *Salmonella*. Este sistema ayuda a prevenir la contaminación entre lotes y actúa en forma de barrera impidiendo la formación de un ciclo endémico de la infección o repetidas infecciones desde el ambiente. Asimismo, Beloeil *et al.* (1999) describen que periodos de vacío (vaciado y limpieza) entre lotes de animales menores de un día, incrementan el riesgo de contaminación de los cerdos.

1.3.2.3. Sanidad y medidas de bioseguridad.

El riesgo de excreción de *Salmonella* se incrementa cuando ocurren brotes de diarreas en la fase de engorde. Por lo tanto, la presencia de otros patógenos digestivos (adenomatosis intestinal, disentería porcina) que causen disturbios entéricos, aumentan el riesgo de excreción de *Salmonella* (Beloeil, *et al.* 1999; Von Altrock *et al.* 2000). Asimismo, Fablet *et al.* (2003) mencionan que la presencia del virus del PRRS, circovirus porcino, influenza y *Lawsonia intracellularis*, puede asociarse con la excreción de *Salmonella*. Por otro lado, la utilización de tratamientos con antibióticos al final de la fase de engorde también se asoció con el riesgo de excreción de *Salmonella* (Fablet *et al.*, 2003). Un resultado similar fue encontrado por Van der Wolf *et al.* (2001), donde la utilización de la tilosina como promotor del crecimiento en la fase de engorde se asoció con una alta seroprevalencia. Las razones esgrimidas para explicar este hallazgo, se basaron en que la tilosina (bacteriostático activo contra grampositivos) tenía un efecto dañino sobre la flora endógena, provocando una disminución de la colonización. En la actualidad, se ha prohibido la utilización de la tilosina junto a otros promotores del crecimiento en la alimentación de los cerdos de engordes.

Con respecto a las medidas de bioseguridad, la ausencia de control de los roedores y pájaros se han descritos como factores de riesgo muy importantes. Letellier *et al.* (1999) reconocen que los roedores pueden actuar como reservorios de *Salmonella*. Barber *et al.* (2002), detectaron en granjas de cerdos infectados entre un 2% y 10% de roedores excretores de *Salmonella*. La falta de medidas para controlar la entrada de pájaros se ha asociado significativamente con la seropositividad (Bahnsen *et al.*, 2001). Se sabe que los pájaros pueden transportar pasivamente *Salmonella*, y sus heces pueden contaminar el alimento. Además los pájaros muertos pueden ser consumidos por los cerdos. Barber *et al.* (2002) describen que alrededor de un 8% de las heces de los pájaros de una granja infectada son positivas. Por lo cual los pájaros y los roedores pueden contribuir de forma indirecta a mantener fuentes de infección en la granja.

Otro aspecto importante es el manejo de los reemplazos, Davies *et al.* (2000a) mencionan que los altos índices de reposición y las fuentes externas de reposición pueden contribuir al mantenimiento de la infección por *Salmonella* en algunas explotaciones. En esta situación se pueden plantear dos escenarios. En primer lugar, que

debido al estrés del transporte y la introducción en un nuevo rebaño, se inicie una fase de excreción en los reemplazos, lo cual forma una fuente de contaminación para las cerdas del rebaño. En segundo lugar, que los reemplazos con una inmunidad específica menor que las cerdas existentes, presentan una mayor susceptibilidad a la infección y pueden infectarse al entrar en contacto con las cerdas propias de las granjas. Los riesgos que acarrea este problema pueden solucionarse utilizando adecuados sistemas de cuarentena y adaptación para las cerdas de reemplazo.

Una fuente adecuada de agua limpia y fresca es importante en la producción animal. La contaminación del agua puede ocurrir tanto en su origen, como en la granja propiamente dicha. Letellier, *et al.* (1999) y Oliveira *et al.* (2002a) describen el papel del agua en la diseminación de la infección por *Salmonella* en las granjas porcinas. Por lo tanto, se aconseja tomar una serie de medidas como la cloración del agua, realizar pruebas de potabilidad y la protección de los depósitos del agua para prevenir la contaminación por pájaros, roedores y polvo.

1.3.3 El cerdo como reservorio de salmonelosis para las personas.

Las intoxicaciones alimentarias constituyen un importante problema de salud pública mundial. Se estima que ocurren hasta 81 millones de casos anuales (Davies, 1999). Entre las principales fuentes de contagio para las personas tenemos los productos de origen animal, especialmente los aviares, aunque en los últimos años se ha observado una creciente implicación de productos cárnicos de origen bovino y porcino. Dentro de esta problemática, las toxiinfecciones alimentarias producidas por el género *Salmonella* se encuentran entre las patologías más frecuentes mundialmente. En España, en el año 2001, se registraron 7.930 aislamientos de *Salmonella* y durante el año 2002, ocurrieron un total de 13.826 casos de intoxicación alimentaria. (SIM, 2002)¹ En Cataluña, en el año 2001 se denunciaron 6.805 brotes de toxiinfección alimentaria, de los cuales, en el 45% de los casos el agente etiológico fue *Salmonella* (Departament de Sanitat i Seguretat Social, 2002).

¹ Sistema de Información Microbiológica (SIM) Año 2002. <http://193.146.50.130/ve/sim2002.htm>.

Aunque en menor medida que las aves, los cerdos son un reservorio de *Salmonella* para las personas, tal como lo demuestran los datos sobre aislamientos de este microorganismo en carne de cerdo y productos derivados. En los Estados Unidos, la frecuencia de aislamientos en canales de cerdo es muy variable (0% - 48%) (Schwarz, 1999). En España, se ha descrito que entre el 3% - 12,6% de las carnes de cerdo dan lugar al aislamiento de *Salmonella* (Darwich *et al.*, 1999; Usera *et al.*, 2001). Asimismo, en Dinamarca, se ha estimado que entre 10% y 15% de las salmonelosis en las personas están causadas por la ingestión de carne de cerdo (Hald *et al.*, 1999). Además, en un estudio llevado a cabo entre 1996 y 1997 se encontraron anticuerpos contra *Salmonella* en un 28% de canales porcinas (Christensen *et al.*, 1999).

La tasa de contaminación por *Salmonella* de los productos cárnicos de porcino depende de la existencia de un programa de control de *Salmonella* y del tipo de seguimiento analítico que se realice. Diversos sondeos indican valores de aproximadamente 11% de contaminación en países como Estados Unidos, Alemania, Italia y Holanda, valores muy superiores al 1% encontrado en Dinamarca ó 0,02% en Suecia (Comisión Europea, 2000; Hurd, *et al.* 2001; Korsak *et al.* 2003).

La transmisión de *Salmonella* de los cerdos a las personas se suele originar por la contaminación de la carne de cerdo por cualquier serotipo de *Salmonella*. En un alto porcentaje, esta contaminación ocurre en la sala de matanza, donde el procesamiento de las canales constituye el principal factor de riesgo para que *Salmonella* entre en la cadena alimentaria. El estrés del transporte, la supresión de alimento antes de la matanza, el contacto entre cerdos sanos e infectados y todos los sucesos pre-sacrificio incrementan la eliminación de *Salmonella* por parte de animales asintomáticos (Kim *et al.*, 1999).

1.4. Métodos de diagnóstico.

1.4.1. Métodos bacteriológicos.

Tradicionalmente, el cultivo bacteriológico y la posterior identificación por pruebas bioquímicas han sido los métodos usados para el diagnóstico de la salmonelosis. Sin embargo, estos métodos son laboriosos y consumen mucho tiempo. En el caso del

cerdo, la mayoría de los protocolos se han desarrollado para los casos clínicos de salmonelosis (Nielsen *et al.*, 1997). Sin embargo, la detección de *Salmonella* en los rebaños infectados subclínicamente (que son mucho más frecuentes que los rebaños con signos clínicos) no es tan simple puesto que la excreción se produce a niveles muy bajos, y esto hace que el aislamiento de *Salmonella* sea más difícil. Por lo tanto, es necesario disponer de un método que tenga una alta sensibilidad para detectar tanto a los animales infectados como a los excretores asintomáticos.

En general, los métodos bacteriológicos incluyen tres aspectos que vamos a revisar a continuación: un pre-enriquecimiento no selectivo, seguido por un enriquecimiento selectivo y la siembra en un medio sólido selectivo e indicativo.

1.4.1.1. Pre-enriquecimiento.

El aislamiento de *Salmonella* a partir de muestras como el alimento, muestras ambientales o de animales tratados, que contienen un número bajo de salmonelas o bacterias poco viables, puede ser difícil. En estos casos se sugiere el pre-enriquecimiento (Aho 1992).

Históricamente, se han desarrollado varios medios de pre-enriquecimiento. El caldo lactosa (CL) fue uno de los primeros en utilizarse ampliamente. Sin embargo, su uso ha disminuido porque la fermentación de la lactosa que se produce durante la incubación resulta en una acidificación del medio que puede inhibir o matar a las salmonelas presentes (Hilker, 1975). Se han formulado otros medios de pre-enriquecimiento sin un azúcar fermentable y con una gran capacidad tampón, como por ejemplo, agua de peptona tamponada (APT), el caldo universal (UB), el medio M9 y otros. La eficacia de estos medios varía dependiendo de su capacidad tampón. Juven *et al.* (1984) describen que los medios APT y M9 son mejores que el medio CL. Sin embargo, Hoofar *et al.* (1998) señalan que para muestras de cerdos y pollos el medio UB presenta una mayor capacidad tampón en comparación con el APT.

El uso del pre-enriquecimiento en material fuertemente contaminado como las heces no está muy claro, y durante años no se utilizó porque se pensaba que favorecía el crecimiento de la microflora acompañante a *Salmonella* y aumentaba el número de

falsos positivos (Aho, 1992). Sin embargo, hoy en día se ha convertido en una práctica común para el aislamiento de *Salmonella* (Harvey *et al.* 1980; Davies *et al.* 2000b).

1.4.1.2. Enriquecimiento selectivo.

El enriquecimiento en un medio selectivo es una fase crítica porque suprime la microflora competitiva y permite la proliferación de *Salmonella* a niveles que puedan ser detectados después en un medio sólido. Son muchos los caldos de enriquecimiento utilizados para recobrar selectivamente *Salmonella*, aunque los tres medios de enriquecimiento más utilizados son el caldo de Rappaport-Vassiliadis (RV), el caldo tetracionato y el caldo selenito (Walkman, 2000).

Se han realizado pocos estudios comparando las distintas metodologías de enriquecimiento para el aislamiento de *Salmonella* a partir de heces de cerdos infectados naturalmente y los resultados de los estudios existentes son contradictorios. Bager *et al.* (1991) describen que el enriquecimiento en caldo RV fue marcadamente superior al tetracionato y al selenito. Asimismo, Michael *et al.* (1999) concluyen que el RV y el tetracionato fueron superiores al selenito para enriquecimiento selectivo de *Salmonella*. Sin embargo, Nollet *et al.* (2001) indican que el tetracionato tuvo una menor sensibilidad en comparación con RV y selenito. Sin embargo; una gran desventaja del caldo selenito es su toxicidad (Waltman, 2000). Por otro lado, algunos medios de enriquecimiento selectivo inhiben el crecimiento de algunos serotipos. Así, *Salmonella* Derby puede no detectarse en los protocolos que utilizan RV (Hoorfar *et al.*, 2000) y *Salmonella* Choleraesuis puede inhibirse cuando se utiliza los caldos tetracionato o selenito (Smith 1952; Chung *et al.* 1970).

Se han desarrollado medios semi-sólidos selectivos como una alternativa a los caldos de enriquecimiento. Goossens *et al.* (1984) elaboraron un medio de enriquecimiento semi-sólido, basado en las características del caldo de enriquecimiento RV, al que denominaron medio semi-sólido Rappaport-Vassiliadis modificado (MSRV). Este medio semi-sólido combinaría las propiedades selectivas del RV y la característica de movilidad de la mayoría de serotipos de *Salmonella*. Varios estudios han descrito las ventajas de estos medios semi-sólidos en el aislamiento de salmonelas procedentes de muestras de cerdo y con una eficiencia significativamente superior a los caldos de

enriquecimiento (Hoofar *et al.* 2000; Voogt *et al.* 2001; Davies *et al.* 2001; Nollet *et al.* 2001).

1.4.1.3. Medios selectivos sólidos.

Se han desarrollado varios medios de agar selectivo para el aislamiento de *Salmonella* basados en el principio de selectividad y diferenciación. La selectividad involucra la incorporación de una sustancia inhibidora al medio que impida específicamente el crecimiento de otras enterobacterias. La característica de diferenciación de un medio de agar implica la adición de sustancias que permitan distinguir visualmente las colonias de *Salmonella* de las de otras bacterias. Los caracteres más utilizados son la producción de ácido sulfhídrico (SH₂+) o la incapacidad de fermentar la lactosa.

Recientemente, Dusch *et al.* (1995) compararon seis medios para el aislamiento de *Salmonella*: agar Hektoenteric (HE), agar Rambach (Ra), medio identificación de *Salmonella* SM-ID (SM), agar xilosa-lisina-tergitol 4 (XLT4), agar verde brillante novobiocina-glicerol-lactosa (NBGL) y medio Rappaport-Vassiliadis semi-sólido modificado (MSRV). En este estudio, el MSRV fue el medio que mostró la mayor sensibilidad y especificidad, pero debido a su naturaleza semisólida fue el medio con más dificultad para usar en el laboratorio. El agar XLT4 mostró una mayor sensibilidad que el agar HE y una especificidad cercana al 100%. Los otros medios mostraron una eficacia menor (Dusch *et al.*, 1995). Asimismo, Michael *et al.* (1999) describen que el agar XLT4 presentó una mayor sensibilidad y especificidad, en comparación con el agar verde brillante y agar Ra. Por otro lado, mencionan que la eficacia del medio sólido va a depender en gran medida de la eficacia del medio de enriquecimiento.

Los medios de agar sólido deben ser juzgados no sólo por su capacidad para permitir el crecimiento de *Salmonella*, sino también por su capacidad para diferenciar colonias de *Salmonella* de otras bacterias. La falta de capacidad de discriminación puede dar lugar a falsos positivos, lo que incrementa el tiempo de análisis de las muestras. Pignato *et al.* (1995) y Mallinson *et al.* (2000) coinciden en describir al *Citrobacter freundii* como el principal microorganismo en dar falso positivo en XLT4 y agar Ra respectivamente.

1.4.2. Métodos inmunoenzimáticos aplicados al diagnóstico bacteriológico.

La utilización de ELISA de captura para detectar el microorganismo en los alimentos y piensos está ganando un amplio uso en las industrias. Mientras los métodos de cultivo pueden tardar entre 3-7 días para identificar el microorganismo, con el método de ELISA se puede detectar la bacteria en un periodo de tiempo más corto, usualmente 1 día. Sin embargo; la fiabilidad de algunas de estas pruebas es cuestionable. En general, al utilizar muestras limpias mejora la eficiencia de la prueba. Con las heces o muestras contaminadas con heces, la eficacia de la prueba es menor en relación con el alimento (Fedorka-Cray *et al.*, 2000). Varios autores coinciden en describir que la principal desventaja de este método es la de requerir un mínimo de 10^4 - 10^5 UFC/ml para detectar el microorganismo (Lambiri, *et al.* 1990; Van Poucke *et al.* 1990). Por lo tanto, para alcanzar este número debe utilizarse una fase de pre-enriquecimiento.

1.4.2.1. Métodos serológicos.

Otro método para la monitorización de *Salmonella* en cerdos es la detección de anticuerpos en suero o jugo de carne mediante ELISA (Nielsen *et al.* 1995; Van der Heijden *et al.* 1998; Wiuff *et al.* 2000a). Habitualmente, los ELISAs para *Salmonella* están basados en el uso como antígeno de lipopolisacáridos (LPS) de la bacteria. Puede utilizarse el LPS de un solo serogrupo o mezclar el de varios (*mix*-ELISA). En este último caso, la combinación más frecuente es la de los serogrupos B, C1 y D1. Según se cree, entre el 90% y el 95% de las infecciones por *Salmonella* en cerdos son producidas por alguno de estos serogrupos (Van der Wolf *et al.*, 1999). A algunos ELISAs se les agregan antígenos de LPS-*Salmonella* pertenecientes a los serogrupos C2, E1 y G2 para cubrir un espectro mayor de serotipos.

El principio de la técnica (figura 1) se basa en tapizar la placa de ELISA con el LPS de *Salmonella*. Seguidamente se coloca la muestra de suero o jugo de carne de cerdo, y si los anticuerpos están presentes en la muestra, se unirán al antígeno. Tras el periodo de incubación y lavado posterior, se agrega un segundo anticuerpo (anti-IgG de cerdo) conjugado con peroxidasa. La reacción antígeno-anticuerpo se revela por la adición de un sustrato. La intensidad del color desarrollado en los pocillos es proporcional a la concentración de anticuerpos en la muestra.

Los anticuerpos contra *Salmonella* pueden estar presentes hasta un periodo aproximado de unos tres meses después de iniciarse la infección (Gray *et al.*, 1996) y son una prueba de que el animal ha estado en contacto con la bacteria. Las principales ventajas del ELISA son su facilidad de estandarización y su mayor sensibilidad en relación a los métodos bacteriológicos. Asimismo, no hay problemas de contaminación cruzada desde los camiones, corrales de espera o en el proceso de matanza si el muestreo se realiza en matadero, y la relación coste-eficacia es mucho mejor que la de los métodos bacteriológicos.

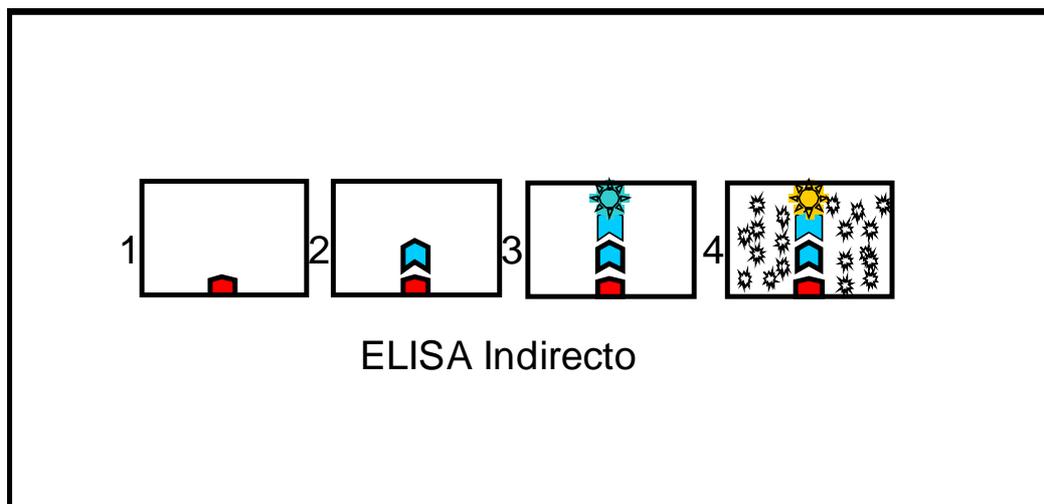


Figura 1. Principio de un ELISA indirecto. 1. Pocillo tapizado con LPS de *Salmonella*. 2. Anticuerpo presente en las muestras (suero o carne). 3. Anticuerpo anti-Ig de cerdo marcado (conjugado). 4. Sustrato para revelar el conjugado y desarrollar color.

Las desventajas de esta metodología derivan de su propio fundamento. No se puede discriminar excretores de individuos que se han recuperado y no se pueden detectar infecciones muy recientes.

En estudios experimentales, la sensibilidad y especificidad de los ELISAs son cercanas al 100%. Sin embargo, diferentes estudios (Nielsen *et al.* 1998; Lo Fo Wong *et al.* 2000; Enoe *et al.* 2001) han evaluado estos parámetros en condiciones de infección natural, encontrándose valores que oscilan entre 18% - 90% para la sensibilidad y entre 30% - 100% para la especificidad. Las posibles causas de esta discrepancia pueden ser variadas. Hay que tener en cuenta los antígenos utilizados para tapizar las placas y los

serotipos que estén presentes en los rebaños (Lo Fo Wong *et al.* 2000). Por otra parte, influye el punto de corte utilizado para clasificar los positivos, puesto que la capacidad de detectar animales seropositivos se reduce significativamente cuando el punto de corte se incrementa (Mousing *et al.*, 1997). Otro aspecto no menos importante es el tipo de muestra analizada. Nielsen *et al.* (1998) describen una sensibilidad relativamente menor al utilizar jugo de carne en la evaluación serológica. Van der Heijden (2001) evaluó diferentes ELISAs utilizados comercialmente y observó que la mayoría de los ELISAs presentaron una especificidad satisfactoria pero se encontraron grandes diferencias en cuanto a la sensibilidad de las pruebas.

La detección de anticuerpos contra el antígeno-O de *Salmonella* se usa con resultados satisfactorios en la monitorización de rebaños de cerdos. Sin embargo, un aspecto a tener en cuenta son las reacciones cruzadas que se producen con los ELISAs. Wiuff *et al.* (2002) describen la presencia de reacciones cruzadas con *Citrobacter freundii* y *Yersinia enterocolitica* O3. Asimismo, Van der Heijden *et al.* (2001) mencionan que la mayoría de los ELISAs disponibles comercialmente reaccionaron frente a una muestra positiva a *Yersinia enterocolitica* O3. Esta reacción podría deberse a que los ELISAs para *Salmonella* están basados en el LPS de la bacteria y esta estructura es muy similar entre las diferentes enterobacterias. Esta circunstancia debe tenerse en cuenta en el momento de interpretar los resultados ya que un número considerable de sueros podrían dar lugar a reacciones inespecíficas. Por otra parte, a medida que se avance en el control de *Salmonella* en los rebaños y la prevalencia sea baja, se requerirá de una prueba con mayor especificidad, y esto probablemente nunca se logre con una prueba basada en LPS.

