



ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΘΕΣΣΑΛΙΑΣ  
ΣΧΟΛΗ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ ΥΓΕΙΑΣ  
ΤΜΗΜΑ ΚΤΗΝΙΑΤΡΙΚΗΣ

ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΟ ΜΙΚΡΟΒΙΟΛΟΓΙΑΣ ΚΑΙ ΠΑΡΑΣΙΤΟΛΟΓΙΑΣ

Διευθύντρια: Καθηγήτρια Αγγελική ΡΟΔΗ- ΜΠΟΥΡΙΕΛ

*Διδακτορική Διατριβή*

**«ΔΙΕΡΕΥΝΗΣΗ ΤΗΣ ΣΗΜΑΝΤΙΚΟΤΗΤΑΣ ΤΗΣ ΣΑΛΜΟΝΕΛΛΩΣΗΣ**

**ΤΟΥ ΧΟΙΡΟΥ**

**ΑΠΟ ΤΟΝ ΣΤΑΒΛΟ ΣΤΟ ΤΡΑΠΕΖΙ»**

υπό

**ΓΡΑΜΜΑΤΩ Δ. ΕΥΑΓΓΕΛΟΠΟΥΛΟΥ**

Κτηνίατρος

Υπεβλήθη για την εκπλήρωση μέρους των

απαιτήσεων για την απόκτηση του

Διδακτορικού Διπλώματος

Καρδίτσα, 2015

© 2015 Γραμμάτω Ευαγγελοπούλου

Η έγκριση της διδακτορικής διατριβής από το Τμήμα Κτηνιατρικής της Σχολής Επιστημών Υγείας του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας δεν υποδηλώνει αποδοχή των απόψεων του συγγραφέα (Ν. 5343/32 αρ. 202 παρ. 2).

## **ΤΡΙΜΕΛΗΣ ΣΥΜΒΟΥΛΕΥΤΙΚΗ ΕΠΙΤΡΟΠΗ**

Αγγελική Ρόδη-Burriel, Καθηγήτρια, Επιβλέπουσα  
Εργαστήριο Μικροβιολογίας και Παρασιτολογίας,  
Τμήμα Κτηνιατρικής, Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας

Σπυρίδων Κρήτας, Αναπληρωτής Καθηγητής, Μέλος Συμβουλευτικής Επιτροπής  
Εργαστήριο Μικροβιολογίας και Λοιμωδών νοσημάτων,  
Τμήμα Κτηνιατρικής, ΑΠΘ

Γεώργιος Χριστοδουλόπουλος, Καθηγητής, Μέλος Συμβουλευτικής Επιτροπής  
Παθολογική Κλινική,  
Τμήμα Κτηνιατρικής, Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας

## **ΕΠΤΑΜΕΛΗΣ ΕΞΕΤΑΣΤΙΚΗ ΕΠΙΤΡΟΠΗ**

Αγγελική Ρόδη-Burriel Τμήμα Κτηνιατρικής, Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας

Σπυρίδων Κρήτας Τμήμα Κτηνιατρικής, ΑΠΘ

Γεώργιος Χριστοδουλόπουλος Τμήμα Κτηνιατρικής, Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας

Χαράλαμπος Μπιλλίνης Τμήμα Κτηνιατρικής, Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας

Ιωάννης Παππάς Τμήμα Κτηνιατρικής, Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας

Ανδρέα Πεξαρά Τμήμα Κτηνιατρικής, Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας

Φιλίουσης Γεώργιος Τμήμα Κτηνιατρικής, ΑΠΘ

*Στον πατέρα μου, Τάκη  
και στη μητέρα μου, Θάλεια  
για όλα όσα μου προσέφεραν και συνεχίζουν να προσφέρουν...*

*Στον σύζυγό μου Δημήτρη*

*Στα αγγελοúδια μου,  
Αγγελική και Θάλεια*



<b>ΕΥΡΕΤΗΡΙΟ ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΩΝ</b>	<b>Σελ.</b>
<b>ΕΥΧΑΡΙΣΤΙΕΣ</b>	<b>14</b>
<b>ΠΕΡΙΛΗΨΗ</b>	<b>17</b>
<b>ABSTRACT</b>	<b>24</b>
<b>ΚΕΦΑΛΑΙΟ 1</b>	<b>29</b>
<b>ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΚΗ ΑΝΑΣΚΟΠΗΣΗ</b>	
<b>1.1 ΤΟ ΓΕΝΟΣ <i>Salmonella</i></b>	<b>30</b>
1.1.1 Ιστορική αναδρομή της ονοματολογίας του γένους <i>Salmonella</i>	<b>30</b>
1.1.2 Το σημερινό σύστημα ταξινόμησης - ονοματολογίας του γένους <i>Salmonella</i>	<b>32</b>
<b>A concise history of <i>Salmonella</i> spp. nomenclature</b> Evangelopoulou GD, Burriel AR, Spyrou V. 2010. Journal of the Hellenic Veterinary Society 61(4), 323-329.	<b>35</b>
<b>Το σημερινό σύστημα ταξινόμησης του γένους <i>Salmonella</i> και οι επιπτώσεις του στον έλεγχο των λοιμώξεων</b> Ευαγγελοπούλου Γ.Δ., Γκόβαρης Α., Κρήτας Σ., Μπουριέλ Α. 2012. (Πανελλήνιο Συνέδριο Κρέατος MEAT DAYS 2012- Το Κρέας και τα Προϊόντα του «Από το στάβλο στο Πιάτο»- Αθήνα 29,30 Σεπτεμβρίου- 1 Οκτ 2012). σελ 502-510.	<b>42</b>
<b>A Brief Account of the Rules Applied to the Naming and Epidemiologically Grouping <i>Salmonella</i> Strains when Isolated from Animals</b> Evangelopoulou G, Kritas S, Govaris A, Burriel AR. 2014. Journal of Medical Sciences 14(3): 101-107. DOI: 10.3923/jms.2014.101.107	<b>51</b>

1.1.3 Χαρακτηριστικά των <i>Salmonella</i> spp.	58
1.1.4 Αντιγονική σύνθεση	60
1.1.5 Ειδικότητα ξενιστή	64
<b>Η έννοια της «προσαρμογής-εξειδίκευσης ξενιστή» στα είδη του γένους <i>Salmonella</i> και ο ρόλος της στις χοιροτροφικές μονάδες</b> Ευαγγελοπούλου Γ.Δ, Γκόβαρης Α., Κρήτας Σ., Μπουριέλ Α. (Πανελλήνιο Συνέδριο Κρέατος MEAT DAYS 2012- Το Κρέας και τα Προϊόντα του «Από το στάβλο στο Πιάτο». Αθήνα 29,30 Σεπτεμβρίου- 1 Οκτωβρίου 2012). σελ 105-111.	68
<b>Animal salmonellosis: A brief review of “Host Adaptation and Host Specificity” of <i>Salmonella</i> spp.</b> Evangelopoulou G, Kritas S, Govaris A, Burriel AR. 2013. Veterinary World 6(10), 703-708.	77
<b>1.2 ΣΑΛΜΟΝΕΛΛΩΣΗ ΤΟΥ ΧΟΙΡΟΥ ΚΑΙ ΔΗΜΟΣΙΑ ΥΓΕΙΑ</b>	<b>83</b>
1.2.1 Επιδημιολογία – Παράγοντες κινδύνου στην εκτροφή	83
1.2.2 Ανάλυση της κατανομής των οροτύπων των <i>Salmonella</i> spp. στην ΕΕ	85
1.2.3 Παθογένεια	86
1.2.4 Αντιμικροβιακή αντοχή	90
1.2.5 Οικονομικές επιπτώσεις στη χοιροτροφία και στη Δημόσια Υγεία	93
1.2.6 Μέτρα ελέγχου των <i>Salmonella</i> spp. στις εκτροφές χοίρου	95
<b>Εκτροφή χοίρων απαλλαγμένων από <i>Salmonella</i> spp.</b> Ευαγγελοπούλου Γ.Δ., Γκόβαρης Α., Κρήτας Σ., Μπουριέλ Α. (Πανελλήνιο Συνέδριο Κρέατος MEAT DAYS 2012- Το Κρέας και τα Προϊόντα του «Από το στάβλο στο Πιάτο». Αθήνα 29, 30 Σεπτεμβρίου- 1 Οκτωβρίου 2012). Σελ 135-147.	98

<b>The commercial impact of pig <i>Salmonella</i> spp. infections in border-free markets during an economic recession</b> Evangelopoulou G, Kritas S, Christodoulopoulos G, Burriel AR. 2015. Veterinary World 8(3), 257-272.	<b>111</b>
1.2.7 Έλεγχος της Σαμονέλλωσης του χοίρου στην Ελλάδα	<b>127</b>
<b>1.3 ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ</b>	<b>129</b>
<b>1.4 ΣΚΟΠΟΣ ΤΗΣ ΔΙΔΑΚΤΟΡΙΚΗΣ ΔΙΑΤΡΙΒΗΣ</b>	<b>131</b>
<b>ΚΕΦΑΛΑΙΟ 2</b> <b>ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ</b>	<b>132</b>
2.1 Πρόδρομη Ορολογική διερεύνηση <i>Salmonella</i> spp. σε χοιρομητέρες και παχυνόμενους χοίρους	<b>133</b>
2.2 Διερεύνηση της σαλμονέλλωσης των χοίρων στο σφαγείο	<b>134</b>
2.2.1 Συλλογή ιστών	<b>134</b>
2.2.2. Συλλογή περιβαλλοντικών δειγμάτων σφαγείου	<b>135</b>
2.3 Μικροβιολογική διερεύνηση της μόλυνσης ιστών και περιβαλλοντικών δειγμάτων	<b>135</b>
2.3.1 Απομόνωση των <i>Salmonella</i> spp.	<b>135</b>
2.3.2 Συντήρηση των απομονωθέντων στελεχών	<b>137</b>
2.3.3 Ταυτοποίηση των <i>Salmonella</i> spp.	<b>137</b>
2.3.4 Διερεύνηση άτυπων βιοχημικών αντιδράσεων	<b>138</b>
2.4 Διενέργεια δοκιμών ελέγχου ευαισθησίας σε αντιμικροβιακές ουσίες και αιθέρια έλαια	<b>138</b>
2.5 Στατιστική Ανάλυση	<b>140</b>
2.5.1 Πρόδρομη ορολογική διερεύνηση <i>Salmonella</i> spp. σε χοιρομητέρες και παχυνόμενους χοίρους	<b>140</b>

2.5.2 Οροδιερεύνηση χοίρων στο σφαγείο	140
2.5.3 Διενέργεια δοκιμών ελέγχου ευαισθησίας σε αιθέρια έλαια	140
<b>ΚΕΦΑΛΑΙΟ 3</b>	<b>142</b>
<b>ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ</b>	
3.1 Πρόδρομη Ορολογική διερεύνηση <i>Salmonella</i> spp. σε χοιρομητέρες και παχυνόμενους χοίρους	143
3.2 Οροδιερεύνηση χοίρων στο σφαγείο	146
3.3 Μικροβιολογική διερεύνηση της μόλυνσης ιστών και περιβαλλοντικών δειγμάτων	147
3.3.1 Απομόνωση των <i>Salmonella</i> spp.	147
3.3.2 Οροταυτοποίηση των <i>Salmonella</i> spp.	152
3.3.3 Άτυπες αντιδράσεις κατά την αξιολόγηση των αποικιών στα θρεπτικά υποστρώματα.	155
3.3.4 Στατιστική ανάλυση οροδιερεύνησης και απομονώσεων	158
3.4 Διενέργεια δοκιμών ελέγχου ευαισθησίας σε αντιμικροβιακές ουσίες και αιθέρια έλαια.	161
<b>Ο χοίρος και το κρέας του ως πιθανές πηγές σαλμονέλλωσης του Έλληνα καταναλωτή</b> Ευαγγελοπούλου Γ., Κρήτας Σ., Χριστοδουλόπουλος Γ., Μπουριέλ Α. 2015. (Πανελλήνιο Συνέδριο- Το Κρέας και τα Προϊόντα του «Από τον Στάβλο στο πιάτο» 2015. Θεσσαλονίκη 27, 28 Φεβρουαρίου- 1 Μαρτίου 2015). σελ. 109- 117.	172
<b>Pork Meat as a Potential Source of <i>Salmonella enterica</i> subsp. <i>arizonae</i> Infection of Man</b> Evangelopoulou G, Kritas S, Govaris A, Burriel AR. 2014. Journal of Clinical Microbiology 52, 741-744.	181
<b>Colonisation of pig gallbladders with <i>Salmonella</i> species important to</b>	186

<b>public health</b> Evangelopoulou G, Filioussis G, Kritas S, Christodoulopoulos G, Triantafyllou LA, Burriel AR. 2014. Short Communication. Veterinary Record doi: 10.1136/vr.102822.	
<b>Isolation and Antimicrobial Testing of <i>Aeromonas</i> spp., <i>Citrobacter</i> spp., <i>Cronobacter</i> spp., <i>Enterobacter</i> spp., <i>Escherichia</i> spp., <i>Klebsiella</i> spp., and <i>Trabulsiella</i> spp. from the Gallbladder of Pigs</b> Evangelopoulou G, Filioussis G, Kritas S, Christodoulopoulos G, Kantere M, Burriel AR. 2015. Polish Journal of Microbiology 64(2), 185-188.	<b>189</b>
<b>The role of H<sub>2</sub>S in the recovery of <i>Salmonella</i> spp. from animals</b> Evangelopoulou G, Burriel AR. 2015. Global Veterinary Summit. August 31-September 2, 2015 Florida, USA ( <i>poster presentation accepted</i> )	<b>193</b>
<b>Presence of emerging <i>Salmonella</i> spp. serovars in pig farms: a risk to public health</b> Evangelopoulou G, Kritas S, Christodoulopoulos G, Sbiraki AP, Burriel AR. Journal of Agromedicine ( <i>under review</i> )	<b>194</b>
<b>ΚΕΦΑΛΑΙΟ 4</b>	<b>211</b>
<b>ΓΕΝΙΚΗ ΣΥΖΗΤΗΣΗ</b>	
4.1 Ορολογική διερεύνηση <i>Salmonella</i> spp. σε χοιρομητέρες και παχυνόμενους χοίρους	<b>212</b>
4.2 Σύγκριση ορολογικών και βακτηριολογικών μεθόδων κατά τη διερεύνηση <i>Salmonella</i> spp. σε χοίρους τελικής πάχυνσης	<b>214</b>
4.3 Επικρατέστεροι ορότυποι <i>Salmonella</i> spp. κατά τη σφαγή χοιρινών	<b>220</b>
4.4 Σύγκριση της δράσης αιθέριων ελαίων και ευρέως χρησιμοποιούμενων αντιβιοτικών έναντι <i>Salmonella</i> spp.	<b>228</b>
4.5 Προβλήματα που προέκυψαν κατά τη διάρκεια της απομόνωσης και του βιοχημικού χαρακτηρισμού των Εντεροβακτηριοειδών	<b>231</b>
4.5.1 Ευαισθησία υποστρωμάτων	<b>232</b>

4.5.2 <i>Salmonella</i> spp. λακτόζη θετικά	236
4.5.3 Ο ρόλος του H <sub>2</sub> S στην απομόνωση <i>Salmonella</i> spp. από τα ζώα	237
<b>ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ</b>	<b>239</b>
<b>ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΚΕΣ ΠΗΓΕΣ</b>	<b>244</b>
<b>ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ</b> <b>ΔΗΜΟΣΙΕΥΣΕΙΣ - ΑΝΑΚΟΙΝΩΣΕΙΣ</b> <b>ΤΗΣ ΔΙΔΑΚΤΟΡΙΚΗΣ ΔΙΑΤΡΙΒΗΣ</b>	<b>275</b>

<b>ΕΥΡΕΤΗΡΙΟ ΠΙΝΑΚΩΝ</b>	<b>Σελ.</b>
Πίνακας 1.1: Διαφοροποιητικά βιοχημικά χαρακτηριστικά ειδών και υποειδών <i>Salmonella</i> spp.	<b>59</b>
Πίνακας 3.1: Αριθμός ορολογικά εξετασθέντων ζώων ανά εκτροφή.	<b>143</b>
Πίνακας 3.2: Συγκεντρωτικός πίνακας οροθετικότητας χοιρομητέρων και χοίρων τελικής πάχυνσης 39 ελληνικών εκτροφών.	<b>144</b>
Πίνακας 3.3: Συντελεστές συσχέτισης επί του συνόλου των ζώων των 5 γεωγραφικών περιοχών.	<b>145</b>
Πίνακας 3.4: ANOVA one factor ( $\alpha=0,05$ ) για τη διερεύνηση της σημαντικότητας της ηλικίας και της γεωγραφικής περιοχής ως προς την οροθετικότητα.	<b>146</b>
Πίνακας 3.5: Αποτελέσματα οροθετικότητας στα <i>Salmonella</i> spp. για χοίρους τελικής πάχυνσης.	<b>146</b>
Πίνακας 3.6: Συγκριτικά αποτελέσματα βακτηριολογικών μεθόδων απομόνωσης και ορολογικών μεθόδων διερεύνησης <i>Salmonella</i> spp.	<b>147</b>
Πίνακας 3.7: Υποστρώματα απομόνωσης τυπικών <i>Salmonella</i> spp. και οι προτεινόμενες αντιδράσεις τους.	<b>148</b>
Πίνακας 3.8: Κατανομή απομονωθέντων οροτύπων από τις διάφορες περιοχές δειγματοληψίας των μολυσμένων ζώων.	<b>149</b>
Πίνακας 3.9α: Ορότυποι <i>Salmonella</i> spp. που απομονώθηκαν από πέντε διαφορετικές περιοχές δειγματοληψίας χοίρων τελικής πάχυνσης.	<b>153</b>
Πίνακας 3.9β: Στελέχη <i>Salmonella</i> spp. που αναγνωρίστηκαν βιοχημικά από χοίρους τελικής πάχυνσης.	<b>154</b>
Πίνακας 3.10: Ορολογικά αποτελέσματα χοίρων από τους οποίους απομονώθηκαν ορότυποι <i>Salmonella</i> spp., που δεν ανήκουν στις οροομάδες B, C1 ή D και επομένως δεν θα «έπρεπε» να είχαν ανιχνευτεί με την ορολογική μέθοδο που χρησιμοποιήθηκε.	<b>154</b>
Πίνακας 3.11: Άτυπες <i>Salmonella</i> spp. Φαινοτυπικός χαρακτηρισμός αποικίας και υποστρώματος.	<b>157</b>

Πίνακας 3.12: Αποτελέσματα της δοκιμασίας $\chi^2$ για την οροταυτοποίηση, το Microgen και το API.	<b>158</b>
Πίνακας 3.13: Σύσχετιση οροταυτοποίησης, Microgen και API.	<b>159</b>
Πίνακας 3.14: Ευαισθησία- Ειδικότητα της ELISA για διαφορετικές τιμές cut off.	<b>159</b>
Πίνακας 3.15: Πίνακας 2x2 αποτελεσμάτων Οροταυτοποίησης <i>Salmonella</i> και ELISA για τιμή cut-off OD 10%.	<b>160</b>
Πίνακας 3.16: Πίνακας 2x2 αποτελεσμάτων Οροταυτοποίησης <i>Salmonella</i> και ELISA για τιμή cut-off OD 20%.	<b>160</b>
Πίνακας 3.17: Πίνακας 2x2 αποτελεσμάτων Οροταυτοποίησης <i>Salmonella</i> και ELISA για τιμή cut-off OD 40%.	<b>160</b>
Πίνακας 3.18: Συγκεντρωτικά αποτελέσματα ανθεκτικότητας σε αντιμικροβιακές ουσίες στελεχών <i>Salmonella</i> spp. που απομονώθηκαν από χοίρους και περιβαλλοντικά δείγματα αυτών.	<b>162</b>
Πίνακας 3.19: Ζώνες ανάσχεσης (mm) των αιθέριων ελαίων σε 3 διαφορετικές ποσότητες έναντι <i>Salmonella</i> spp. στελεχών.	<b>165</b>
Πίνακας 3.20: Συγκεντρωτικά αποτελέσματα της αντιμικροβιακής δράσης του ριγανέλαιου, έλαιου δενδρολίβανου και θυμαρέλαιου έναντι <i>Salmonella</i> spp. που απομονώθηκαν από χοίρους.	<b>167</b>
Πίνακας 3.21: Στατιστική ανάλυση εκτίμησης επίδρασης του είδους του αιθερίου ελαίου στο εύρος της ζώνης αναστολής.	<b>167</b>
Πίνακας 4. 1. Ορότυποι <i>Salmonella</i> που απομονώθηκαν στην Ελλάδα από χοίρους και περιβαλλοντικά δείγματα αυτών.	<b>227</b>



<b>ΕΥΡΕΤΗΡΙΟ ΓΡΑΦΗΜΑΤΩΝ</b>	<b>Σελ.</b>
Γράφημα 1: Αντιμικροβιακή δράση ριγανέλαιου και εφαρμοζόμενη ποσότητα.	<b>168</b>
Γράφημα 2: Αντιμικροβιακή δράση έλαιου δενδρολίβανου και εφαρμοζόμενη ποσότητα.	<b>168</b>
Γράφημα 3: Αντιμικροβιακή δράση θυμαρέλαιου και εφαρμοζόμενη ποσότητα.	<b>169</b>
Γράφημα 4: Ορότυπος και αντιμικροβιακή δράση ριγανέλαιου.	<b>169</b>
Γράφημα 5: Ορότυπος και αντιμικροβιακή δράση θυμαρέλαιου.	<b>170</b>
Γράφημα 6: Ορότυπος και αντιμικροβιακή δράση έλαιου δενδρολίβανου.	<b>170</b>

<b>ΕΥΡΕΤΗΡΙΟ ΕΙΚΟΝΩΝ</b>	<b>Σελ.</b>
Εικόνα 1. Καλλιέργειες στο MSR.V.	<b>156</b>
Εικόνα 2. Καλλιέργειες στο Salmonella Chromogenic Agar.	<b>156</b>
Εικόνα 3. Αντιμικροβιακή δράση Α: Αντιβιοτικών, Β: Ριγανέλαιου 30 μl, Γ: ριγανέλαιου 5 και 15 μl.	<b>164</b>

## ΕΥΧΑΡΙΣΤΙΕΣ

Η παρούσα διδακτορική διατριβή εκπονήθηκε στο Εργαστήριο Μικροβιολογίας και Παρασιτολογίας του Τμήματος Κτηνιατρικής του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας, κάποια επιμέρους τμήματα στο Εργαστήριο Μικροβιολογίας και Λοιμωδών Νοσημάτων του Τμήματος Κτηνιατρικής του Α.Π.Θ, ενώ η οροταυτοποίηση έγινε στο Εθνικό Εργαστήριο Αναφοράς Σαλμονελλών (Χαλκίδα).

Η εκπόνηση αυτής της διδακτορικής διατριβής υπήρξε μια διαδικασία μάθησης γεμάτη προκλήσεις τόσο σε επιστημονικό όσο και σε ανθρώπινο επίπεδο. Το αποτέλεσμα της σκληρής προσωπικής δουλειάς και προσπάθειας ίσως δεν θα ήταν εφικτό χωρίς την τεράστια επιστημονική και ψυχολογική υποστήριξη που είχα την τύχη να δεχτώ από την επιβλέπουσά μου, την οικογένειά μου, τους φίλους και τους συναδέλφους μου. Έτσι, καθώς αυτό το «ταξίδι» φτάνει στο τέλος του νιώθω την ανάγκη να εκφράσω τις ειλικρινείς μου ευχαριστίες στους ανθρώπους που με συνόδευσαν και με στήριξαν όλα αυτά τα χρόνια.

Τις πρώτες ευχαριστίες μου θα ήθελα να εκφράσω στην επιβλέπουσά μου, την Καθηγήτρια, κ. Αγγελική Ρόδη- Μπουριέλ, η οποία κατ' αρχήν με εμπιστεύτηκε και μου έδωσε αυτή την ευκαιρία, αναθέτοντάς μου τη συγκεκριμένη διδακτορική διατριβή. Θα ήθελα να ξέρετε ότι η γνωριμία και η συνεργασία μαζί σας ήταν ένα μεγάλο προνόμιο και μια ανεπανάληπτη εμπειρία και νιώθω ιδιαίτερα τυχερή, αλλά και ευγνώμων γι' αυτό. Δεν μου διδάξατε μόνο το νόημα της Κτηνιατρικής επιστήμης, αλλά το νόημα της ζωής! Σας ευχαριστώ για την ατέλειωτη υπομονή σας, την επιμονή σας, για το αμείωτο ενδιαφέρον σας όχι μόνο για την πορεία της έρευνας, αλλά για κάθε τι που με απασχολούσε, τις συμβουλές, τις ατέλειωτες σελίδες που διαβάσατε και διορθώσατε για μένα, για το ότι ήσασταν πάντα δίπλα μου για να με στηρίζετε στα δύσκολα, για την ώθηση που μου δίνετε να συνεχίζω, για την αγάπη σας...

Ευχαριστώ επίσης θερμά τον Αναπληρωτή Καθηγητή κ. Σπυρίδων Κρήτα, ο οποίος συντέλεσε ουσιαστικά στην ολοκλήρωση μέρους της διατριβής στο Εργαστήριο Μικροβιολογίας και Λοιμωδών Νοσημάτων του Τμήματος Κτηνιατρικής του Α.Π.Θ, καθώς και για την ενθάρρυνσή του όλα αυτά τα χρόνια.

Θερμές ευχαριστίες θέλω να εκφράσω στον Καθηγητή κ. Χριστοδουλόπουλο Γεώργιο για τη βοήθεια και τα θετικά σχόλιά του.

Ευχαριστώ βαθύτατα τον Λέκτορα κ. Φιλιούση Γεώργιο για τη βοήθειά του, την επιστημονική του καθοδήγηση, για τη συνεργασία που είχαμε όλα αυτά τα χρόνια γύρω από το θέμα της διατριβής, καθώς και για την ψυχολογική στήριξη που μου παρείχε.

Αισθάνομαι επίσης την ανάγκη να ευχαριστήσω θερμά τα άλλα τρία μέλη της Επταμελούς Εξεταστικής Επιτροπής τους: Καθηγητή κ. Μπιλλίνη Χαράλαμπο, Αν. Καθηγητή κ. Παππά Ιωάννη και Επικ. Καθηγήτρια κ. Πεξάρá Ανδρεάνα, για τη συμμετοχή τους και για τα σχόλιά τους.

Θερμότερες ευχαριστίες θέλω να εκφράσω στο λοιπό προσωπικό του Εργαστηρίου Μικροβιολογίας και Παρασιτολογίας του Τμήματος Κτηνιατρικής του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας, και ιδιαιτέρως στον Λέκτορα κ. Λευκαδίτη Μενέλαο και την κ. Πατσιαούρα Δήμητρα για τη συνεργασία και την ηθική τους συμπαράσταση.

Όμως, η διατριβή δεν θα ολοκληρωνόταν χωρίς τη βοήθεια πολλών άλλων ανθρώπων. Έτσι, οφείλω ευχαριστίες:

Στον φίλο και συνάδελφο κ. Κουκούλη Αθανάσιο για την ανεκτίμητη βοήθειά του στη συλλογή δειγμάτων, στους συναδέλφους της Κτηνιατρικής Διεύθυνσης Καρδίτσας, καθώς και σε όλο το προσωπικό των Σφαγείων Καρδίτσας και Πύλης και στους χοιροτρόφους με τους οποίους συνεργάστηκα.

Στο προσωπικό του Εθνικού Εργαστηρίου Αναφοράς Σαλμονελλών (Χαλκίδα) για τις πολλές ώρες που αφιέρωσαν στην οροταυτοποίηση και την άψογη επικοινωνία.

Στον Αντισυνταγματάρχη (ΥΟ) κ. Καργαδούρο Πέτρο, για τη στήριξή του να παραμείνω στο Εργαστήριο Μικροβιολογίας και να συνεχίσω με την εκπόνηση της διδακτορικής διατριβής.

Στον φίλο και συνάδελφο Ταγματάρχη (ΥΚ) κ. Τριανταφύλλου Ελευθέριο για τη βοήθειά του, όποτε την χρειάστηκα.

Στη φίλη μου Ταγματάρχη (ΥΝ) κ. Μουστάκα Ελένη για την πολύτιμη βοήθειά της κατά τη στατιστική επεξεργασία των δεδομένων.

Στη φίλη μου Αντιπλοίαρχο (ΥΝ) κ. Γκαντώνα Ανδρομάχη που με συνόδευσε σε δύο συνέδρια (Κων/πολη και Λισαβόνα) και για την ηθική της συμπαράσταση.

Στους φίλους μου Βάσω Κοντούλη και Δημήτρη Κολοβό για τη βοήθειά τους σε θέματα που αφορούσαν προβλήματα με τον Η/Υ.

Ένα τεράστιο ευχαριστώ σίγουρα δεν είναι αρκετό για να ευχαριστήσω την οικογένειά μου για την αμέριστη συμπαράσταση, βοήθεια και εμπιστοσύνη.

Ειδικά, τον πατέρα μου Τάκη, ο οποίος με αυταπάρνηση εργάστηκε δίπλα μου ακούραστα στο σφαγείο και στον πάγκο του εργαστηρίου ατελειωτες νύχτες και αργίες. Πατέρα, σε ευχαριστώ για τις προσευχές σου, για το αστείρευτο ενδιαφέρον σου για αυτή την έρευνα και για το ότι ήσουν πάντα περήφανος για μένα. Χωρίς εσένα σίγουρα δεν θα τα κατάφερα.

Τη μητέρα μου, Θάλεια, για την ανεκτίμητη βοήθειά της με τα παιδιά μου. Την αδερφή μου Ιωάννα, τον γαμπρό μου Κώστα και τα πεθερικά μου Αριστείδη και Αγγελική για τη βοήθεια και κατανόηση που μου προσέφεραν και αυτοί.

Τον σύζυγό μου, Δημήτρη, που ήταν πάντα δίπλα μου, για την ενθάρρυνση, τη συνεχή ενίσχυση, για όλα τα κτηνιατρικά συνέδρια που παρακολούθησε σε Ελλάδα και εξωτερικό. Δημήτρη, σε ευχαριστώ για την αγάπη, την υπομονή και την υποστήριξή σου όλα αυτά τα χρόνια. Πραγματικά πιστεύω ότι είσαι ο Καταδρομέας με τις περισσότερες γνώσεις στη σαλμονέλλωση του χοίρου στον κόσμο!

Τέλος ένα τεράστιο ευχαριστώ στα δύο αγγελοΰδια μου, τα μικρά μου κοριτσάκια Αγγελική και Θάλεια για την υπομονή τους, για τις ώρες και τις μέρες που στερήθηκαν την αγάπη μου. Σας υπόσχομαι ότι από δω και πέρα θα καταβάλλω κάθε προσπάθεια να αναπληρώσω όλον αυτόν τον χρόνο!

Ευχαριστώ ανώνυμα όλους, φίλους και γνωστούς, που με στήριξαν ψυχολογικά και ζητώ προκαταβολικά συγγνώμη αν ξέχασα κάποιον.

## ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Το γένος *Salmonella* περιλαμβάνει παθογόνα βακτηρίδια με παγκόσμια σημασία στη Δημόσια Υγεία και την οικονομία, λόγω του άμεσου οικονομικού κόστους που προκύπτει από τα ποσοστά θνησιμότητας και θνητότητας, καθώς και των ανυπολόγιστων απωλειών σε ζωοκομικά προϊόντα. Στο είδος *Salmonella enterica* ανήκουν πάνω από 2.500 ορότυποι με σημασία στη Δημόσια Υγεία και τη ζωική παραγωγή. Οι ορότυποι αυτοί διαφέρουν σημαντικά ως προς το εύρος των ξενιστών τους, καθώς και ως προς τη φύση της νόσου που είναι ικανοί να προκαλέσουν. Ο χοίρος και τα προϊόντα του αποτελούν σημαντική δεξαμενή διασποράς του παθογόνου στην τροφική αλυσίδα, λόγω του ότι τα είδη του γένους *Salmonella* είναι ευρέως διαδεδομένα στα συστήματα παραγωγής χοίρων παγκοσμίως. Οι υποκλινικές λοιμώξεις του χοίρου με *Salmonella* spp. έχουν ζωνοτικό χαρακτήρα με μεγάλη σημασία στην ασφάλεια των τροφίμων, συνεπώς και στη χοιροτροφία, καθιστώντας την επιτήρηση των σαλμονελλώσεων απαραίτητη.

Σκοπός της παρούσας διατριβής ήταν η μελέτη της επιδημιολογίας των *Salmonella* spp. σε ελληνικές εκτροφές χοίρου, ώστε να διερευνηθεί η σημαντικότητα του χοιρινού κρέατος για τη Δημόσια Υγεία.

Μετά από εκτενή μελέτη της κείμενης διεθνούς βιβλιογραφίας, αποφασίστηκε η διαδικασία της ερευνητικής μελέτης της σαλμονέλλωσης του χοίρου σε επίπεδο σφαγείου, ώστε να καθοριστεί η σημασία της μόλυνσης στη Δημόσια Υγεία.

Αρχικά η μόλυνση διερευνήθηκε ορολογικά με δείγματα αίματος 314 συών και 374 χοίρων τελικής πάχυνσης από 39 εκτροφές, αγνώστου επιπέδου μόλυνσης με *Salmonella* spp., σε πέντε γεωγραφικές περιοχές της Ελλάδας (Θεσσαλία, Στερεά Ελλάδα, Β. Ελλάδα, Ήπειρος, Κρήτη). Η ορολογική διερεύνηση έγινε με τη χρήση εμπορικά διαθέσιμης έμμεσης mix-ELISA (Herd-Check Swine Salmonella Antibody Test Kit, Idexx Laboratories, Inc., Maine, USA).

Τα αποτελέσματα έδειξαν ότι η οροθετικότητα ήταν:

- Μεταξύ των χοιρομητέρων 81,53% με cut off  $OD \geq 10\%$  και 20,38% με cut off  $OD \geq 40\%$

- Μεταξύ των χοίρων τελικής πάχυνσης 70,32% με cut off OD $\geq$ 10% και 15,5% με cut off OD $\geq$ 40%
- Μεταξύ των εκτροφών από 0-100% με cut off OD $\geq$ 10% και από 0-63,33% με cut off OD $\geq$ 40%.

Η οροθετικότητα των 39 εκτροφών ήταν εξαρτημένη από την επιλεγείσα τιμή cut off της ELISA. Αυτή η διερεύνηση έδειξε ότι η καλύτερη συσχέτιση μεταξύ ορολογικών μεθόδων και απομονώσεων παρατηρήθηκε για τιμή OD cut off 40%. Συγκεκριμένα το Odds Ratio για την τιμή του cut off 40% ήταν OR 2,456 (1,004 – 6,007) (95% CI), δηλαδή ένα ζώο είχε 2,456 φορές πιθανότητες να βρεθεί *Salmonella* spp. θετικό. Επιπλέον, η στατιστική ανάλυση επιβεβαίωσε τον σημαντικό επιδημιολογικό ρόλο των χοιρομήτερων στη διατήρηση και διασπορά της μόλυνσης με *Salmonella*, δηλαδή τον ρόλο τους στη μετάδοση του παθογόνου σε χοίρους τελικής πάχυνσης. Με βάση αυτά τα δεδομένα για cut off της OD 40% η συχνότητα εμφάνισης (επιπολασμός) της *Salmonella* στις χοιρομητέρες σε σχέση με τους χοίρους τελικής πάχυνσης ήταν 20,38% και 15,5% αντίστοιχα.

Με δεδομένα τα ευρήματα της προκαταρκτικής οροδιερεύνησης ο σχεδιασμός της απομόνωσης του παθογόνου και της συσχέτισής του με τα ποσοστά οροθετικότητας περιορίστηκε στη Θεσσαλία, όπου τα ποσοστά των οροθετικών εκτροφών ήταν μεταξύ 0-92,6% με cut off OD $\geq$ 10% και μεταξύ 0-20% (cut off OD $\geq$ 40%).

Για την απομόνωση και ταυτοποίηση των οροτύπων τα επιλεγμένα δείγματα εξετάστηκαν με βάση το ISO 6579:2002, Annex D για τρόφιμα και ζωοτροφές (ISO 2002). Τα δείγματα ήταν αίμα, ιστοί και κοπράνα από 123 σφάγια χοίρων τελικής πάχυνσης, που προήλθαν από 15 εκτροφές με 2.500 περίπου ζώα τελικής πάχυνσης. Δηλαδή ελέγχθηκε ορολογικά και μικροβιολογικά περίπου το 5% αυτών των ζώων. Για τον μικροβιολογικό έλεγχο των εκτροφών διερευνήθηκαν 615 δείγματα ιστών και κοπράνων. Η οροθετικότητα των εξετασθέντων ζώων συνολικά ήταν 59,35% με cut off OD $\geq$ 10% και 20,33% με cut off OD $\geq$ 40%, ενώ το ποσοστό των οροθετικών ζώων με βακτηριολογική επιβεβαίωση ήταν 65,11% με cut-off OD $\geq$  10% και 30,23% με cut-off OD $\geq$  40%. Διαφαίνεται ότι η ευαισθησία και η ειδικότητα της mix-ELISA είναι στατιστικά σημαντική (95% CI) με cut-off OD $\geq$  10%.

Επιπλέον των δειγμάτων από σφάγια χοίρων, εξετάστηκαν μικροβιολογικά 378 δείγματα επιφανειών (swab samples) του σφαγείου, ώστε να διερευνηθεί ο ρόλος τους στην επιμόλυνση των σφάγιων.

Από τη μικροβιολογική διερεύνηση με το ISO 6579:2002 απομονώθηκαν 265 στελέχη. Τα στελέχη αυτά ήταν Gram και οξειδάση αρνητικά, άρα ανήκαν στην οικογένεια των Εντεροβακτηριοειδών και ταυτοποιήθηκαν βιοχημικά με το API 20E (Biomérieux, France) και το Microgen™ GnA+B-ID (Microgen Bioproducts Ltd, UK). Χαρακτηρίστηκαν ως *Salmonella* spp. 101 στελέχη, τα οποία ελέγχθηκαν με πολυδύναμους αντι-O, αντι-H και αντι-Vi ορούς και στάλθηκαν στο Εθνικό Εργαστήριο Αναφοράς Σαλμονελλών (Χαλκίδα) για πλήρη οροταυτοποίηση.

Τελικά οροταυτοποιήθηκαν πλήρως 82 στελέχη (55 προερχόμενοι από ζώα και 27 από τις επιφάνειες του σφαγείου), 4 χαρακτηρίστηκαν ως ατυποποίητα, 14 αναγνωρίστηκαν βιοχημικά ως *S. enterica* subsp. *arizonae* και ένα ως *S. enterica* subsp. *indica*. Μεταξύ των αναγνωρισμένων οροτύπων ήταν οι νεοαναδυόμενοι μονοφασκοί τύποι του οροτύπου Typhimurium, *S. enterica* subsp. *enterica* ser. 4,5, 12:i:- (16 στελέχη) και *S. enterica* subsp. *enterica* ser. 4,12:i:- (9 στελέχη), οι μονοφασκοί *S. enterica* subsp. *enterica* ser. 6,7:k:- (7 στελέχη) και *S. enterica* subsp. *enterica* ser. 6,14,25:-:1,2 (ένα στέλεχος) και οι πιο σπάνιοι ορότυποι των υποειδών *enterica* subsp. *diarizonae* 61:k:1,5, *S. enterica* subsp. *salamae* 38:b:1,2 και *S. enterica* subsp. *houtenae* 40:g,t:- (ένα στέλεχος ο καθένας). Από τα λοιπά στελέχη, 38 ανήκαν στον ορότυπο Typhimurium και 12 σε άλλους οροτύπους (*S. Bredeney* (3 στελέχη), *S. Agona*, *S. Derby*, *S. Infantis*, *S. Meleagridis*, *S. Cerro*). Παρόλο που ο ορότυπος Typhimurium ήταν ο επικρατέστερος (38), η πλειοψηφία του συνόλου των λοιπών οροτύπων ανήκαν σε εκείνους που θεωρούνται αναδυόμενοι ή «εξωτικοί» όσον αφορά τη σαλμονέλλωση του ανθρώπου.

Για τη διερεύνηση της σημασίας της αντιβιοαντοχής στη Δημόσια Υγεία, τα 101 στελέχη αναγνωρισμένα με τα API 20E, Microgen™ GnA+B-ID και την οροταυτοποίηση ως *Salmonella* spp. διερευνήθηκαν με τη μέθοδο διάχυσης των δίσκων σε 24 αντιμικροβιακές ουσίες. Οι ουσίες ήταν: amoxicillin (30 µg), amoxicillin/clavulanic acid (20/10µg), ampicillin (10 µg), ampicillin/sulbactam (10/10 µg), aztreonam (30 µg), cefotaxime (30 µg), cefoxitin (30 µg), ceftazidime (30 µg),

ceftiofur (30 µg), ceftriaxone (30 µg), cefuroxime (30 µg), chloramphenicol (30 µg), colistin (50 µg), doripenem (10 µg), enrofloxacin (5 µg), erythromycin (15µg), gentamycin (10 µg), kanamycin (30 µg), nalidixic acid (30 µg), penicillin G (10 µg), rifampin (30 µg), sulfamethoxazole/trimethoprim (23.75/1.25 µg), tetracycline (30 µg) και tigecycline (15 µg).

Τα ευρήματα έδειξαν υψηλά ποσοστά ανθεκτικότητας σε: penicillin G (10 µg) (93%), rifampin (30 µg) (75,24%), tetracycline (30 µg) (68,31%), sulfamethoxazole/trimethoprim (23.75/1.25 µg) (61,38%), ampicillin (10 µg) (54,45%), amoxicillin (30 µg) (53,46%) και μικρότερα σε chloramphenicol (30 µg) (22,77%), kanamycin (30 µg) (14,85%) και colistin (50 µg) (11,88%).

Λόγω της παρατηρούμενης υψηλής ανθεκτικότητας και της επιβολής περιορισμών στη χρήση των αντιμικροβιακών ουσιών, διερευνήθηκε η ευαισθησία 59 στελεχών με πολλαπλή ανθεκτικότητα εκ των οροταυτοποιηθέντων *Salmonella* spp. που απομονώθηκαν από σφάγια χοίρων, σε τρεις αναραιώτες ποσότητες (5, 15 και 30 µl) αιθέριων ελαίων από ρίγανη, δενδρολίβανο και θυμάρι. Τόσο το ριγανέλαιο όσο και το θυμαρέλαιο είχαν ισχυρή ανασταλτική επίδραση, ακόμη και για την ποσότητα των 5 µl, χωρίς στατιστικά σημαντική διαφορά μεταξύ τους, ενώ το έλαιο δενδρολίβανου δεν είχε καμία ή παρουσίασε μικρότερη αντιμικροβιακή δράση σε σχέση με το ριγανέλαιο και το θυμαρέλαιο. Η σύγκριση των αντιμικροβιακών ιδιοτήτων αυτών των αιθέριων ελαίων με τα ευρέως χρησιμοποιούμενα αντιβιοτικά για το ίδιο στέλεχος (tetracycline, amoxicillin, ampicillin, sulfamethoxazole/trimethoprim) αποκάλυψε ότι τα αιθέρια έλαια έχουν καλύτερη αντιμικροβιακή δράση από τα χρησιμοποιηθέντα αντιβιοτικά.