Otro aspecto a tener en cuenta en las reacciones cruzadas es la detección de inmunoglobulinas M (IgM) específicas o inespecíficas (Wiuff *et al.*, 2002), especialmente para aquellos ELISAs que tienen una elevada avidéz.

1.4.3. Reacción en cadena de la polimerasa (PCR).

La reacción en cadena de la polimerasa (PCR) es una técnica que permite producir en el laboratorio múltiples copias de un fragmento de ADN específico. Como su nombre indica, se basa en la actividad del enzima ADN-polimerasa que es capaz de fabricar una

cadena de ADN complementaria a otra ya existente. Sus únicos requerimientos son que existan nucleótidos (adenina, timina, citosina y guanina) en el medio, que son la materia base para fabricar el ADN, y una pequeña cadena de ADN que pueda unirse a la molécula que queremos copiar para que sirva como iniciadora.

La extraordinaria capacidad de la PCR de replicar exponencialmente una secuencia determinada de ADN, la ha convertido en una poderosa herramienta de diagnóstico para la detección de patógenos en heces y muestras de ambiente cuando el aislamiento es difícil. La PCR se ha utilizado para identificar la presencia de salmoneras en alimentos y muestras clínicas (Feder *et al.* 2001; Oliveira *et al.* 2003), pero en general, tiene una baja sensibilidad por su incapacidad de detectar *Salmonella* en concentraciones menores de 10^3 UFC/gr de muestras (Chiu, *et al.*, 1996). Por otro lado, se describe la obtención de falsos positivos ya que existe un 90% de homología entre el genoma de *Salmonella* y *Escherichia coli* (Salyers, *et al.*, 1994). Algunos autores han mejorado la detección de la PCR por combinación de ésta con la incorporación de un procedimiento de un pre-enriquecimiento o un enriquecimiento selectivo (PCR-RV) (Feder *et al.* 2001; Oliveira *et al.* 2003).

1.5. Resistencia a los agentes antimicrobianos en *Salmonella*.

Otro aspecto que hay tener en consideración en la salmonelosis es la resistencia a los antimicrobianos, cuya emergencia constituye un grave problema sanitario de ámbito mundial. El abuso de los antibióticos es uno de los factores para el surgimiento de bacterias resistentes a estos compuestos. En los últimos años se ha observado un incremento en los niveles de resistencia de la flora comensal del intestino humano, que se ha relacionado con el uso de antibióticos en animales de abasto (Van de Bogaard *et al.*, 2000).

Uno de los principales motivos de alarma para las autoridades sanitarias ha sido el aumento de los casos de gastroenteritis y septicemia ligados a cepas de *Salmonella* resistentes a los antimicrobianos. Ante esta situación, la Unión Europea (UE) y otros países han tomado una serie de medidas encaminadas al control, prevención e investigación de los mecanismos de difusión y desarrollo de resistencias (Diario Oficial de las Comunidades Europeas, 1999).

En el caso de *Salmonella* y dado su carácter de zoonosis, tiene gran interés conocer los niveles de resistencia a los antimicrobianos. En Francia, Martel *et al.* (2000) analizaron la resistencia a los antibióticos de 6600 cepas de *Salmonella* procedentes de diferentes orígenes. El 75,4% de los aislamientos fue resistente al menos frente a uno de los antimicrobianos probados y un 20% mostró una sensibilidad intermedia. Las resistencias más frecuentes fueron a la ampicilina (A), cloranfenicol (C), estreptomicina (S), sulfonamida (Su) y tetraciclina (T). Las cepas de origen animal (aviar y cerdos) fueron las más resistentes. En España, Cruchaga, *et al.* (2001) estudiaron 1710 cepas de *Salmonella* aisladas de personas, animales y alimentos. El 75% de las cepas mostró resistencia al menos frente a uno de los antimicrobianos probados y el 41% fueron multirresistentes. Las resistencias más comunes se observaron a la A, C, S, Su, T, y al ácido nalidíxico. Asimismo, Usera *et al.* (2002) analizaron 474 cepas de *Salmonella* de origen animal y el 81,5% mostraron resistencia al menos frente a unos de los antimicrobianos. En ambos estudios, las cepas de origen porcino fueron considerablemente más resistentes. En Estados Unidos, Gebreyes, *et al.* (2000) analizaron 1257 aislamientos de origen porcino, el 49,7% de las cepas fueron multirresistentes siendo las resistencias más frecuentemente observadas frente a la T y A.

Entre los serotipos aislados con mayor frecuencia descritos como multirresistentes, destaca *Salmonella* Typhimurium, particularmente las cepas pertenecientes al fagotipo DT104. Desde su aparición en 1984 en el Reino Unido, este fagotipo se ha diseminado y se ha descrito en diferentes partes del mundo (Molbak *et al.* 1999; Gebreyes *et al.* 2000; Mogelmoose *et al.* 2000; DEFRA, 2000, 2001) caracterizándose por presentar un patrón de pentarresistencia característico denominado R-ACSSuT (ampicilina, cloranfenicol, estreptomicina, sulfamida, tetraciclina) que, en algunas cepas, se ha visto ampliado a trimetoprim, quinolonas y cefalosporinas (Wiuuff *et al.* 2000b; Walker *et al.* 2000; Mateu *et al.* 2002). La existencia de estos clones multirresistentes de *Salmonella* reduce la probabilidad de éxito de los tratamientos antimicrobianos en la terapéutica hospitalaria habitual.

Gebreyes *et al.* (2000; 2001) mencionan que el problema de la multirresistencia a los antimicrobianos no es un problema exclusivo del *Salmonella* Typhimurium, puesto que estos patrones de multirresistencia pueden observarse en otros serotipos comunes en los

rebaños porcinos. Asimismo, describen que esta multirresistencia está frecuentemente asociada con la presencia de integrones que alojan “genes cassettes” que codifican resistencia a los antibióticos (Sandvang *et al.* 1998; Gebreyes *et al.* 2000). Estos elementos se transmiten en su totalidad y pueden integrarse en el cromosoma bacteriano como ocurre en el caso de *Salmonella* Typhimurium DT104 (cassette ACSSuT) (Daly *et al.*, 2000), o pueden albergarse en un plásmido como ocurre en el serotipo 4,5,12:i:-. (Guerra *et al.*, 2001; 2002).

1.5.1. Determinación de la resistencia a los antimicrobianos.

La determinación de la sensibilidad antimicrobiana de un aislado o cepa bacteriana es una de las principales funciones de los laboratorios de microbiología clínica. Para los clínicos, los resultados de sensibilidad son muchas veces tan importantes como la identificación del patógeno en sí mismo. Esto es particularmente cierto por el aumento de las resistencias a los antimicrobianos y en especial en aquellos casos donde las opciones para el tratamiento están limitadas. Los objetivos principales de una prueba de sensibilidad son predecir el resultado terapéutico de un agente antimicrobiano y guiar a los clínicos en la selección del compuesto más apropiado para un problema particular. Asimismo, permiten seleccionar antibióticos alternativos que puedan usarse si se presentan reacciones adversas al agente antimicrobiano inicialmente utilizado.

La mayoría de las pruebas de sensibilidad antimicrobiana clasifican a los microorganismos en tres categorías: sensibles, intermedios o resistentes. Un resultado sensible implica que hay una gran posibilidad de que el paciente responda al tratamiento con el antibiótico probado. El resultado resistente nos indica todo lo contrario. Por otro lado, la categoría de intermedio representa una zona tampón en la cual la interpretación dependerá de numerosos factores tales como la localización de la infección, la dosis que pueda suministrarse, etc.

Existen varios métodos para determinar la sensibilidad de un determinado microorganismo a los antibióticos. Básicamente, estas pruebas pueden llevarse a cabo en medios de crecimiento líquidos o sólidos y se puede seleccionar entre sistemas manuales, semiautomáticos o automáticos. Entre los métodos automáticos más difundidos existen el VITEK System, el WalkAway System, el miniAPI y Sensititre.

Estos métodos utilizan la turbidimetría, la fotometría o la fluorimetría para determinar el crecimiento bacteriano. Asimismo, estos equipos cuentan con un sistema informático que les permite analizar el crecimiento bacteriano y originar un informe con los resultados de sensibilidad expresados en forma cualitativa (sensible, intermedio o resistente) o cuantitativa ($\mu\text{g/ml}$).

1.5.1.1. Método de difusión de disco en gel de agar: Técnica de Kirby-Bauer.

El método de difusión de disco es la prueba de sensibilidad más difundida y aplicada en los laboratorios de microbiología clínica. Para realizar esta prueba, se dispone comercialmente de discos de papel impregnado con una cantidad concreta de un antimicrobiano, que se aplican sobre la superficie de un medio de agar nutritivo (Mueller-Hinton, Mueller-Hinton sangre) previamente inoculado con el microorganismo a probar. El antibiótico contenido en el disco difunde a través del agar, creando un gradiente de concentración del antimicrobiano alrededor del disco (figura 2). En el área donde la concentración del antibiótico impide el crecimiento bacteriano se forma una zona de inhibición alrededor de cada disco. Las cepas se clasifican como sensibles, intermedias o resistentes en función de los halos de inhibición obtenidos y su comparación con los rangos aceptados.

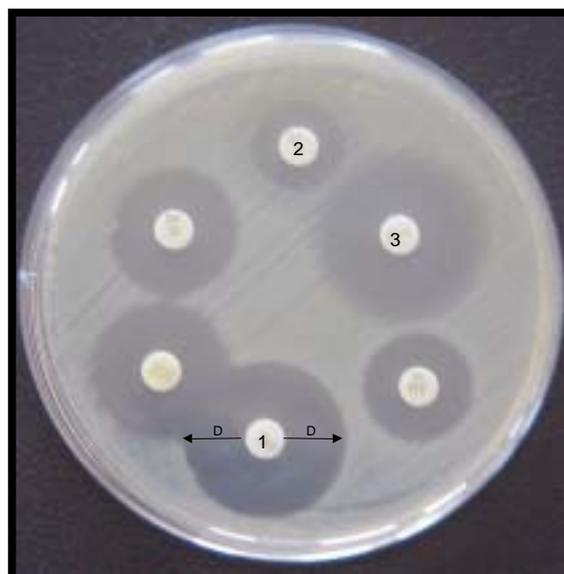


Figura 2. Caso hipotético de la técnica de difusión de disco en agar Mueller-Hinton. D: halo de inhibición, 1: sensible, 2: resistente, 3: intermedio.

Entre las ventajas de este método puede destacarse que es técnicamente sencillo y reproducible, los reactivos son relativamente poco costosos y no se requiere de equipos especiales para su aplicación. Las categorías de los resultados son fácilmente comprensibles por el clínico y la flexibilidad en cuanto a la selección de agentes antimicrobianos usados para la prueba permiten su adaptación a diversas circunstancias. La principal limitación del método de difusión de disco es que únicamente es interpretable para microorganismos de crecimiento rápido y no exigente.

1.5.1.2. Pruebas de sensibilidad por métodos de dilución.

Los métodos de dilución pueden llevarse a cabo en medios sólidos o líquidos, y se utilizan para determinar las concentraciones mínimas inhibitorias (CMI). Ésta es la mejor medida para evaluar *in vitro* la actividad antimicrobiana de un antibiótico. Así, es común referir la CMI y los valores de inhibición que agrupan bajo ellos al 50% y al 90% de cepas de una especie (CMI₅₀ y CMI₉₀). Estos valores permiten una evaluación de la probabilidad de tratar eficazmente con un agente concreto una infección producida por un microorganismo dado. En estas pruebas, los agentes antimicrobianos se analizan en un rango de diluciones de factor dos, que depende del antibiótico a usar, el microorganismo a ser probado y el sitio donde se halla la infección. Asimismo, la serie debe incluir concentraciones que permitan determinar la interpretación de las diferentes categorías (sensible, intermedio, resistente) y también el rango esperado para la concentración mínima inhibitoria (CMI) de la cepa control.

Estos métodos ofrecen una considerable flexibilidad puesto que los medios usados pueden ser suplementados o reemplazados con otro medio especial que permiten el crecimiento de los microorganismos fastidiosos. La flexibilidad de las pruebas de dilución es también evidente en el momento de describir los resultados ya que éstos pueden expresarse cuantitativamente ($\mu\text{g/ml}$), cualitativamente (sensible, resistente, intermedio) o de ambos modos.

1.5.1.2.1. Método de dilución en agar.

Este método consiste en la mezcla del antibiótico con el agar en una serie de diluciones en base 2. Mediante este método se pueden evaluar numerosos aislamientos simultáneamente y se pueden detectar contaminaciones bacterianas o crecimientos heterogéneos. Las principales desventajas de este método son la cantidad de horas que consume en su realización y lo laborioso de la preparación de las placas, especialmente cuando se analizan diferentes antibióticos.

1.5.1.2.2. Método de dilución por caldo (macrodilución).

Consiste en determinar la sensibilidad de una bacteria frente a un antibiótico por la interacción de ambos en un medio líquido (caldo). El volumen de caldo utilizado en cada concentración de antibiótico es ≥ 1.0 ml (usualmente 2.0 ml) contenido en tubos de 13 x 100 mm. El microorganismo a probar se inocula dentro de una serie de caldos que contienen la concentración del antibiótico a probar y seguidamente se incuban a 37°C durante 16-20 horas. La lectura de la CMI se realiza por observación directa de los tubos; la presencia de turbidez, precipitado o un punto de sedimento con un diámetro ≥ 2 mm se considera un crecimiento positivo.

1.5.1.2.3. Método de dilución por caldo (microdilución).

Este método es muy similar al de macrodilución, pero se diferencia en que utiliza volúmenes muy pequeños (0,2 - 0,05 ml). Se emplean placas de microdilución (figura 3) estériles en las que se dispensan el caldo y los antibióticos, o bien se utiliza placas preparadas disponibles comercialmente.

En líneas generales, los pocillos de la placa de microdilución representan la serie de tubos utilizados en la macrodilución y en ellos se procede a realizar las respectivas diluciones del antibiótico en caldo, a las que se agrega el inóculo de la cepa problema. Tras incubar la placa a 37°C durante 16 - 20 horas se realiza la lectura. Una alícuota del inóculo debe cultivarse para controlar su pureza y su correcta densidad. La lectura se realiza por observación directa de la placa y el crecimiento se verifica por presencia de turbidez o un botón de sedimento en el fondo del pocillo.

Diluciones del antibiótico

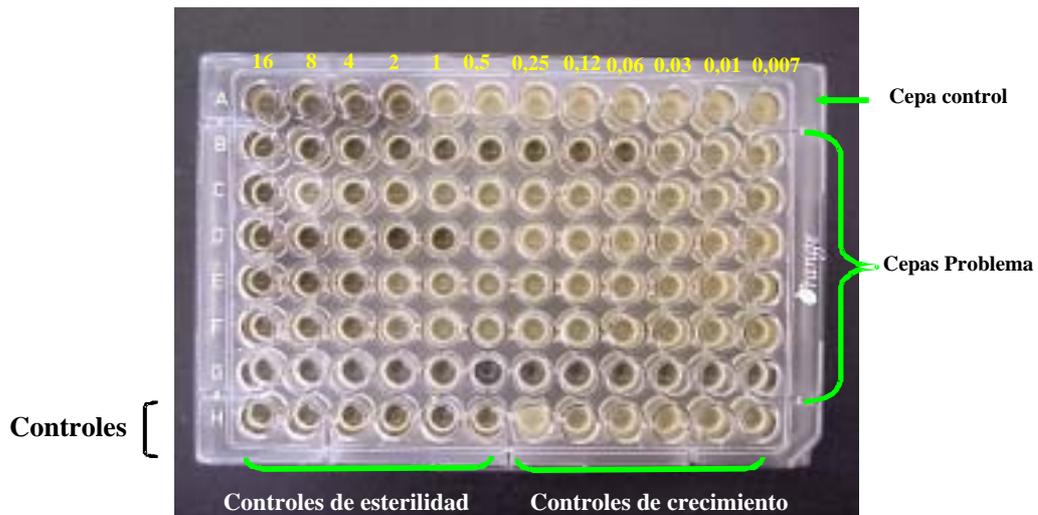


Figura 3. Caso hipotético del método de microdilución en placa. Placa de microdilución con diferentes resultados de sensibilidad de cepas problema frente a un antimicrobiano. Fila A una cepa control. Fila B-G cepas problema. Fila H pocillos de controles, H1-H3 (control de medio), H4-H6 (control del antimicrobiano) y H7-H12 (control de crecimiento de cepas problema).

2. OBJETIVOS

1. Determinar la prevalencia de la infección por *Salmonella* en el ganado porcino de Cataluña y conocer los factores de riesgo asociados a esta infección en las granjas porcinas.
2. Conocer los serotipos asociados a la infección por *Salmonella* en las granjas porcinas de Cataluña.
3. Determinar los perfiles de resistencia a los agentes antimicrobianos de las cepas de *Salmonella* aisladas.
4. Comparación de pruebas comerciales de ELISA para el diagnóstico serológico de la salmonelosis porcina.

3. MATERIALES Y MÉTODOS

En el presente estudio se planteó la realización de una encuesta epidemiológica para determinar la prevalencia y seroprevalencia de la infección por *Salmonella* en granjas de producción de porcino de Cataluña.

3.1 Marco de la encuesta.

De acuerdo al censo porcino publicado por el Centro de Estadística Agraria de Cataluña 1998, el número total de granjas en Cataluña es de 12.513. Para determinar el tamaño de la muestra se partió de las siguientes premisas: las granjas constituyeron la unidad muestral, se estimó una prevalencia de infección del 20%, una precisión de 7,5% y un nivel de confianza de un 95%. De este modo se determinó un tamaño de la muestra de al menos 108 granjas.

Dadas las desigualdades en el reparto dentro del territorio a estudiar, sólo se tuvieron en cuenta aquellas comarcas en las que su censo porcino superaba el 1,5% (figura 4) del total de granjas de Cataluña. La selección de las granjas se hizo de acuerdo a la posibilidad de muestreo ofrecida por las empresas propietarias o los veterinarios al cargo de las granjas.

3.2. Muestreo bacteriológico.

Se partió de la premisa de que si una granja estaba infectada, al menos un 15% de los animales presentes estarían infectados. Bajo esta hipótesis y con un 95% de confianza, se calculó que deberían examinarse 19 muestras de heces por unidad de producción estudiada. A efectos prácticos, en el contexto de esta tesis; se entiende por unidad de engorde un cebo de cerdos, bien sea en una granja de ciclo completo o en un cebadero aislado. Del mismo modo, una unidad de reproductoras puede estar en un ciclo completo o en una fase 1. En las reproductoras, las muestras de heces (25 gramos) se recogieron individualmente. En las unidades de engorde, la toma de muestras se realizó recogiendo un total de 25 gramos de heces de cinco puntos (5 x 5 grs.) diferentes del

corral. Las diferentes muestras de heces se colocaron en recipientes estériles a 4°C y se transportaron el mismo día al laboratorio para su procesamiento.

Figura 4. Comarcas de Cataluña que superan el 1,5% del censo porcino total

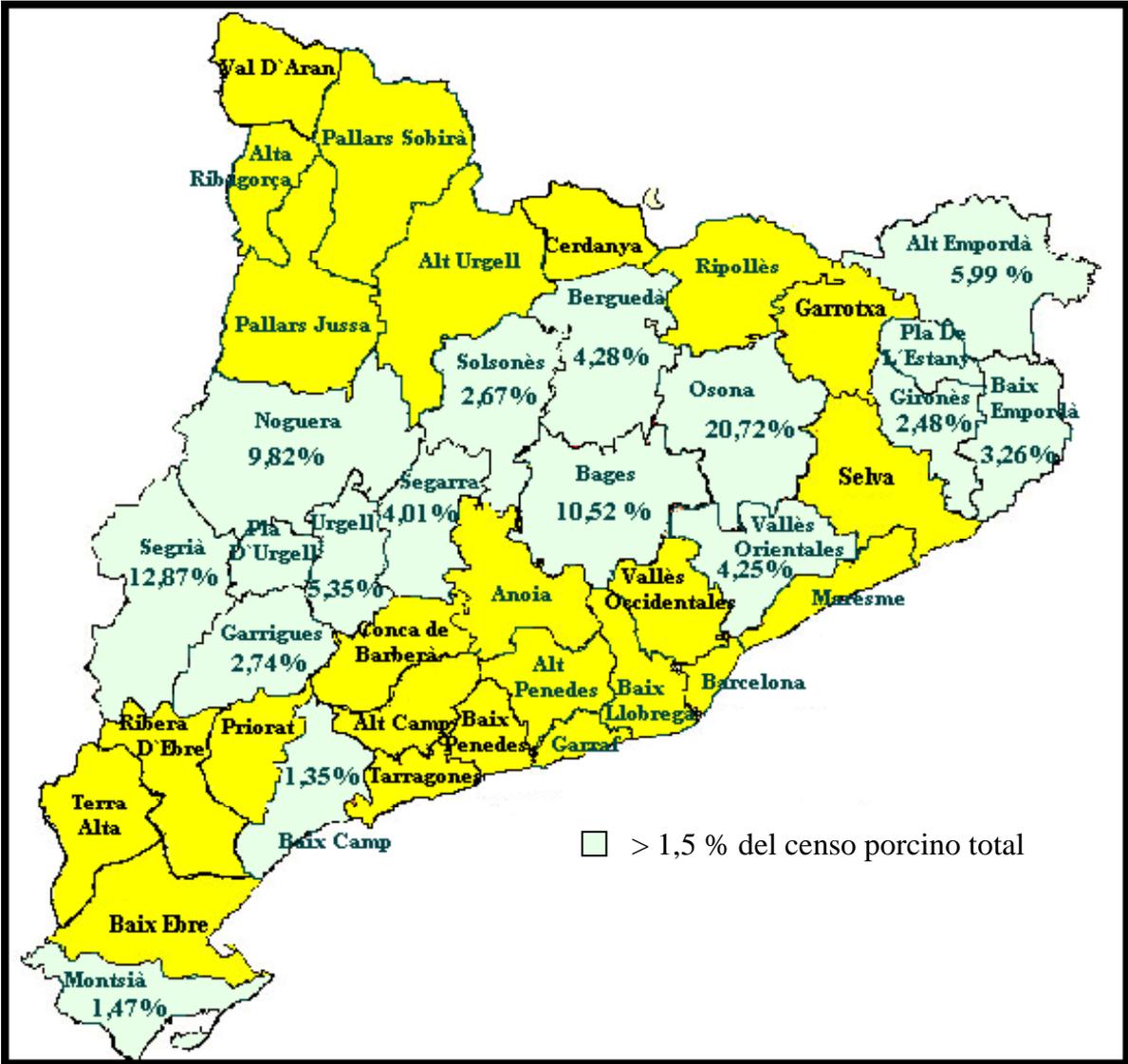


Tabla 2. Comarcas catalanas previstas en el muestreo y número de granjas por comarca.