Τα αποτελέσματα έδειξαν ότι στην Κεντρική Ελλάδα οι χοίροι μολύνονται από τουλάχιστον 14 διαφορετικούς οροτύπους. Ο μεγάλος αριθμός διαφορετικών οροτύπων και η παρουσία σημαντικών νεοαναδυόμενων παγκοσμίως είναι η πρώτη φορά που παρατηρείται στην Ελλάδα.

Συμπεραίνεται από τα αποτελέσματα αυτής της διερεύνησης ότι το κρέας του χοίρου είναι μια σημαντική πηγή σαλμονέλλωσης του ανθρώπου, όχι μόνο από συνηθισμένους οροτύπους, αλλά και από νεοαναδυόμενους, οι οποίοι εμφανίζουν υψηλή ανθεκτικότητα σε ευρέως χρησιμοποιούμενες αντιμικροβιακές ουσίες. Επιπλέον, η μελέτη έδειξε ότι ο κίνδυνος για τον άνθρωπο προέρχεται από το συγκεκριμένο ζώο που



φέρει το παθογόνο στους ιστούς του και όχι λόγω διασταυρούμενης επιμόλυνσης του σφάγιου που μπορεί να συμβεί κατά τη σφαγή.

Κατά τη μελέτη των ανωτέρω προέκυψαν δυσκολίες στην απομόνωση και τον βιοχημικό χαρακτηρισμό των Εντεροβακτηρίων, που χρήζουν αναφοράς, αφού επηρεάζουν τα ποσοστά θετικότητας και τον τελικό προσδιορισμό των οροτύπων που μολύνουν τον χοίρο. Μεταξύ αυτών ήταν η παρουσία λακτόζη θετικών salmonellae, τα προβλήματα ευαισθησίας των χρησιμοποιηθέντων υποστρωμάτων, καθώς και ο ρόλος του H<sub>2</sub>S στην απομόνωση *Salmonella* spp. από τα ζώα. Αυτά τα προβλήματα επηρεάζουν αρνητικά τον ακριβή καθορισμό του ποσοστού μόλυνσης των σφάγιων, άρα και τον καθορισμό του μεγέθους της επικινδυνότητας του κρέατος χοίρου για τον καταναλωτή.

Η παρούσα μελέτη υποδεικνύει την ανάγκη συνεχούς επιτήρησης της συχνότητας εμφάνισης του παθογόνου στις ελληνικές χοιροτροφικές μονάδες, καθώς και της προσπάθειας απομόνωσής του με δειγματοληψίες κυρίως ιστών και κοπράνων, αφού το παθογόνο δείχνει τροπισμό και εγκατάσταση στον λεμφικό ιστό κυρίως. Επιπλέον, διαφάνηκε ότι η συστηματική αξιόπιστη μελέτη των σαλμονελλώσεων απαιτεί άριστα εκπαιδευμένο στη βακτηριολογία επιστημονικό προσωπικό, ώστε να εντοπίζονται και τα άτυπα στελέχη, που δεν εμπίπτουν στους κανόνες των προτεινόμενων διεθνών μεθόδων.

**UNIVERSITY OF THESSALY**  
**SCHOOL OF HEALTH SCIENCES**  
**FACULTY OF VETERINARY MEDICINE**

**INVESTIGATION OF THE SIGNIFICANCE OF**  
**PIG SALMONELLOSIS**  
**FROM STABLE TO TABLE**

**GRAMMATO D. EVANGELOPOULOU**

Military Veterinarian

**A THESIS SUBMITTED FOR THE DEGREE OF**  
**DOCTOR OF PHILOSOPHY**

Work carried out at the Laboratory of Microbiology and Parasitology of the Faculty of  
Veterinary Medicine of the University of Thessaly

Karditsa. Greece 2015

## **ADVISORY COMMITTEE**

Angeliki Rothi Burriel, Professor, Supervisor  
Laboratory of Microbiology and Parasitology  
Faculty of Veterinary Medicine, University of Thessaly

Spyridon Kritas, Associate Professor, Member of Advisory Committee  
Department of Microbiology and Infectious Diseases  
Faculty of Veterinary Medicine, Aristotle University of Thessaloniki

Georgios Christodoulopoulos, Member of Advisory Committee  
Department of Clinical Veterinary Medicine  
Faculty of Veterinary Medicine, University of Thessaly

## **EXAMINATION BOARD**

Professor A.R. Burriel Faculty of Veterinary Medicine, University of Thessaly

Associate Professor S. Kritas Faculty of Veterinary Medicine, Aristotle University of Thessaloniki

Professor G. Christodoulopoulos Faculty of Veterinary Medicine, University of Thessaly

Professor Ch. Billinis Faculty of Veterinary Medicine, University of Thessaly

Associate Professor I. Pappas Faculty of Veterinary Medicine, University of Thessaly

Assistant Professor A. Pexara Faculty of Veterinary Medicine, University of Thessaly

Lecture G. Filioussis Faculty of Veterinary Medicine, Aristotle University of Thessaloniki

## ABSTRACT

*Salmonella* spp. is one of the most important zoonotic pathogens. Human and animal salmonellosis remain a serious global problem, because of the direct economic costs resulting from morbidity and mortality, and, thus, the considerable losses in animal products. Within the species *Salmonella enterica* there are over 2,500 different serovars, many of which have great veterinary and medical significance, although they differ widely in their host range, within mammals and birds, and in the nature of disease that may cause. Most important are subclinically infected pigs, which represent the most likely route for *Salmonella* entering the food chain. These animals shed the microorganism into their environment, maintaining the infection in a farm by infecting pen mates. Thus, these animals should be targeted for successful control of infection, making surveillance of pig salmonellosis mandatory.

The aim of this thesis was to study the epidemiology of *Salmonella* spp. in Greek pig farms, in order to investigate the significance of pork for Public Health.

After extensive reviewing of the existing literature, the studying of pig salmonellosis focused at the slaughterhouse in an attempt to evaluate the role of carcass for Greek consumer infections.

Initially the infection was investigated serologically. Serum samples examined were from 314 sows and 374 finishing pigs. Thirty nine farms of unknown *Salmonella* spp. status and five geographic regions of Greece (Thessaly, Central Greece, N. Greece, Epirus, Crete) participated in the initial study. For the serological investigation a commercial indirect mix-ELISA kit (Herd-Check Swine Salmonella Antibody Test Kit, Idexx Laboratories, Inc., Maine, USA) was used.

The results showed that seropositivity was:

- Among sows: 81.53% with a cut off  $OD \geq 10\%$  and 20.38% with a cut off  $OD \geq 40\%$ .
- Among finishing pigs: 70.32% with a cut off  $OD \geq 10\%$  and 15.5% with a cut off  $OD \geq 40\%$ .
- Among farms: from 0-100% with a cut off  $OD \geq 10\%$  and 0-63.33% with a cut off  $OD \geq 40\%$ .

The seroprevalence of the 39 farms was dependent on the chosen cut off value of the ELISA. When the ELISA was compared with isolation, the best correlation was observed with an ELISA OD cut off value of 40%. Specifically, the Odds Ratio for a cut off value of 40% was OR 2.456 (1.004 – 6.007) (95% CI). Thus, an animal was 2.456 times more likely to be *Salmonella* spp. positive. The important role of sows in the maintenance of *Salmonella* spp. infection in a farm was statistically confirmed. The findings showed that with a cut off value of OD 40% the prevalence of *Salmonella* in sows and finishers was 20.38% and 15.5% respectively.

After the preliminary seroprevalence study, the isolation of the pathogen and its association with seropositivity was limited in the area of Thessaly, where the rates of seropositive farms ranged between 0-92.6% with a cut off  $OD \geq 10\%$  and between 0- 20% with a cut off  $OD \geq 40\%$ .

For the isolation and identification of the infecting serovars, the samples were examined following ISO 6579: 2002, Annex D for food and animal feeding stuffs (ISO 2002). Samples tested were lymph nodes, gallbladder, intestine, neck muscle and faeces from 123 carcasses of slaughtered pigs, representing 15 farms having approximately 2,500 finishers. Thus, about 5% of these animals were tested. Serum was also examined from each animal as described above. 615 tissue and faecal samples were cultured and 123 serum samples were tested for antibodies against *Salmonella* spp.

Additionally to the pig samples, 378 environmental samples from the surfaces of the slaughterhouses (swab samples) were examined, in order to investigate their role in the contamination of the carcasses.

The mean seroprevalence of these animals was overall 59.35% with a cut off  $OD \geq 10\%$  and 20.33% with a cut off  $OD \geq 40\%$ . The proportion of seropositive animals bacteriologically confirmed was 65.11% with a cut-off  $OD \geq 10\%$  and 30.23% with a cut-off  $OD \geq 40\%$ . As for sensitivity and specificity of the mix-ELISA bacteriologically confirmed it was statistically significant (95% CI) with a cut-off  $OD \geq 10\%$ . The bacteriological investigation with ISO 6579: 2002 recovered 265 Gram and oxidase negative isolates, belonging, thus, to the family of Enterobacteriaceae. These isolates were biochemically placed to species using the API 20E (Biomérieux, France) and Microgen™ GnA + B-ID (Microgen Bioproducts Ltd, UK) Systems. Of the 265 isolates

101 were identified as *Salmonella* spp. with these systems and were tested positive with a polyvalent slide agglutination test detecting O- and H- antigens, were sent to the Greek National Reference Laboratory (NRL -Chalkida) for specific serotyping. Among them were 15 biochemically identified as *S. enterica* subsp. *arizonae* and one as *S. enterica* subsp. *indica*. Of the remaining 82 isolates (55 from carcasses and 27 from the slaughterhouse environment) were fully serotyped and 4 were untypeable.

The serovars identified were the new emerging monophasic variants of *S. Typhimurium*, *S. enterica* subsp. *enterica* ser. 4,5, 12:i:- (16 isolates) και *S. enterica* subsp. *enterica* ser. 4,12:i:- (9 isolates), the monophasic *S. enterica* subsp. *enterica* ser. 6,7:k:- (7 isolates) and *S. enterica* subsp. *enterica* ser. 6,14,25:-:1,2 (one isolate) and the rarer serovars of subspecies *enterica* subsp. *diarizonae* 61:k:1,5, *S. enterica* subsp. *salamae* 38:b:1,2 and *S. enterica* subsp. *houtenae* 40:g,t:- (one isolate each). From the remaining isolates, 38 belonged to serovar Typhimurium and 12 to other serovars (*S. Bredeney* (3 isolates), *S. Agona*, *S. Derby*, *S. Infantis*, *S. Meleagridis*, *S. Cerro*). Although, serovar Typhimurium was the prevalent one (37.6%), the majority of the serovars were those considered emerging or "exotic" in terms of human salmonellosis.

In order to investigate antimicrobial resistance with regards to Public Health, the 101 isolates identified as *Salmonella* spp. with the API 20E, Microgen™ GnA+B-ID and serotyping were tested against 24 antimicrobial agents with the disk diffusion method. These agents were: amoxicillin (30 µg), amoxicillin/clavulanic acid (20/10µg), ampicillin (10 µg), ampicillin/sulbactam (10/10 µg), aztreonam (30 µg), cefotaxime (30 µg), cefoxitin (30 µg), ceftazidime (30 µg), ceftiofur (30 µg), ceftriaxone (30 µg), cefuroxime (30 µg), chloramphenicol (30 µg), colistin (50 µg), doripenem (10 µg), enrofloxacin (5 µg), erythromycin (15µg), gentamycin (10 µg), kanamycin (30 µg), nalidixic acid (30 µg), penicillin G (10 µg), rifampin (30 µg), sulfamethoxazole/trimethoprim (23.75/1.25 µg), tetracycline (30 µg) and tigecycline (15 µg).

The findings showed high resistance to penicillin G (10 mg) (93%), rifampin (30 micrograms) (75.24%), tetracycline (30 ug) (68.31%), sulfamethoxazole / trimethoprim (23.75 / 1.25 g) (61.38%), ampicillin (10 ug) (54.45%), amoxicillin (30 mg) (53.46%)

and smaller to chloramphenicol (30 ug) (22.77%), kanamycin (30 g) (14.85%) and colistin (50 mg) (11.88%).

Due to the observed high resistance to commonly used antimicrobials, the antimicrobial activities of oregano, rosemary and thyme Essential Oils (EOs) were investigated at three graded undiluted concentrations (5, 15, 30  $\mu$ l). Fifty nine *Salmonella* spp. isolates, showing multiple resistance were tested. Strong inhibitory effect was observed with oregano and thyme EOs, even for the amount of 5  $\mu$ l, although without a statistically significant difference between them. The rosemary essential oil exhibited the least activity in relation to the oregano and thyme EOs. Comparison of the antibacterial effects of these EOs with commonly used antimicrobials (tetracycline, amoxicillin, ampicillin, sulfamethoxazole/trimethoprim) for the same strain revealed that the EOs have a better effect in controlling *Salmonella*, independent of the level of resistance to antibiotics.

The results showed that pigs in Central Greece were infected by at least 14 different serovars. The large number of different serovars and the presence of important newly emerging ones is the first time observed in Greece.

Thus, it can be concluded from the results of this investigation, that pork meat is a major source of human salmonellosis, not only for ordinary serovars, but also for newly emerging ones, showing, also, high resistance to commonly used antimicrobials. Additionally, the evidence showed that for the conditions in Thessaly the risk for man comes from the individual animal carrying the pathogen to its tissues and not from carcass cross-contamination during slaughtering. Hence, risk reactions for the region of Thessaly should be focused on reducing individual pig infection.

When investigating the above, some difficulties were encountered in the isolation and biochemical characterization of enterobacteria. They need mention, because they affect the final determination of positivity and serovar prevalence. Among these were the presence of lactose-positive salmonellae, the sensitivity problems of the used media and the role of H<sub>2</sub>S in the recovery of *Salmonella* spp. from animals. These problems affect negatively the precise determination of carcass contamination rate, thus the size of the risk of pork meat for the consumer.

This study showed the need for continuous monitoring of the pathogen's prevalence in Greek pig farms, using tissue samples and not only faeces, due to the pathogen's tissue tropism. It also became apparent that reliable systematic study of pig salmonellosis depends on staff well trained in bacteriology, thus, capable of identifying atypical strains escaping the internationally proposed methods.



# **ΚΕΦΑΛΑΙΟ 1**

## **ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΚΗ ΑΝΑΣΚΟΠΗΣΗ**

## 1.1 ΤΟ ΓΕΝΟΣ *Salmonella*

### 1.1.1 Ιστορική αναδρομή της ονοματολογίας του γένους *Salmonella*

Το γένος *Salmonella* ανήκει στην οικογένεια των Εντεροβακτηριοειδών και αποτελεί σημαντικό παθογόνο παράγοντα τόσο για τον άνθρωπο, όσο και για τα ζώα. Ο μικροοργανισμός μελετάται συστηματικά για περισσότερα από 100 χρόνια, αλλά ακόμη και σήμερα πολλά χαρακτηριστικά του παραμένουν άγνωστα και είναι υπό διαρκή διερεύνηση. Το όνομά του αποδόθηκε στον Daniel Elmer Salmon, έναν Αμερικανό κτηνίατρο παθολογοανατόμο, ο οποίος με τον συνεργάτη του, τον Theobald Smith, απομόνωσαν για πρώτη φορά την '*Salmonella choleraesuis*' από το έντερο του χοίρου το 1884 και πρότειναν τον μικροοργανισμό αυτό ως τον αιτιολογικό παράγοντα της «χολέρας» του χοίρου (Salmon, 2015). Ο μικροοργανισμός, αποδείχθηκε στη συνέχεια ότι σπανίως προκαλεί εντερική νόσο σε χοίρους, άρα δεν ήταν ο αιτιολογικός παράγοντας που αναζητούσαν. Ονομάστηκε αρχικά '*Bacillus choleraesuis*' και μετέπειτα μετονομάστηκε σε '*Salmonella choleraesuis*' από τον Γάλλο βακτηριολόγο Lignieres το 1900, ο οποίος πρότεινε ότι ο συγκεκριμένος μικροοργανισμός έπρεπε να ονομαστεί '*Salmonella*' προς τιμήν του Salmon (The Salmonella Subcommittee of the Nomenclature Committee of the International Society for Microbiology 1934). Το 1900, το γένος '*Salmonella* Liengieres 1900' περιελάμβανε μια ομάδα Gram (-) βακτηρίων, στην οποία συνεχώς προστίθενταν καινούργια μέλη, τα οποία σχετιζόνταν με ποικίλες κλινικές καταστάσεις, γεωγραφικές περιοχές και ζωικά είδη. Μεταξύ αυτών ήταν τα '*Bacillus typhimurium*, *Bacillus typhi*, *Bacterium paratyphi*, *Bacillus enteritidis*, *Bacillus choleraesuis*' (Brown 1935).

Έκτοτε, χάρη στο αμείωτο ενδιαφέρον διερεύνησης κλινικών περιστατικών προέκυψε η ανάγκη ταξινόμησης των μελών του γένους *Salmonella*. Ξεκινώντας από την οροταυτοποίηση, η διάκριση των μελών του γένους γινόταν με βάση την ταυτοποίηση των σωματικών (O) αντιγόνων και των αντιγόνων των μαστιγίων (H) (White 1926). Αυτό το σύστημα της οροταυτοποίησης, που ξεκίνησε από τον White το 1926 (White 1926) και επεκτάθηκε από τον Kauffmann, είχε ως αποτέλεσμα την περιγραφή ενός μεγάλου αριθμού οροτύπων. Μάλιστα ο Kauffmann πίστευε ότι κάθε ορότυπος μπορούσε να θεωρείται ως ξεχωριστό είδος (Kauffmann 1966). Αυτή η ταξινόμηση

εφαρμόστηκε μετά το 1966 και είχε ως αποτέλεσμα την αναγνώριση πολλών ειδών του γένους *Salmonella*, που αν επικρατούσε και σήμερα ο αριθμός των ειδών του γένους θα ξεπερνούσε τις 2.600. Αντίθετα, πριν το 1966, σε στελέχη του γένους *Salmonella* που απομονώνονταν από διαφορετικά κλινικά περιστατικά, δίνονταν συγκεκριμένα ονόματα είτε σύμφωνα με την ασθένεια που προκαλούσαν (*S. typhi*, *S. typhimurium*, *S. enteritidis*), είτε ανάλογα με το ζώο από το οποίο απομονώθηκε ο μικροοργανισμός (*S. gallinarum*, *S. abortusovis*, *S. choleraesuis*), είτε τέλος ανάλογα με τη γεωγραφική τοποθεσία από όπου πρωταπομονώθηκε το στέλεχος (*S. london*, *S. panama*) (The Salmonella Subcommittee of the Nomenclature Committee of the International Society for Microbiology 1934). Τα ονόματα αυτά είχαν υιοθετηθεί ευρέως και χρησιμοποιούνταν για πολλές δεκαετίες, γι' αυτό και δεν τροποποιήθηκαν με βάση το νέο σύστημα της αντιγονικής σύνθεσης.

Η μεγάλη πληθώρα των ονομάτων, η οποία τελικά αποτελούσε εμπόδιο στην προσπάθεια αναγνώρισης της σημασίας αυτού του μικροοργανισμού για τη Δημόσια Υγεία, κατέδειξε την ανάγκη μείωσης της πληθώρας των «ειδών» του γένους *Salmonella* και απλοποίησης της ταξινόμησής του αρχικά σε τρία είδη: *S. choleraesuis* (για το είδος αναφοράς), *Salmonella typhosa* (παλαιότερα γνωστή ως *typhi*) και *Salmonella kauffmannii*, το οποίο αργότερα μετονομάστηκε σε *Salmonella enteritidis* (Borman et al. 1944, Ewing 1972). Μία ακόμη από τις αλλαγές που έγιναν στην ονομασία των ειδών ήταν και η διαίρεση του γένους σε υπογένη (Kauffmann 2009), στα οποία προστέθηκε και το γένος *Arizona* ως υπογένο III του γένους *Salmonella* (Crosa et al. 1973, Rohde 1979, Tindal et al. 2005).

Ορόσημο στην προσπάθεια ταξινόμησης του γένους *Salmonella* αποτέλεσε το 1973 η μελέτη της θερμικής σταθερότητας του υβριδισμένου DNA- DNA του γένους, η οποία έδειξε ότι τα «είδη» που ονομάστηκαν κατά τη διάρκεια της ιστορίας της μελέτης του μικροοργανισμού και των οροτύπων του, θα μπορούσαν να αποτελέσουν «ένα είδος» (Crosa et al. 1973). Έτσι, η πρώτη έκδοση των Εγκεκριμένων Βακτηριακών Ονομάτων (Approved Bacterial Names), μετά την μοριακή ταυτοποίηση του γένους, περιελάμβανε πέντε είδη. Αυτά ήταν τα *S. arizone*, *S. choleraesuis*, *S. enteritidis*, *S. typhi* και *S. typhimurium* (Skerman et al. 1980).

Οι συχνές διαφωνίες ως προς την ονοματολογία, οδήγησαν την «Επιτροπή Κρίσεων» (Judicial Commission) στη δημοσίευση της Απόφασης 80 (“Judicial Opinion 80”). Με την Απόφαση 80 η Επιτροπή συμφώνησε ότι από το 2005 και μετά το όνομα του στελέχους αναφοράς [type strain (LT2<sup>T</sup>)] θα πρέπει να είναι το *Salmonella enterica* (Euzéby 1999). Με την Απόφαση 80 η Επιτροπή αποδέχτηκε ότι το γένος *Salmonella* αποτελείται από δύο είδη, τα *S. bongori* και *S. enterica* (είδος αναφοράς), και έξι υποείδη τα οποία ανήκουν στο είδος *S. enterica* (Judicial Commission of the International Committee on Systematic Prokaryotes 2005). Το όνομα κάθε υποείδους διαμορφωνόταν από το όνομα του είδους αναφοράς, ακολουθούμενο από τα επίθετα *arizonae*, *diazarizonae*, *enterica*, *houthenae*, *indica* και *salamae*. Μέχρι να δημοσιευθεί επισήμως αυτή η άποψη ένα τρίτο είδος, το *Salmonella subterranean* (Shelobolina et al. 2004), περιελήφθη στον εγκεκριμένο κατάλογο του 2005. Όμως το τρίτο είδος τοποθετήθηκε, πρόσφατα, μοριακά πλησιέστερα στην *Escherichia hermannii* (Euzéby 2010) και όχι στο γένος *Salmonella*, δημιουργώντας πιθανώς την ανάγκη για την θέσπιση νέων κανόνων και νέου καταλόγου ονομάτων.

### 1.1.2 Το σημερινό σύστημα ταξινόμησης - ονοματολογίας του γένους *Salmonella*

Η Απόφαση 80, ωστόσο, δεν απέρριψε τον προηγούμενο κατάλογο των εγκεκριμένων ονομάτων για το γένος *Salmonella*. Αυτό είχε ως αποτέλεσμα τη δημιουργία ενός καταλόγου, ο οποίος συνδυάζει και τα δύο συστήματα ονοματολογίας (πριν και μετά το 2005). Γι’ αυτό, ο σημερινός κατάλογος Εγκεκριμένων Βακτηριακών Ονομάτων της «Επιτροπής Κρίσεων» (LPSN 2015) περιλαμβάνει εννέα είδη και 14 υποείδη. Τα είδη που καταγράφονται είναι τα *S. arizonae*, *S. bongori*, *S. choleraesuis*, *S. enterica*, *S. enteritidis*, *S. paratyphi*, *S. subterranean*, *S. typhi* και *S. typhimurium*. Τα υποείδη είναι είτε τα *S. choleraesuis* ακολουθούμενα από τα επίθετα *arizonae*, *bongori*, *choleraesuis*, *diazarizonae*, *houthenae*, *indica*, *salamae* ή τα *S. enterica* ακολουθούμενα από τα παραπάνω επίθετα.

Βέβαια, γνωστά παγκοσμίως κέντρα παρακολούθησης και μελέτης λοιμωδών νοσημάτων εφαρμόζουν πλέον συστηματικά την Απόφαση 80. Ένα από αυτά είναι το CDC (Centers for Disease Control and Prevention), που βασισμένο σε συστάσεις του

WHO Collaborating Centre, περιλαμβάνει στο γένος *Salmonella* δύο είδη, *S. enterica* (είδος αναφοράς-type species) και *S. bongori* και στο είδος *S. enterica* έξι υποείδη: *S. enterica* subsp. *enterica* ή υποείδος I, *S. enterica* subsp. *salamae* ή υποείδος II, *S. enterica* subsp. *arizonae* ή υποείδος IIIa, *S. enterica* subsp. *diarizonae* ή υποείδος IIIb, *S. enterica* subsp. *houtanae* ή υποείδος IV και *S. enterica* subsp. *indica* ή υποείδος VI (Grimont & Weill 2007, Issenhuth- Jeanjean et al. 2014).

Η ταξινόμηση των ανωτέρω γίνεται σύμφωνα με το Σχήμα των White-Kauffmann-Le Minor, βάσει των σωματικών αντιγόνων (O), των αντιγόνων μαστιγίου (H) και των αντιγόνων κάψας (Vi). Οι διάφορες αλληλεπιδράσεις των αντιγόνων αυτών με συγκεκριμένα αντισώματα καθορίζουν την πληθώρα των οροτύπων του γένους.

Αξιοσημείωτο είναι ότι, το 99,5% του συνόλου των απομονωθέντων στελεχών *Salmonella* ανήκει στο υποείδος *S. enterica* subsp. *enterica*. Οι ορότυποι αυτοί απαντώνται τόσο στα θερμόαιμα, όσο και στα ψυχρόαιμα ζώα, ενώ οι υπόλοιποι ορότυποι (άλλα υποείδη) συνδέονται κυρίως με τα ψυχρόαιμα ζώα. Οι ορότυποι του υποείδους *enterica*, είχαν πριν το 1966 ονόματα, τα οποία σχετίζονταν με συγκεκριμένη νόσο ή ξενιστή ή δήλωναν τη γεωγραφική προέλευση του οροτύπου. Επειδή δε είχαν **λανθασμένα** αποδοθεί απο τον Kauffmann σε είδη γραφόταν με πλάγια γραφή. Γι' αυτό για ιστορικούς λόγους, οι ορότυποι αυτοί διατήρησαν το όνομα που τους είχε δοθεί πριν το 1966 και δεν αναφέρονται με βάση την αντιγονική τους σύνθεση, αλλά διακρίνονται από τον τρόπο γραφής τους (Grimont & Weill 2007).

Δηλαδή, για την αποφυγή σύγχυσης ανάμεσα στους οροτύπους και τα είδη, το όνομα του οροτύπου αρχίζει με κεφαλαίο γράμμα και δεν γράφεται με πλάγια γραφή. Την πρώτη φορά που αναφέρεται, το όνομα του γένους ακολουθείται από τη λέξη «serovar» (ή την συντόμευση “ser” ) και μετά ακολουθεί το όνομα του οροτύπου, π.χ. *Salmonella enterica* subsp. *enterica* ser. Choleraesuis. Έτσι, αποφεύγεται η σύγχυση και η αντιμετώπιση των οροτύπων ως είδη (Agbaje et al 2011). Στις επόμενες αναφορές το όνομα μπορεί να απλοποιηθεί. Δηλαδή το όνομα του γένους μπορεί να ακολουθείται απ' ευθείας από το όνομα του οροτύπου, π.χ. *Salmonella* Choleraesuis (Grimont & Weill 2007).

Για εκείνα τα υποείδη που καθορίζονται από τον αντιγονικό τους τύπο, το όνομα του υποείδους γράφεται με λατινικούς χαρακτήρες (II-VI) (όχι πλάγια γραφή) και

ακολουθεί ο αντιγονικός τύπος που περιλαμβάνει τα σωματικά (O) αντιγόνα, τα αντιγόνα μαστιγίου (H) φάσης 1 και τα αντιγόνα μαστιγίου (H) φάσης 2, αν υπάρχουν. Άνω και κάτω τελεία παρεμβάλλεται ανάμεσα από κάθε αντιγόνο, π.χ. *Salmonella* serovar Π 39:z10:z6. Για τους οροτύπους του είδους *Salmonella bongori* (παλαιότερα ανήκε στο υπογένος V), το V χρησιμοποιείται ακόμα για λόγους πρακτικής, π.χ. *S.* V 13,22:z35:- (Popoff 2004).

Υπεύθυνο για τη συνεχή ανανέωση του Σχήματος των White- Kauffmann-Le Minor είναι το Κέντρο Συνεργασίας Αναφοράς και Έρευνας του γένους *Salmonella* του Παγκόσμιου Οργανισμού Υγείας στο Ινστιτούτο Pasteur στο Παρίσι (the WHO Collaborating Centre for Reference and Research on *Salmonella*).

Οι υποενότητες 1.1.1 και 1.1.2 περιγράφονται αναλυτικά στις εργασίες:

1. Evangelopoulou GD, Burriel AR, Spyrou V. 2010. **A concise history of *Salmonella* spp. nomenclature.** Journal of the Hellenic Veterinary Society 61(4), 323-329.
2. Ευαγγελοπούλου Γ.Δ., Γκόβαρης Α., Κρήτας Σ., Μπουριέλ Α. 2012. **Το σημερινό σύστημα ταξινόμησης του γένους *Salmonella* και οι επιπτώσεις του στον έλεγχο των λοιμώξεων.** (Πανελλήνιο Συνέδριο Κρέατος MEAT DAYS 2012- Το Κρέας και τα Προϊόντα του «Από το στάβλο στο Πιάτο»- Αθήνα 29,30 Σεπτεμβρίου- 1 Οκτ 2012). σελ 502-510.
3. Evangelopoulou G, Kritas S, Govaris A, Burriel AR. 2014. **A Brief Account of the Rules Applied to the Naming and Epidemiologically Grouping *Salmonella* Strains when Isolated from Animals.** Journal of Medical Sciences 14(3), 101-107. DOI: 10.3923/jms.2014.101.107

## A concise history of *Salmonella* spp. nomenclature

Evangelopoulou G. D., DVM<sup>1</sup>, Burriel A., DVM, MSc, MSc, PhD<sup>2</sup>, Spyrou V., DVM, PhD<sup>3</sup>

<sup>1</sup> Kolokotroni 47, Mandra Attikis 196 00, Athens, GR

<sup>2</sup> Faculty of Veterinary Medicine, University of Thessaly, Trikalon 224, Karditsa 43100, GR

<sup>3</sup> Department of Animals Production, Technological Education Institution, 41110, Larissa, GR

## Μια συνοπτική ανασκόπηση της ιστορίας της ονοματολογίας του γένους *Salmonella*

Γ. Δ. Ευαγγελοπούλου, DVM<sup>1</sup>, Burriel A., DVM, MSc, MSc, PhD<sup>2</sup>, Β. Σπύρου, DVM PhD<sup>3</sup>

<sup>1</sup> Κολοκοτρώνη 47, Μάνδρα Αττικής 196 00

<sup>2</sup> Τμήμα Κτηνιατρικής, Τρικάλων 224, Καρδίτσα 431 00

<sup>3</sup> Τμήμα Ζωικής Παραγωγής, ΤΕΙ Θεσσαλίας, Λάρισα 411 10

**ABSTRACT.** The history of typing strains of the genus *Salmonella* is a matter, perhaps, causing anxiety to those choosing to do research with this microorganism. The nomenclature and taxonomy of microorganisms of great Public Health importance, such as *Salmonella*, are causing proliferation of opinions and information representing various "schools of thought". They produce a difficult to manage bulk of scientific information, eventually deterring inexperienced newcomers in this field of research. In overcoming this confusing proliferation of information, international bodies, having the responsibility of summarizing and officializing available knowledge, publish regularly "landmark decisions" on nomenclature and taxonomy. The present concise review of the history of *Salmonella* nomenclature aims in guiding the inexperienced researchers studying salmonellosis in animals and man toward the sources of accurate information.

**Keywords:** nomenclature, *Salmonella*, history

**ΠΕΡΙΛΗΨΗ.** Η ταυτοποίηση και ονοματολογία στελεχών του γένους *Salmonella* είναι ένα πολύπλοκο θέμα. Γενικότερα, η μεγάλη ερευνητική δραστηριότητα για τους μικροοργανισμούς που αφορούν τη δημόσια υγεία έχει ως αποτέλεσμα τη συσσώρευση επιστημονικών δεδομένων, η διαχείριση των οποίων συχνά είναι δύσκολη. Για το λόγο αυτό, οι διεθνείς οργανισμοί οι οποίοι ασχολούνται με την ταξινόμηση και ονοματολογία των μικροοργανισμών, σε τακτά χρονικά διαστήματα επαναπροσδιορίζουν τα κριτήρια με βάση τα οποία γίνεται η ταξινόμηση και η ονοματολογία τους. Στην παρούσα εργασία γίνεται μια σύντομη ανασκόπηση της ιστορικής διαδρομής της ονοματολογίας του γένους *Salmonella* με στόχο την κατανόηση της πληθώρας των πληροφοριών που αφορούν την ονοματολογία του συγκεκριμένου γένους.

**Λέξεις ευρετηρίασης:** ονοματολογία, *Salmonella*, ταξινόμηση

**Correspondence:** Burriel A.  
Faculty of Veterinary Medicine, University of Thessaly, Trikalon 224, Karditsa 43100, GR  
Tel.: +30-24410-66088, +30- 6972314842, e-mail: aburriel@vet.uth.gr

**Αλληλογραφία:** Burriel A.  
Τμήμα Κτηνιατρικής, Τρικάλων 224, Καρδίτσα 431 00  
Τηλ.: +30-24410-66088, +30- 6972314842, e-mail: aburriel@vet.uth.gr

**Submission date:** 03.12.2010  
**Approval date:** 31.01.2011

**Ημερομηνία υποβολής:** 03.12.2010  
**Ημερομηνία εγκρίσεως:** 31.01.2011



### Introduction

The genus *Salmonella* is one of the most pathogenic members of the family of Enterobacteriaceae for man and animals. Many of its serotypes cause typhoid fever and severe diarrhea in man and a range of signs varying from subclinical to severe clinical enteric disease in animals (Acheson and Keusch 1997, Kuhns 2010). Salmonellosis is a foodborne infection, thus infected food producing animals are a health hazard requiring surveillance (SANCO 2009). Due to the microorganism's pathogenicity for man, it is systematically studied for more than 100 years by a plethora of scientists around the world, but, still today, many of its pathogenic characteristics are unknown.

The genetic base of *Salmonella* pathogenicity is better understood nowadays, since molecular methods are applied for studying the pathogen (Lim et al. 2005, Falush et al. 2006). These methods, in addition to associating the various isolated strains with the animal host or the type of clinical disease, have improved the existing knowledge on typing of the microorganism. They have not, however, given a definite answer to the many conflicting opinions continuously published on the nomenclature and taxonomy of the genus *Salmonella*. The lengthy and vigorous study of the genus *Salmonella* should have clarified these conflicting points, but, on the contrary, it further confuses those studying *Salmonella* spp. Thus, it is little help for the inexperienced scientists in appropriately reporting their research or clinical findings. The bulk of information, the many versions of "correct opinions", newer and older methods employed simultaneously, the choices of acclaimed agencies and laboratories and the difficulties of most of the others to follow their methodology, have been still confusing. Therefore, a concise review of this history could help them be encouraged when they are studying the microbe's pathogenicity and not its nomenclature or taxonomy. It could, also, provide them with a "friendly list" of sources to start their understanding of the confusing history of *Salmonella* spp. nomenclature. The search of the electronic databases on *Salmonella* and salmonellosis is another deterrent due to the bulk of information that is available, many times badly interpreted or referred to. Conflict and confusion for typing *Salmonella* spp. is the true history of an interesting and important microorganism.

### Conflict and confusion for typing an important microorganism

The genus *Salmonella*, widely recognized as one group of microorganisms having worldwide importance, is the "star germ" for scientists arguing about bacterial nomenclature and taxonomy. The experts in microbiology propose, suggest, adopt and ignore opinions, perhaps, little thinking about those who will eventually have to use the names proposed, when reporting the possible causes of an observed clinical condition.

Organizations, such as the World Health Organization (WHO), the Centers for Disease Control (USA) and others (Internet sites, 2010), systematically inform scientists and the public about the conditions, pre-existing and newly described, caused by members of the genus *Salmonella*, but little information is given about the rules used in the typing of the cause.

Thus, older clinicians (medical doctors and veterinarians) report their work typing salmonella members in the way they are accustomed to, while their younger colleagues may find themselves struggling to understand what should be the official, thus the most appropriate, method of typing members of the genus *Salmonella*.

If their work is rejected for publication or severely criticized "for lack of current knowledge" about the nomenclature and taxonomy of *Salmonella* spp., they are discouraged to further pursue bacteriology, an already difficult field of microbiology. In the present short review, the aim is to give a reliable summary of the ongoing discussion of experts proposing names, species and schemes concerning the genus *Salmonella* from the point of view of an inexperienced scientist. It is hoped that the discussion will help young scientists and enthusiastic starting researchers understand how opinions influence science, if they are not indisputably proven as true or when they disregard the difficulties of many others around the world in adopting their suggestions. The history of the genus *Salmonella* is realistically reflecting the imposed scientific ambition, rather than the practical knowledge useful to everyone (clinicians and researchers).

### Typing of a newly isolated microorganism

In 1884, T. Smith, a highly acclaimed veterinarian (Brown 1935) working as a young scientist for the



Bureau of Animal Industry, Department of Agriculture, USA isolated from the intestine of a dead pig a "bacterium", which he thought was the cause of hog cholera (Smith 1894). Dr. Smith was at the time supervised by Dr. Salmon, also an acclaimed veterinarian of this time and a pioneer in animal disease control (Salmon 2010). The isolate of the two veterinarians was initially named "Bacillus cholerae suis", but in 1900 it was erected to the status of a genus by the French bacteriologist Liengieres with the name "*Salmonella*" (The Salmonella Subcommittee of the Nomenclature Committee of the International Society for Microbiology 1934). The name, given in favor of Dr. Salmon by the chief of the Bureau of Animal Industry, is shadowing the contributions of the young scientist Dr. Smith, but, it is, also, reflecting the conflicts and ambitions of those working in pioneering fields of human and animal diseases. The genus *Salmonella* is a very large group of important microorganisms, clearly showing the reasons why a proliferation of opinions is characterizing all microorganisms of increased Public Health importance.

In 1900, the genus *Salmonella* Liengieres 1900 included a group of Gram (-) bacteria among which the best known are *Bacillus typhi-murium*, *Bacillus typhi*, *Bacterium paratyphi*, *Bacillus enteritidis*, *Bacillus cholerae-suis* (Brown 1935). However, the importance of this group of bacteria was increasing, as the reports with information relating them to a variety of clinical conditions, locations and animal species were increasing, coming from scientists working in the field of infectious diseases.

The 1st Congress of the International Society for Microbiology in 1930 was a landmark for the genus *Salmonella* Liengieres 1900. Shortly after this first congress, the nomenclature committee of the society formed a subcommittee having the responsibility to give answers to questions concerning the taxonomy and nomenclature of the genus *Salmonella* Liengieres 1900 (The *Salmonella* Subcommittee of the Nomenclature Committee of the International Society for Microbiology 1934). Among the members of the subcommittee was Dr Kauffmann from Denmark, the "father" of the many thousands of salmonella serotypes.

The subcommittee published in 1934 the first official list with approved names for the genus *Salmonella* Liengieres 1900. The principle of the list was based on the "Kauffmann-White Scheme", but it

was adhering as far as possible to the International Rules of Bacterial nomenclature. The Kauffmann-White Scheme is based on the presence or absence of specific antibodies against (O) and (H) antigens. (O) and (H) antigens were accidentally discovered in 1896 (Todar 2008, Euzeby 2010) and have been used since to group the genus *Salmonella*. The first officially reported list of groups of antigenically similar microorganisms using as differentiating characteristics the (O) and (H) antigens, divided the existing 44 species of *Salmonella* into five groups (The Salmonella Subcommittee of the Nomenclature Committee of the International Society for Microbiology 1934).

Since the publishing of this list, microbiologists have attempted to successfully group strains isolated from various sources, developing eventually a complicated system of naming isolates. The system initially based on the concept of disease, animal species and area of first isolation, was giving new names, thus the status of species, to phenotypically and antigenically different isolates. Names, such as *Salmonella typhi*, *Salmonella typhi-murium*, *Salmonella enteritidis*, *Salmonella gallinarum*, *Salmonella abortus-ovis*, *Salmonella Cholerae-suis*, *Salmonella london*, *Salmonella panama* and many others included in the first official list of salmonella names, became common and are still familiar to field veterinarians and doctors (The Salmonella Subcommittee of the Nomenclature Committee of the International Society for Microbiology 1934). Uninterrupted interest in the study of *Salmonella* serotyping increased further the number of species. The list of serotypes and species, becoming unmanageable for diagnosticians as early as in the 1940's, required a change. Thus, opinions were published proposing a different thinking on the naming of microorganisms, in general, and members of the family of *Enterobacteriaceae* in particular (Borman et al. 1944).

The scientific opinion of the time on the taxonomy and nomenclature of the genus of *Salmonella* was that the multitude of names was "a deterrent to the progress in the field of medical bacteriology and, particularly, to the recognition of the importance of these organisms in public health" (Borman et al. 1944). This opinion of Borman et al. (1944) is still held true today, although Opinion 80, issued by the Judicial Commission of the International Committee on Systematic Prokaryotes (Tindal et al. 2005), has officially restricted the proliferation of species, however it is not



reducing the number of serotypes or restricting the number of species on the approved list of bacterial names (Euzeby 2010, Approved Lists of Bacterial Names 2010, Bacterial Nomenclature up-to-date: Approved List, Validation List 2010) to only two, as proposed by Opinion 80.

Borman et al. (1944), in criticizing the proliferation of names within the genus *Salmonella*, proposed the concept of the “few species” within which all other species and serotypes should be placed.

#### The concept of the few species

Borman et al (1944) proposed three species receiving the names *S. choleraesuis* for the type species, *Salmonella typhosa* (previously known as typhi) and *Salmonella kauffmannii*. The names were suggested only as the base for further knowledge on the concept of few species within the genus *Salmonella*, thus, they were, to the opinion of some, arbitrarily given (Kauffmann and Edwards 1952). *S. kauffmannii*, proposed in honor of the contributions of Dr. Kauffmann, was perhaps, an attempt to soothe the sharp criticism expressed on his contribution to the unmanageable proliferation of species within the genus *Salmonella* (Borman et al. 1944). *S. kauffmannii* was proposed to include all the known serotypes, the product of Dr Kauffmann's scientific opinion (The Salmonella Subcommittee of the Nomenclature Committee of the International Society for Microbiology 1934).

Of course, proposals are useful, when scientific achievement is not overshadowing the need for practical thinking. Thus, practical “opinions” take time to mature, especially if a field is marked by the presence of scientists that are considered pioneers in their field, and *Salmonella* is still suffering the consequences of early pioneering opinion. However, the reduction in the number of species was becoming increasingly appealing, even to those working vigorously for many decades on the concept of the many species, like Dr. Kauffmann and his team. They, remaining firm in their concept of diagnostically serotyping salmonella, had early recognized the need of sub-grouping the genus of *Salmonella* and their thoughts were reflected in the first official list of species published in 1934 (The *Salmonella* Subcommittee of the Nomenclature Committee of the International Society for Microbiology 1934). This list had divided *Salmonella* species and serotypes into five relative groups.