Comarcas	Total de explotaciones	Porcentaje	Número de granjas a estudiar
Alt Empordà	621	5,99	6
Bages	1090	10,52	11
Baix Camp	139	1,35	2
Baix Empordà	337	3,26	3
Berguedà	443	4,28	4
Garrigues	283	2,74	3
Gironès	256	2,48	2
Montsià	151	1,47	1
Noguera	1017	9,82	10
Osona	2148	20,72	25
Pla d'Urgell	517	4,99	5
Pla de L'Estany	335	3,23	3
Segarra	416	4,01	4
Segrià	1334	12,87	17
Solsonès	277	2,67	3
Urgell	555	5,35	5
Vallès Oriental	441	4,25	4
Total	10.360	100	108

3.2.1 Encuesta epidemiológica.

En la visita realizada a cada granja se entrevistó al veterinario responsable o al propietario de la granja para rellenar una encuesta en la que se incluían datos sobre el estado general de la granja y su funcionamiento; principalmente, referentes al tamaño de la cabaña (total de cerdas y plazas de engorde), características de las construcciones e instalaciones, aspectos relacionados con la bioseguridad, tasa de reposición, tratamientos antimicrobianos rutinarios que se aplicaban y la presencia de otras actividades ganaderas en el recinto (Anexo nº 1).

Para rellenar las encuestas de las granjas de la comarca de Osona que se muestrearon en el matadero (apartado 3.4.1) se realizó entrevistando por teléfono a los propietarios o a través de las cooperativas que gestionan dichas granjas (Anexo nº 2).

3.3. Metodología de laboratorio.

3.3.1. Procesamiento de las muestras de heces.

3.3.1.1. Cultivo microbiológico.

Las muestras se analizaron el mismo día de su recolección. Inicialmente, con la ayuda de una espátula de madera se procedió a homogeneizar la muestra y se tomó una pequeña parte (aproximadamente 1gr) con un hisopo de algodón para, seguidamente, sembrar en caldo Rappaport-Vassiliadis (RV) y se procedió a incubar a 42°C. Posteriormente, se realizaron subcultivos a las 24 y 48 horas en placa de agar Xilosina-Lisina-Tergitol-4 (XLT4) que se incubaron a 37°C durante 24 h. A continuación, las colonias sospechosas observadas en XLT4 (colonias de color rojo, o amarillo con un ennegrecimiento en la parte central de la colonia) se sembraron en una placa de agar MacConkey, incubándose a 37°C durante 24 h. Las cepas lactosa negativo se procedieron a examinar mediante pruebas bioquímicas (tabla 3). En los casos en que la cepa no se correspondiera exactamente al perfil bioquímico esperado se procedía a realizar una batería de pruebas más completas (API20E, Biomérieux). Una vez identificadas presumiblemente como *Salmonella* se enviaron al Centro Nacional de Referencia de Salmonelosis (Algete, Madrid) para su serotipificación según el esquema de Kauffman-White-Le-Minor y fagotipificación de los aislados del serotipo Typhimurium mediante el “Sistema Colindale”. Todas las cepas se conservaron a - 80°C en criobolas (AEB 400100; Laboratories AES-CRYO-Billes) para posteriores estudios.

Tabla 3. Perfil bioquímico compatible con *Salmonella*

TSI ^a	SIM	Urea	Citrato	Fenilalanina
K/AG/S _H ₂ + ó K/A/S _H ₂ + S _H ₂ +/Indol	-/Motilidad +	-	+	-

^aK: alcalino, A: ácido, G: producción de gas, SH₂: producción de sulfuro de hidrógeno (ennegrecimiento).

3.3.1.2. Pruebas de sensibilidad antimicrobiana.

Todas las cepas de *Salmonella* aisladas se analizaron mediante la técnica de Kirby-Bauer, para determinar sus patrones de sensibilidad frente a un panel de 18 agentes antimicrobianos comúnmente utilizados en medicina humana y/o veterinaria (tabla 4).

3.3.1.2.1. Método de difusión de disco.

3.3.1.2.1.1. Preparación del inóculo:

El inóculo se obtuvo a partir de un cultivo fresco en agar sangre de la cepa a examinar. Con el asa de siembra estéril se procedió a tocar levemente una colonia y a continuación se resuspendió en solución salina fisiológica, ajustándose visualmente a una turbidez equivalente a 0,5 en la escala de McFarland. Seguidamente, se introdujo un hisopo de algodón estéril en la suspensión bacteriana ajustada, se eliminó el exceso de líquido presionando contra las paredes del tubo y se sembró toda la superficie de la placa de agar Mueller-Hinton un mínimo de tres veces en ángulos opuestos de 60° aproximadamente. A continuación, con la ayuda de una pinza estéril, se colocaron los discos de antibióticos, a razón de seis por placa, ejerciendo una ligera presión sobre ellos para asegurar un buen contacto con el agar. Posteriormente las placas se incubaron a 37°C durante 18-24 horas.

3.3.1.2.1.2. Lectura y validación de resultados:

Se procedió a medir el halo de inhibición con una regla graduada en milímetros. Los resultados de los halos de inhibición se interpretaron como sensibles, intermedios o resistentes según las normas de la NCCLS, 1999 (tabla 4). En todas las determinaciones

se utilizó como cepa control *Escherichia coli* ATCC 25922. Los resultados de las cepas problema se validaban únicamente si los halos de inhibición de la cepa control para cada antibiótico se hallaban dentro de los límites aceptados por el documento M31-A de la NCCLS 1999. Cuando algún compuesto no figuraba en los estándares se utilizaron los valores sugeridos por el fabricante de los discos.

Tabla 4: Antimicrobianos utilizados y halos de inhibición considerados para la clasificación, según las normas de la NCCLS (National Committee for Clinical Laboratory Standards. 1999).

Antibióticos	Concentración	Sensible	Intermedio	Resistente
	(µg)	(mm)	(mm)	(mm)
Ampicilina	10	≥17	14-16	≤13
Amoxicilina + ácido clavulánico	30	≥18	14-17	≤13
Ceftiofur	30	≥21	18-20	≤17
Ceftriaxona	30	≥17	14-16	≤13
Ácido nalidíxico	30	≥21	17-20	≤16
Flumequine	30	≥19	14-18	≤13
Enrofloxacin	5	≥21	17-20	≤16
Ciprofloxacina	5	≥21	17-20	≤16
Estreptomicina	10	≥15	13-14	≤12
Gentamicina	10	≥15	13-14	≤12
Apramicina	15	≥15	13-14	≤12
Neomicina	30	≥17	15-16	≤14
Sulfamida	200	≥17	13-16	≤12
Sulfamida + trimetoprim	1,25+23,75	≥16	11-15	≤10
Cloranfenicol	30	≥18	13-17	≤12
Tetraciclina	30	≥19	15-18	≤14
Colistina	50	≥15	N.A.*	≤14
Nitrofurantóina	300	≥17	14-16	≤13

* No aplicable

3.4. Muestreo serológico.

3.4.1. Comarca de Osona.

Para tener una visión más amplia de la enfermedad se planteó la realización de un muestreo serológico. Se seleccionó la comarca de Osona por ser una zona de alta densidad ganadera y tener una población más homogénea que otras comarcas. De acuerdo al censo publicado por el Centro de Estadística Agraria de Cataluña (1998), el

número total de granjas de engorde en la comarca de Osona es de 2.148. Se partió de las siguientes premisas: las granjas constituyeron la unidad muestral, la prevalencia esperada de infección era del 20%, la precisión de 7,5% y el nivel de confianza de un 95%. De este modo se determinó un tamaño de la muestra de 104 granjas totales, aunque finalmente se analizaron 141 granjas, ya que se tuvo la oportunidad de aumentar el muestreo.

En cuanto al número de muestras de sangre a tomar en cada granja se calculó en base a los siguientes criterios; detectar, con un 95% de confianza, al menos un individuo positivo en cualquier granja en la que la prevalencia de portadores fuese mayor o igual al 25%. En cada granja se procedió a tomar 11 muestras de sangre por medio de visitas a los mataderos (durante el proceso de sangrado) y otras en las mismas granjas (se realizó un muestreo de forma aleatoria de la comarca).

Con el objeto de tener una amplia gama de muestras a la hora de comparar los distintos ELISAs, también se recogieron muestras de sangre de 42 unidades de maternidad. La toma de las muestras de sangre a cada una de las cerdas se realizó por punción de la vena yugular o por sangrado de la cola. Las muestras de sangre se centrifugaron para la obtención del suero y seguidamente se almacenaron en tubos individuales de seroteca a – 20°C hasta su análisis.

Cada granja muestreada se identificó por su marca de registro oficial en el matadero. Los propietarios o veterinarios responsables se entrevistaron telefónicamente para obtener los datos de la encuesta que figura en el anexo 2.

3.4.2. Procesamiento de los sueros.

Para el estudio de la seroprevalencia de *Salmonella*, las muestras de suero fueron analizadas mediante ELISA para detectar anticuerpos específicos frente a los antígenos O 1, 4, 5, 6, 7 y 12 de la cadena de polisacárido (PS) de *Salmonella*. Con este fin se empleó un ELISA indirecto disponible comercialmente al que denominaremos ELISA A (Salmonella Covalent Mix-ELISA® SVANOVA Biotech AB, Uppsala, Sweden). Por otra parte, se seleccionó un número de 361 sueros y se analizaron conjuntamente mediante otro ELISA comercial al que denominaremos ELISA B (SALMOTYPE®

LABOR DIAGNOSTIK, Leipzig), que detectaba anticuerpos frente a los mismos antígenos que la prueba A, y posteriormente se compararon los resultados obtenidos.

3.4.2.1. ELISA A.

La técnica se realizó acorde a las instrucciones del fabricante. Todos los reactivos se atemperaron antes de su uso. Se procedió a realizar una dilución 1/400 de los controles positivos, negativos y sueros problema. Esto se realizó en dos fases; en una placa de pre-dilución se colocaron 5 µl de los controles y sueros problema y se diluyeron con 195 µl de la solución tampón (1/40). A continuación, en la placa de ELISA tapizada con el antígeno, se procedió a colocar 90 µl de solución tampón en cada pocillo y seguidamente, se agregó 10 µl de los sueros y controles prediluidos, en los pocillos previamente designados para cada una de las muestras (1/400). Tras una incubación de 1 hora a temperatura ambiente, se procedió a lavar la placa con PBS-Tween un mínimo de tres veces. Posteriormente, se procedió a la colocación de 100 µl/pocillo del anticuerpo de conejo conjugado con peroxidasa anti-Ig de cerdo (diluido 1/8000). Tras una incubación de 1 hora a temperatura ambiente y tres lavados posteriores, se añadió 100 µl/pocillo del sustrato TMB incubándose durante 10 minutos.

Finalmente, la reacción se detuvo agregando 50 µl de solución de parada (H₂SO₄) y se realizó la lectura de las absorbancias (densidad óptica) en un lector de ELISA (Labsystems Multiskan RC) a 450nm de longitud de onda. Con las lecturas obtenidas se calcularon los porcentajes de positividad (P.P) de las muestras y de los controles positivo y negativo con la siguiente fórmula:

$$P.P = \frac{D.O. \text{ del suero problema}}{D.O. \text{ del control positivo}} \times 100$$

La prueba se valida si la $\overline{D.O.}$ del control positivo es mayor de 0,8 y menor de 2,0. Por otro lado, el porcentaje de positividad del control negativo debería ser menor del 25%. Los sueros problema se clasifican como positivos si su porcentaje de positividad es superior al 40% del control positivo.

En base a los resultados serológicos, las granjas se clasificaron en tres niveles de acuerdo al esquema danés (Mousing *et al.*, 1997): Nivel 1, prevalencia baja (< 10% de las muestras positivas), nivel 2, prevalencia moderada (> 10% hasta < 50% de las muestras positivas), nivel 3, rebaños con una alta prevalencia (> 50% de las muestras positivas).

3.4.2.2. ELISA B.

Todos los reactivos se atemperaron antes de su uso. La técnica se realizó acorde a las instrucciones del fabricante. Los sueros de comprobación, cuatro controles positivos (C1-C4) y uno negativo (C5) con un porcentaje de D.O. conocido, estaban liofilizados y se reconstituyeron con agua destilada. Los sueros problema se diluyeron en dos pasos hasta 1/400. Inicialmente, en una placa de pre-dilución se colocaron 5 µl de los sueros y se diluyeron con 195 µl de la solución tampón (1/40). A continuación en la placa de ELISA tapizada con el antígeno, se añadieron por duplicado los sueros de control (100 µl/pocillo) directamente en los pocillos previamente designados. Para los sueros problema, en cada pocillo de la placa se agregaron 90 µl de solución tampón y seguidamente 10 µl de los sueros prediluidos. La dilución final de los sueros problema fue de 1/400. Luego de una incubación de 1 hora a temperatura ambiente, se procedió al lavado de las placas con PBS-Tween un mínimo de tres veces. Tras el lavado, se procedió a colocar 100 µl/pocillo del anticuerpo conjugado con peroxidasa liofilizado de conejo anti-IgG de cerdo (diluido 1:250). Tras una incubación de 1 hora a temperatura ambiente, se añadieron 100 µl/pocillo de la solución de sustrato de TMB y se incubó durante 10 minutos.

Finalmente, la reacción se detuvo agregando 100 µl de solución de parada (H₂SO₄) y se realizó la lectura de las absorbancias en un lector de ELISA (Labsystems Multiskan RC) a 450nm. Para que los resultados fuesen válidos, el cociente del suero control positivo C1 y el suero de control negativo C5 debería ser mayor de 4,0. Seguidamente, con los resultados de los sueros de control se construyó una recta de regresión y se determinó el coeficiente de correlación (r^2) entre la D.O. y la concentración de anticuerpos. La prueba se validaba si r^2 era mayor a 0,95. Los sueros con D.O. superior o igual a 40% del control positivo fueron clasificados como positivos.

3.5. Análisis epidemiológico.

Para elaborar la base de datos se utilizó el paquete de programas Epi-Info, versión 6 (Dean *et al.*, 1994). Con la ayuda de la utilidad ANALYSIS, se calcularon las frecuencias de las diferentes variables. Los intervalos de confianza de las proporciones calculadas se determinaron utilizando el paquete estadístico Epicalc 2000.

3.5.1. Análisis de los factores de riesgo.

Los datos obtenidos del cuestionario se guardaron y analizaron por medio del paquete estadístico Epi-info 6. En un primer paso se creó una variable “ausencia/presencia” de infección y se hizo un análisis bivariable con todas las variables. Los factores con un nivel de significación $p < 0,25$ pasaron a formar parte de una regresión logística múltiple realizada mediante el paquete estadístico Epi-info 2002 (Dean *et al.*, 2002), para obtener un modelo explicativo de los potenciales factores de riesgo. Como modelo final se seleccionó aquel que presentó una significación estadística con una $p < 0,05$ en la prueba de máxima verosimilitud y obtuvo un mayor porcentaje de explicación de la positividad. En el caso de las variables referentes al número de animales, se tomó como punto de corte el centil 50%.

3.6. Comparación de pruebas diagnósticas (ELISA A y B).

3.6.1. Concordancia.

La concordancia entre los resultados obtenidos de los diferentes ELISAs se calculó mediante el valor *kappa* a través del paquete estadístico Win-Episcope.

3.6.2. Análisis ROC (Receiver Operating Characteristic).

Dada la escasa concordancia de resultados entre los dos ELISAs, se procedió a reevaluar los sueros utilizando un criterio de interpretación distinto. En primer lugar para cada suero se determinó una densidad óptica corregida o ratio S/P de acuerdo a la siguiente fórmula:

$$S/P = \frac{D.O. \text{ problema} - D.O. \text{ control negativo}}{D.O. \text{ control positivo} - D.O. \text{ control negativo}}$$

Esta ratio S/P permitía normalizar la distribución de los resultados en cada ELISA. A continuación, cada valor de ratio S/P se apareó con su clasificación original (positivo o negativo) que se obtuvo siguiendo las instrucciones del fabricante. Para cada serie de datos (ELISA A o B) se realizó un análisis ROC utilizando el programa StatsDirect. Este análisis ROC calculaba el valor S/P que podía utilizarse como punto de corte óptimo en cada caso. Los sueros se reclasificaron como positivos o negativos de acuerdo al punto de corte ROC y se compararon los resultados de ambas pruebas (A y B) nuevamente con el valor *kappa*.

4. RESULTADOS

4.1. Cultivo microbiológico.

4.1.1. Método bacteriológico.

Sobre agar XLT4 (24 y 48 h) se recuperaron un total de 3885 colonias sospechosas de ser salmonelas (CSS). De ellas, 2800 se descartaron por ser lactosa positiva tras siembra en agar MacConkey. De las restantes 1085, 96 (8,8%) aislamientos eran efectivamente *Salmonella* y otros cincuenta y tres aislamientos más (4,9%) se clasificaron mediante API20E como de discriminación incierta entre *Salmonella arizonae* o *Escherichia coli* SH₂+, pero al ser serotipificadas resultaron no ser *Salmonella*. Los restantes 936 aislamientos lactosa negativos se descartaron tras las pruebas bioquímicas. De los 96 aislamientos de *Salmonella*, 54 se obtuvieron tras las 24 h de incubación en Rappaport-Vassiliadis (30 en las reproductoras y 24 en los engordes) y 42 a las 48 h (20 en las reproductoras y 22 en los engordes). En la tabla 5 se da una información más detallada sobre estos hallazgos.

Tabla 5. Evaluación del crecimiento obtenido sobre agar XLT4

Periodo de incubación	Agar XLT4 (CSS ^a)	MacConkey		<i>Salmonella</i>	Arizonae <i>E. coli</i> SH ₂ +	Otros ^b
		Lactosa +	Lactosa -			
24 h	2050	1481	569	54	38	477
48 h	1835	1319	516	42	15	459
Total (%)	3885	2800 (72%)	1085 (28%)	96 (8,8%)	53(4,9%)	936 (86,3%)

^a Colonias sospechosas *Salmonella*, ^b *Citrobacter freundii*, *Enterobacter cloacae*, *Escherichia fergusonii*, *Proteus* spp. *Escherichia coli* (lactosa -)

4.1.2. Muestreo previsto y realizado.

Dentro del marco de la encuesta de este estudio estaba previsto el muestreo de las comarcas Alt Empordà, Gironès, Montsià y Solsonès. El muestreo de estas comarcas no se realizó debido a una serie de medidas de prevención y control que fueron instauradas en varias comarcas catalanas, a causa de los brotes de Peste Porcina Clásica que ocurrieron durante los años 2001-2002 en Cataluña. Se incluyeron tres comarcas, Alt Camp, Conca d'Barberà y Ribera d'Ebre que no superan el 1,5% del censo porcino de

Cataluña, pero cuyo sistema de producción se consideró representativo de la cabaña porcina catalana. Asimismo, se incluyó una comarca de la zona limítrofe con Aragón denominada la Franja, con una alta densidad porcina y un gran intercambio comercial histórico con Cataluña. Como se ha expuesto anteriormente, fue imposible seguir al detalle la planificación del muestreo en cada una de las comarcas previamente seleccionadas debido a las crisis sanitarias del sector. En la tabla 6 se da una información más detallada del muestreo realizado.

Tabla 6. Muestreo previsto y muestreo realizado, y número de granjas positivas.

Comarcas	Muestreo previsto	Muestreo realizado	Granjas positivas
Alt Empordà	6	0	0
Alt Camp	0	2	0
Bages	11	2	2
Baix Camp	2	1	1
Baix Empordà	3	3	1
Berguedà	4	3	0
Conca d' Barberà	0	2	0
Franja	0	16	3
Garrigues	3	2	0
Gironès	2	0	0
Noguera	10	2	0
Montsià	1	0	0
Osona	25	29	11
Pla d'Urgell	5	4	0
Pla de L'Estany	3	4	0
Ribera d'Ebre	0	3	1
Segarra	4	1	1
Segrià	17	54	15
Urgell	5	8	1
Solsonès	3	0	0
Vallès Oriental	4	3	3
Total	108	139	39

4.1.3. Prevalencia global.

Del análisis bacteriológico de las 139 granjas (46 granjas de ciclo completo con unidades de reproductoras y engorde, 28 unidades de reproductoras únicamente y 65 unidades de engorde exclusivamente) pertenecientes a varias comarcas de la Comunidad Autónoma de Cataluña y áreas limítrofes de influencia, 39 fueron positivas, obteniéndose un 28,06% (I.C. 95%: 20,93% - 36,42%) de prevalencia de infección (tabla 6).