Decades later, Kauffmann and his team remained firm on the correctness of their method of serotyping salmonella, but they softened their approach to the concept of the three species (Kauffmann and Edwards 1952). In an attempt to appear as having their opinion on the matter, but not accepting earlier suggestions without objections, they proposed a biomedical scheme of grouping the recognized species of the genus *Salmonella* into three species, giving them the names *S. choleraesuis*, *Salmonella typhosa* and *Salmonella enterica*. This concept of dividing the genus was held valid to the 1970's, when molecular typing became the new tool of research on strains isolated from clinical cases (Crosa et al. 1973). However, although molecular methods genetically relate isolates, they have not yet resolved the confusion created by the many *Salmonella* species and serotypes (Approved Lists of Bacterial Names 2010; Bacterial Nomenclature up-to-date: Approved List, Validation List, 2010, Euzeby 2010).

Thus, earlier opinions, held and based on less objective methods of typing the genus *Salmonella*, continued to come back, further confusing instead of helping the new reader of nomenclature and taxonomy for the genus. Between changes in the names of species, some proposed the division of the genus into sub-genuses or sub-genera (Kauffmann 2009). This grouping of the genus of *Salmonella* followed earlier concepts of grouping the known species and serotypes (The Salmonella Subcommittee of the Nomenclature Committee of the International Society for Microbiology 1934), eventually including the genus *Arizona*, too (Kauffmann 1960, Crosa et al. 1973, John Lindquist, 2010) having one species, the species *Arizona hunshawii* (Ewing 1969). The genus *Arizona* has some atypical similarities with the genus *Salmonella*, eventually becoming sub-genus III of the genus of *Salmonella* (Crosa et al. 1973, Rohde 1979, Tindal et al. 2005). The division of the genus into sub-genuses did not stop proliferation of new serotypes, but it had successfully stopped proliferation of species.

By 1973, when the first major molecular typing of *Salmonella* was attempted scientists were reporting results on the concept of three species, which had become *S. cholerae-suis*, *S. typhi* and *Salmonella enteritidis* (Ewing 1972). However, molecular typing of the genus showed that the species named during the history of studying the microorganism and its serotypes



could possibly form “one species” (Crosa et al. 1973). This discovery challenged for the first time both trends of thought; the early concept that each serotype was one species (The *Salmonella* Subcommittee of the Nomenclature Committee of the International Society for Microbiology 1934) and the concept of few species (Borman et al. 1944).

#### The principle of the “one species”

The molecular typing of Salmonellae in the 1970's (Crosa et al. 1973) had started a new thinking on the nomenclature and taxonomy of this group of bacteria, but like all new methods, it was not yet fully challenged for its correctness. Thus, the first publishing of the Approved Bacterial Names, after molecular typing of the genus, continued to include five species. They were *S. arizone*, *S. choleraesuis*, *S. enteritidis*, *S. typhi* and *S. typhimurium* (Skerman et al. 1980). The observed diversity in opinion between those naming microorganisms and those seeking scientific proof of assumed differences show the existing differences between the attitudes of taxonomists, those setting the rules of nomenclature, those studying pathogenicity and those involved in clinical work (Crosa et al. 1973, Lim et al. 2005, Falush et al. 2006).

Since the first publishing of the Approved Bacterial Names (The *Salmonella* Subcommittee of the Nomenclature Committee of the International Society for Microbiology 1934), regular updates are published based on the opinions of the subcommittee of the Nomenclature Committee of the International Society of Microbiology. All proposals concerning changes in the taxonomy and nomenclature of bacteria are addressed to them for an official consideration. One such request for an opinion on acceptance of the principle of “one species” was made by LeMinor et al. (1982) many years after the first molecular typing of the genus (Crosa et al. 1973, Le Minor et al. 1982). They proposed to keep the name *S. choleraesuis* for the type species (Le Minor and Popoff, 1987), further dividing it into six sub-species named *S. choleraesuis* subsp *choleraesuis*, *S. choleraesuis* subsp *salamae*, *S. choleraesuis* subsp *arizone*, *S. choleraesuis* subsp *diarizonae*, *S. choleraesuis* subsp *hountanae* and *S. choleraesuis* subsp *bongori*. This proposal was also seeking an official opinion on the concept of sub-species within the genus. Their proposal was officially put in the Judicial Commission of the International

Committee of Systematic Bacteriology in 1987 together with a proposition to officially reduce the sub-genuses (I, IIa, IIIb, IV, V and VI) to the status of sub-species (I, IIa, IIIb, IV, V and VI). However, their request was rejected by the Judicial Commission on the assumption that such changes could eventually erase from memory the importance of serotype *S. typhi* (Wayne 1991). In addition, their proposal was invalidated as soon *S. choleraesuis* subsp *bongori* was described as a separate species taking the name *Salmonella bongori* (Reeves et al. 1989).

Almost simultaneously, the subcommittee of *Enterobacteriaceae*, which is a Member of the International Committee on Systematic Bacteriology, proposed, in the XIV International Symposium of Microbiology, the re-naming of the type species giving it the name *Salmonella enterica* (Penner 1988). The name “enterica” was proposed because it had not been previously used as a name of a serotype, thus it was less confusing compared to the name *S. choleraesuis*, appearing at times as species and at other times as a serotype. This proposal was, also, rejected, but the efforts to overcome judicial concerns continued (Euzéby 1999). This new proposal was seeking an exemption for serotype *S. typhi*, requesting its elevation to the status of species due to its clinical importance. The frequent requests of an opinion lead the Judicial Commission to publish the “Judicial Opinion 80”. With Opinion 80, the Commission agreed that from 2005 and thereafter, the name of the type strain (LT<sup>27</sup>) should be *Salmonella enterica* replacing the name *S. choleraesuis* (Euzéby 1999). The Commission issued explanations to bacteriologists on support of the change in the name and the taxonomy of *Salmonella* spp. (Tindal et al. 2005). With Opinion 80 the Commission accepted that the genus *Salmonella* had two species, *S. bongori* and *S. enterica*, and six sub-species belonging to *S. enterica* (Judicial Commission of the International Committee on Systematic Prokaryotes 2005). The name of each sub-species was formed using the name of the type species followed by the epithets *arizonae*, *diarizonae*, *enterica*, *hountanae*, *indica* and *salamae*. By that time, this opinion was officially published, a third species was identified and included in the approved list of 2005. It was named *Salmonella subterranean* (Shelobolina et al. 2004), which is today molecularly placed closer to *Escherichia hermanni* (Euzéby 2010), probably, forcing soon a new ruling and a new list of names.

### The current types of *Salmonella* spp in published papers

Euzeby (2010), in his very informative and brief comment on the current standing of rules used in the nomenclature of *Salmonella* spp., clearly states that Judicial Opinion 80 (Judicial Commission of the International Committee on Systematic Prokaryotes 2005, Tindal et al. 2005) did not reject previous nomenclature. Thus, two systems of nomenclature are currently used. The one was validly published before 2005 and the other was published after 2005 and using the name *S. enterica* for the type strain. Thus, the current list of Approved Bacterial Names (Approved Lists of Bacterial Names 2010, Bacterial Nomenclature up-to-date: Approved List 2010), is the valid one. The most recent revision of it includes nine species and 14 sub-species. The species listed are *S. arizonae*, *S. bongori*, *S. choleraesuis*, *S. enterica*, *S. enteritidis*, *S. paratyphi*, *S. typhi* and *S. thyphimurium*. The sub-species are either *S. choleraesuis* followed by the epithets *arizonae*, *bongori*, *choleraesuis*, *diarizonae*, *houtenae*, *indica*, *salamae* or *S. enterica* followed by the above epithets.

The current list of Approved Bacterial Names appears as a compromise to all who historically influenced the names of the genus *Salmonella*. The number of species included on the list follows the early

concept of the few species (Borman et al. 1944). Although early molecular typing showed evidence that the concept of "one species" could be held valid to a point (Crosa et al. 1973), this concept cannot be scientifically sound for the present. Molecular methods have, like all methods, flaws because their results depend on the technique used and those working with the method (Crosa et al. 1973, Lim et al. 2005, Falush et al. 2006). Furthermore, before a very large data bank of genetic information is build and computerized, any new nomenclature received from molecular methods should be further examined.

Thus, they cannot be used reliably in taxonomy and nomenclature, but they should be considered important tools in relating isolates from different sources when epidemiological studies are conducted. In the case of *Salmonella* typing, they could eventually replace serotyping. In such a case, the complicated system of naming serotypes could be slowly replaced with an easier molecular system. If agencies and laboratories, such as the WHO, Centers of Disease Control and others, continue to serotype salmonella microorganisms rather than species or molecular types, the issue of *Salmonella* nomenclature and taxonomy will evolve in a confusing and complicated way, deterring the work of the inexperienced with the genus. ■

### REFERENCES

- Acheson DW and Keusch GT (1997) Intestinal infections with *Salmonella* and *Yersinia* species. In: LaMont JT editor. *Gastrointestinal Infections: diagnosis and management*. New York: Marcel Dekker Inc. pp 149-189.
- Approved Lists of Bacterial Names (Amended) 1989, American Society of Microbiology  
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/bookshelf/br.fcgi?book=bacname&part=A52> Accessed 7 July 2010
- [http://www.hpa.org.uk/infections/topics\\_az/salmonella/menu.htm](http://www.hpa.org.uk/infections/topics_az/salmonella/menu.htm)
- <http://www.hpazoonosesconference.org.uk/presentations/Salm%20TH.pdf>
- <http://www.medvetnet.org/cms/templates/doc.php?id=57>
- <http://www.defra.gov.uk/animalh/diseases/zoonoses/salmonella-control.htm>
- <http://www.niaid.nih.gov/factsheets/Salmonellosis.htm>
- [http://www.defra.gov.uk/animalh/diseases/vetsurveillance/az\\_index.htm#salmonella](http://www.defra.gov.uk/animalh/diseases/vetsurveillance/az_index.htm#salmonella)
- <http://www.nwph.net/NWZG/Lists/Diseases/DispForm.aspx?ID=28>, Accessed 7 July 2010
- Bacterial Nomenclature up-to-date: Approved List, Validation List, June (2010), DSMZ-Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH, Braunschweig, Germany  
[http://www.dsmz.de/microorganisms/bacterial\\_nomenclature\\_info.php?species=subterranea&bnu\\_no=780769#780769](http://www.dsmz.de/microorganisms/bacterial_nomenclature_info.php?species=subterranea&bnu_no=780769#780769) Accessed 7 July 2010
- Borman EK, Stuart CA, Wheeler K (1944) Taxonomy of the family Enterobacteriaceae. *J Bacteriol* 48:351-67.
- Brown JH (1935) Theobald Smith 1859-1934. *J Bacteriol* 30:1-3.
- Crosa JH, Brenner DJ, Ewing WH, Falkow S (1973) Molecular relationships among the salmonellae. *J Bacteriol* 115:307-15.
- Ewing WH (1969) Arizona Hinshawii comb nov. *Int J Syst Bacteriol* 1:1.
- Ewing HW (1972) The nomenclature of *Salmonella*, its usage and definitions of the three species. *Can J Bacteriol* 184:1303-1312.
- Euzeby JP (2010) List of Prokaryotic names with standing in nomenclature-Genus *Samonella*, [www.bacterio.cict.fr/s/salmonella.html](http://www.bacterio.cict.fr/s/salmonella.html), Accessed 7 July 2010.
- Euzeby JP (1999) Revised *Salmonella* nomenclature: designation of *Salmonella enterica* (ex Kauffmann and Edwards 1952) Le Minor and Popoff 1987 sp. nov., nom. rev. as the neotype species of the genus *Salmonella* Lignieres 1900 (Approved Lists 1980), rejection of the name *Salmonella choleraesuis* (Smith 1894) Weldin 1927 (Approved Lists 1980), and conservation of the name *Salmonella typhi* (Schroeter 1886) Warren and Scott 1930 (Approved Lists



- 1980). Request for an Opinion Int J Syst Bacteriol 49:927-930.
- Falush D, Torpdahl M, Didelot X, Conrad FD, Wilson JD (2006) Mismatch induced speciation in Salmonella: model data. Phil Trans R Soc B 361:2045-2053.
- Judicial Commission of the International Committee on Systematic Prokaryotes (2005). The type species of the genus Salmonella Lingnieres 1900 is Salmonella enterica (ex Kauffman and Edwards 1952) Le Minor and Popoff 1987, with type strain LT2T and conservation of the epithet enterica in Salmonella enterica over all earlier epithets that may be applied to this species. Opinion 80. Int J System Evol Microbiol 55: 519-520.
- John Lindquist University of Wisconsin-Madison, Bacteriology 102: Salmonella-General Aspects and Nomenclature. [www.splammo.net/bact102/102xsal.html](http://www.splammo.net/bact102/102xsal.html), Accessed 7 July 2010.
- Kauffmann F and Edwards RP (1952) Classification and Nomenclature of Enterobacteriaceae. Inter Bulletin 2: 2-8.
- Kauffmann F (2009) Two biochemical sub-divisions of the genus salmonella. Acta Paht. Microbiol Scand 49:393-396.
- Kuhns MD (2010) Salmonella Infections [www.history.army.mil/booksdocs/wwii/PM4/CH18.Salmonellal.htm](http://www.history.army.mil/booksdocs/wwii/PM4/CH18.Salmonellal.htm), accesses 6-7-2010.
- Lim H, Lee HK, Hong CH, Bahk GJ, Choi SW (2005) Comparison of four molecular methods for the differentiation of Salmonella spp. Inter J Food Microbiol 105: 411-418.
- Le Minor L, Veron M, and Popoff M (1982) A proposal for Salmonella nomenclature. Ann Microbiol 133:245-254.
- Le Minor L and Popoff MY (1987) Request for an opinion. Designation of Salmonella enterica sp. nov., nom. rev., as the type and only species of the genus Salmonella. Int J Syst Bacteriol 37:465-8.
- Penner JL (1988) International Committee on Systematic Bacteriology Taxonomic Subcommittee on Enterobacteriaceae. Int J Syst Bacteriol 8:223-4.
- Reeves MW, Evins GM, Heiba AA, Plikaytis BD, Farmer JJ III (1989) Clonal nature of Salmonella typhi and its genetic relatedness to other salmonellae as shown by multilocus enzyme electrophoresis and proposal of Salmonella bongori comb. nov. J Clin Microbiol 27:313-20.
- Rohde R (1979) Serological integration of all known Arizona-species into the Kauffmann-White-scheme (author's transl). Zentralbl Bacteriol Orig A Zentralbl Bacteriol Orig A. 243:148-76.
- Salmon D. E. [www.whonamedit.com/doctor/cfm/408.html](http://www.whonamedit.com/doctor/cfm/408.html), Accessed 7 July 2010.
- SANCO (2009) Directorate General for Health and Consumers (SANCO). Workshop on Salmonella Control in Pigs 26 February 2009 [http://ec.europa.eu/food/food/biosafety/salmonella/other\\_act\\_en.htm](http://ec.europa.eu/food/food/biosafety/salmonella/other_act_en.htm), November 2010.
- Shelobolina ES, Sullivan SA, O'Neill KR, Nevin KP, Lovley DR (2004) Isolation, characterization, and U(VI)-reducing potential of a facultatively anaerobic, acid-resistant bacterium from low-pH, nitrate- and U(VI)-contaminated subsurface sediment and description of Salmonella subterranean sp. nov. Appl Environ Microbiol 70:2959-2965.
- Skerman VBD, Mc Gowan V, Sneath PHA (1980) Approved list of bacterial names. Int J Syst Bacteriol 30:225-420.
- Smith T (1894) The hog-cholera group of bacteria. U.S. Bur Anim Ind Bull 6:6-40.
- Tindal JB, Grimont DAP, Garrity MG, Euzéby PJ (2005). Nomenclature and taxonomy of the genus Salmonella. Int J Syst Evol Microbiol 55:521-524.
- Todar K (2008) Salmonella and Salmonellosis. In: On line book of bacteriology <http://www.textbookofbacteriology.net/salmonella.html> Accessed 7 July 2010.
- The Salmonella Subcommittee of the Nomenclature Committee of the International Society for Microbiology (1934). The genus Salmonella Lingnieres 1900. J Hyg 34: 333-350.
- Wayne LG (1991) Judicial Commission of the International Committee on Systematic Bacteriology. Int J Syst Bacteriol 41:185-7.



Salmonella

## Το σημερινό σύστημα ταξινόμησης του γένους *Salmonella* και οι επιπτώσεις του στον έλεγχο των λοιμώξεων

Ευαγγελοπούλου Γ. Δ.<sup>1</sup>, Γκόβαρης Α.<sup>2</sup>, Κρήτας Σ.<sup>3</sup>, Μπουριέλ Α.<sup>4</sup>

<sup>1</sup>Υποψήφια Διδάκτωρ, Εργαστήριο Μικροβιολογίας και Παρασιτολογίας, Τμήμα Κτηνιατρικής, Σχολή Επιστημών Υγείας, Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας, Τρικάλων 224, ΤΚ 431 00, Καρδίτσα, E-mail:matinavet@hotmail.com

<sup>2</sup>Αναπληρωτής Καθηγητής, Εργαστήριο Υγιεινής Τροφίμων Ζωικής Προέλευσης, Τμήμα Κτηνιατρικής, Σχολή Επιστημών Υγείας, Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας, Τρικάλων 224, ΤΚ 431 00, Καρδίτσα

<sup>3</sup>Αναπληρωτής Καθηγητής, Εργαστήριο Μικροβιολογίας και Λοιμωδών Νοσημάτων, Κτηνιατρική Σχολή Α.Π.Θ., ΤΚ 541 24, Θεσσαλονίκη

<sup>4</sup>Καθηγήτρια, Εργαστήριο Μικροβιολογίας και Παρασιτολογίας, Τμήμα Κτηνιατρικής, Σχολή Επιστημών Υγείας, Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας, Τρικάλων 224, ΤΚ 431 00, Καρδίτσα

**Περίληψη:** Το γένος *Salmonella* είναι ένα από τα πιο παθογόνα μέλη της οικογένειας των Εντεροβακτηριοειδών για τον άνθρωπο και τα ζώα. Εξαιτίας της παθογόνου δράσεώς του στον άνθρωπο, ο μικροοργανισμός αυτός μελετάται συστηματικά για περισσότερα από 100 χρόνια από πλήθος επιστημόνων παγκοσμίως, αλλά ακόμη και σήμερα πολλά χαρακτηριστικά του παραμένουν άγνωστα και είναι υπό διαρκή διερεύνηση. Η ικανότητα αναγνώρισης των στελεχών ή της γενεαλογικής γραμμής των παθογόνων μικροοργανισμών, αποτελεί προϋπόθεση για την αντιμετώπιση πολλών ζητημάτων στην κλινική μικροβιολογία και την επιδημιολογία. Το σύστημα της οροταυτοποίησης, το οποίο συνεχώς ανανεώνεται καθώς αναδύονται καινούριοι ορότυποι, έχει δημιουργήσει με την πάροδο του χρόνου ένα σύνολο δεδομένων υψίστης σημασίας, που επιτρέπει την μακροπρόθεσμη επιτήρηση του γένους *Salmonella* στην τροφική αλυσίδα και συνεπακόλουθα και στη Δημόσια Υγεία. Ωστόσο, το παραδοσιακό σχήμα οροταυτοποίησης των White-Kauffmann-Le Minor αναγνωρίζεται παγκοσμίως ως ένα "χρυσό πρότυπο" για την ταξινόμηση των ειδών του γένους *Salmonella* από το επίπεδο του υποείδους και κάτω. Εξάλλου, το γενετικό υπόβαθρο της παθογένειας του μικροοργανισμού αρχίζει να αποκαλύπτεται στις μέρες μας με την χρήση των μεθόδων της μοριακής μικροβιολογίας. Οι μέθοδοι αυτοί, πέρα από την συσχέτιση των διαφόρων απομονωθέντων στελεχών με το ζώο-ξενιστή ή τον τύπο της κλινικής νόσου, έχουν βελτιώσει την ήδη υπάρχουσα γνώση της οροταυτοποίησης του μικροοργανισμού. Δεν έχουν δώσει, όμως, οριστική απάντηση στον μεγάλο αριθμό των αντικρουόμενων απόψεων που δημοσιεύονται συνεχώς, από τους διεθνείς οργανισμούς, οι οποίοι φέρουν την ευθύνη δημοσιοποίησης της υπάρχουσας γνώσης, σχετικά με την ονοματολογία και την ταξινόμηση του γένους *Salmonella*. Έτσι, ο τρόπος με τον οποίο θα πρέπει να αναφέρονται οι ορότυποι στα γραπτά κείμενα είναι αμφιλεγόμενος. Ο σκοπός της παρούσας σύντομης ανασκόπησης είναι να βοηθήσει τους νέους επιστήμονες να κατανοήσουν το σημερινό σύστημα ονοματολογίας και τον ορθό τρόπο δημοσίευσης των ερευνητικών και κλινικών ευρημάτων τους, κυρίως όταν διερευνούν θέματα Δημόσιας Υγείας.