4.1.4. Prevalencia individual.

El total de muestras procesadas fue de 3667, de las cuales se obtuvieron 96 aislamientos de *Salmonella*, equivalentes al 2,62% (I.C. 95%: 2,14% - 3,20%) de prevalencia individual (tabla 7). Se obtuvieron diferencias significativas entre el porcentaje de muestras positivas en reproductoras y engordes. Así, el 3,38% (I.C. 95%: 2,54% - 4,46%) de las heces de las reproductoras fueron positivas, mientras que sólo del 2,10% (I.C. 95%: 1,56% - 2,82%) de las muestras de heces de animales de engordes se aisló *Salmonella*.

Tabla 7. Total de muestras analizadas por categoría y la prevalencia encontrada

Categoría	Número de muestra	Muestras positivas	Prevalencia
Reproductora	1480	50	3,38%*
Engorde	2187	46	2,10%*
Total	3667	96	2,62%

**Odds ratio (OR):* 1,63 (I.C. 95%: 1,06 - 2,49), p=0,018

4.1.5. Prevalencia por unidades de reproductoras y engorde.

4.1.5.1. Reproductoras.

Se analizaron un total de 74 unidades de reproductoras de las que 18 fueron positivas (24,32%, I.C. 95%: 15,42% - 35,93%). Dentro de las granjas positivas se analizaron un total de 360 muestras de las cuales 50 (13,8%) fueron positivas. La prevalencia en reproductoras según el tipo de producción y el número de cerdas se detalla en la tabla 8.

Tabla 8. Prevalencia en reproductoras por tipos de producción y estratos.

Tipo de Producción	Número de unidades	Positivas	Prevalencia	Valor p
Ciclo completo	46	11	23,91%	n.s ¹
Fase 1	28	7	25%	n.s
Total	74	18	24,32%	
Estratos				
Pequeño (0 - 99)	2	0	0%	n.s
Mediano (100 - 250)	20	4	20%	n.s
Grande (> 250)	50	14	28%	n.s
Sin datos	2			
Total	74	18	24,32%	

¹ No significativo

4.1.5.2. Engordes

De las 113 unidades de engorde examinadas 23 fueron positivas (20,35%, I.C. 95%: 13,59% - 29,18%). Dentro de las unidades positivas, se analizaron 460 muestras, de las cuales 46 (10%) fueron positivas. Sólo se observaron diferencias significativas de prevalencia en relación con el número de plazas de cebo. Así, los cebos mayores de 1600 animales mostraban una prevalencia mayor que los cebos más pequeños (tabla 9).

Tabla 9. Prevalencia encontrada entre los diferentes tipos de producción y por estratos en las unidades de engordes.

Tipo de Producción	Número de unidades	Positivas	Prevalencia	Valor p
Ciclo completo	46	12	26,08%	n.s ¹
Cebadero	65	11	16,92%	n.s
Sin datos	2			
Total	113	23	20,35%	
Estratos				
Pequeño (1 - 399)	15	0	0%	
Mediano (400 - 1599)	62	12	19,35%	
Grande (> 1600)	29	8	27,58%	0,0359
Sin datos	7	3		
Total	113	23	20,35%	

¹ No significativo

4.1.6. Análisis epidemiológico.

4.1.6.1. Unidades de reproductoras.

En dos de las unidades no pudo completarse la encuesta por lo que, finalmente sólo se analizaron los datos de 72 de ellas. Inicialmente, se incluyeron ocho factores en el análisis logístico ($p < 0,25$), de los que tres se asociaron significativamente a la infección ($p < 0,05$): drenaje de los purines en conducciones a cielo abierto, ausencia de sistemas de desratización y número de reproductoras (> 250). El modelo de regresión logística se presenta en la tabla 10.

Tabla 10. Modelo de regresión logística para el estudio de las reproductoras

Factor	OR ^a (I.C. 95% ^b)	Valor p
Drenaje (abierto/cerrado)	34,48 (1,22 - 100)	0,037
Número de cerdas (> 250)	9,26 (1,15 - 74,62)	0,030
Control de roedores (sí/no)	0,05 (0,003 - 0,87)	0,039
Máxima verosimilitud = 33,78%		0,003

^a Odds Ratio, ^b Intervalo de confianza 95%.

4.1.6.2. Unidades de engorde (análisis bacteriológico).

De las 113 unidades de engorde analizadas, sólo se completaron los datos de 109 encuestas. En una primera fase, se seleccionó un total de 14 factores ($p < 0,25$) para el posterior análisis por regresión logística. En el modelo logístico multivariante final, se determinaron dos factores asociados al estado de infección: la presencia de otras especies de abasto en la granja y el número de plazas de engorde (> 1600). La existencia de brotes previos de salmonelosis no resultó estadísticamente significativa, aunque el valor p y el intervalo de confianza indican, como mínimo, una tendencia a la asociación. Dentro de las diferentes especies de abasto presentes en las granjas, las aves eran las principales fuente de infección (OR 3,71 (I.C. 95%: 1,11- 12,39), $p = 0,032$). El modelo de regresión logística se presenta en la tabla 11.

Tabla 11. Modelo de regresión logística para el estudio de los engordes

Factor	OR ^a (I.C: 95% ^b)	Valor p
Otras especies de abasto en la granja (sí/no)	5,826 (1,55 - 21,83)	0,008
Plazas de engorde (>1600)	4,760 (1,21 - 20)	0,020
Brote salmonelosis	4,032 (0,90 - 18,05)	0,068
Máxima verosimilitud = 81,67%		0,0047

^aOdds Ratio, ^bIntervalo de confianza

4.1.6.3. Unidades de engorde (serología)

A través de entrevistas telefónicas se obtuvo los datos de 102 encuestas. Ocho factores se incluyeron en el análisis logístico ($p < 0,25$), de los cuales dos se asociaron significativamente a la infección ($p < 0,05$): evitar la entrada de pájaros y el origen del agua (pozo/red). Asimismo, en aquellas granjas donde se utiliza agua de pozo, la ausencia de cloración del agua (OR 8,88 (I.C. 95%: 1,58 - 49,83), $p = 0,008$) resultó estadísticamente significativa. El modelo de regresión logística se presenta en la tabla 12.

Tabla 12. Modelo de regresión logística en unidades de engordes (serología).

Factor	OR ^a (I.C: 95% ^b)	Valor p
Evitar entrada de pájaros (si/no)	0,30 (0,09 - 0,95)	0,04
Origen agua (pozo/red)	3,64 (1,19 - 11,06)	0,02
Máxima verosimilitud = 82,63%		0,01

^aOdds Ratio, ^bIntervalo de confianza 95%

4.2. Serotipos aislados.

Se obtuvieron noventa y seis cepas de *Salmonella* de las 139 granjas analizadas. Sin embargo, cuando de una granja se obtenían distintos aislados del mismo serotipo, sólo se consideraron cepas distintas los aislamientos con diferentes fenotipos y características de sensibilidad antimicrobiana. Con esta restricción, nosotros consideramos tener 59 cepas pertenecientes a 17 serotipos diferentes (tabla 13). En las reproductoras se detectaron 11 serotipos y en los cebos 14. El serotipo más común en reproductoras fue Anatum, seguido por Rissen, Tilburg y Goldcoast. Sin embargo, en

los cebos el serotipo Typhimurium fue el más frecuente, seguido por Rissen, Derby y la variante monofásica 4,5,12:i:-. Sólo tres granjas de las 46 en las que se estudiaron simultáneamente unidades de reproductoras y engorde, presentaron infección en ambos grupos de producción. En un rebaño coincidió el serotipo en ambas categorías (Bovismorbificans) y en los otros dos casos los serotipos eran diferentes (Bovismorbificans-Typhimurium e Infantis-Derby). En 32 rebaños se aisló un solo serotipo, en seis rebaños dos serotipos diferentes y en un rebaño tres diferentes serotipos (tablas 14-16). De la fagotipificación del serotipo Typhimurium, en la actualidad sólo se tienen los resultados de dos cepas; una no tipificable (NT) y otra de fago no reconocido (PNR). Con respecto a la variante monofásica 4,5,12:i:-, una cepa corresponde al fago U302 y otra no tipificable.

Tabla 13. Distribución de los serotipos por fase de producción y granjas

Serotipo	Nº de granjas	Nº de aislamientos	Reproductoras	Engordes
Anatum	9	10	7	3
Rissen	7	8	4	4
Typhimurium	7	7	1	6
Derby	3	5	1	4
Tilburg	2	5	4	1
4,5,12:i:-	4	4	-	4
Goldcoast	1	4	4	-
Bovismorbificans	3	3	2	1
Diarizonae	2	2	-	2
Kapemba	2	2	1	1
Ohio	2	2	1	1
Virchow	1	1	1	-
Infantis	1	1	1	-
Bredeney	1	2	-	2
Grumpensis	1	1	-	1
Senftenberg	1	1	-	1
Kedougou	1	1	-	1
Total	N.A ^a	59	27	32

a. No aplicable, más de un serotipo por granja

Tabla 14. Granjas con un único serotipo (n=32)

Serotipo (número de granjas)	Código de granja (número de aislamientos)
Anatum (7)	I (2), L (1), Y (1), Z (1), AA (17), KK (1), LL (1)
Rissen (7)	F (2), O (2), P (1), U (1), V (1), CC (1), C (10)
Typhimurium (5)	H (1), K (1), M (1), EE (1), HH (1)
Bovismorbificans (4)	G (2), S (1), T (1), OO (1)
Derby (2)	E (1), GG (1)
Diarizonae (2)	D (2), X (1)
4,5,12:i:- (2)	JJ (1), MM (1)
Infantis (1)	FF (1)
Bredeney (1)	B (2)
Kedougou (1)	Q (1)
Ohio (1)	R (1)
Senftenberg (1)	DO (2)

Tabla 15. Rebaños con dos serotipos

Identificación del rebaño	Nº de aislamientos	Serotipo (número de aislamientos)
A	3	Virchow (2), Anatum (1)
J	2	4,5,12:i:- (1), Anatum (1)
N	9	Goldcoast (8), Typhimurium (1)
W	3	Grumpensis (2), 4,5,12:i:- (1)
BB	2	Tilburg (1), Kapemba (1)
II	5	Tilburg (4), Kapemba (1)

Tabla 16. Rebaños con tres serotipos

Identificación del rebaño	Nº de aislamientos	Serotipo (número de aislamientos)
NN	6	Derby (4), Typhimurium (1), Ohio (1)

4.2.1. Serogrupos detectados

Los serogrupos más frecuentes en las unidades de producción estudiadas fueron el E1, C1 y el B, detectados en 33 de las 41 unidades positivas (80,48%). En siete rebaños se contabilizaron 2 serogrupos distintos simultáneamente (tabla 17).

Tabla 17. Serogrupos de *Salmonella* aisladas desde 41 unidades de producción de cerdos en Cataluña

	Un único serogrupo							Múltiples serogrupos						Total
	B	C1	C2	D	E1	E4	Otros ^a	B+C1	C1+E1	E4+D	B+C2	B+E1	B+G2	
Aislados	19	23	13	2	26	7	6	N.A ^b	N.A	N.A	N.A	N.A	N.A	96 ^d
Unidades	10	9	4	-	7	1	3	1	1	2	1	1	1	41 ^c

a. Otros *Salmonella* 61:k: 1,5 (3), Kedougou (1), Grumpensis (2).

b. No aplicable.

c. Total de unidades positivas (engordes, reproductoras)

d. Total de aislamientos

4.3. Perfiles de antibiosensibilidad.

En los análisis de sensibilidad realizados por el método de Kirby-Bauer a los 96 aislamientos de *Salmonella*, se observó que las resistencias más frecuentes fueron: tetraciclina 68,8% (66/96), sulfamidas 67,7% (65/96) y a la combinación sulfamida + trimetoprim 53,1% (51/96). Se detectó una sensibilidad superior al 95% para la gentamicina, ceftiofur, flumequine, enrofloxacina y ciprofloxacina, y del 100% frente a la ceftriaxona y colistina. Sólo 12 aislamientos (12,50%) (Ohio, Kapemba, Goldcoast (2) y Rissen (8)) fueron sensibles a todos los antimicrobianos utilizados. Sesenta (62,50%) de los aislamientos presentaron resistencia a tres o más antimicrobianos simultáneamente. Asimismo, varios aislados de una misma granja y pertenecientes a un mismo serotipo presentaron distintos perfiles de sensibilidad. La tabla 18 muestra los porcentajes de sensibilidad de las salmonelas aisladas a los compuestos antimicrobianos utilizados.

Tabla 18. Resultados de sensibilidad a los agentes antimicrobianos de los aislados de *Salmonella* obtenidos.

Antibióticos	Resistente	Intermedio	Sensible
Ampicilina	41,7	0	58,3
Amoxicilina + Ácido clavulánico	17,7	11,5	70,8
Ceftiofur	0	3,1	96,9
Ceftriaxona	0	0	100
Ácido Nalidíxico	8,3	7,3	84,4
Enrofloxacin	0	3,1	96,9
Flumequine	0	4,2	95,8
Ciprofloxacina	0	1	99
Gentamicina	4,2	0	95,8
Estreptomycin	33,7	11,2	55,1
Neomicina	3,1	5,2	91,7
Apramicina	3,1	2,1	94,8
Sulfamida	67,7	10,4	21,9
Sulfamida + Trimetoprim	53,1	0	46,9
Cloranfenicol	17,7	2,1	80,2
Tetraciclina	68,8	18,8	12,4
Colistina	0	0	100
Nitrofurantoína	25,0	13,5	61,5

4.3.1 Patrones de multirresistencia.

De las 96 cepas obtenidas, se observaron 24 patrones de multirresistencia. Los más frecuentes fueron ASuTTm (11 cepas) y ATTmNalAmc (12 cepas). Los patrones más amplios correspondieron a una cepa del serotipo Infantis, resistente a nueve agentes antimicrobianos simultáneamente (R-ACSSuTTmNalGenNit) y dos aislamientos de la variante monofásica 4,5,12:i:-, obtenidos de granjas distintas y resistentes simultáneamente a diez agentes antimicrobianos, con patrones de resistencia ACSSuTTmNalGenAprNit y ACSSuTTmGenAprAmcNit, respectivamente. En la tabla 19 se presentan los distintos patrones de multirresistencia encontrados.

4.3.2. Frecuencia de resistencia entre los serotipos.

De las 59 cepas obtenidas, se examinó la frecuencia de resistencias entre los serotipos para determinar si ésta se agrupaba en alguno de ellos. Las resistencias a la sulfamida (17 serotipos), estreptomycin (17 serotipos), tetraciclina (16 serotipos) y a la combinación sulfonamidas + trimetoprim (14 serotipos), fueron las más ampliamente distribuidas. Sin embargo, para los otros antimicrobianos, sólo dos o tres de los

serotipos agrupaban la mayoría de las resistencias encontradas. Por ejemplo, 15 aislamientos fueron resistentes al cloranfenicol y de ellos, 9 pertenecen al serotipo Typhimurium y a la variante monofásica 4,5,12:i:-. Asimismo, 24 aislamientos presentaron resistencia a la ampicilina, de ellos, 15 pertenecían a los serotipos Anatum, Typhimurium y a la variante monofásica 4,5,12:i:-. En la tabla 20 se presentan estos resultados en detalle.

Tabla 19. Patrones de multirresistencia de los 96 aislamientos de *Salmonella*

Patrones de multirresistencia	Número de aislamientos	Serotipos
SSuT	3	Derby (1), Diarizonae (2)
SSuNit	1	Goldcoast
SuTmNit	1	Tilburg
ATAmc	1	Derby
SSuTTm	7	Bovismorbificans (3), Kapemba, Bredeney, Grumpensis (2)
ASuTTm	11	Anatum
CSuTTmNit	2	Tilburg
STTmNit	1	Tilburg
CSSuTTm	2	Senftenberg
ASuTTmNal	1	Anatum
ATTmNalAmc	12	Anatum
ASuTTmNit	1	Anatum
ACSuTTm	3	4,5,12:i:- (2), Diarizonae
ACSuTTm	1	Typhimurium
ACSSuT	1	Typhimurium
ACSSuTNit	1	Typhimurium
ACSSuTAmcNit	3	Typhimurium
CSSuTTmNeoNit	2	Virchow
ACSSuTTmNeo	1	Ohio
ASSuTTmGenApr	1	Anatum
ACSSuTTmNalAmc	1	Rissen
ACSSuTTmNalGenNit	1	Infantis
ACSSuTTmGenAprAmcNit	1	4,5,12:i:-
ACSSuTTmNalGenAprNit	1	4,5,12:i:-
Total	60	

Tabla 20. Frecuencia de resistencia entre los 59 diferentes serotipos considerados

Serotipos	Número de cepas	Número de cepas resistentes											
		A	C	S	Su	T	Tm	Nal	Gen	Apr	Neo	Amc	Nit
Anatum	10	9	-	1	9	9	9	2	1	1	-	2	1
Rissen	8	2	1	2	5	5	2	1	-	-	-	1	-
Typhimurium	7	5	5	4	5	6	1	-	-	-	-	3	4
Derby	5	1	-	2	1	5	-	-	-	-	-	1	2
Tilburg	5	-	-	2	3	2	4	2	-	-	-	-	5
4,5,12:i:-	4	4	4	2	4	4	4	1	2	2	-	1	2
Goldcoast	4	-	-	1	1	-	-	1	-	-	-	-	3
Bovismorbificans	3	-	-	2	2	2	2	-	-	-	-	-	-
Diarizonae	2	1	1	1	2	2	1	-	-	-	-	-	-
Kapemba	2	-	-	1	1	-	1	-	-	-	-	-	-
Ohio	2	1	1	1	1	1	1	-	-	-	1	-	-
Virchow	1	-	1	1	1	1	1	-	-	-	1	-	1
Infantis	1	1	1	1	1	1	1	1	1	-	-	-	1
Bredeney	2	-	-	1	2	2	2	-	-	-	-	-	-
Grumpensis	1	-	-	1	1	1	1	-	-	-	-	-	-
Senftenberg	1	-	1	1	1	1	1	-	-	-	-	-	-
Kedougou	1	-	-	1	1	1	-	-	-	-	-	-	-
Total	59	24	15	25	41	43	31	8	4	3	2	8	19

4.5. Estudio serológico

Al final de este estudio se examinaron 141 unidades de engorde (104 prevista en el estudio y 39 unidades de engorde más, que se tuvo la oportunidad de muestrear), 109 de ellas fueron positivas, obteniéndose una prevalencia del 77,3% (I.C. 95%: 69,34% - 83,75%). La clasificación de las 109 unidades de engorde positivas de acuerdo al esquema danés, resultó en un 15,6% (9,61% - 24,08%) de granjas en el nivel 1; 49,54% (39,89% - 59,23%) en el nivel 2 y 34,86% (26,15% - 44,65%) de los cebos situados en el nivel 3. Con respecto a los tipos de producción, se encontró una seroprevalencia del 85% en los cebos que se hallaban en granjas de ciclo completo y del 70,49% en los cebos aislados (diferencias no significativas) (tabla 21). La seroprevalencia en relación con el número de plazas, fue del 84,21%, 75,44% y 73,08% en los estratos pequeños, medianos y grandes respectivamente (tabla 21). No hubo diferencias significativas al respecto.

Tabla 21. Prevalencia serológica en las unidades de engorde según los tipos de producción y estratos

Tipo de Producción	Número de unidades	Positivas	Prevalencia	I.C.95%
Ciclo completo	40	34	85%	69,48 - 93,75%
Cebadero	61	43	70,49%	57,26 - 81,13%
Sin datos	40	32		
Total	141	109	77,3%	69,34 - 83,75%
Estratos				
Pequeño (1 – 399)	19	16	84,21%	84,21 - 95,83%
Mediano (400 – 1599)	57	43	75,44%	61,96 - 85,47%
Grande (> 1600)	26	19	73,08%	73,08 - 87,65%
Sin datos	39	31		
Total	141	109	77,3%	

4.5.1. Comparación de pruebas diagnósticas (ELISAs A y B).

Al realizar la comparación de las densidades ópticas crudas obtenidas en ambos ELISAs mediante un análisis de regresión, se obtuvo una correlación $r=0,55$ (I.C. 95%: 0,47 - 0,61). El valor *kappa* para la comparación de los resultados obtenidos (positivo-negativo) aplicando la interpretación de las densidades ópticas según el criterio de los respectivos fabricantes fue de 0,191 (I.C. 95%: 0,089 - 0,294), indicativo de una muy pobre concordancia (tabla 22).

Tabla 22. Comparación de los resultados de los ELISAs A y B

		ELISA B		Total
		+	-	
ELISA A	+	118	62	180
	-	84	97	181
Total		202	159	361

4.5.2. Análisis ROC.

Cuando se utilizaron las ratios S/P, el análisis ROC calculó un punto de corte S/P $\geq 0,3389$ para el ELISA A, con un área bajo la curva (ABC) de 0,9999 (figura 4). Este punto de corte concordaba con el 100% de los resultados negativos obtenidos usando las indicaciones del fabricante y en un 99,44% con los resultados positivos. En el ELISA B, un punto de corte S/P $\geq 1,3776$ concordaba con el 99,37% de los resultados negativos usando las directrices del fabricante y en un 99,45% con los resultados positivos. El ABC en el análisis fue de 0,9997. Cuando se compararon los resultados de ambos ELISAs usando las ratios S/P, no mejoró significativamente el valor *kappa* 0,241 (0,139 - 0,344).

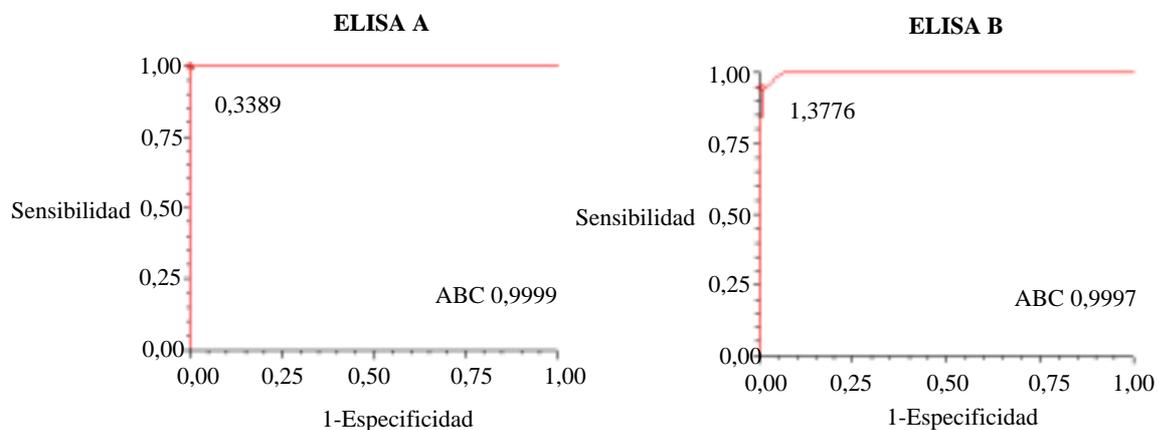


Figura 4. Curva ROC de los ELISAs A y B

La transformación de los resultados de densidad óptica en ratios S/P permitió observar la distribución de resultados en ambos ELISAs (figura 5). Así, los valores S/P del ELISA A seguían una distribución casi normal mientras que los valores S/P del ELISA B se ajustaban menos a una distribución normal. En este último caso podía observarse una acumulación importante de sueros en las ratios S/P cercana al punto de corte.

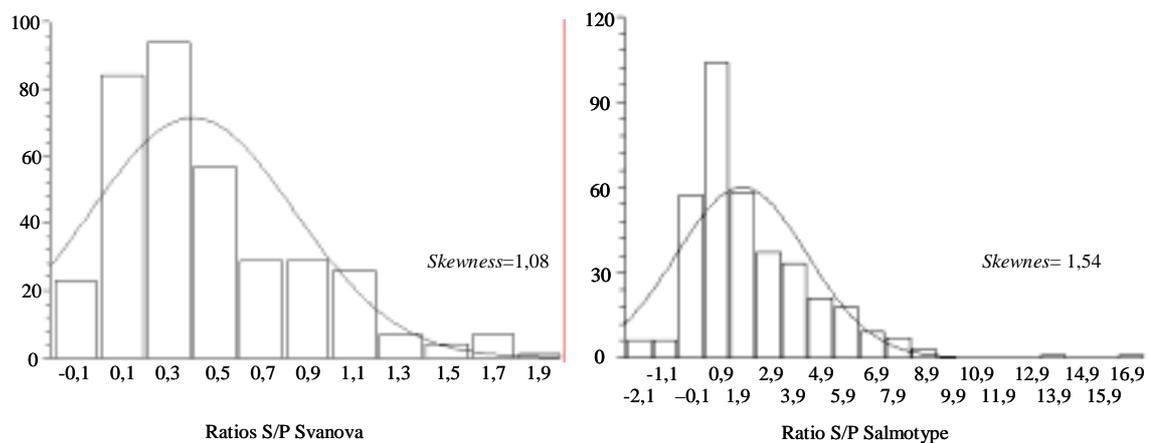


Figura 5. Distribución de las ratios S/P de los ELISAs A y B. Las barras indican el número de muestras en cada ratio S/P y la curva indica la distribución normal que idealmente se obtendría a partir de la media y la desviación estándar de las ratios S/P calculadas. *Skewness=1* indica plena normalidad.

Para determinar la posible causa de estas discrepancias, se seleccionaron al azar 10 sueros que fueran positivos en ELISA B (Salmotype) y se inactivaron por calor (56 °C, 30 minutos), tras lo que se volvieron a analizar en el ELISA B. Todos dieron resultados negativos después de este tratamiento. En contraste, los sueros positivos en Svanova no se vieron afectados por el tratamiento.

5. DISCUSIÓN

5.1. Método bacteriológico.

Tradicionalmente, el cultivo de muestras fecales ha sido el método utilizado para detectar portadores de *Salmonella*. Sin embargo, los métodos bacteriológicos desarrollados para tal fin tienen carencias de sensibilidad y especificidad, son laboriosos y consumen mucho tiempo. En estos métodos se recomienda un pre-enriquecimiento seguido de un enriquecimiento selectivo para pasar finalmente a un cultivo en un medio sólido selectivo. El uso de un pre-enriquecimiento supone un aumento de la sensibilidad dado que favorece la viabilidad de aquellas salmonelas que, por diversos motivos, estuviesen dañadas o sujetas a condiciones de estrés (Michael *et al.*, 1999). En nuestro estudio se obvió el pre-enriquecimiento y se optó por la siembra de las muestras de heces directamente en un medio de enriquecimiento selectivo. Las razones de esta modificación se fundamentan en dos criterios. En primer lugar, en estudios previos (no mostrados en esta tesis) vimos que el uso de un pre-enriquecimiento, aunque mejoraba la sensibilidad en relación al número total de individuos detectados, no tenía un impacto significativo en cuanto al número de granjas positivas, puesto que en una granja infectada, la proporción de excretores es relativamente alta. Por otra parte, existían también razones de economía de tiempo y medios. Al organizar el muestreo semanalmente, el uso de pre-enriquecimiento alargaba el procesado de cada muestra hasta su identificación final durante al menos 7 días, con lo que, las muestras de diferentes granjas se hubieran solapado haciendo imposible su análisis rutinario.

Para el cultivo en medio sólido, utilizamos el agar XLT4. Este medio ha demostrado su utilidad para recobrar *Salmonella* a partir de muestras de alimentos y heces, así como para reducir la competición de otras enterobacterias (Michael *et al.* 1999; Mallinson *et al.* 2000). Sin embargo, la eficacia para recobrar *Salmonella* sobre el medio de agar va a depender de la eficacia de la fase de enriquecimiento selectivo. En nuestro estudio, en el agar XLT4 se obtuvo una elevada proporción de colonias morfológicamente sospechosas de ser *Salmonella* (CSS) que posteriormente no pudieron confirmarse (sólo 96 aislamientos confirmados de más de 3800 colonias examinadas). Las posibles razones para este alto porcentaje de falsos positivos pueden derivar del hecho de que el medio Rappaport-Vassiliadis permite el crecimiento de otras enterobacterias con

características similares a *Salmonella*. El agar XLT4 tiene un sistema indicador basado en la lisina-decarboxilasa y la producción de ácido sulfídrico, que demuestra ser de una baja especificidad. El principal porcentaje de falsos positivos se debió a cepas SH₂⁺ de *Escherichia coli*, tanto lactosa positivas como negativas, seguido, con una menor frecuencia, por *Citrobacter freundii*, *Enterobacter cloacae*, *Escherichia fergusonii* y *Proteus* spp. Estos resultados nos indican que en las muestras de heces de cerdos se pueden encontrar una gran variedad microorganismos capaces de confundirse con *Salmonella* en agar XLT4. De hecho, Ziemer *et al.* (2001) ya describen que las muestras de cerdos dan lugar a una mayor cantidad de CSS que las de otras especies. En cualquier caso, los datos bibliográficos sugieren que tanto el medio de RV como el agar XLT4 están entre los más selectivos (Nollet *et al.* 2001; Ziemer *et al.* 2001) por lo que, en nuestra opinión es necesario realizar nuevas investigaciones que conduzcan a una mejora de los protocolos de aislamiento para las muestras porcinas.

Por otra parte, en el marco de este estudio, se probó el medio semisólido Rappaport-Vassiliadis como alternativa al agar XLT4 (datos no mostrados en esta tesis). Sin embargo, las cepas de *Escherichia coli* SH₂⁺ poseían capacidad móvil, con lo que esta alternativa no era aceptable.

5.2. Prevalencia en rebaños.

Una de las decisiones clave a la hora de diseñar un estudio epidemiológico sobre la prevalencia de *Salmonella* en cerdos, es la elección del momento del muestreo. Usualmente se selecciona el muestreo en el matadero por comodidad y facilidad de obtener diferentes tipos de muestras. Sin embargo, se ha demostrado que durante el transporte, y en las áreas de espera de los mataderos, una infección inicial por *Salmonella*, por ejemplo en tonsilas, puede alcanzar el colon y recto en dos horas (Morrow *et al.*, 2002). Es por ello que, las muestras fecales recogidas en los mataderos, podrían dar falsas estimaciones de la prevalencia en rebaño, dada la posibilidad de infección en el mismo corral de espera a partir de heces de animales alojados anteriormente en él (Kim *et al.* 1999; Hurd *et al.* 2001; 2002).

Los datos disponibles de otros países muestran prevalencias muy variables pero que raramente bajan del 15 % (Baggesen *et al.* 1999; Rowe *et al.* 2001; Rajic *et al.* 2001). En nuestro estudio, encontramos un 28,06 % de rebaños positivos. Esto sugiere que, aunque la proporción de rebaños infectados en Cataluña es alta, no es superior a la de otros países con niveles económicos y sociales parecidos. Sin embargo, debe considerarse que un solo muestreo puede no ser suficiente para tener una imagen fidedigna del estatus de la infección por *Salmonella* en un rebaño concreto. Esto es debido a que la dinámica de la infección está sujeta a variaciones a lo largo del tiempo.

5.3. Prevalencia individual.

La prevalencia de *Salmonella* en los rebaños de cerdos puede diferir considerablemente con distintas condiciones de producción y en distintos países. Así, por ejemplo, en varios estudios se describen prevalencias individuales de excretores alrededor del 1% – 2% (Stege *et al.* 2000; Grafanakis *et al.* 2001), pero en otros países industrializados de Europa o América se llega a niveles del 10% o superiores (Van der Wolf *et al.* 1999; Rajic *et al.*, 2001). En nuestro estudio, la prevalencia individual de portadores fue de 2,62%, un valor que se sitúa en el rango inferior de lo descrito en la bibliografía.

Las diferencias de prevalencia individual pueden ser debidas a variaciones en la forma del muestreo y también al método de cultivo, e incluso a factores de producción o geográficos, lo que dificulta el establecimiento de comparaciones entre estudios. En nuestro caso, debe tenerse en cuenta que la prevalencia real de la infección por *Salmonella* podría ser más alta de lo que hemos hallado, ya que, según mencionamos anteriormente, los métodos bacteriológicos sufren de una cierta falta de sensibilidad (Baggesen *et al.*, 1993). Además el carácter intermitente de la eliminación de *Salmonella* en los cerdos infectados subclínicamente y el volumen de heces analizado son factores adicionales que pueden afectar la sensibilidad (Davies *et al.*, 2000b).

Otro punto que merece discusión es el hecho de que se encontrase un mayor número de muestras positivas entre las reproductoras (3,38%) que en los engordes (2,10%). Estos hallazgos, no concuerdan con lo descrito por otros investigadores, que describen una proporción significativamente menor en las cerdas (Christensen *et al.* 1999; Letellier *et al.* 1999 Funk *et al.* 2001). Según estos autores, los niveles de infección bajos en las

reproductoras se relacionan con las diferentes prácticas de higiene, el alojamiento, una mayor disponibilidad de agua (mayor contenido de agua en las heces) y el tipo de alimentación (consumo de mayor cantidad de alimento y presencia de fibra). En nuestro estudio, en el muestreo de los engordes, las muestras analizadas eran mezcla de heces de distintos animales con lo que no sería descartable que existiese un efecto de dilución que explicase la menor proporción de muestras positivas en los engordes.

Dentro de las unidades de reproductoras positivas, un 13,4% de las hembras eran excretoras. Este hecho refuerza la implicación del riesgo de la transmisión de la infección a los lechones (Funk *et al.*, 2001). En los engordes encontramos un 10% de prevalencia. Carlson *et al.* (1999) describen prevalencias entre 0,8% y 22% en rebaños positivos. Por lo tanto, este resultado nos indica la existencia de un número considerable de animales con excreción activa de *Salmonella*. Sin embargo, esta excreción es probablemente infrecuente, ya que sólo un 2,10% de las muestras fueron positivas, o por el contrario, este resultado se deba al efecto de dilución a causa del muestreo realizado en esta categoría. En conjunto estos resultados, nos indican la presencia de un alto número de animales con excreción activa en las granjas infectadas. Este hecho debe tenerse en cuenta si en el futuro se desea poner en marcha un programa de control de *Salmonella* en las granjas de Cataluña.

5.4. Factores de riesgo.

5.4.1. Reproductoras.

Para poder desarrollar programas eficientes y establecer procedimientos de control económicamente realizables, es necesaria la determinación de los factores de riesgo para las granjas.

Diversos estudios han mostrado el importante papel de las cerdas en la epidemiología de la salmonelosis por su capacidad para mantener la infección en la granja y transmitirla a sus lechones (Letelier *et al.* 1999; Kranker *et al.* 2001). En nuestro estudio se determinó una asociación entre la infección de las reproductoras y el número de cerdas presentes en la granja. Este hecho ha sido descrito por Hamilton *et al.* (2000) quienes sugieren

que este factor puede atribuirse al mayor número de cerdas de reposición necesarias en las granjas grandes y a proporciones elevadas de cerdas jóvenes.

Por otro lado, se determinó que el control de los roedores y el tipo de drenaje de los purines también eran factores de riesgo. Se sabe que los roedores pueden actuar como reservorios de *Salmonella* (Letellier *et al.*, 1999). Barber *et al.* (2002), detectaron entre un 2% y 10% de roedores excretores de *Salmonella* en granjas de cerdos infectadas, por lo que su papel como posibles reservorios no sería desdeñable. Por otra parte, los drenajes abiertos de los purines son una fuente de contaminación para los pájaros, roedores, artrópodos y también pueden contaminar las botas, con lo cual contribuirían de forma indirecta en mantener fuentes de infección en la granja.

5.4.2. Engordes.

En nuestro estudio, los resultados del análisis de las encuestas epidemiológicas en los engordes muestran que la presencia en explotaciones porcinas de otras especies de ganado es un riesgo importante. Este factor ha sido descrito previamente (Funk *et al.*, 2001). En nuestro caso, las aves fueron los animales más relacionados con el hecho de tener cerdos positivos en el engorde. Diversos estudios atribuyen a las aves el principal papel como reservorio de *Salmonella* (Mulder *et al.*, 1999; Capita *et al.* 2003) y por lo tanto, no resulta extraña esta relación. La práctica mixta de explotaciones debería evitarse si se desean establecer planes de control de salmonelosis porcina.

Por otra parte, era más probable que las unidades de engorde grandes fueron más propensas a tener animales positivos que las unidades pequeñas. Este resultado concuerda con lo descrito por Quessy *et al.* (1999) y Funk *et al.* (2001). Una posible explicación es que estas unidades usualmente reciben animales de diferentes orígenes, por lo cual incrementan así la posibilidad de introducir cerdos infectados. En nuestro estudio, no se pudo relacionar el número de orígenes con el estado de positividad, dado que, en muchos casos esta información no se pudo obtener, particularmente en aquellas granjas que funcionaban exclusivamente como cebaderos. Sin embargo, el sentido común sugiere que, dada la extensión de la infección debería considerarse la reducción del número de orígenes para disminuir el riesgo de diseminación de *Salmonella* en los cebos de cerdos.

El tercer factor que parecía que podía tener relación con la excreción de *Salmonella* en los engordes era el hecho de haber sufrido brotes clínicos previos. Lógicamente, si la granja se infectó con anterioridad, es muy probable que quedaran portadores y la infección se perpetuase en la granja (Barber *et al.*, 2002).

Con respecto a la serología en las unidades de engorde, la falta de medidas para controlar la entrada de pájaros fue uno de los factores que se asoció significativamente con la seropositividad. Se sabe que los pájaros pueden transportar pasivamente *Salmonella*, sus heces pueden contaminar el alimento y los pájaros muertos pueden ser consumidos por los cerdos. Así, Bahnson *et al.* (2001) describen esta misma relación y Barber *et al.* (2002) determinan que alrededor de un 8% de las heces de los pájaros de una granja infectada son positivos. Es por lo tanto recomendable que se instalen redes en las ventanas de las granjas y se revise periódicamente su buen estado.

En nuestro estudio, también se ha determinado una relación entre el origen del agua y su cloración, con la positividad de la granja. Así, las granjas que utilizaban agua de pozo, era más probable que estuvieran infectadas. La razón para ello radicaría en la propia contaminación del agua a partir de filtraciones o vertidos de otras explotaciones (Letellier *et al.*, 1999). En el caso particular de la comarca de Osona o de las de Lérida, debe tenerse en cuenta que sus densidades de granjas son de las mayores de Europa (150 – 250 cerdos / Km²). En esta zona, los acuíferos presentan elevados niveles de nitrógeno, indicador claro de contaminación procedente de purines que han sido usados como abono o de vertidos ilegales. No cabe duda que el uso de aguas sin potabilizar tiene que ser un importante factor de riesgo.

Hay pocos trabajos publicados acerca del efecto del tamaño del rebaño sobre la seroprevalencia en cebos. Mousing *et al.* (1997) y Van der Wolf *et al.* (2001) describen que la seroprevalencia en las unidades de engorde está relacionada con el tamaño del rebaño. Sin embargo, Carstensen *et al.* (1998) concluyen que el tamaño del rebaño tiene un efecto significativo sobre la seroprevalencia de *Salmonella*, aunque desde el punto de vista biológico es de poca importancia. Esto es debido a la existencia de factores que actúan tanto individualmente (tipo de corral, separación entre corrales, densidad, etc), como a nivel general de la granja (manejo de los desechos, alimentación líquida / alimentación sólida, proceso de desinfección, etc.) o en ambos (sistema todo

dentro / todo fuera). En nuestro estudio serológico no se observó ninguna diferencia relacionada con el tamaño del cebo. Nuestra opinión coincide con la de Carstensen *et al.* (1998) en relación que el tamaño de la granja podría ser un factor de riesgo para la *Salmonella* pero también puede actuar como una variable confusora.

Es interesante destacar que factores como por ejemplo la limpieza y desinfección, las prácticas de manejo todo dentro/todo fuera, el origen del pienso u otros, que tradicionalmente se han asociado a la salmonelas, no fueron significativos en nuestro estudio. Una posible explicación podría ser que su intensidad fuese relativamente baja para la capacidad de este estudio. Con nuestro diseño, sólo se detectarían factores con un riesgo relativo superior a 3,5. Por otro lado, los factores anteriormente mencionados tendrían más relación con la diseminación de *Salmonella* en la granja una vez ésta se hubiese infectado que con la posible entrada de la infección en la granja. El análisis de regresión logística se hizo tomando como efecto el hecho de que la granja tuviese o no portadores pero no podía considerar la proporción de positivos por granja.

5.5. Serotipos.

Somos conscientes de que un solo muestreo no es suficiente para tener una visión global acerca de si cada granja tiene un patrón de *Salmonella* específico. Sin embargo, los resultados de la serotipificación muestran la existencia de una amplia variedad de serotipos (17 serotipos) circulantes en las granjas de cerdos de Cataluña. En las unidades de engorde, *Salmonella* Typhimurium fue el serotipo predominante. Habitualmente, *Salmonella* Typhimurium se describe como el serotipo predominante en los rebaños porcinos (Baggesen *et al.* 1996; Proux *et al.* 2000; Gibson *et al.* 2001). Sin embargo, en las reproductoras *Salmonella* Anatum fue el más frecuente, seguido por *Salmonella* Rissen. La amplia variedad de serotipos encontrados y la baja frecuencia de aislamiento del mismo serotipo en reproductoras y cebo, nos permite sugerir o bien la existencia de diferentes fuentes de entrada (entre las que no puede descartarse el alimento, los roedores u otros animales) y ciclos de mantenimiento diversos para cada fase de producción, o bien, la distinta persistencia de diferentes serotipos en animales de fases de producción distintas. De todas formas, los datos bibliográficos indican que los serotipos exóticos aparentemente no son capaces de establecerse de forma endémica en

los rebaños porcinos (Baggesen *et al.*, 1996), al contrario de lo que sucedería con *Salmonella Cholerasuis*, *Salmonella Typhimurium* o *Salmonella Derby* entre otros.

Debe reseñarse que, en paralelo a este trabajo, en los últimos 3 años hemos estudiado 345 brotes de diarrea en transición y engorde, de los cuales en 17 (4,9%) se aisló *Salmonella*. De ellos, en 13 (3,76%) el serotipo aislado fue *Salmonella Typhimurium*. Si consideramos que en nuestro estudio de portadores el 6,19% de las unidades de engorde son positivas a *Salmonella Typhimurium*, es tentador pensar que la capacidad de este serotipo para establecerse endémicamente en una granja es alta.

5.6. Perfiles de antibiosensibilidad.

Los antibiogramas dieron como resultado un alto porcentaje de resistencias entre las cepas de *Salmonella* analizadas. Las resistencias más comunes fueron a la tetraciclina, las sulfamidas y la ampicilina. Estos compuestos han sido usados durante décadas en la producción porcina tanto como agentes terapéuticos o como profilácticos y su resistencia está ampliamente difundida (Bahnsen *et al.* 1999; Breuil *et al.* 2000; Farrington *et al.* 2001). La aparición de estas cepas resistentes podría afectar la producción ganadera, ya que va a limitar las opciones de tratamiento provocando un incremento de los fracasos terapéuticos. Por tanto, los tratamientos frente a *Salmonella* con ampicilina, tetraciclina, sulfamida y sus combinaciones son hoy en día probablemente poco efectivos

La combinación amoxicilina y ácido clavulánico se utiliza comúnmente en la terapia de salmonelosis invasivas en las personas (Poirel *et al.*, 1999). En trabajos previos se han descrito aislamientos de *Salmonella Typhimurium* con una sensibilidad disminuída a este compuesto (Espinasse *et al.* 1997; Gebreyes *et al.* 2000). En nuestro estudio se detectó un porcentaje alto (41,7%) de cepas de *Salmonella* resistentes, la mayoría de ellos agrupadas en los serotipos Anatum y Typhimurium. Este antimicrobiano no se utiliza en la producción porcina en España, y las razones que explicarían el origen de esta resistencia no están claras. Sin embargo, una sobreproducción de betalactamasas originadas frente a betalactámicos más simples, podría influir en su resistencia (Bradford *et al.* 1999; Fey *et al.* 2000).