**Λέξεις ευρετηρίασης:** ονοματολογία, *Salmonella*, ταξινόμηση



## ΕΙΣΑΓΩΓΗ

Το γένος *Salmonella* είναι ένα από τα πιο παθογόνα μέλη της οικογένειας των Εντεροβακτηριοειδών για τον άνθρωπο και τα ζώα. Πολλοί ορότυποι αυτού του γένους ευθύνονται για την πρόκληση του τυφοειδούς πυρετού και της οξείας διαρροϊκής νόσου του ανθρώπου, ενώ στα ζώα προκαλούν διάφορα συμπτώματα, που ποικίλουν ανάμεσα στην υποκλινική και την οξεία κλινική εντερική νόσο (Acheson and Keusch 1997, Kuhns 2010). Επειδή η σαλμονέλλωση αποτελεί μια τροφογενή λοίμωξη, τα προσβεβλημένα παραγωγικά ζώα συνιστούν κίνδυνο για την Δημόσια Υγεία, γεγονός που επιβάλλει την επιτήρηση του μικροοργανισμού (SANCO, 2009). Η διαδικασία της επιτήρησης εξαρτάται από την ακρίβεια της ταυτοποίησης των οροτύπων, η οποία απαιτεί ένα συγκεκριμένο και τυποποιημένο σύστημα ονοματολογίας. Παρά την αναγνώριση των *Salmonella* spp. ως σημαντικά παθογόνων μικροοργανισμών, το πολύπλοκο σύστημα της ονοματολογίας του γένους παραμένει δυσκατανόητο για πολλούς ερευνητές των επιστημών υγείας. Επιπλέον, συνεχώς προστίθενται νέοι ορότυποι, αυξάνοντας την πολυπλοκότητα της ταξινόμησης του μικροοργανισμού.

Έτσι, η εκτενής και επίπονη μελέτη των *Salmonella* spp., ενώ θα έπρεπε να ξεκαθαρίσει αυτά τα αντικρουόμενα ζητήματα, αντίθετα προκαλεί ακόμη μεγαλύτερη σύγχυση σε εκείνους που τα μελετούν. Συνεπώς, παρέχεται ελάχιστη βοήθεια στον άπειρο επιστήμονα, όταν αυτός πρέπει να αναφέρει με τον σωστό τρόπο τα πορίσματα της έρευνάς του ή τα διάφορα κλινικά ευρήματα. Παράλληλα, η έρευνα των ηλεκτρονικών βάσεων δεδομένων για τα *Salmonella* spp. και την σαλμονέλλωση είναι μια ακόμη επίπονη εργασία, που οφείλεται στη συσσώρευση των διαθέσιμων πληροφοριών, οι οποίες πολλές φορές παρερμηνεύονται ή αναφέρονται λανθασμένα. Τελικά, ο μεγάλος όγκος των πληροφοριών, οι πολλές εκδοχές των "ορθών απόψεων", νεότερα και παλαιότερα συστήματα ονοματολογίας που εφαρμόζονται ταυτόχρονα, οι επιλογές των αναγνωρισμένων εργαστηρίων και οι δυσκολίες των περισσότερων άλλων να ακολουθήσουν την μεθοδολογία τους, εξακολουθούν να προκαλούν σύγχυση.

Έτσι, εξαιτίας της πολυπλοκότητας της ονοματολογίας των *Salmonella* spp. οι επιστήμονες τελικά χρησιμοποιούν διαφορετικά συστήματα αναφοράς και "συνεννόησης" για το γένος *Salmonella*. Ωστόσο, η

ομοιομορφία στην ονοματολογία των *Salmonella* spp. είναι αναγκαία για την επικοινωνία μεταξύ των επιστημόνων, των υπαλλήλων της υγείας και το κοινό. Δυστυχώς, η καθημερινή πρακτική συνδυάζει συχνά αρκετά συστήματα ονοματολογίας που χωρίζουν, αρκετές φορές λανθασμένα, το γένος σε είδη, υποείδη, ομάδες υποομάδες, και ορότυπους και αυτό προκαλεί σύγχυση (Brenner et al. 2000).

Σε αντίθεση με άλλα βακτηριακά γένη, τα στελέχη του γένους *Salmonella* διακρίνονται μέσω της οροαυτοποίησης. Η ορολογική ταξινόμηση των *Salmonella* spp., σε >2500 ορότυπους μέχρι σήμερα, έχει κλινική, επιδημιολογική, αλλά και ιστορική σημασία και προϋποθέτει την ύπαρξη ενός ενιαίου κώδικα επικοινωνίας.

## ΙΣΤΟΡΙΚΗ ΔΙΑΔΡΟΜΗ

Το γένος *Salmonella* πήρε το όνομά του από τον Daniel Elmer Salmon, έναν Αμερικανό κτηνίατρο παθολογοανατόμο (Smith 1894). Ο Salmon και ο συνεργάτης του, Theobald Smith, απομόνωσαν από το έντερο του χοίρου το 1884 έναν μικροοργανισμό και τον πρότειναν ως τον αιτιώδη παράγοντα της "κοινής χολέρας" του χοίρου. Ο μικροοργανισμός αυτός, που ονομάστηκε *Salmonella choleraesuis*, αποδείχθηκε στη συνέχεια ότι σπανίως προκαλεί εντερική νόσο σε χοίρους και συνεπώς δεν ήταν ο αιτιολογικός παράγοντας που αναζητούσαν (Salmon, 2010). Το απομονωθέν στέλεχος των δύο κτηνιάτρων αρχικά ονομάστηκε "*Bacillus choleraesuis*", αλλά το 1900 αναβαθμίστηκε στο επίπεδο του γένους από τον Γάλλο βακτηριολόγο Liengieres με το όνομα "*Salmonella*" (The *Salmonella* Subcommittee of the Nomenclature Committee of the International Society for Microbiology 1934). Το 1900 το γένος *Salmonella* Liengieres 1900 περιελάμβανε μια ομάδα Gram (-) βακτηρίων ανάμεσα στα οποία περισσότερο γνωστά είναι τα "*Bacillus typhimurium*", "*Bacillus typhi*", "*Bacterium paratyphi*", "*Bacillus enteritidis*", "*Bacillus choleraesuis*" (Brown 1935). Ωστόσο, το ενδιαφέρον για αυτή την ομάδα των βακτηρίων αυξανόταν, καθώς αυξανόταν και οι αναφορές πληροφοριών των επιστημόνων που ασχολούνταν με λοιμώδη νοσήματα και συσχετιζαν αυτά τα βακτήρια με ποικίλες κλινικές καταστάσεις, με διάφορες περιοχές και με διάφορα είδη ζώων.

Η ταξινόμηση των μελών του γένους *Salmonella* εξελίχθηκε με την πάροδο του χρόνου (Miller and Pegues



2000, Euzéby 1999). Ξεκινώντας από την οροταυτοποίηση, η διάκριση των μελών του γένους *Salmonella* γινόταν με βάση την ταυτοποίηση των σωματικών (O) αντιγόνων και των αντιγόνων των μαστιγίων (H) (White 1926). Αυτό το σύστημα της οροταυτοποίησης, που ξεκίνησε από τον White το 1926 (White 1926) και επεκτάθηκε από τον Kauffmann, είχε ως αποτέλεσμα την περιγραφή ενός μεγάλου αριθμού οροτύπων. Μάλιστα ο Kauffmann πίστευε ότι κάθε ορότυπος μπορούσε να θεωρείται ως ξεχωριστό είδος (Kauffmann 1966). Αυτή η ταξινόμηση εφαρμόστηκε μετά το 1966. Με αυτό τον τρόπο ταξινόμησης αναγνωρίστηκαν πολλά είδη του γένους *Salmonella*. Εάν αυτή η λανθασμένη αντίληψη επικρατούσε και σήμερα, ο αριθμός των ειδών του γένους θα ξεπερνούσε τις 2.500.

Πριν το 1966, σε στελέχη του γένους *Salmonella* που απομονώνονταν από διαφορετικά κλινικά περιστατικά, δίνονταν συγκεκριμένα ονόματα είτε σύμφωνα με την ασθένεια που προκαλούσαν (όπως *S.typhi*, *S.typhimurium*, *S.enteritidis*), είτε ανάλογα με το ζώο από το οποίο απομονώθηκε ο μικροοργανισμός, (όπως *S.gallinarum*, *S. abortusovis*, *S.choleraesuis*), είτε τέλος ανάλογα με την γεωγραφική τοποθεσία από όπου πρωταπομονώθηκε το στέλεχος (όπως π.χ. *S.london*, *S.panama*) (The *Salmonella* Subcommittee of the Nomenclature Committee of the International Society for Microbiology 1934). Όμως επειδή αυτά τα ονόματα χρησιμοποιούνταν για χρόνια και συνεπώς είχαν ευρέως υιοθετηθεί, δεν τροποποιήθηκαν με βάση το νέο σύστημα της αντιγονικής σύνθεσης.

Η επίδραση των μοριακών τεχνικών: Στα χρόνια που ακολούθησαν έγιναν πολλές σημαντικές προσπάθειες μείωσης της πληθώρας των "ειδών" του γένους *Salmonella*, αλλά πάντα υπήρχαν διαφωνίες ως προς τον καταλληλότερο τρόπο ονοματολογίας (Ewing 1986, Agbaje et al 2011, Le Minor and Poroff 1987).

Ορόσημο στην εξέλιξη της ταξινόμησης του γένους *Salmonella* αποτέλεσε η μελέτη της θερμικής σταθερότητας του υβριδισμού DNA-DNA του γένους το 1973, η οποία έδειξε ότι τα "είδη" που ονομάστηκαν κατά την διάρκεια της ιστορίας της μελέτης του μικροοργανισμού και των οροτύπων του, θα μπορούσαν να αποτελέσουν "ένα είδος" (Crosa et al. 1973). Η μοριακή ταυτοποίηση του γένους τη δεκαετία του 1970 (Crosa et al. 1973) οδήγησε στο ξεκίνημα ενός νέου τρόπου σκέψης της ονοματολογίας και ταξινόμησης αυτής της ομάδας των βακτηρίων, αλλά όπως όλες οι νέες μέθο-

δοι δεν είχε ακόμη πλήρως ελεγχθεί για την ορθότητά της. Έτσι, η πρώτη έκδοση των Εγκεκριμένων Βακτηριακών Ονομάτων (Approved Bacterial Names), μετά την μοριακή ταυτοποίηση του γένους, περιελάμβανε πέντε είδη. Αυτά ήταν τα *S. arizonae*, *S. choleraesuis*, *S. enteritidis*, *S. typhi* and *S. typhimurium* (Skerman et al. 1980). Η παρατηρούμενη ετερογένεια στις απόψεις ανάμεσα σε εκείνους που ονομάτιζαν μικροοργανισμούς και σε εκείνους που αναζητούσαν επιστημονική απόδειξη για τις υποτιθέμενες διαφορές, δείχνει τις υπάρχουσες διαφωνίες ανάμεσα στις τάσεις των ταξινομητών, σε εκείνους που θέτουν τους κανόνες της ονοματολογίας, σε εκείνους που μελετούν την παθογένεια και σε εκείνους που ασχολούνται με την κλινική έρευνα (Crosa et al. 1973, Lim et al. 2005, Falush et al. 2006).

Οι συχνές διαφωνίες ως προς την ονοματολογία, οδήγησαν την "Επιτροπή Κρίσεων" (Judicial Commission) στην δημοσίευση της Απόφασης 80 ("Judicial Opinion 80"). Με την Απόφαση 80 η Επιτροπή συμφώνησε ότι από το 2005 και μετά το όνομα του στελέχους αναφοράς [type strain (LT2T)] θα πρέπει να είναι το *Salmonella enterica* (Euzéby 1999). Η Επιτροπή εξέδωσε εξηγήσεις στους βακτηριολόγους ως υποστήριξη των αλλαγών στην ονοματολογία και ταξινόμηση των *Salmonella* spp. (Tindal et al. 2005). Με την Απόφαση 80 η Επιτροπή αποδέχτηκε ότι το γένος *Salmonella* αποτελείται από δύο είδη, τα *S. bongori* και *S. enterica*, και έξι υποείδη τα οποία ανήκουν στο *S. enterica* (Judicial Commission of the International Committee on Systematic Prokaryotes 2005). Το όνομα κάθε υποείδους διαμορφωνόταν από το όνομα του είδους αναφοράς ακολουθούμενο από τα επίθετα *arizonae*, *diarizonae*, *enterica*, *hountanae*, *indica* και *salamae*. Μέχρι να δημοσιευθεί επισήμως αυτή η άποψη ένα τρίτο είδος αναγνωρίστηκε και περιελήφθη στον εγκεκριμένο κατάλογο του 2005. Ονομάστηκε *Salmonella subterranean* (Shelobolina et al. 2004), το οποίο σήμερα τοποθετείται μοριακά πλησιέστερα στην *Escherichia hermanii* (Euzéby 2010) και όχι στο γένος *Salmonella*, δημιουργώντας πιθανώς την ανάγκη για την θέσπιση νέων κανόνων και νέου καταλόγου ονομάτων.

Στο εξής, ο σημερινός κατάλογος των Εγκεκριμένων Βακτηριακών Ονομάτων (Approved Lists of Bacterial Names 2010, Bacterial Nomenclature up-to-date: Approved List 2010) είναι ο έγκυρος. Η πιο πρόσφατη



αναθεώρησή του περιλαμβάνει εννέα είδη και 14 υποείδη. Τα είδη που καταγράφονται είναι τα *S. arizonae*, *S. bongori*, *S. choleraesuis*, *S. enterica*, *S. enteritidis*, *S. paratyphi*, *S. subterranean*, *S. typhi* και *S. typhimurium*. Τα υποείδη είναι είτε τα *S. choleraesuis* ακολουθούμενα από τα επίθετα *arizonae*, *bongori*, *choleraesuis*, *diarizonae*, *houtenae*, *indica*, *salamae* ή τα *S. enterica* ακολουθούμενα από τα παραπάνω επίθετα.

#### ΤΟ ΣΧΕΔΙΟ ΤΩΝ KAUFFMANN - WHITE - LE MINOR (THE KAUFFMANN-WHITE-LE MINOR SCHEME)

Το γένος *Salmonella* περιλαμβάνει μια ομάδα μικροοργανισμών, οι οποίοι παρουσιάζουν μεγάλη γενετική ομοιότητα. Το σημερινό σύστημα ταξινομεί αυτούς τους μικροοργανισμούς με βάση τα αντιγόνα των ποικίλων οροτύπων του γένους. Όπως προαναφέρθηκε, αυτή η προσπάθεια είχε ξεκινήσει από τους Kauffmann και White σχεδόν πριν ένα αιώνα. Είναι επομένως αποτέλεσμα πολυετών ερευνών γύρω από τις αλληλεπιδράσεις των αντισωμάτων με τα επιφανειακά αντιγόνα των *Salmonella* spp. Το Σχέδιο των Kauffmann - White (που σήμερα ορίζεται ως το Σχέδιο των Kauffmann - White - Le Minor) φιλοδοξούσε, αλλά και συνεχίζει, να είναι εργαλείο καθημερινής διαγνωστικής χρήσης.

Σύμφωνα με το Σχέδιο των Kauffmann - White - Le Minor τα υποείδη του γένους *Salmonella* υποδιαιρούνται σε οροτύπους μέσω της οροταυτοποίησης, η οποία αποτελεί τον ακρογωνιαίο λίθο της επιδημιολογικής επιτήρησης αυτού του παθογόνου μικροοργανισμού. Κάθε αντιγονικά διαφορετικός τυπος του γένους διακρίνεται με βάση τα σωματικά αντιγόνα (O antigen), τα αντιγόνα μαστίγιου (H antigen) και τα αντιγόνα κάψας (Vi antigen).

Τα αντιγόνα O είναι λιποπολυσακχαρίτες που είναι συστατικά του κυτταρικού τοιχώματος. Η δομή του O- αντιγόνου διαφέρει ανάμεσα στα διάφορα στελέχη των *Salmonella* spp. Έτσι, το σχήμα ταυτοποίησης των Kauffmann-White-Le Minor αναγνωρίζει μέχρι 67 διαφορετικούς παράγοντες δόμησης του O- αντιγόνου διαχωρίζοντας το γένος *Salmonella* σε 50 διαφορετικές ανασσομόδες. Τα O- αντιγόνα ορίζονται με αραβικούς αριθμούς: 1,2,3...κλπ (WHOCC 2007).

Τα H αντιγόνα είναι ουσίες πρωτεϊνικής φύσης (αποτελούνται από την πρωτεΐνη φλατζελίνη) και βρίσκονται στα μαστίγια των μικροοργανισμών που τα διαθέτουν. Οι περισσότεροι ορότυποι των *Salmonella* spp.

μπορούν να παράγουν μαστίγια με δύο διαφορετικές αντιγονικές ειδικότητες, γεγονός που θα μπορούσε να βοηθήσει τον μικροοργανισμό να επιβιώσει από τους μηχανισμούς άμυνας του ξενιστή του. Σε αυτή την περίπτωση το H-αντιγόνο καλείται διφασικό. Λίγοι άλλοι, όπως οι *Salmonella enterica* ser. Enteritidis και *Typhi* παράγουν μαστίγια τα οποία έχουν πάντα την ίδια αντιγονική ειδικότητα. Αυτά τα αντιγόνα καλούνται μονοφασικά. Έτσι οι ορότυποι των *Salmonella* spp. χωρίζονται σε δύο ομάδες. Στους ορότυπους της ομάδας της φάσης 1 (ειδική φάση) και σε αυτούς της φάσης 2 (μη ειδική φάση). Τα αντιγόνα που ανήκουν στη φάση 1, χαρακτηρίζονται με πεζά γράμματα του λατινικού αλφαβήτου από το "a" ως το "z". Τα αντιγόνα που ανήκουν στη φάση 2 χαρακτηρίζονται με αραβικούς αριθμούς "1", "2", "3", κ.λπ.. Ένας ορότυπος είναι δυνατόν να έχει αντιγόνα μόνο της μίας φάσης, όπως ο *Salmonella enteritidis* ή να έχει αντιγόνα και των δύο φάσεων, όπως ο *Salmonella typhimurium* και ο *Salmonella choleraesuis*. Τα ακίνητα στελέχη *Salmonella gallinarum* και *Salmonella pullorum*, στερούνται μαστιγίων, επομένως δεν έχουν H- αντιγόνα. (Lodish et al 2000, Anon. 2005).

Έτσι, κάθε ορότυπος του γένους *Salmonella* αναγνωρίζεται από τον μοναδικό συνδυασμό των αντιγόνων του, δηλαδή από την αντιγονική του σύνθεση. Ο καθορισμός του οροτύπου ενός στελέχους *Salmonella* έχει ως εξής:

**Υποείδος (subspecies) [κενό] O-αντιγόνο [:] Vi -αντιγόνο (αν υπάρχει) [:] H-αντιγόνο-α φάσης 1 [:] H-αντιγόνο-α φάσης 2.**

Τα κύρια αντιγόνα χωρίζονται με άνω κάτω τελεία και τα επιμέρους αντιγόνα με κόμμα. Για παράδειγμα ο ορότυπος *Typhimurium* ορίζεται ως *Salmonella* I 7,4,5,12i:1,2 (Anon. 2005).

Το Σχέδιο των Kauffmann-White -Le Minor είναι ένα έγγραφο στο οποίο έχουν καταγραφεί όλοι οι αντιγονικοί τύποι των αναγνωρισμένων οροτύπων των *Salmonella* spp. (Poroff and Le Minor 2001; Grimont and Weill 2007). Υπεύθυνο για την ανανέωση του παραπάνω σχεδίου είναι το Κέντρο Συνεργασίας Αναφοράς και Έρευνας του γένους *Salmonella* του Παγκόσμιου Οργανισμού Υγείας στο Ινστιτούτο Pasteur στο Παρίσι (the WHO Collaborating Centre for Reference and Research on *Salmonella*). Κάθε χρόνο νεο-αναγνωρισμένοι ορότυποι αναφέρονται στο περιοδικό "Research in Microbiology" (Poroff et al. 2004). Στην τελευταία έκδοση του 2007

Γένος-Genus (Το πρώτο γράμμα κεφαλαίο, πλάγια γραφή)	Είδος-Species (πλάγια γραφή)	Υποείδος-Subspecies (πλάγια γραφή)	Ορότυπος-Serovar name (Το πρώτο γράμμα κεφαλαίο, όχι πλάγια γραφή)	Αριθμός οροτύπων σε κάθε είδος και υποείδος(WHO CC-Sal 2007)
<i>Salmonella</i>	<i>enterica</i>	<i>enterica</i> υποείδος I ή	Choleraesuis, Enteritidis, Typhi, Typhimurium	1531
		<i>salamae</i> υποείδος II ή	9,46:z:z39	505
		<i>arizonae</i> ή υποείδος IIIa	43:z29:-	99
		<i>diarizonae</i> υποείδος IIIb ή	6,7:1,v:1,5,7	336
		<i>hountanae</i> ή υποείδος IV	21:m,t:-	73
		<i>indica</i> ή υποείδος VI	59:z36:-	13
	<i>bongori</i>	υποείδος V	13,22:z39:-	22
Σύνολο				2.579

Πίνακας 1. Ταξονομική θέση (τρόπος γραφής και ονοματολογία) (Lin-Hui and Cheng-Hsun 2007)

υπήρχαν 2.579 ορότυποι του γένους *Salmonella*. Οι όροι "ορότυπος-serotype" και "οροπαραλλαγή-serovar" χρησιμοποιούνται εξίσου συχνά, αλλά σύμφωνα με τους Κανόνες του Βακτηριολογικού Κώδικα -The Rules of the Bacteriological Code, προτιμάται η χρήση του όρου "οροπαραλλαγή-serovar" (1990 Revision).