La ceftriaxona es otro de los antimicrobianos de primera elección para el tratamiento de salmonelosis invasivas, especialmente en niños, para los que las quinolonas producen efectos adversos. Aunque es un fenómeno raro, se ha descrito el aislamiento de salmonellas resistentes a la ceftriaxona en personas y animales (Dunne *et al.* 2000; Fey *et al.* 2000). Por su parte, Gray *et al.* (2001) describen entre 1997 y 1999 el aislamiento de 50 cepas de *Salmonella* resistentes a cefalosporinas de tercera generación. En nuestro estudio no se observó resistencia frente a la ceftriaxona y sólo dos cepas tuvieron un resultado de sensibilidad intermedia al ceftiofur. Este tipo de cepas ha sido descrita recientemente en España (Mateu *et al.*, 2002) aunque parece que se mantiene a niveles muy bajos.

Con respecto a los aminoglucósidos, la estreptomina fue el compuesto con el mayor número (25/59) de cepas resistentes. Estos datos concuerdan con observaciones previas de otros autores (Headrick *et al.* 2001; Oliveira *et al.* 2002b). Este hecho puede relacionarse con la elevada proporción de cepas multirresistentes de patrón R-ACSSuT. Con respecto a la gentamicina, neomicina y apramicina, la prevalencia de resistencias fue menor de 5%. Estos resultados son similares a los descritos por Breuil *et al.* (2000) y Gebreyes *et al.* (2000) que señalan una frecuencia de resistencias que no superan el 10%. En nuestro estudio, se encontraron tres cepas con resistencia simultánea a la gentamicina y la apramicina. Threlfall *et al.* (1986) sugieren que la resistencia a la gentamicina podría deberse a la utilización de la apramicina en la medicina veterinaria. Sin embargo, no deben descartarse otros orígenes, puesto que de las tres cepas que presentan esta simultaneidad de resistencia, dos pertenecen a la variante monofásica (4,5,12:i:-) de *Salmonella* Typhimurium. Diversos estudios indican que la resistencia a los aminoglucósidos (gentamicina, apramicina) es una característica de estos aislamientos independientemente de la especie de origen. (Guerra *et al.* 2002; De la Torre *et al.* 2003).

Por su amplio espectro y potencia antimicrobiana las quinolonas son los fármacos de primera elección para el tratamiento de infecciones producidas por bacterias gramnegativas. Una causa de gran preocupación es la aparición de cepas de *Salmonella* con una sensibilidad disminuida a las quinolonas. Breuil *et al.* (2000) describen una prevalencia de resistencia al ácido nalidíxico entre 1% y 72% en cepas de origen veterinario y Malorny *et al.* (1999) describen un 7,5% de resistencia en cepas aisladas

de cerdos. En nuestro estudio se determinó que un 8,3% de los aislamientos fueron resistentes al ácido nalidíxico y esas mismas cepas presentaron sensibilidad intermedia a las fluoroquinolonas. Este resultado sugiere un comportamiento similar a lo observado en otros estudios.

La aparición de cepas de *Salmonella* resistentes a las fluoroquinolonas se ha relacionado con la introducción de estos antimicrobianos en la medicina veterinaria (Threlfall *et al.* 1998; Molbak *et al.* 1999). Según datos obtenidos de nuestras encuestas (no mostrados en el apartado de resultados) la enrofloxacin figura entre los antimicrobianos más utilizados para la prevención o tratamiento colectivo de problemas digestivos. Tomando en cuenta que la resistencia a las quinolonas suele producirse escalonadamente por acumulación de mutaciones en los genes diana, es lógico pensar que una parte de las cepas de perfil intermedio detectadas por nosotros podría, en un futuro, convertirse en cepas plenamente resistentes. Dada la amplia utilización de las quinolonas, particularmente la enrofloxacin, es necesario hacer hincapié en la importancia del uso racional de estos compuestos.

También se detectó un número considerable de cepas resistentes al cloranfenicol y a la nitrofurantoína. En la actualidad, la resistencia a estos compuestos se sigue describiendo con unos porcentajes muy altos (Breuil *et al.* 2000; Martel *et al.* 2000; Rheault *et al.* 2001), a pesar de que se han dejado de utilizar hace décadas en la producción animal. La persistencia de la resistencia al cloranfenicol y a otros compuestos no utilizados en la actualidad en la producción porcina, podría resultar de la existencia de una unión genética entre la resistencia a estos compuestos y la resistencia a otros antimicrobianos. Se sabe que en diferentes microorganismos entéricos, la multiresistencia puede estar asociada con la presencia de integrones que alojan “cassettes” que codifican resistencia a múltiples antimicrobianos (Sandvang *et al.* 1998; Gebreyes *et al.* 2000; 2001). Este es el caso del “cassette” ACSSuT de las cepas del fagotipo DT104 de *Salmonella* Typhimurium (Daly *et al.*, 2000). Estos integrones se suelen transmitir en su totalidad, por lo que la resistencia a ciertos antimicrobianos se continúa detectando a pesar de haberse dejado de utilizar.

En los últimos años, en España es bastante común el uso rutinario de la colistina como tratamiento preventivo de diarreas en los cerdos, sobre la base de su eficacia y fácil administración. En nuestro estudio todas las cepas de *Salmonella* fueron sensibles a la colistina, lo que concuerda con los resultados obtenidos por Van der Wolf *et al.* (1999) en Holanda. Asimismo, Mateu *et al.* (2002) en Cataluña, describen que cepas de *Salmonella* aisladas de brotes clínicos fueron sensibles a la colistina. Sin embargo, Kim *et al.* (2001) describen un 14,2% de cepas resistentes a este compuesto, siendo éste un valor muy alejado de nuestras observaciones. Según nuestros datos y los obtenidos a través del estudio de brotes clínicos, y en lo que respecta exclusivamente a *Salmonella*, la colistina puede continuar considerándose como antimicrobiano de primera elección en cerdos.

5.7. Patrones de resistencia.

En nuestro análisis se comprobó que sólo un 12,50% de las cepas eran sensibles a todos los antimicrobianos probados, mientras que el 62,50% eran resistentes a 3 o más antimicrobianos. Estos valores de resistencia son inferiores a los descritos por Farrington *et al.*, (2001) quienes describieron un 90% de aislamientos multirresistentes en EE.UU. Sin embargo, nuestros resultados son superiores a los descritos por otros autores. Así, en Bélgica, Jacob *et al.* (2001) determinaron que un 57,6% de los aislamientos fueron totalmente sensibles y un 44% de los aislamientos fueron multirresistentes. Van der Wolf *et al.* (1999) en Holanda encontraron que un 58,3% de cepas analizadas fueron sensibles y el 10,4% fueron multirresistentes. Estos resultados claramente demuestran que la multirresistencia está ampliamente presente en las cepas de *Salmonella* en Cataluña, lo que sugiere la necesidad de establecer sistemas de monitorización. Por otro lado, la existencia de estas cepas multirresistentes va a limitar las opciones de tratamiento provocando un incremento de fracasos terapéuticos.

Habitualmente, estos perfiles multirresistentes se asocian a *Salmonella* Typhimurium (Threlfall *et al.* 1994; Gebreyes *et al.* 2000) y, particularmente, al fagotipo DT104 que presenta un “cassette” de multirresistencia ACSSuT. En nuestro estudio, seis de los siete aislamientos de *Salmonella* Typhimurium fueron multirresistentes con diferentes perfiles. Sin embargo, el patrón de resistencia ACSSuT se observó en otros serotipos, tal como ya describieran Gebreyes *et al.* (2000). De hecho, en los 17 serotipos

encontrados se observaron cepas multirresistentes. Las principales diferencias se hallaron en la amplitud de esta multirresistencia. Así, el perfil más amplio (resistente a 10 antimicrobianos) se observó en la variante monofásica de *Salmonella* Typhimurium, seguida por una cepa del serotipo Infantis (resistente a nueve compuestos) y una cepa del serotipo Rissen (resistente a ocho compuestos).

¿Cuál es el papel que juega el uso de antibióticos en el desarrollo y aparición de esta resistencia? Con nuestros resultados no está claro si esta resistencia se ha desarrollado debido a prácticas de manejo de las granjas, o si los microorganismos entran en las granjas con esta resistencia preformada, pero la presencia de esta diversidad de serotipos con patrones de multirresistencia indica que este problema no es exclusivo de *Salmonella* Typhimurium y que por tanto, cualquier aislado del cerdo tiene probabilidad de ser multirresistente. Sin duda, este hecho representa un alto riesgo y deben establecerse urgentemente sistemas de vigilancia y control de esta situación.

5.8. Serología.

5.8.1 Seroprevalencia.

En los últimos años, el método de monitorización de *Salmonella* que mayor aceptación tiene es el ELISA, bien sea aplicado en muestras de sangre o en jugo de carne (Nielsen *et al.* 1995; Van der Heijden *et al.* 1998; Wiuff *et al.* 2000a). Las principales ventajas de esta técnica son su facilidad de estandarización entre distintos laboratorios, su mayor sensibilidad y su relación coste-eficacia, mucho mejor que en los métodos bacteriológicos. La principal desventaja es que no se pueden detectar infecciones muy recientes (1 ó 2 semanas antes del muestreo) y que no permite determinar el momento de la infección. Además los anticuerpos contra *Salmonella* pueden detectarse hasta tres meses desde el inicio de la infección, con lo que es posible obtener un resultado negativo en cerdos que se infectaron con anterioridad a este periodo. Otro problema es que las pruebas de ELISA actualmente disponibles sólo detectan anticuerpos contra los serogrupos B, C1 y D1.

Datos obtenidos de otros estudios y en países con un amplio programa de control y vigilancia de *Salmonella* en porcino, describen una seroprevalencia (utilizando suero y un punto de corte $DO \geq 40\%$) entre el 24% y el 47% (Mousing *et al.* 1997; Proux *et al.* 2000; Van der Wolf *et al.* 2001; Grafanakis *et al.* 2001). En nuestro estudio, la seroprevalencia en los engordes fue del 77,3%. Este resultado es un claro indicador de la amplia presencia de la infección en las granjas de Cataluña. Las posibles causas involucradas en este hecho son difíciles de explicar. A pesar de que la cabaña porcina española ha experimentado un incremento significativo en los últimos 30 años y una mejora evidente en cuanto a genética, nutrición, manejo e instalaciones, hay que considerar que aún existe una gran proporción de explotaciones con sistemas de manejo y producción poco eficaces desde el punto de vista sanitario, como son los de aplicar un flujo continuo de animales entre fases de producción, la relativamente baja implantación de adecuados sistema de cuarentena y la poca consideración de las medidas de bioseguridad en las granjas.

En nuestro estudio los resultados bacteriológicos y serológicos fueron distintos. Este resultado concuerda con lo obtenido por Van Winsen *et al.* (2001). Pero contrasta con Christensen *et al.* (1999) quienes hallaron una asociación entre la seroprevalencia y la evaluación bacteriológica. En nuestra opinión, y dada la naturaleza misma de ambos sistema de diagnóstico que valoran procesos diferentes, resulta lógica la discrepancia encontrada.

5.8.2. Seroprevalencia en el rebaño.

La distribución de la seroprevalencia en los rebaños según el esquema danés dio como resultado una proporción considerable de explotaciones en los niveles II y III, muy superior a los descritos en Dinamarca y Holanda al comienzo de su programa nacional de control de *Salmonella* (Mousing *et al.* 1997; Van der Wolf *et al.* 2001). En vistas de estos resultados, en los actuales momentos sería inviable la aplicación de un programa de control y vigilancia de *Salmonella* similar al danés. Por ello, sugerimos la aplicación de un conjunto de medidas prácticas derivadas de los factores de riesgo conocidos, que fuesen de fácil aplicación y económicamente factibles, con el objetivo a medio plazo de disminuir la seroprevalencia. Posteriormente deberían comenzarse a delinear pautas para el establecimiento de un programa de control de *Salmonella* a gran escala. Entre las

medidas que vemos posibles figuran algunas de bioseguridad elementales, como el control de pájaros y roedores, la cloración del agua, el cierre de drenajes de purines y medidas de manejo como la disminución del número de orígenes por engorde.

5.8.3. Relación entre los resultados serológicos y los serogrupos detectados en el análisis microbiológico.

En nuestro estudio sólo, el 63,4% de los aislamientos de *Salmonella* serotificados pertenecieron a los serogrupos B, C1 y D1, en comparación al 89% de Holanda (Van der Wolf *et al.*, 1999) y el 94,5% de Dinamarca (Baggesen *et al.*, 1996). Esta diferencia puede ser importante porque los ELISAs actualmente utilizados sólo detectan anticuerpos contra estos serogrupos. En nuestro estudio, en 21 de los rebaños bacteriológicamente positivos se aislaron salmonelas pertenecientes a otros serogrupos no detectados por el ELISA. Por lo tanto, los resultados serológicos deben interpretarse con mucho cuidado si se desea aplicar un programa de monitorización serológica contra *Salmonella*. En función de los serotipos existentes, la serología reflejaría en mayor o menor medida la realidad. Es por ello que cualquier programa de monitorización serológica debe acompañarse de una monitorización bacteriológica.

5.8.5 Comparación de pruebas diagnósticas.

Desde que Nielsen *et al.* describieron en 1995 un ELISA para la detección de anticuerpos contra *Salmonella enterica* en cerdos, varios laboratorios de diferentes países han desarrollado sus propias pruebas con este mismo fin (Van der Heijden *et al.* 1998; Gabert *et al.* 1999; Blaha *et al.* 1999 y Proux *et al.* 2000). Hoy en día, el ELISA se ha convertido en el método internacional de monitorización de cerdos portadores de *Salmonella*. La mayoría de los ELISAs son de tipo indirecto y utilizan LPS como antígeno, por lo que se sugiere que sus resultados deberían en gran medida ser comparables (Van der Heijden 2001). En nuestro estudio se determinó una pobre concordancia entre los resultados obtenidos por los dos ELISAs estudiados ($kappa$ 0,191), lo que claramente indica que ambas pruebas no son intercambiables. Además, la normalización de los resultados utilizando las ratios S/P no tuvo efecto para mejorar la concordancia entre las pruebas, lo que sugiere que no se trata de un problema de interpretación, sino originado en la naturaleza misma de cada ELISA. En consecuencia,

y a pesar de que los respectivos fabricantes indican que la sensibilidad y especificidad de sus pruebas son cercanas al 100%, no puede recomendarse la adopción de ninguno de los dos como método estándar hasta que se aclaren las causas de esta discrepancia. Según nuestros resultados, es muy probable que el ELISA B detecte en mayor medida IgM. La naturaleza de estas IgM, específicas de *Salmonella* o no, resulta desconocida para nosotros, pero plantea la necesidad de determinar más estándares comunes, puesto que a la hora de clasificar una granja, los resultados que se pueden obtener con una u otra prueba puede ser opuestos. Van der Heijden (2001) describió una gran diferencia en la sensibilidad de diferentes ELISAs disponibles comercialmente o utilizados en laboratorios no oficiales. En ese mismo estudio, la prueba ELISA B utilizada con un punto de corte de $DO \geq 40\%$ (similar a nuestras condiciones) fue la prueba que mostró la peor sensibilidad. En nuestras manos, quizás la prueba B sufra de falta de especificidad.

6. CONCLUSIONES

1. La combinación de caldo Rappaport-Vassiliadis y agar XLT4 como medios selectivos para el aislamiento de *Salmonella* a partir de heces de cerdo, permite el crecimiento de una gran variedad de enterobacterias que pueden confundirse morfológicamente con *Salmonella*. Es necesario el desarrollo de nuevas metodologías de aislamiento adaptadas específicamente a este tipo de muestras.

2. Se demuestra que un porcentaje considerable de granjas porcinas de Cataluña (28%) presenta animales con excreción activa de *Salmonella*. Este hecho puede tener implicaciones importantes para la Salud Pública y la Seguridad Alimentaria.

3. El estudio epidemiológico realizado muestra que la infección por *Salmonella* está estrechamente relacionada con factores de bioseguridad elementales. La aplicación de medidas simples como la desratización, la cloración del agua, el control de pájaros, etc., debería tener un impacto positivo sobre la reducción de esta infección en las granjas porcinas de Cataluña.

4. Se demuestra que la proporción de cepas de *Salmonella* de origen porcino con características de multirresistencia a los agentes antimicrobianos es elevada (62,5%). Esta multirresistencia puede afectar a cualquier serotipo. Desde este punto de vista, la infección de las personas por cepas de *Salmonella* de origen porcino conlleva el riesgo potencial de presentar dificultades en el tratamiento antimicrobiano.

5. Los altos porcentajes de sensibilidad frente a la colistina que presentan las cepas de *Salmonella* aisladas, nos permiten sugerir que ésta puede ser una buena opción para el tratamiento de salmonelosis entérica en cerdos.

6. Los resultados de los análisis serológicos indican que la mayor parte de las granjas analizadas tienen unos porcentajes de positividad elevados (65% de granjas con más del 30% de animales positivos). Esta observación lleva a concluir que la aplicación de programas de control y vigilancia siguiendo el esquema de los países nórdicos y de CentroEuropa (“esquema danés”) es, en estos momentos, inviable en España

7. Una elevada proporción de las granjas examinadas (36%) presentan serotipos de *Salmonella* que no serían detectables serológicamente con las pruebas comerciales actualmente disponibles. Por tanto, cualquier programa de control serológico en España debería acompañarse de una monitorización bacteriológica para que sus resultados puedan ser correctamente interpretados.

8. La comparación de los ELISAs estudiados indica que existe una pobre concordancia entre sus resultados. Si se establecen programas de control serológico deberían armonizarse las distintas pruebas o bien debería utilizarse una única prueba diagnóstica.

7. BIBLIOGRAFÍA

- Aho, M. 1992. Problems of *Salmonella* sampling. *International Journal of Food Microbiology*, **15**:225-235.
- Anderson, E. S., Ward, L. R., De Saxe, M. J., De Sa, J. D. H. 1977. Bacteriophage-typing designations *Salmonella typhimurium*. *Journal of Hygiene*, **78**:297-300.
- Bager, F., Petersen, J. 1991. Sensitivity and specificity of different methods for the isolation of *Salmonella* from pigs. *Acta Veterinaria Scandinavica*, **32**:473-481.
- Baggesen, D. L., Wegener, H. C. 1993. Detection of *Salmonella* in swine. *Dansk Veterinaertidsskrift*, **76**:1017-1022.
- 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. *Preventive Veterinary Medicine*, **26**:201-213
- Baggesen, D. L., Christensen, J., Nielsen, A. C., Svensmark, B., Nielsen, B. 1999. Characterization of *Salmonella enterica* isolated from swine herds in a cross-sectional study of the Danish swine production. *Proceedings of the 3rd International Symposium on the Epidemiology and Control of Salmonella in Pork*, Washington, D. C., 237-239.
- Bahnson, P. B. Ferdorka-Cray, P. J. 1999. The association of antimicrobial resistance patterns and reported usage of antimicrobials in commercial growing pig production. *Proceedings of the 3rd International Symposium on the Epidemiology and Control of Salmonella in Pork*, Washington, D.C., 240-241.
- Bahnson, P. B., Fedorka-Cray, P. J., Mateus-Pinella, N., Fransen, L., Grass, J., Gray, J. 2001. Herd-level risk for *Salmonella* culture positive status in slaughtered pigs. *Proceedings of the 4th International Symposium on the Epidemiology and Control of Salmonella and other food borne pathogens in Pork*, Leipzig, Germany, 244-249.
- Barber, D. A., Bahnson, P. B., Isaacson, R. E., Jones, C. J., Weigel, R. M. 2002. Distribution of *Salmonella* in swine production ecosystems. *Journal of Food Protection*, **65**:1861-1868.
- Beloil, P. A., Eveno, E., Gerault, P., Fravallo, P., Rose, V., Rose, N., Madec, F. 1999. An exploratory study about contamination of pens of finishing pigs by

- ubiquitous *Salmonella*. *Proceedings of the 3rd International Symposium on the Epidemiology and Control of Salmonella in Pork*, Washington, D.C., 101-104.
- Blaha, T., Gaber, T. H., Weber, C. 1999. Testing the proficiency of the German test Kit Salmotype®-ELISA2 to identify *Salmonella* antibodies in porcine sera and meat juices in USA diagnostic laboratories. *Proceedings of the 3rd International Symposium on the Epidemiology and Control of Salmonella in Pork*, Washington, D.C., 24-25.
- Bradford, P. A., Petersen, P. J., Fingerman, I. M., White, D. G. 1999. Characterization of expanded-spectrum cephalosporin resistance in *E. coli* isolates associated with bovine calf diarrhea disease. *Journal Antimicrobial Chemotherapy*, **44**:607-610.
- Breuil, J., Brisabois, A., Casin, I., Armand-Lefevre, L., Frémy, S., Collatz, E. 2000. Antibiotic resistance in salmonellae isolated from humans and animals in France: comparative data from 1994 and 1997. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, **46**:965-971.
- Bush, E. J., Wagner, B., Fedorka-Cray, P. J. 1999. Risk factors associated with shedding of *Salmonella* by U.S. finishing hogs. *Proceedings of the 3rd International Symposium on the Epidemiology and Control of Salmonella in Pork*, Washington, D.C., 106-108.
- Canibe, N., Jensen, B. B. 2003. Fermented and nonfermented liquid feed to growing pigs: effect on aspects of gastrointestinal ecology and growth performance. *Journal Animal Science*, **81**:2019-2031.
- Capita, R., Álvarez-Astorga, M., Alonso-Calleja, C., Moreno, B., García-Fernández, M. 2003. Occurrence of *Salmonella* in retail chicken carcasses and their products in Spain. *International Journal of Food Microbiology*, **81**:169-173.
- Carlson, A. R. Blaha, Th. 1999. Investigations into the infection-contamination-infection cycle of zoonotic *Salmonella* on swine farms: Investigation into the occurrence of *Salmonella* in the environment on four selected Minnesota swine farms. *Proceedings of the 3rd International Symposium on the Epidemiology and Control of Salmonella in Pork*, Washington, D.C., 109-112.
- Carstensen, B., Christensen, J. 1998. Herd size and sero-prevalence of *Salmonella enterica* in Danish swine herds: random effects models for register data. *Preventive Veterinary Medicine*, **34**:191-203.