#### Η ΣΗΜΕΡΙΝΗ ΟΝΟΜΑΤΟΛΟΓΙΑ ΤΩΝ ΕΙΔΩΝ ΤΟΥ ΓΕΝΟΥΣ *Salmonella*.

Το σημερινό σύστημα ονοματολογίας που χρησιμοποιείται από το CDC (Centers for Disease Control and Prevention) για το γένος *Salmonella* βασίζεται σε συστάσεις του WHO Collaborating Centre. Σύμφωνα με το σύστημα του CDC, το γένος *Salmonella* περιλαμβάνει δύο είδη: τα *S. enterica* (είδος αναφοράς-type species) και *S. bongori*. Το είδος *S. enterica* αποτελείται από έξι υποείδη (Lin-Hui and Cheng-Hsun 2007): α) *S. enterica* subsp. *enterica*, β) *S. enterica* subsp. *salamae*, γ) *S. enterica* subsp. *arizonae*, δ) *S. enterica* subsp.

*diarizonae*, ε) *S. enterica* subsp. *hountanae* και στ) *S. enterica* subsp. *indica*. (Πίνακας 1).

#### Ονοματολογία των οροτύπων του υποείδους *S. enterica*

Στα περισσότερα βακτηριακά γένη δεν δίνονται ονομασίες στους οροτύπους, αλλά αυτοί καθορίζονται με βάση την αντιγονική τους σύνθεση π.χ. *Escherichia coli* O104: H4. Εξαίρεση αποτελούν οι ορότυποι του υποείδους *S. enterica* subsp. *enterica* (subspecies I). Οι ορότυποι του συγκεκριμένου υποείδους αντιπροσωπεύουν παραπάνω από το 99,5% του συνόλου των απομονωθέντων στελεχών *Salmonella* και απαντώνται τόσο στα θερμόαιμα, όσο και στα ψυχρόαιμα ζώα, ενώ οι τα άλλα υποείδη συνδέονται κυρίως με τα ψυχρόαιμα ζώα (De Lappe 2009). Εξαιτίας της συχνής απομόνωσης των οροτύπων του υποείδους *enterica*, αλλά και για ιστορικούς λόγους, οι ορότυποι αυτοί διατήρησαν το όνομα που τους είχε δοθεί πριν το 1966 και



δεν αναφέρονται με βάση την αντιγονική τους σύνθεση (WHOC-Salm 2007). Αυτά τα ονόματα, τα οποία σχετίζονται με συγκεκριμένη νόσο ή ξενιστή ή δηλώνουν την γεωγραφική προέλευση του οροτύπου, είχαν λανθασμένα αποδοθεί από τον Kauffmann σε είδη και γραφόταν με πλάγια γραφή.

Για την αποφυγή σύγχυσης ανάμεσα στους οροτύπους και τα είδη, το όνομα του οροτύπου αρχίζει με κεφαλαίο γράμμα και δεν γράφεται με πλάγια γραφή. Όταν δημοσιεύεται για πρώτη φορά σε μια αναφορά, το όνομα του γένους ακολουθείται από τη λέξη "serovar" (ή την συντόμηση "ser") και μετά ακολουθεί το όνομα του οροτύπου, π.χ. *Salmonella enterica* subsp. *enterica* ser. *Choleraesuis*. Έτσι, αποφεύγεται η σύγχυση και η αντιμετώπιση των οροτύπων ως είδη (Agbaje et al 2011). Στις επόμενες αναφορές το όνομα μπορεί να απλοποιηθεί. Δηλαδή το όνομα του γένους μπορεί να ακολουθείται απ' ευθείας από το όνομα του οροτύπου, π.χ. *Salmonella Choleraesuis*. Θα πρέπει να σημειωθεί ότι, στα επιστημονικά κείμενα, η συντόμηση του ονόματος του γένους (*Salmonella*=S) είναι ορθότερο να ακολουθείται από το όνομα του είδους (π.χ. *E. coli*). Συνεπώς, το όνομα του οροτύπου δεν θα πρέπει να ακολουθεί τη συντόμηση του ονόματος του γένους (π.χ. *S. Choleraesuis*) (WHOC-Salm 2007). Παρόλα αυτά, ο τελευταίος τρόπος ονοματολογίας συναντάται σε πολλά επιστημονικά κείμενα.

### Ονοματολογία των οροτύπων των υποειδών II-VI

Για εκείνα τα υποείδη που καθορίζονται από τον αντιγονικό τους τύπο, το όνομα του υποείδους γράφεται με λατινικούς χαρακτήρες (II-VI) (όχι πλάγια γραφή) και ακολουθεί ο αντιγονικός τύπος που περιλαμβάνει τα σωματικά (O) και αντιγόνα μαστιγίου (H) φάσης 1 και τα αντιγόνα μαστιγίου (H) φάσης 2, αν υπάρχουν. Άνω και κάτω τελεία παρεμβάλλεται ανάμεσα από κάθε αντιγόνο, π.χ. *Salmonella serovar* II 39:z10:z6. Για τους οροτύπους του είδους *Salmonella bongori* (πλαιότερα ανήκε στο υπογένος V), το V χρησιμοποιείται ακόμα για λόγους πρακτικής, π.χ. S.V 13,22:z35:- (Poroff 2004).

### ΕΠΙΛΟΓΟΣ

Η ιστορία της εξέλιξης της ονοματολογίας και της ταξινόμησης του γένους *Salmonella* χαρακτηρίζεται από μια πολύ δυναμική πορεία, καθιστώντας το γένος

*Salmonella* ως το "νούμερο ένα μικρόβιο" των επιστημόνων που ασχολούνται με την βακτηριακή ονοματολογία και ταξινόμηση. Διάφορα συστήματα βασισμένα σε βιοχημικά χαρακτηριστικά ή σε μοριακές τεχνικές ή ακόμη στην επιδημιολογία και στα κλινικά συμπτώματα της νόσου, έχουν χρησιμοποιηθεί στην προσπάθεια ταξινόμησης του γένους (Agbaje et al 2011), με αποτέλεσμα τη δημιουργία ενός πολύπλοκου και τελικά δύσχρηστου συστήματος ονοματολογίας. Έτσι, οι παλαιότεροι κλινικοί (ιατροί και κτηνίατροι) παρουσιάζουν το έργο τους ταυτοποιώντας τα στελέχη της *Salmonella*, "κατά το δοκούν", ενώ οι νεαρότεροι συνάδελφοί τους αγωνίζονται να καταλάβουν ποια είναι η επίσημη και συνεπώς η καταλληλότερη μέθοδος ταυτοποίησης των μελών αυτού του γένους. Παράλληλα, η απομόνωση καινούριων οροτύπων κάθε χρόνο, καθιστά επιτακτική την ανάγκη ενός κοινώς αποδεκτού συστήματος "επικοινωνίας" των επιστημόνων σχετικά με το γένος *Salmonella*.

Το πρόβλημα της ονοματολογίας του γένους *Salmonella* είναι ότι χρησιμοποιούνται ταυτόχρονα δύο συστήματα ονοματολογίας (Tindall et al. 2005). Προς το παρόν η συζήτηση σχετικά με την αποδοχή ενός "συναινετικού" είδους αναφοράς παραμένει στην Απόφαση 80-Ορίσιον 80 του 2005. Η σύγχρονη ονοματολογία, που χρησιμοποιείται από το CDC, βασίζεται στις συστάσεις του WHO Collaborating Centre και ανταποκρίνεται επαρκώς στις ανησυχίες και στις απαιτήσεις των επιστημόνων (WHOC-Sal 2007). Σύμφωνα με αυτή, το γένος *Salmonella* αποτελείται από δύο είδη. Είδος αναφοράς είναι το *S. enterica*, το οποίο απαρτίζεται από έξι υποείδη.

Παρόλο που είναι δύσκολο από τους μη ειδικούς να εκτιμήσουν τις τροποποιήσεις στην ονοματολογία του γένους *Salmonella*, οι προτεινόμενες αλλαγές θα πρέπει να γίνουν αποδεκτές, γιατί παρέχουν μια ενιαία και οργανωμένη προσέγγιση της ονοματολογίας του γένους, την οποία στερεί η αυστηρή προσκόλληση στις συνήθειες που επέβαλλε το ιστορικό προηγούμενο. Ο σημερινός κατάλογος των Εγκεκριμένων Βακτηριακών Ονομάτων εμφανίζεται ως μια συμβιβαστική λύση σε όλους όσους επηρέασαν ιστορικά την ονοματολογία του γένους *Salmonella*. Όμως, στην περίπτωση της ταυτοποίησης του γένους *Salmonella*, οι μοριακές μέθοδοι θα μπορούσαν τελικά να αντικαταστήσουν την οροταυτοποίηση. Σε μια τέτοια περίπτωση, το περίπλοκο σύστημα της ονοματολογίας

των οροτύπων, θα μπορούσε σταδιακά να αντικατασταθεί με ένα ευκολότερο μοριακό σύστημα. Εάν οι οργανισμοί και τα εργαστήρια, όπως ο WHO, το CDC κ.ά συνεχίσουν να οροτυποποιούν τους μικροοργανισμούς και όχι τα είδη ή τους μοριακούς τύπους, το ζήτημα της ονοματολογίας και ταξινόμησης του γένους *Salmonella* θα εξελιχθεί σε μια συγκεχυμένη και περι-

πλοκή κατάσταση, αποτρέποντας τον άπειρο επιστήμονα να ασχοληθεί με το γένος. Επιπλέον, με την αύξηση των πληροφοριών που συλλέγονται από την μελέτη των λοιμώξεων του ανθρώπου και των ζώων, αυξάνεται και η δυσκολία σύγκρισης των αποτελεσμάτων επιδημιολογικών ή κλινικών μελετών, ως προς την σημασία των διαφόρων στελεχών στη Δημόσια Υγεία.

## The current taxonomy system in *Salmonella* spp. and their impact in the control of infection

Evangelopoulou G.D.<sup>1</sup>, Govaris A.<sup>2</sup>, Kritas S.<sup>3</sup>, Burriel A.R.<sup>4</sup>

<sup>1</sup> PhD Student, Laboratory of Microbiology and Parasitology, Faculty of Veterinary Medicine, School of Health Science, University of Thessaly, Trikalon 224, Karditsa 431 00, Greece, E-mail:matinavet@hotmail.com

<sup>2</sup> Associate Professor, Laboratory of Hygiene of Foods of Animal Origin, Faculty of Veterinary Medicine, School of Health Science, University of Thessaly, Trikalon 224, Karditsa 431 00, Greece

<sup>3</sup> Associate Professor, Laboratory of Microbiology and Infectious Diseases, School of Veterinary Medicine, Aristotelian University, Thessaloniki 541 24, Greece

<sup>4</sup> Professor, Laboratory of Microbiology and Parasitology, Faculty of Veterinary Medicine, School of Health Science, University of Thessaly, Trikalon 224, Karditsa 431 00, Greece

**Summary:** The genus *Salmonella* is one of the most pathogenic members of the family of Enterobacteriaceae for man and animals. Due to the microorganism's pathogenicity for man, it is systematically studied for more than 100 years by a plethora of scientists around the world, but still today many of its pathogenic characteristics are unknown. The ability to distinguish strains or clonal lineages of a bacterial pathogen is a prerequisite for addressing many questions in clinical microbiology and epidemiology. The serotyping scheme, which is continuously updated as new serovars are discovered, has generated over the years a significant information, useful for the epidemiological surveillance and control of *Salmonella* spp. in the food chain and public health. Today, the traditional *Salmonella* serotyping scheme of White-Kauffmann-Le Minor is still held worldwide as the accepted "gold standard" for the classification of *Salmonella*, below the subspecies level. However, the genetic base of *Salmonella* pathogenicity is better understood when molecular methods are applied for studying the pathogen. These methods, in addition to associating the various isolated strains with the animal host or the type of clinical disease, have improved the existing knowledge on the typing of the microorganism. They have not, however, given a final answer to the many conflicting opinions continuously published, by international bodies having the responsibility of summarizing and officializing available knowledge, on the nomenclature and taxonomy of the genus *Salmonella*. Thus, there is some controversy as how to properly indicate serovars in written documents. The aim of the present short review is to help young scientists understand the existing nomenclature system and the way they should appropriately report their research or clinical findings, especially when they research issues of public health.

**Keywords:** nomenclature, *Salmonella*, taxonomy



### Βιβλιογραφία

- Acheson DW and Keusch GT (1997) Intestinal infections with *Salmonella* and *Yersinia* species. In: LaMont JT editor. *Gastrointestinal Infections: diagnosis and management*. New York: Marcel Dekker Inc. pp 149-189.
- Agbaje M, Begum R.H., Oyekunle M. A., Ojo E., Adenubi O.T. (2011) Evolution of *Salmonella* nomenclature: a critical note. *Folia Microbiol* 56:497-503
- Anon. (2005) *Salmonella Annual Summary*, CDC <http://www.cdc.gov/ncidod/dbmd/philisdata/salmonella.htm>
- Approved Lists of Bacterial Names (Amended) 1989, American Society of Microbiology <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/bookshelf/br.fcgi?book=bacname&part=A52> Accessed 7 July 2010
- [http://www.hpa.org.uk/infections/topics\\_az/salmonella/menu.htm](http://www.hpa.org.uk/infections/topics_az/salmonella/menu.htm)
- <http://www.hpazoonosesconference.org.uk/presentations/Salm%20TH.pdf>
- <http://www.medvetnet.org/cms/templates/doc.php?id=57>
- <http://www.defra.gov.uk/animalh/diseases/zoonoses/salmonella-control.htm>
- <http://www.niaid.nih.gov/factsheets/Salmonellosis.htm>
- [http://www.defra.gov.uk/animalh/diseases/vetsurveillance/az\\_index.htm#salmonella](http://www.defra.gov.uk/animalh/diseases/vetsurveillance/az_index.htm#salmonella)
- <http://www.nwph.net/NWZG/Lists/Diseases/DispForm.aspx?ID=28>, Accessed 7 July 2010
- Brenner FW, Villar RG, Angulo FJ, Tauxe R, Swaminathan B (2000) *Salmonella* nomenclature. *J Clin Microbiol* 38:2465-2467
- Brown JH (1935) Theobald Smith 1859-1934. *J Bacteriol* 30:1-3
- Crosa JH, Brenner DJ, Ewing WH, Falkow S (1973) Molecular relationships among the *Salmonellae*. *J Bacteriol* 115:307-315
- De Lappe N. (2009) *Salmonella Taxonomy*. Version 1. Ref NSRLFM041, Dept of Medical Microbiology, Division of Clinical Microbiology, Galway University Hospitals
- [http://www.nuigalway.ie/research/salmonella\\_lab/downloads/salmonella\\_taxonomy.pdf](http://www.nuigalway.ie/research/salmonella_lab/downloads/salmonella_taxonomy.pdf)
- Euzéby JP (1999) Revised *Salmonella* nomenclature: designation of *Salmonella enterica* (ex Kauffmann and Edwards 1952) Le Minor and Popoff 1987 sp. nov., nom. rev. as the neotype species of the genus *Salmonella* Lignieres 1900 (approved lists 1980), rejection of the name *Salmonella choleraesuis* (Smith 1894) Weldin 1927 (approved lists 1980), and conservation of the name *Salmonella typhi* (Schroeter 1886) Warren and Scott 1930 (approved lists 1980). Request for an opinion. *Int J Syst Bacteriol* 49(2):927-930
- Euzéby JP (2010) List of Prokaryotic names with standing in nomenclature-Genus *Salmonella*, [www.bacterio.cict.fr/s/salmonella.html](http://www.bacterio.cict.fr/s/salmonella.html), Accessed 7 July 2010
- Ewing, W. H. (1986). *Edwards and Ewing's identification of Enterobacteriaceae*, 4th ed. Elsevier Science Publishing Co. Inc., New York, N.Y.
- Falush D, Torpdahl M, Dideot X, Conrad FD, Wilson JD (2006) Mismatch induced speciation in *Salmonella*: model data. *Phil Trans R Soc B* 361:2045-2053
- Grimont PAD, Weill FX (2007) *Antigenic formulae of the Salmonella serovars*, Ninth Edition, world health organization collaborating centre for reference and research on *Salmonella*. Institute Pasteur, Paris
- Judicial Commission of the International Committee on Systematic Prokaryotes (2005). The type species of the genus *Salmonella* Lignieres 1900 is *Salmonella enterica* (ex Kauffmann and Edwards 1952) Le Minor and Popoff 1987, with type strain LT2T and conservation of the epithet *enterica* in *Salmonella enterica* over all earlier epithets that may be applied to this species. Opinion 80. *Int J System Evol Microbiol* 55: 519-520
- Kauffmann F (1966) *The bacteriology of Enterobacteriaceae*. Munksgaard, Copenhagen
- Kuhns MD (2010) *Salmonella Infections* [www.history.amedd.army.mil/booksdocs/wwii/PM4/CH18.Salmonellal.htm](http://www.history.amedd.army.mil/booksdocs/wwii/PM4/CH18.Salmonellal.htm), accesses 6-7-2010
- Le Minor, L., and M. Y. Popoff. (1987). Request for an opinion. Designation of *Salmonella enterica* sp. nov., nom. rev., as the type and only species of the genus *Salmonella*. *Int. J. Syst. Bacteriol.* 37:465-468.
- Lim H, Lee HK, Hong CH, Bahk GJ, Choi SW (2005) Comparison of four molecular methods for the differentiation of *Salmonella* spp. *Inter J Food Microbiol* 105: 411-418.
- Lin-Hui S, Cheng-Hsun C (2007) *Salmonella* nomenclature. *Chang Gung Med J* 30(3):210-219
- Lodish H, Berk A, Zipursky SL, et al. (2000). *Functional Rearrangements in Chromosomal DNA in Molecular Cell Biology*. 4th edition. New York: W.

- H. Freeman <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/bookshelf/br.fcgi?book=mcb&part=A2223>
- Miller SI, Pegues DA (2000) *Salmonella* species, including *Salmonella typhi*. In: Mandell GL, Bennett JE, Dolin R (eds) *Mandell, Douglas, and Bennett's principles and practices of infectious diseases*, vol 2, 5th edn. Churchill Livingstone, Philadelphia, pp 2344-2363
  - Popoff MY, Bockemuhl J, Gheesling LL (2004) Supplement 2002 (no. 46) to the Kauffmann-White scheme. *Res Microbiol* 155:568-570
  - Popoff MY, Le Minor L (2001) Antigenic formulas of the *Salmonella* serovars, 8th revision. World Health Organization Collaborating Centre for Reference and Research on *Salmonella*, Paris
  - Salmon D. E. [www.whonamedit.com/doctor/cfm/408.html](http://www.whonamedit.com/doctor/cfm/408.html), Accessed 7 July 2010
  - SANCO Workshop on *Salmonella* Control in Pigs 26 February (2009), [http://ec.europa.eu/food/food/biosafety/salmonella/other\\_act\\_en.htm](http://ec.europa.eu/food/food/biosafety/salmonella/other_act_en.htm), November 2010
  - Shelobolina ES, Sullivan SA, O'Neill KR, Nevin KP, Lovley DR (2004) Isolation, characterization, and U(VI)-reducing potential of a facultatively anaerobic, acid-resistant bacterium from low-pH, nitrate- and U(VI)-contaminated subsurface sediment and description of *Salmonella subterranean* sp. nov. *Appl Environ Microbiol* 70:2959-2965.
  - Skerman VBD, Mc Gowan V and Sneath PHA (1980) Approved list of bacterial names. *Int J Syst Bacteriol* 30:225-420
  - Smith T (1894) The hog-cholera group of bacteria. *U.S. Bur Anim Ind Bull* 6: 6-40
  - The *Salmonella* Subcommittee of the Nomenclature Committee of the International Society for Microbiology (1934). The genus *Salmonella* Lingnieres 1900. *J Hyg* 34: 333-350
  - Tindal JB, Grimont DAP, Garrity MG, Euzéby PJ (2005). Nomenclature and taxonomy of the genus *Salmonella*. *Int J Syst Evol Microbiol* 55:521-524
  - White, B. (1926) Further studies on the *Salmonella* group. Medical Research Council Special Report 103, 3-160
  - WHOCC-Salm (2007) Antigenic formulae of the *Salmonella* serovars, 9th revision World Health Organization Collaborating Centre for Reference and Research on *Salmonella*, Pasteur Institute, 2007.

*JMS (ISSN 1682-4474) is an International, peer-reviewed scientific journal that publishes original article in experimental & clinical medicine and related disciplines such as molecular biology, biochemistry, genetics, biophysics, bio-and medical technology. JMS is issued eight times per year on paper and in electronic format.*

*For further information about this article or if you need reprints, please contact:*

Grammato Evangelopoulou  
Laboratory of Microbiology and Parasitology,  
Faculty of Veterinary Medicine,  
School of Health Science,  
University of Thessaly,  
Trikalon 224,  
43100, Karditsa, Greece

Tel: +30-2441066088

Fax: +30-2441066088

## A Brief Account of the Rules Applied to the Naming and Epidemiologically Grouping *Salmonella* Strains when Isolated from Animals

<sup>1</sup>Grammato Evangelopoulou, <sup>3</sup>Spyridon Kritas,  
<sup>2</sup>Alexander Govaris and <sup>1</sup>Angeliki R. Burriel

*Salmonella* spp., the most pathogenic genus of the family of Enterobacteriaceae for man and animals, has many of its pathogenicity determinants still unknown, although it is systematically studied for more than 100 years. This is mainly due to the slow development of methods reliably associating the molecular characteristics of strains or clonal lineages with their observed pathogenicity and epidemiology. The same has hampered the effective control of animal salmonellosis, thus prevention of human infections. However, in recent years, many new molecular methods are developed to genetically, thus also taxonomically, define *Salmonella* spp. and are also useful in better understanding the pathogenicity of the microorganism. A better understanding of the microbe's pathogenicity is the key to the development of effective means, such as vaccines, for controlling animal salmonellosis, regardless of animal species. However, due to their costs and limited molecular information, serotyping, the classical method for many decades of placing *Salmonella* isolates into similar antigenic groups, remains the tool for epidemiologically studying the microorganism, during the surveillance of animal salmonellosis. Serotyping, known as the White-Kauffmann-Le Minor, scheme, has produced during the years a bulk of information contributing to conflicting opinions concerning the nomenclature and taxonomy of the genus *Salmonella*, thus needing constant revision of the rules managing it. Molecular methods are expected to steadily resolve these conflicts but they are yet far from replacing the existing system of naming and grouping *Salmonella* isolates. Thus, a concise summary of the existing scientific opinions and rules influencing still today the grouping of the genus *Salmonella*, could be useful to veterinarians and others working with the surveillance of animal salmonellosis.