- Catchpole, C. R., Andrews, J. M., Brenwald, N., Wise, R. 1997. A reassessment of the in vitro activity of colistin sulphomethate sodium. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, **39**:255-260
- Commission European. 2000. Opinion of the scientific committee in food-borne diseases. <http://www.europa.eu.int/comm/fon/fs/>.
- Crosa, J. H., Brenner, D. J., Ewing, W. H., Falkow, S. 1973. Molecular relationships among the salmonellae. *Journal of Bacteriology*, **115**:307-315.
- Cruchaga, S., Echeita, A., Aladueña, A., García, P. J., Frías, N., Usera, A. 2001. Antimicrobial resistance in *Salmonella* from humans, food and animals in Spain in 1998. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, **47**:315-321.
- Chiu, C. H., Ou, J. T. 1996. Rapid identification of *Salmonella* serovars in feces by specific detection of virulence genes, *invA* and *spvC*, by an enrichment broth culture-multiplex PCR combination assay. *Journal of Clinical Microbiology*, **34**:2619-2622.
- Chiu, C. H., Wu, T. L., Su, L. H., Chu, Ch., Chia, J. H., Kuo, A. J., Chien, M. Sh., Lin, T. Y. 2002. The emergence in Taiwan of fluoroquinolone resistance in *Salmonella enterica* serotype Choleraesuis. *The New England Journal of Medicine*, **346**:413-419.
- Christensen, J., Baggesen, D. L., Soerensen, V., Svensmark, B. 1999. *Salmonella* level of Danish swine herds based on serological examination of meat-juice samples and salmonella occurrence measured by bacteriological follow-up. *Preventive Veterinary Medicine*, **40**:277-292.
- Christensen, J., Baggesen, D. L., Nielsen, B., Stryhn, H. 2002. Herd prevalence of *Salmonella* spp. in Danish pig herds after implementation of the Danish *Salmonella* control program with reference to a pre-implementation study. *Veterinary Microbiology*, **88**:175-188.
- Chung, G. T., Frost, A. J. 1970. The growth of *Salmonella choleraesuis* in various enrichment broths. *Journal of Applied Bacteriology*, **33**:449-453.
- Dahl, J. 1997. Cross-sectional epidemiological analysis of the relations between different herd factors and *Salmonella*-seropositivity. In *Proceeding of the VII International Symposium on Veterinary Epidemiology and Economics*, 23.
- Daly, M. Fanning, S. 2000. Characterization and chromosomal mapping of antimicrobial resistance genes in *Salmonella enterica* serotype Typhimurium. *Applied and Environmental Microbiology*, **66**:4842-4848.

- Darwich, L., Mateu, E., Martín, M., Torre, E., Casal, J. 1999. Salmonelosis porcina en España, aparición de cepas con perfiles de multirresistencia a los agentes antimicrobianos. *Anaporc*, (195):5-16.
- Darwich, L., De la Torre, E., Frías, N., García, P. J., Peña, F. J., Torre, E., Mateu, E. 2000. Caracterización de cepas de *Salmonella* aisladas en porcino en Cataluña. *Laboratorio Veterinario*, (15):17-23.
- Davies, P. R. 1998. Isolation of *Salmonella* serotypes from feces of pigs raised in a multiple-site production systems. *Journal of the American Veterinary Medical Association*, **212**:1925-1929.
- Davies, P. R. 1999. Foodborne pathogens and pork production: What is our Achilles'Heel? *American Association of Swine Practitioners*, 275-285.
- Davies, P. R., Funk, J. A., Morrow, W. E. M 2000a. Fecal shedding of *Salmonella* by gilts before and after introduction to a swine breeding farm. *Swine Health and Production*, **1**:25-29.
- Davies, P. R., Turkson, P. K., Funk, J. A., Nichols, M. A., Ladely, S. R., Fedorka-Cray, P. J., 2000b. Comparison of methods for isolating *Salmonella* bacteria from faeces of naturally infected pigs. *Journal of Applied Microbiology*, **89**:169-177.
- Davies, R. H., Bedford, S., Shankster, S. 2001. Enhanced culture techniques for the detection of *Salmonella*. *Veterinary Record*, **148**:539-540.
- Davis, M.A., Hancock, D.D., Besser, T. E. 2002. Multiresistant clones of *Salmonella enterica*: The importance of dissemination. *Journal of Laboratory Clinical Medicine*, **140**:135-41.
- De la Torre, E., Zapata, D., Tello, M., Mejía, W., Frías, N., García Peña, F. J., Mateu, E. M., E. Torre. 2003. Several *Salmonella enterica* subsp. *enterica* serotype 4,5,12:i:- phage type isolated from swine samples originate from serotype Typhimurium DT U302. *Journal of Clinical Microbiology*, **41**:2393-2400.
- Dean, A. D., Dean, J. A., Burton, A. H., Dicker, R. C. 1994. Epi-info version 6: a word processing, database, and statistics program for epidemiology on microcomputers. USD, Incorporated, Stone Mountain, Georgia.
- Dean, A. D., Dean, J. A., Burton, A. H., Dicker, R. C. 2002. Epi-info version 2002 a word-processing, database, and statistics program for epidemiology on microcomputers. USD Incorporated, Stone Mountain, Georgia.
- Departament de Sanitat i Seguretat Social. 2002. Protocol de prevenció i control de brots de toxiinfecció alimentària. Generalitat de Catalunya <http://www.gencat.es>

- Department for Environment, Food & Rural Affairs. 2000. *Salmonella* in Livestock Production in Gran Bretaña. Published by Veterinary Laboratories Agency, 61-70.
- Department for Environment, Food & Rural Affairs. 2001. *Salmonella* in Livestock Production in Gran Bretaña. Published by Veterinary Laboratories Agency, 66-70.
- Diario Oficial de las Comunidades Europeas. DOCE 195 de 13.7. 1999. p. 1-3. Resolución del Consejo sobre la resistencia a los antibióticos “Plan de prevención de la amenaza microbiana”.
- Dunne, E. F., Fey, P. F., Kludt, P., Reporter, R., Mostashari, F., Shillam, P., Wicklund, J., Miller, C., Holland, B., Stamey, K., Barret, T. J., Rashed, J. K., Tenover, F. C., Ribot, E. M., Angulo, F. J. 2000. Emergence of domestically acquired ceftriaxone resistant *Salmonella* infections associated with AmpC beta-lactamase. *Journal of the American Medical Association*, **284**:31561-3156.
- Dusch, H., Altwegg, M. 1995. Evaluation of five new plating media for isolation of *Salmonella* species. *Journal of Clinical Microbiology*, **33**:802-804.
- Enoe, C., Andersen, S., Wachmann, H., Sorensen, L. L. 2001. Estimation of sensitivity and specificity of an indirect enzyme-linked immunosorbent (ELISA) for detection of antibodies against *Salmonella enterica* in meat juice and of microbiological examination of caecal content and mesenteric caecal lymph nodes for *S. enterica*. *Proceedings of the 4th International Symposium on the Epidemiology and Control of Salmonella and other food borne pathogens in Pork*, Leipzig, Germany, 518-520.
- Espinasse, F., Gheorghiu, R., Poiata, A., Labia, R., Nicolas-Chanoine, M. H. 1997. Reduced susceptibility to co-amoxiclav in *Escherichia coli*, *Salmonella typhimurium* and *Klebsiella pneumoniae* isolated in Romania between 1985 and 1993. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, **39**:103-106.
- Euzéby, J. P. 1997. Dictionnaire de bactériologie vétérinaire. <http://www.bacterio.cict.fr/bacdico/gorde.html>
- Fablet, C., Beloeil, P. A., Fravallo, P., Jolly, J. P., Eveno, E., Hascoet, G., Alvat, G., Madec, F. 2003. Factors associated with excretion of *Salmonella* in finishing pigs. 35^{ém} *Journées de la Recherche Porcine*, Ed. ITP. Février.
- Farrington, L. A., Harvey, R. B., Buckley, S. A., Droleskey, R. E., Nisbet, D. J., Inskip, P. H. 2001. Prevalence of antimicrobial resistance in *Salmonellae* isolated from

- market-age swine. A preliminary survey of antibiotic resistance of *Salmonella* in market-age swine. *Journal of Food Protection*, **64**:1496-1502.
- Feder, I., Nietfeld, J. C., Galland, J., Yeary, T., Sargeant, J. A., Oberst, R., Tamplin, M. L., Luchansky, J. B. 2001. Comparison of cultivation and PCR-Hybridization for detection of *Salmonella* in porcine faecal and water samples. *Journal of Clinical Microbiology*, **39**:2477-2484.
- Fedorka-Cray., P. J., Wipp, Sh. C., Isaacson, R. E., Nord, N., Lager, K. 1994. Transmission of *Salmonella* Typhimurium to swine. *Veterinary Microbiology*, **41**:333-344.
- Fedorka-Cray, P. J. 2000. *Salmonella in Domestic Animals*. Wray C., Wray A. (eds) CABI Publishing, Reino Unido, 191–207.
- Fey, P. D., Safranek, T. J., Rupp, M. E., Dunne, E. F., Ribot, E., Iwen, P. C., Brandford, P. A., Angulo, F. J., Hinrichs, S. H. 2000. Ceftriaxone-resistant *Salmonella* infection acquired by a child from cattle. *New England Journal of Medicine*, **342**:1280-1281.
- Funk, J. A., Davies, P. R., Nichols, M. A. 2001. Longitudinal study of *Salmonella enterica* in growing pigs reared in multiple-site swine production systems. *Veterinary Microbiology*, **83**:45-60.
- Gabert, J., Schalch, B., Grey, B., Spener, A., Stolle, A., Weber, C., Kramer, T. 1999. The use of a commercial test system (Salmotype®ELISA) for tracing antibodies to *Salmonella* in the serum of pigs. *Proceedings of the 3rd International Symposium on the Epidemiology and Control of Salmonella in Pork*, Washington, D.C, 37-41.
- Gebreyes, W. A., Davies, P. R., Morrow, W. E. M., Funk, J. A., Altier, C. 2000. Antimicrobial resistance of *Salmonella* isolates from swine. *Journal of Clinical Microbiology*, **38**:4633-4636.
- Gebreyes, W., Altier, C., Funk, J., Davies, P. R. 2001. Antimicrobial resistance, diversity and class-I integrons among *Salmonella* serovars isolated from swine. *Proceedings of the 4th International Symposium on the Epidemiology and Control of Salmonella and other food borne pathogens in Pork*, Leipzig, Germany, 392-395.
- Gibson, K., Blaha, T., Fedorka-Cray, P. 2001. Investigations into *Salmonella* serovar and antimicrobial resistance patterns in commercial swine herds. *Proceedings of the 4th International Symposium on the Epidemiology and Control of*

- Salmonella* in Pork and other food borne pathogens in pork, Leipzig, Germany, 387-391.
- Goossens, H., Wauters, G., De Boeck, M., Janssens, M., Butzler, J. 1984. Semisolid selective-motility enrichment medium for isolation of salmonellae from fecal specimens. *Journal of Clinical Microbiology*, **19**:940-941.
- Grafnakis, E., Leontides, L., Genigeorgis, C. 2001. Seroprevalence and antibiotic sensitivity of serotypes of *Salmonella enterica* in Greek pig herds. *Veterinary Record*, **148**:407-411.
- Gray, E. T., Fedorka-Cray, P. J., Hermosillo, J., Headrick, M. 2001. Expanded-spectrum cephalosporin resistance and multi-drug resistance in *Salmonella* isolates from swine. *Proceedings of the 4th International Symposium on the Epidemiology and Control of Salmonella and other food borne pathogens in pork*, Leipzig, Germany, 377-379.
- Gray, J. T., Fedorka-Cray, P. J., Stabel, T. J. Kramer, T. T. 1996. Natural transmission of *Salmonella choleraesuis* in swine. *Applied and Environmental Microbiology*, **62**:141-146.
- Guerra, B., Soto, S. A., Argüelles, J. M. Mendoza, C. M. 2001. Multidrug resistance is mediated by large plasmids carrying a class 1 integron in the emergent *Salmonella enterica* serotype (4,5,12:i:-). *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, **45**:1305-1308.
- Guerra, B., Soto, S., Helmuth, R., Mendoza, M. C. 2002. Characterization of a self-transferable plasmid from *Salmonella enterica* serotype Typhimurium clinical isolates carrying two integron borne gene cassette together with virulence and drug resistance genes. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, **46**:2977-2981.
- Hald, T., Wegener, H. C. 1999. Quantitative assessment of the sources of human salmonellosis attributable to pork. *Proceedings of the 3rd International Symposium on the Epidemiology and Control of salmonella in Pork*, Washington, D.C., 200-204.
- Hamilton, D., Bobbitt, J., Dahl, J., Coates, K., Lester, S., Pointon, A. 2000. Risk factors for with in herds *Salmonella* infection of pigs in Australia. *Proceedings of the 16th International Pig Veterinary Society Congress*, Melbourne, Australia, 204.
- Harvey, R. B., Egan, L. F., Anderson, R. C., Droleskey, R. E., Nisbet, D. J. 2000. Antibiotic resistance profiles of Salmonellae isolated from an integrated swine

- operation. *Proceedings the 16th International Pig Veterinary Society Congress*, Melbourne, Australia, 212.
- Harvey, R. W. S., Price, T. H. 1980. *Salmonella* isolation with rappaport's medium after preenrichment in buffered peptone water using a series of inoculum ratios. *Journal of Hygiene*, **85**:125-128.
- Headrick, M. L., Fedorka-Cray, P. J., Wray, C., Dillard, L., Gray, J., Eubank, J., Hermosillo, J. 2001. Three year trends from NARMS-EB, 1997-1999: A comparison of antimicrobial resistance in *Salmonella* isolated from swine. *Proceedings of the 4th International Symposium on the Epidemiology and Control of Salmonella and other food borne pathogens in pork*, Leipzig, Germany, 380-384.
- Hilker, J. S. 1975. Enrichment serology and fluorescent antibody procedures to detect salmonellae in foods. *Journal of Milk and Food Technology*, **38**:227-231.
- Hojberg, O., Canibe, N., Knudsen, B., Borg Jensen, B. 2003. Potential rates of fermentation in digest from the gastrointestinal tract of pigs: Effect of feeding fermented liquid feed. *Applied and Environmental Microbiology*, **69**:408-418.
- Hoorfar, J., Baggesen, D. L. 1998. Importance of pre-enrichment media for isolation of *Salmonella* spp. from swine and poultry. *FEMS Microbiology Letters*, **169**:125-130.
- Hoorfar, J., Mortensen, A. V. 2000. Improved culture methods for isolation of *Salmonella* organisms from swine feces. *American Journal of Veterinary Research*, **61**:1426-1429.
- Hurd, H. S., Gailey, J. K., McKean, J. D., Rostagno, M. H. 2001. Experimental rapid infection in market swine following exposure to *Salmonella* contaminated environment. *Berliner und Munchener Tierarztlitcche Wochenschrift*, **114**:382-384.
- Hurd, H. S., McKean, J. D., Griffith, R. W., Wesley, I. V., Rostagno, M. H. 2002. *Salmonella enterica* infections in market swine with and without transport and holding. *Applied and Environmental Microbiology*, **68**:2376-2381.
- Jacob, B., Korsak, N., Etienne, G., Etienne, F., Daube, G. 2001. Serotypes and antimicrobial patterns of *Salmonella* strains isolated from three different pig production systems: farrow to finish pig herds, wean to finish pig herds and slaughter pigs of all origin. *Proceedings of the 4th International Symposium on*

- the Epidemiology and Control of Salmonella and other food borne pathogens in pork*, Leipzig, Germany, 214-216.
- Jorgensen, L., Kjaersgaard, H., Wachmann, H., Jensen, B. B., Knudsen, K. E. B. 2001. Effect of pelleting and of use of lactic acid in feed on *Salmonella* prevalence and productivity in weaners. *Proceedings of the 4th International Symposium on the Epidemiology and Control of Salmonella and other food borne pathogens in pork*, Leipzig, Germany, 109-111.
- Juven, B. J., Cox, N.A., Bailey, J. S., Thompson, J. E., Charles, O. W., Schutze, J. V. 1984. Recovery of *Salmonella* from artificially contaminated poultry feed in non-selective and selective broth media. *Journal of Food Protection*, **47**:299-302.
- Kim, B. H., Tak, R. B., Kim, K. T., Cho, K. H., Jung, B. Y. 2001. Antimicrobial susceptibility and serotypes of *Salmonella* organisms recovered from Korean swine. *Proceedings of the 4th International Symposium on the Epidemiology and Control of Salmonella and other food borne pathogens in pork*, Leipzig, Germany, 415-418.
- Kim, J. H., Heo, K. N., Odle, J., Han, K., Harrel, R. J. 2001. Liquid diets accelerate the growth of early-weaned pigs and the effects are maintained to market weight. *Journal of Animal Science*, **79**:427-434.
- Kim, J. Y., Bahnson, P. B., Troutt, H. F., Isaacson, R. E., Weigel, R. M., Miller, G. Y. 1999. *Salmonella* prevalence in market weight pigs before and after shipment to slaughter. *Proceedings of the 3rd International Symposium on the Epidemiology and Control of Salmonella in Pork*, Washington, D.C., 137-139.
- Korsak, N., Jacob, B., Groven, B., Etienne, G., China, B., Ghafir, Y., Daube, G. 2003. *Salmonella* contamination of pigs and pork in an integrated pig production system. *Journal of Food Protection*, **66**:1126-1133.
- Kranker, S., Dahl, J., Wingstrand, A. 2001. Bacteriological and serological examination and risk factors analysis of *Salmonella* occurrence in sow herds, including risk factors for high *Salmonella* seroprevalence in receiver finishing herds. *Berliner und Munchener Wochenschrift*, **114**:382-384.
- Lambiri, M., Mavridou, A., Richardson, S. C. Papadakis, J. A. 1990. Comparison of the TECRA *Salmonella* immunoassay with the conventional culture methods. *Letters in Applied Microbiology*, **11**:182-184.

- Le Minor, L., Popoff, M. Y. 1987. Request for an opinion. Designation of *Salmonella enterica* sp. nov. Rev., as the type and only species of the genus *Salmonella*. *International Journal of Systematic Bacteriology*, **37**:465-468.
- Letellier, A., Messier, S., Paré, J., Ménard J., Quessy, S. 1999. Distribution of *Salmonella* in swine in Québec. *Veterinary Microbiology*, **67**:299-306.
- Lo Fo Wong, D. M. A., Dahl, J., Altrock, A von., Grafanaskis, S., Thorberg, B. M., Van der Wolf, P. J. 1999. Herd-Level risk factors for the introduction and spread of *Salmonella* in pig herds. *Proceedings of the 3rd International Symposium on the Epidemiology and Control of Salmonella in Pork*, Washington, D.C., 151-154.
- Lo Fo Wong, D.M.A., Hald, T. (Eds.). 2000. *Salmonella* in pork (SALINPORK): pre-harvest and harvest control options based on epidemiologic, diagnostic and economic research. Final report to European Commission of project FAIR1 CT950400.
- Ludewing, M., Ahrens, A., Fehlhaber, K. 2001. Comprehensive serological and bacteriological investigations of the *Salmonella* prevalence of slaughter swine in Saxony. *Proceedings of the 4th International Symposium on the Epidemiology and Control of Salmonella and other food borne pathogens in pork*, Leipzig, Germany, 195-197.
- Malorny, B., Schroeter, A., Helmuth, R. 1999. Incidence of quinolone resistance over the period 1986 to 1998 in veterinary *Salmonella* isolates from Germany. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, **43**:2278-2282.
- Mallinson, E. T., Miller, R. G., Rezende, C. E., Ferris, K. E., de Graft-Hanson, J., Joseph, S. W., 2000. Improved plating media for the detection of *Salmonella* species with typical and atypical hydrogen sulphide production. *Journal of Veterinary Diagnostic Investigation*, **12**:414-417.
- Martel, J. L., Tardy, F., Brisabois, A., Lailier, R., Coudert, M., Chaslus-Dancla, E. 2000. The French antibiotic resistance monitoring programs. *International Journal of Antimicrobial Agents*, **14**:275-283.
- Mateu, E., Martín, M., Torre, E., Casal, J. 1999. Antibiotic-resistant *Salmonella* in pigs in Spain. *Veterinary Record*, **16**:80.
- Mateu, E., Martín, M., Darwich, L., Mejía, W., Frías, N. Garcia, F. J. 2002. Multiple drug resistance of *Salmonella* strains isolated from swine in Catalunya, Spain. *Veterinary Record*, **150**:147-150.

- Michael, G. B., Cardoso, M., Costa, M. 1999. Comparison of selenite cystine broth, tetrathionate broth and rappaport-vassiliadis broth for the recovery of *Salmonella* from swine feces. *Proceedings of the 3rd International Symposium on the Epidemiology and Control of Salmonella in Pork*, Washington, D.C., 78-80.
- Miller, S.I., Hohmann, E.L., Peques, D.A. 1995. *Salmonella* (Including *Salmonella typhimurium*). In: Mandell, G.L., Bennett, J.E., Dolin, R. (eds.), Mandell, Douglas and Bennett's Principles and practices of infectious disease. Churchill Livingstone, New York, USA, pp. 2013-2033.
- Mogelmoose, V., Nielsen, B., Bagger, J., Pihl, K. Nielsen, V. 2000. Eradication of multi-resistant *Salmonella* Typhimurium DT104 infections in Danish swine herds. *Proceedings of the 16th International Pig Veterinary Society Congress*, Melbourne, Australia, 216.
- 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 Journal of Medicine*, **341**:1420-1425.
- Morrow, W. E. M., See, M. T., Eisemann, J., Davies, P. R., Zering, K. 2002. Effect of withdrawing feed from swine on meat quality and prevalence of *Salmonella* colonization at slaughter. *Journal American Veterinary Medical Association*, **220**:497-502.
- Mousing, J., Jensen, P. T., Halgaard, C., Bager, F., Feld, N., Nielsen, B., Nielsen, J. P., Bech-Nielsen, S. 1997. Nation-wide *Salmonella enterica* surveillance and control in Danish slaughter swine herds. *Preventive Veterinary Medicine*, **29**:247-261.
- Mulder, R. W. A. W. 1999. European directives to regulate food safety. *World Poultry Science*, **15**:50-51.
- National Committee for Clinical Laboratory Standards. 1999. *Performance Standards for Antimicrobial Disk and Dilution Susceptibility test for Bacteria Isolated from Animals; Approved Standard Documento M31-A*.
- Nielsen, B., Baggesen, D. L., Bager, F., Haugegaard, J., Lind, P. 1995. The serological response to *Salmonella* serovar *typhimurium* and *infantis* in experimentally infected pigs. The time course followed with an indirect anti-LPS ELISA and bacteriological examinations. *Veterinary Microbiology*, **47**:205-218.

- Nielsen, B., Baggesen, D. L. 1997. Update on laboratory diagnosis of subclinical *Salmonella* infections in pigs. *Proceedings 2nd International Symposium on Epidemiology and Control of Salmonella in Pork*, Copenhagen, Dinamarca, 19-25.
- Nielsen, B., Ekeröth, L., Bager, F., Lind, P. 1998. Use of muscle fluid as source of antibodies for serologic detection of *Salmonella* infection in slaughter pig herds. *Journal of Veterinary Diagnostic Investigation*, **10**:158-163.
- Nollet, N., Maes, D., De Zutter, L., de Kruif, A., Van Hoof, J. 2001. Evaluation of different enrichment media for the isolation of *Salmonella* spp. from faeces and lymph nodes in slaughter pigs. *Proceedings of the 4th International Symposium on the Epidemiology and Control of Salmonella and other food borne pathogens in pork*, Leipzig, Germany, 540-544.
- Oliveira, C. J. B., Carvalho, L.F. O. S., Fernandez, S. A., Tavechio, A. T., Menezes, C. C. P., Domínguez, F. J. 2002a. Dugging gutter filled with fresh water in finishing barns had no effect on the prevalence of *Salmonella enterica* on Brazilian swine farms. *Preventive Veterinary Medicine*, **55**:173-178.
- Oliveira, C. J. B., Carvalho, L.F. O. S., Fernandez, S. A., Tavechio, A. T., Menezes, C. C. P., Domínguez, F. J. 2002b. Antimicrobial resistance of *Salmonella* serotypes isolated from slaughter-age pigs and environmental samples. *Microbial Drug Resistance*, **8**:407-411.
- Oliveira, S. D., Rodenbusch, C. R., Cé, M. C., Rocha, S. L. S. Canal, C. W. 2003. Evaluation of selective and non-selective enrichment PCR procedures for *Salmonella* detection. *Letters in Applied Microbiology*, **36**:217-221.
- Perez, J., Astorga, R., Caracol, L., Mendez, A., Perea, A., Sierra, M. A. 1999. Outbreak of salmonellosis in farmed European wild boars (*Sus scrofa ferus*). *Veterinary Record*, **145**:464-465.
- Pignato, S., Marino, A. M., Emanuele, M. Ch., Iannotta, V., Caracappa, S., Giammanco, G., 1995. Evaluation of new culture media for rapid detection and isolation of salmonellae in foods. *Applied and Environmental Microbiology*, **61**:1996-1999.
- Poirel, L., Guibert, M., Bellais, S., Naas, T., Nordmann, P. 1999. Integron- and carbenicillinase-mediated reduced susceptibility to amoxicillin-clavulanic acid in isolates of multidrug-resistant *Salmonella enterica* serotype Typhimurium

- DT104 from French patients. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, **43**:1098-1104.
- Popoff, M. Y., Bockemühl, J. Gheesling, L. L. 2003. Supplement 2001 (Nº. 45) to the Kauffmann-White scheme. *Research in Microbiology*, **154**:173-174
- Popoff, M. Y., Le Minor. 2001. Antigenic formulas of the *Salmonella* serovars, 8th revision. World health Organization Collaborating Center for Reference and Research on *Salmonella*, Pasteur Institute, Paris, France.
- Proux, K., Houdayer, C., Humbert, F., Cariolet, R., Rose, V., Eveno, E., Madec, F. 2000. Development of complete ELISA using *Salmonella* lipopolysaccharides of various serogroups allowing to detect all infected pigs. *Veterinary Research*, **31**:481-490.
- Quessy, S., Letellier, A, Nadeau, E. 1999. Risk factor associated with the presence of *Salmonella* in swine herds in Quebec. *Proceedings of the 3rd International Symposium on the Epidemiology and Control of Salmonella in Pork*, Washington, D.C., 165-168.
- Rajic, A., Keenliside, J. 2001. *Salmonella* in Swine. *Advances in Pork Production*, **12**:35-40.
- Reeves, M. W., Evins, G. M., Heiba, A. A., Plikaytis, B. D., Farmer, J. J. 1989. Clonal nature of *Salmonella typhi* and its genetic relatedness to other salmonellae as show by multilocus enzyme electrophoresis, and proposal of *Salmonella bongori*. *Journal of Clinical Microbiology*, **27**:313-320.
- Rheault, N., Quessy, S. 2001. Prevalence and resistance patterns of *Salmonella* spp. serotypes from humans and production animals in Canada. *Proceedings of the 4th International Symposium on the Epidemiology and Control of Salmonella and other food borne pathogens in pork*, Leipzig, Germany, 403-405.
- Rowe, T., Leonard, N., Kelly, G., Lynch, P. B., Egan, J., Quirke, A-M., and Quinn, P. J. 2001. Prevalence of infection with *Salmonella* in Irish pigs farms. *Proceedings of the 4th International Symposium on the Epidemiology and Control of Salmonella and other food borne pathogens in pork*, Leipzig, Germany, 192-194.
- Rusell, J. B., Diaz Gonzalez, F. 1986. The effects of fermentation acids on bacterial growth. *Advances Microbiology and Physiology*, **39**:205-234.
- Salyers, A. A., Whitt, D. D. 1994. Bacterial pathogenesis: a molecular approach. *American Society for Microbiology*, 229-243.

- Sandvang, D., Aarestrup, F. M., Jensen, L. B. 1998. Characterization of integrons and antibiotic resistance genes in Danish multiresistant *Salmonella enterica* Typhimurium DT104. *FEMS Microbiology Letters*, **160**:37-41.
- Schwartz, K. J. 1999. *Diseases of Swine* 8th Edition, Straw, B., D'Allaire, S., Mengeling, W., Taylor, D., (Eds.), 535-551, Iowa State University Press Ames. Iowa. U.S.A.
- Seyfarth, A. M., Wegener, H. C., Frimodt-Moller, N. 1997. Antimicrobial resistance in *Salmonella enterica* subsp. *enterica* serovar Typhimurium from humans and production animals. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, **40**:67-75.
- Smith, H. W. 1952. The evaluation of culture media for the isolation of *Salmonella* from faeces. *Journal of Hygiene*, **50**:21-36.
- Stege, H., Christensen, J., Nielsen, J. P., Baggesen, D. L., Enoe, C., Willeberg, P. 2000. Prevalence of subclinical *Salmonella enterica* infection in Danish finishing pig herds. *Preventive Veterinary Medicine*, **44**:175-1888.
- Steinbach, G and Hartung, M. 1999. An attempt to estimate the share of human cases of salmonellosis attributable to *Salmonella* originating from swine. *Berliner und Munchener Tierarztlitche Wochenschrift*, **8**:296-300.
- Threlfall, E. J., Rowe, B., Ferguson, J. L. Ward, L. R. 1986. Characterization of plasmids conferring resistance to gentamicin and apramycin in strains of *Salmonella typhimurium* phage type 204c isolated in Britain. *Journal of Hygiene*, **97**:419-426.
- Threlfall, E. J., Frost, J. A., Ward, L. R., Rowe, B. 1994. Epidemic in cattle and humans of *Salmonella typhimurium* DT104 with chromosomally integrated multiple drug resistance. *Veterinary Record*, **134**:577.
- Threlfall, E. J., Angulo, F. J., Wall, P. G. 1998. Ciprofloxacin-resistant *Salmonella typhimurium* DT104. *Veterinary Record*, **142**:255.
- Usera, M. A., Aladueña, A., Diaz, R., De la Fuente, M., Cerdán, P., Gutierrez, R., Echeita, A. 2001. Análisis de las cepas de *Salmonella* spp. aisladas de muestras de origen no humano en España en el año 2000. *Boletín Epidemiológico Semanal* (España). **9**:281-292.
- Usera, M. A., Aladueña, A., Gonzalez, R., De la Fuente, M., Garcia-Peña, J., Frias, N., Echeita, M.A. 2002. Antibiotic resistance of *Salmonella* spp. from animal sources in Spain in 1996 and 2000. *Journal of Food Protection*, **65**:768-773.

- Van den Bogaard, A. E., London, N., Stobberingh, E. E. 2000. Antimicrobial resistance in pig faecal samples from the Netherlands (five abattoirs) and Sweden. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, **45**:663-71.
- Van der Heijden, H. M. J. F., Boleij, P. H. M., Loeffen, W. L. A., Bongers, J. H., Van der Wolf, P. J., Tielen, M. J. M. 1998. Development and validation of an indirect ELISA for the detection of antibodies against *Salmonella* in swine. *Proceedings of the 15th International Pig Veterinary Society Congress*, Bologna, Italia.
- Van der Heijden, H. M. J. F. 2001. First International Ring Trial of ELISAs for *Salmonella* antibodies detection in swine. *Berliner und Munchener Tierarztlitche Wochenschrift*, **114**:389-392.
- Van der Wolf, P. J., Bongers, J. H., Elbers, A. R. W., Franssen, F. M. M. C., Hunneman, W. A., van Exsel, A. C. A., Tielen, M. J. M. 1999. *Salmonella* infections in finishing pigs in The Netherlands: bacteriological herd prevalence, serogrup and antibiotic resistance of isolates and risk factors for infection. *Veterinary Microbiology*, **67**:263-275.
- Van der Wolf, P. J., Elbers, A. R. W., van der Heijden, H. M. J. F., van Schie, F. W., Hunneman, W. A., Tielen, M. J. M. 2001. *Salmonella* seroprevalence at the population and herd level in pigs in the Netherlands. *Veterinary Microbiology*, **80**:171-184.
- Van Poucke, L. S. G. 1990. *Salmonella*-TEK, a rapid screening method for *Salmonella* species in food. *Applied and Environmental Microbiology*, **56**:924-927.
- Van Winsen, R. L., Van Nes, A., Keuzenkamp, D., Urling, H. A. P., Lipman, L. J. A., Biesterveld, S., Snijders, J. M. A., Veheijden, J. H. M., Van Knapen, F. 2001. Monitoring of transmission of *Salmonella enterica* serovars in pigs using bacteriological detection methods. *Veterinary Microbiology*, **80**:267-274.
- Van Winsen, R. L., Keuzenkamp, D., Urling, H. A. P., Lipman, L. J. A., Snijders, J. M. A., Veheijden, J. H. M., Van Knapen, F. 2002. Effect of fermented feed on shedding of Enterobacteriaceae by fattening pigs. *Veterinary Microbiology*, **87**:267-276.
- Von Altrock, A., Schutte, A., Hildebrandt, G. 2000. Results of the German investigation in the EU-Project “*Salmonella* in Pork (SALINPORK)”—1: Investigations in the farms. *Berliner und Munchener Tierarztlitche Wochenschrift*, **113**:191-201.

- Voogt, N., Raes, M., Wannet, W. J. B., Henken, A. M., van de Giessen, A. W. 2001. Comparison of selective enrichment media for the detection of *Salmonella* in poultry faeces. *Letters in Applied Microbiology*, **32**:89-92.
- Walker, R. A., Lawson, A. J., Lindsay, E. A., Ward, L. D., Wright, P.A., Bolton, F. J., Wareing, D. R. A., Corkish, J. D., Davies, R. H., Threlfall, E. J. 2000. Decreased susceptibility to Ciprofloxacin in outbreak-associated multiresistant *Salmonella* Typhimurium DT104. *Veterinary Record*, **147**:395-396.
- Waltma, W. D. 2000. *Salmonella in Domestic Animals*. Wray C., Wray, A. (Eds), CABI Publishing, Reino Unido, 355-372.
- Ward, L. R., de Sa, J. D. H., Rowe, B. 1987. A phage-typing scheme for *Salmonella enteritidis*. *Epidemiology and Infection*, **99**:291-294.
- Wierup, M. 1997. Principles for integrated surveillance and control of *Salmonella* in swine production. *Proceedings of the 2nd International Symposium on the Epidemiology and Control of Salmonella in Pork*, Copenhagen, Dinamarca, 42-49.
- Wiuff, C., Jauho, E. S., Stryhn, H., Andresen, L. O., Thaulov, K., Boas, U., Jakobsen, M. H., Heegaard, P. M. H. 2000a. Evaluation of a novel enzyme-linked immunosorbent assay for detection of antibodies against *Salmonella*, employing a stable coating of lipopolysaccharide-derived antigens covalently attached to polystyrene microwells. *Journal Veterinary Diagnostic Investigation*, **12**:130-135.
- Wiuff, C., Madsen, M., Baggesen, D. L., Aarestrup, F. M. 2000b. Quinolone resistance among *Salmonella enterica* from cattle, broilers, and swine in Denmark. *Microbial Drug Resistance*, **6**:11-17.
- Wiuff, C., Thorberg, B. M., Engvall, A., Lind, P. 2002. Immunochemical analyses of serum antibodies from pig herds in *Salmonella* non-endemic region. *Veterinary Microbiology*, **85**:69-82.
- World Health Organization. 2000. Drug resistance threatens to reverse medical progress. Press Release WHO/41.
- Yabuuchi, E., Ezaki, T. 2000. Arguments against the replacement of type species of the genus *Salmonella* from *Salmonella choleraesuis* to '*Salmonella enterica*' and the creation of the term 'neotype species', and for conservation of *Salmonella choleraesuis*. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, **50**:1693-1694.

Ziemer, Ch. J. 2001. Evaluation of culture methods for investigation of *Salmonella enterica* serovar ecology in feces. *Proceedings of the 4th International Symposium on the Epidemiology and Control of Salmonella and other food borne pathogens in pork*, Leipzig, Germany, 537-539.

8. ANEXO 1.

ENQUESTA: SALMONEL·LOSI EN EXPLOTACIONS PORCINES (Truges)

Data de realització de l'enquesta:

Enquesta núm.

(a omplir pels responsables de l'enquesta)

DADES GENERALS DE LA GRANJA

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

GRANDÀRIA DE LA GRANJA

- Núm. de truges: _____
- Núm. de places d'**engreix**: _____
- Núm. de places de **transició**: _____

INSTAL·LACIONS

	Gestació	Maternitat	Transició	Engreix
Terra de la nau	Slat/Ciment Ciment Palla Altres, Quin? -----	Slat/Ciment Ciment Palla Altres, Quin? -----	Slat/Ciment Ciment Palla Altres, Quin? -----	Slat/Ciment Ciment Palla Altres, Quin? -----
Tipus de ventilació	Forçada Natural Mixta	Forçada Natural Mixta	Forçada Natural Mixta	Forçada Natural Mixta
Densitat d'animals	Animals/Corral _____ m2 / Corral _____	Animals/Corral _____ m2 / Corral _____	Animals/Corral _____ m2 / Corral _____	Animals/Corral _____ m2 / Corral _____
Particions entre corrals	Murs Barrots Altres. Quina? -----	Murs Barrots Altres. Quina? -----	Murs Barrots Altres. Quina? -----	Murs Barrots Altres. Quina? -----
Disposen de pati?	Si No		Si No	Si No
Disposen de bany de peus?	Si No	Si No	Si No	Si No

	Transició	Engreix
--	------------------	----------------

Abeurador és tipus	Xumet Cassoleta Altre. Quin? _____	Xumet Cassoleta Altre. Quin? _____
Abeurador dins menjadora	Si No	Si No
El pinso es dispensa de forma:	Automàtica Manual. Com? _____	Automàtica Manual. Com? _____
La Menjadora dels animals és de:	Metall Fusta Plàstic Altre. Quin? _____	Metall Fusta Plàstic Altre. Quin? _____

Pel que fa als treballadors:

- Disposen de vestidors ?

Si tenen: Dutxa Rentamans Roba de recanvi Botes netes

Altres, Què? _____

No

. Quan de temps fa que treballa amb porcs?

. Ha patit vosté o algun familiar directe algun problema d'hepatitis o ha sofert icterícia durant el darrer any?

. Passa revisions mèdiques periòdiques?

PRODUCCIÓ

- Quina és la **mitjana de desmamats per truja/any?** _____

- Quin és el percentatge habitual de mortalitat en:

Maternitat _____ **Transició** _____ **Engreix** _____

- Quin és el % de reposició anual de la seva granja? _____

- Quin és el seu cost anual de medicació, per animal d'engreix? _____

- Sistema de producció:

Complet **Fase 2** Núm. d'òrgens _____ **Fase 3** Núm. d'òrgens _____

Flux continu ó **Tot dins, tot fora**

- Origen de les llavors

Propi

Extern Quin/s? _____

Edat de compra _____

Quarantena Existeix sala específica de quarantena? **Si No**

Quant de temps dura? _____

Adaptació Com es fa? _____

- Sala de parts: Es fa buit sanitari de les sales de parts? **Si No**

ALIMENTACIÓ

- El pinso utilitzat és:

d'origen comercial
 d'elaboració pròpia, o preparat especialment per a nosaltres (empresa)
 mixta -comercial i altres- (especificar) _____

Les farines que el componen contenen:

Carn Peix

D'on prové l'aigua de beguda? _____

Fan cloració de l'aigua? **Si**: Quin sistema de cloració utilitzen? _____

No

Cada quan la fan? _____

Cada quan verifiquen la potabilitat de l'aigua? _____

Com fan la verificació? _____

NETEJA

	MATERNITAT	TRANSICIÓ	ENGREIX	QUARANTENA
Freqüència de neteja	_____	_____	_____	_____
Freqüència de desinfecció	_____	_____	_____	_____

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

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

ALTRES ANIMALS

- Tenen mesures per evitar l'entrada d'ocells a la nau? **Si** Quines? _____

No
- Realitzen plans de desratització? **Si** Quins? _____
En cas de raticida, quins ha utilitzat? _____
No
- Altres animals a la granja:
 gossos
 gats
 altres (especificar) _____

DADES SANITÀRIES

- Contra quines malalties vacunen habitualment?
Mares: **ADV PRRS Parvo Mal Roig E.coli Clostridium**
Altres Quines? _____
- Garrins: **ADV PRRS Micoplasma**
Altres Quines? _____
- Diagnostica les causes de mort dels seus animals?
Si Com: **Necròpsia** **Altres (especificar)** _____
No
- Han patit anteriorment algun brot de salmonel·losi?
Si Quan de temps fa? _____
Com es va diagnosticar? _____
Quin tractament van usar per controlar-ho? _____
I per quina via es va aplicar? **Pinso Aigua Inyectable**
No

TRACTAMENTS DE RUTINA

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

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

PROTOCOL DE TREBALL

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

9. ANEXO 2.

ENQUESTA: SALMONEL·LOSI EN EXPLOTACIONS PORCINES (Engreix)

Data de realització de l'enquesta:

Enquesta núm.

--	--	--

(a omplir pels responsables de l'enquesta)

DADES GENERALS DE LA GRANJA

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

GRANDÀRIA DE LA GRANJA

- Núm. de places d'**engreix**: _____

INSTAL·LACIONS

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

Pel que fa als treballadors:

- Disposen de vestidors ?

Si tenen: Dutxa Rentamans Roba de recanvi Botes netes
 Altres, Què? _____
No

PRODUCCIÓ

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

ALIMENTACIÓ

- El pinso utilitzat és:
 d'origen comercial
 d'elaboració pròpia, o preparat especialment per a nosaltres (empresa)
 mixta -comercial i altres- (especificar) _____
 Les farines que el componen contenen:
Carn **Peix**
 D'on prové l'aigua de beguda? _____
 Fan cloració de l'aigua? **Si**: Quin sistema de cloració utilitzen? _____

No
 Cada quan verifiquen la potabilitat de l'aigua? _____

NETEJA

ENGREIX	
Freqüència de neteja	
Freqüència de desinfecció	

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

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

ALTRES ANIMALS

- Tenen mesures per evitar l'entrada d'ocells a la nau? **Si** Quines? _____

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

TRACTAMENTS DE RUTINA

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

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

Com l'aplica?

Pinso Aigua Inyectable Altres

PROTOCOL DE TREBALL

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