**Key words:** Nomenclature, *Salmonella*, taxonomy, animal, salmonellosis

<sup>1</sup>Laboratory of Microbiology and Parasitology,

<sup>2</sup>Laboratory of Hygiene of Foods of Animal Origin, Faculty of Veterinary Medicine, School of Health Science, University of Thessaly, Trikalon 224, Karditsa, 43100, Greece

<sup>3</sup>Department of Microbiology and Infectious Diseases, Faculty of Veterinary Medicine, Aristotle University of Thessaloniki, 54124, Thessaloniki, Macedonia, Greece



## INTRODUCTION

A number of *Salmonella* serovars and strains causing in man typhoid and paratyphoid fever, cause in animals from subclinical infection to severe clinical enteric disease (Acheson and Keusch, 1997). Human salmonellosis is a food borne infection. Thus, infected food producing animals are a public health hazard needing continuous surveillance (SANCO, 2009). Successful surveillance and control of animal salmonellosis depend on the method used to reliably associate strains, significant for Public Health, to their animal source. The fast addition of new serovars on the existing long list, as a result of intensified research in animals, is increasing the complexity of the microorganism's epidemiological classification.

In addition, information about *Salmonella* spp. isolated from animals and reported following the older rules of taxonomy may not be successfully associated to currently reported information, if one is not considering the landmark changes of grouping isolates with the classical methods. The amount of existing information deriving from the application of older taxonomic rules, the many versions of "correct opinions" reported by official microbiological societies and new and older methods employed simultaneously, when taxonomically placing *Salmonella* isolates, are some problems faced by health workers attempting to apply the published methodology.

Until recently, common practice was, when placing isolated strains into species, subspecies, subgenera and serovars, to combine several accepted rules (Brenner *et al.*, 2000). During the years, *Salmonella* isolates, named in previous decades as species, were later placed into subspecies or subgenera and eventually into antigenic sero-groups, better suited to epidemiological investigations. The latter number today more than 2610 serovars (Guibourdenche *et al.*, 2010). The list of serovars becoming longer by the years, did not fully resolve questions on the clinical and epidemiological significance of serovars. Thus, to reliably associate the clinical and epidemiological manifestations of serovars isolated during the surveillance of animal salmonellosis with disease in man or other host animal species, easier, economical and reliable molecular methods are needed. They should, for success in such programs, better match past information with the findings of current *Salmonella* surveillance and control programs around the world, and most importantly, between regions within the same country. This success depends on the effective management of molecular information generated from various sources studying multiple subspecies and serovars as potential pathogens.

When potential pathogens are searched, detection of any number of microbial cells in samples is evidence of infection, enforcing the undertaking of preventive measures. These measures will be most effective in the case of salmonellosis, if they are targeting serovars of increased economic and Public Health importance. This targeting requires precise knowledge of the genetic composition of serovars pathogenic to various animal species and man.

The very large number of serovars recorded is indicative of a similarly large antigenic variation in the *Salmonella* population. These antigenic variations, manifested in a variety of clinical ways, are encoded on specific nucleotides, therefore easily exploited by PCR. Several PCR-based methods are exploited, targeting specific genes of either the most prevalent or all salmonellae (Arrach *et al.*, 2008). Generally, PCR is used as a highly sensitive and specific method for checking the presence of pathogenic bacteria in clinical specimens and is particularly applicable when high sensitivity is required, as in cases of specimens having numbers of a pathogen undetected by culturing (Cohen *et al.*, 1993). In addition, antigenic differences between strains, the result of genes and gene alleles diversity, are also molecularly associated with a strain's phenotype. Thus, an expanded and comprehensive PCR molecular database is needed to firstly accurately place unknown *Salmonella* isolates and secondly select the most important molecules coding for pathogenicity (Wise *et al.*, 2009). Until such a database is successfully enriched to be effectively used during epidemiological investigations, serotyping, historically proven useful in such investigations, will be the accepted method.

Thus, a brief account of landmark official decisions forming the taxonomic rules could help the clinical veterinarian to better associate current knowledge on serovars with past information.

## A BRIEF HISTORY OF THE RULES APPLIED TO TAXONOMY OF *Salmonella* spp.

The genus *Salmonella* was named after Daniel Elmer Salmon, an American veterinary pathologist (Smith, 1894). Salmon and his colleague Theobald Smith, isolated in 1884 from a pig's intestine suffering "*Hog cholera*", a microorganism they assumed it was the cause of the illness. They named it "*Bacillus choleraesuis*". "*Bacillus choleraesuis*" was elevated to the level of a genus in 1900 by the French bacteriologist Liengieres and named "*Salmonella*" (*Salmonella* Subcommittee of the Nomenclature Committee of the International Society for



Microbiology, 1934). The genus *Salmonella* Liengiers included all known Gram (-) bacteria, among which were “*Bacillus typhimurium*”, “*Bacillus typhi*”, “*Bacterium paratyphi*”, “*Bacillus enteritidis*” and of course “*Bacillus choleraesuis*” (Brown, 1935). As information accumulated the following decades on the genus *Salmonella*, it became evident that a more precise system of taxonomically placing the microorganism was needed. Thus, *Salmonella* isolates were initially named to species according to their clinical manifestations, taking names such as *Salmonella typhi*, *Salmonella typhimurium*, *Salmonella enteritidis* or named after their host as e.g., *Salmonella gallinarum*, *Salmonella abortusovis*, *Salmonella choleraesuis* or their geographical origins, named as e.g., *Salmonella london*, *Salmonella panama* (*Salmonella* Subcommittee of the Nomenclature Committee of the International Society for Microbiology, 1934). This complicated system of naming isolates did not epidemiologically associate the various isolates, thus, the antigenic composition of isolates (serotyping) was attempted. This method answered many surveillance questions but it also further complicated the interpretation of existing and new information (Le Minor and Popoff, 1987; Agbaje *et al.*, 2011). Serotyping of each strain was developed in the 1920s on the basis of particular O (cell wall) and H (flagellar) antigens (White, 1926) and expanded during the following decades by Kauffmann (1966) eventually resulting in a large number of serovars. Kauffmann (1966) did actually propose to the scientific community of considering each serovar a separate species belonging to the genus *Salmonella*. If his proposition was adopted, the genus should have by the 70s, before its molecular typing, more than 2500 species; a number completely disassociating epidemiological surveillance from animal and human infections. Evidently, the classification of the genus *Salmonella* has greatly evolved over the years and the rules applied today are the result of numerous compromises and DNA-DNA hybridization (Miller and David, 2000; Euzéby, 1999).

DNA-DNA hybridization first used in the 70s showed that the “species” named in past decades and their serovars were so closely related to each other molecularly, that they could be considered as “one species” (Crosa *et al.*, 1973). This new knowledge should have immediately changed the methods of reporting findings but for practical and historic reasons, the list of Approved Bacterial Names, published immediately after the molecular typing of the genus, included, not one but five species. They were *S. arizonae*, *S. choleraesuis*, *S. enteritidis*, *S. typhi* and *S. typhimurium* (Skerman *et al.*, 1980). In the years after, Comparative Genomic Hybridization (CGH) assays on

whole-genome microarrays showed that genomic differences generally correlated well with a serovar’s phenotype, although some exceptions exist. Similarities and differences between serovars do not, however, place them into a specific genogroup. Specifically, phenotypically similar serovars may have substantially different genetic content, thus placed into different genogroups.

The above brief account illustrates the conflicts between those making the rules of naming isolates and those studying their pathogenicity phenotypically or molecularly (Crosa *et al.*, 1973; Lim *et al.*, 2005; Falush *et al.*, 2006; Wise *et al.*, 2009). More precisely, the conflicts existing to this day, between microbiologists and clinicians. Their conflicts were partially resolved with the publishing of “Judicial Opinion 80” informing them that, after 2005, isolates should be assigned into two species; the type strain “LT2<sup>1</sup>” previously known as *Salmonella choleraesuis*, now renamed *Salmonella enterica* and *Salmonella bongori* (Euzéby, 1999). However, immediately after the publishing of Opinion 80 and before its application, the Judicial Commission of the International Committee on Systematic Prokaryotes accepted division of the species *S. enterica* into six subspecies (Truper, 2005; Tindall *et al.*, 2005). The name of each subspecies was formed by the name of the type species (*S. enterica*) followed by the epithets *arizonae*, *diarizonae*, *enterica*, *hountanae*, *indica* and *salamae*. Concurrently with this division, a third species was included in the approved list of 2005 (Shelobolina *et al.*, 2004). This species is today molecularly placed closer to *Escherichia hermannii* (Skerman *et al.*, 1989), forcing, perhaps, soon a new ruling and a new list of official names for the genus *Salmonella*. Most importantly, Judicial Opinion 80 did not invalidate the previously published list of *Salmonella* names. Thus, two lists of officially accepted names were combined and are currently used in the taxonomy of the genus; the one used just before 2005 and the other after.

This combined list consists, hence, of nine species which are *S. arizonae*, *S. bongori*, *S. choleraesuis*, *S. diarizonae*, *S. enterica*, *S. enteritidis*, *S. paratyphi*, *S. typhi* and *S. typhimurium* and 14 subspecies (Skerman *et al.*, 1989). The subspecies are named either using the historic name for the type species, *S. choleraesuis*, followed by the epithets *arizonae*, *bongori*, *choleraesuis*, *diarizonae*, *houtanae*, *indica*, *salamae* or using the new name of the type species, *S. enterica*, followed by the same as above epithets. Therefore, the researcher is left to choose the rules for placing an isolate. This freedom, however, does not help toward a better understanding of generated epidemiological observations.

Thus, to epidemiologically relate a pathogenic strain isolated from an animal species with disease in man or other animal species, regions or farms, the antigenic serotyping of the White-Kauffmann-Le Minor scheme continues apparently to be the most appropriate (Grimont and Weill, 2007), although molecular typing is fast developing. If serotyping is eventually officially used simultaneously with existing molecular methods, an even more reliable recording of observed clinical manifestations of salmonellosis could be expected in the future.

#### WHITE-KAUFFMANN-LE MINOR SCHEME

The White-Kauffmann- Le Minor, scheme classifies members of the genus *Salmonella* according to their antigens. The interactions between antibodies and specific surface antigens of *Salmonella* spp. are useful diagnostic and epidemiological tools in many laboratories around the world and correlated well with genomes grouped into genovar clades (Grimont and Weill, 2007).

The White-Kauffmann-Le Minor scheme, divides each subspecies of the genus *Salmonella*, as above mentioned, into serovars, relating effectively epidemiological surveillance and disease outbreak investigations, by characterizing each strain's O (somatic), H (flagellar) and Vi (capsular) antigens (Grimont and Weill, 2007).

"O" Antigens are lipopolysaccharides which are components of the cell wall. There are 67 structurally different O-antigens dividing the genus *Salmonella* into 50 different serogroups, called O-groups. O-antigens are characterized using Arabic numerals: 1, 2, 3...etc., (Grimont and Weill, 2007).

"K" Antigens are subunits of the protein "flagellin" present on strains possessing flagella. Most *Salmonella* serovars express two different H-antigens, helping, perhaps, the microbe to overcome the defense mechanisms of its host. Serovars, such as Typhimurium and Choleraesuis, are expressing both H-antigens, thus they are called "diphasic". Others, such as *Salmonella enterica* ser. Enteritidis and Typhi, expressing a single flagellin type, are called "monophasic". Thus, serovars are placed into two groups called Phase 1 and Phase 2. Antigens of the Phase 1 group are characterized by lowercase Roman letters from "a to z" and those of Phase 2 in Arabic numerals: 1, 2, 3...etc. The non-motile serovars Gallinarum and Pullorum are lacking flagellas, thus, they do not have H-antigens (May and Goodner, 1927; CDC, 2007).

Eventually, each *Salmonella* serovar is identified by a unique combination of antigens named in the following order: Name of subspecies [space] definition of O-antigen

[colon] definition of Vi-antigen, if present, [colon] definition of phase 1 H-antigens [colon] definition of phase 2 H-antigens. Between them there is a number of individual antigens separated by commas while the main antigens are separated by a colon. In addition, one should remember, that although the terms "serotype" and "serovar" are equally used when characterizing isolates, the term "serovar" is preferred in the revised "Rules of the Bacteriological Code" (Popoff *et al.*, 2004).

Evidently, the White-Kauffmann-Le Minor scheme helps in the grouping of all known antigenic types of *Salmonella* serovars (Popoff and Le Minor, 2001; Grimont and Weill, 2007); becoming an effective and economic epidemiological tool for animal salmonellosis. However genovars do not always match serogroups and serovars placed in the same serogroup may molecularly be placed into a different molecular clade. This, perhaps, is the result of laterally transferred genes into different genovars (Porwollik *et al.*, 2004).

A combination of the above rules is currently used by the Centers of Disease Control (CDC) in the USA.

#### TAXONOMIC SYSTEM OF THE GENUS *Salmonella* USED BY THE CDC

The current taxonomic system used by the CDC recognizes two species, *S. enterica*, *S. bongori* and six subspecies within the species of *S. enterica*. The subspecies are *S. enterica* subsp. *enterica*, also known as subspecies I, *S. enterica* subsp. *salamae* or subspecies II, *S. enterica* subsp. *arizonae* or subspecies IIIa, *S. enterica* subsp. *diarizonae* or subspecies IIIb, *S. enterica* subsp. *houtanae* or subspecies IV and *S. enterica* subsp. *indica* or subspecies VI (Su and Chiu, 2007). Today, most serovars molecularly typed are belonging to *S. enterica* subspecies I (99.9%) and few to subspecies II and IIIb. Thus, the large number of serovars in subspecies I is requiring the proper naming of serovars within it for avoiding confusion during the matching of epidemiological investigations from around the world. For this purpose, two methods of reporting information on serovars are internationally accepted. The one previously explained and the one preserving to this day historic names. The latter, however, used the rules applied to naming species, long after the molecular typing of serovars (Grimont and Weill, 2007), thus confusing many researchers or clinicians thinking them as species. For avoiding such a confusion, the rules of naming historic serovars (previously known as species) changed and they are now reported strictly following the order: Italicized name of the species and subspecies, e.g., *Salmonella enterica* subsp. *enterica* followed by the

non-italicized abbreviated word ser. for “serovar” and this followed by the capitalized but not italicized second synthetic of the name of a historic previous species, now molecularly considered a serovar (Agbaje *et al.*, 2011). Eventually the name of a historic serovar is reported as in e.g., *Salmonella enterica* subsp. *enterica* ser. Typhi. The name may be shortened in later mentions using only the italicized name of the genus (*Salmonella*) and the non-italicized, capitalized name of the serovar, as in e.g., *Salmonella* Typhi. In the last case, the genus cannot be abbreviated as in *S. Typhi*, a practice used when reporting names of species. However, permitted is the use of only the non-italicized but capitalized last synthetic, as in “serovar Typhi” (Grimont and Weill, 2007). Serovars belonging to the other subspecies of the type species, mainly associated with the cold-blooded animals (De Lappe, 2009), are reported according to their antigenic composition following the rules explained previously. An example is, serovar *Salmonella enterica* subsp. *salamae* 39:z10:z6 or serovar *Salmonella* II 39:z10:z6.

Worth mentioning here is that for a brief time in the past, the genus *Salmonella* was also divided into subgenera (Le Minor *et al.*, 1970). According to this division, *S. bongori*, molecularly defined and accepted as species after 1973, was before this typing, a member of subgenus V. Thus, serovars of the species *S. bongori*, previously placed in the subgenus V, continue to keep the roman letter V and they are written as serovar *Salmonella bongori* V 13, 22:z35: or *Salmonella* V 13, 22:z35: (Popoff *et al.*, 2004).

Responsible for the revision of the White-Kauffmann-Le Minor scheme is the Pasteur Institute in Paris which is the WHO’s Collaborating Centre for Reference and Research on *Salmonella*. Another critical centre for recommending rules and changes concerning the genus *Salmonella* is the CDC and both taking into account information from molecular methods used around the world.

## CONCLUSION

The many scientific opinions published on the rules of naming and epidemiologically grouping *Salmonella* strains through the years have hampered, perhaps, at times the successful attempts of epidemiologically investigating, thus effectively controlling, animal salmonellosis. The bulk of information produced to this day by the biochemical, molecular or epidemiological methods used to classify the genus is complex and ultimately confusing, to those attempting to associate a serovar with an animal host-species (Agbaje *et al.*, 2011).

One should remember, when studying *Salmonella* infections, that some clinicians (medical doctors and veterinarians) may still report their clinical findings using older taxonomic rules, thus confusing their younger colleagues familiar with newer methods, such as molecular.

On the other hand, although molecular information is fast accumulated, Opinion 80, a “consensus” between clinicians and taxonomists, hasn’t yet been fully adopted by organizations, such as the CDC or the WHO’s Collaborating Centre (Grimont and Weill, 2007). This slow adoption by renowned laboratories of officially set rules for such an important microorganism, illustrates the difficulties encountered when the new must successfully merge with the older. These difficulties negatively influence also the application and final acceptance of newly developed and developing molecular methods. It appears, therefore, that there is a long way before molecular methods replace the older rules applied to the epidemiological grouping of *Salmonella* isolates.

The current List of Approved Names which is a compromise between all those methodically studying the microorganism for many decades, is also the link between old and new information concerning this important pathogen causing today the majority of food born illness around the world. Increased access to molecular methods around the world for epidemiologically characterizing isolates of the genus *Salmonella*, need to take into account the above to successfully replace serotyping, helping consequently the better understanding of this microorganism’s pathogenicity, thus the effective control of animal infections.

Leaders in these changes for a guaranteed success should be organizations and laboratories, such as the WHO and the CDC having great experience in properly placing *Salmonella* isolates but also money to further develop new molecular methods and computerized data libraries. Until then, the bulk of information reported by scientists studying human and animal salmonellosis will continue to add difficulties in defining the pathogenic importance of newly isolated strains and, most importantly, studying the adaptation of serovars to new animal hosts.

Serotyping scores in the third External Quality Assurance of *Salmonella* typing (EQA) were found acceptable, due to that 90% of all strains were correctly serotyped. However, in regard to participating laboratories only 15 of 26 (58%) correctly identified all serovars. One EU laboratory identified only 20% of the serovars correctly while another misclassified some of the most common serovars (Pol-Hofstad *et al.*, 2012). Thus,

with an accepted statistical threshold for correct results put at 90, 81% of laboratories would pass. However, in such a case, considering that about 100000 cases of salmonellosis are reported annually to the European Centre for Disease Prevention and Control (ECDC), about 10000 cases would be reported as caused by the wrong serovar and unknown is the number of false negative samples. The problems mainly lie in the typing of H antigens, with subsequent misnaming of the serovars and the limited sensitivity of culturing the microorganism from samples. Perhaps, such problems could be resolved, if a properly chosen molecular method is simultaneously used with culturing and serotyping.

### REFERENCES

- Acheson, D.W. and G.T. Keusch, 1997. Intestinal Infections with *Salmonella* and *Yersinia* Species. In: Gastrointestinal Infections: Diagnosis and Management, LaMont, J.T. (Ed.). Marcel Dekker Inc., New York, pp: 149-189.
- Agbaje, M., R.H. Begum, M.A. Oyekunle, O.E. Ojo and O.T. Adenubi, 2011. Evolution of *Salmonella* nomenclature: A critical note. Folia Microbiol., 56: 497-503.
- Arrach, N., S. Porwollik, P. Cheng, A. Cho, F. Long, S.H. Choi and M. McClelland, 2008. *Salmonella* serovar identification using PCR-based detection of gene presence and absence. J. Clin. Microbiol., 46: 2581-2589.
- Brenner, F.W., R.G. Villar, F.J. Angulo, R. Tauxe and B. Swaminathan, 2000. *Salmonella* nomenclature. J. Clin. Microbiol., 38: 2465-2467.
- Brown, J.H., 1935. Theobald smith 1859-1934. J. Bacteriol., 30: 1-3.
- CDC, 2007. *Salmonella* surveillance: Annual summary, 2005. US Department of Health and Human Services, Atlanta, Georgia.
- Cohen, N.D., H.L. Neibergs, E.D. McGruder, H.W. Whitford, R.W. Behle, P.M. Ray and B.M. Hargis, 1993. Genus-specific detection of Salmonellae using the Polymerase Chain Reaction (PCR). J. Vet. Diagn. Invest., 5: 368-371.
- Crosa, J.H., D.J. Brenner, W.H. Ewing and S. Falkow, 1973. Molecular relationships among the Salmonellae. J. Bacteriol., 115: 307-315.
- De Lappe, N., 2009. *Salmonella* taxonomy. Version 1, Ref: NSRLFM041, Dept of Medical Microbiology, Division of Clinical Microbiology, Galway University Hospitals.
- Euzéby, J.P., 1999. Revised *Salmonella* nomenclature: Designation of *Salmonella enterica* (ex Kauffmann and Edwards, 1952) Le Minor and Popoff (1987) sp. nov. nom. rev. as the neotype species of the genus *Salmonella* Lignieres (1900) (Approved Lists, 1980), rejection of the name *Salmonella choleraesuis* (Smith, 1894) Weldin (1927) (Approved Lists, 1980) and conservation of the name *Salmonella typhi* (Schroeter, 1886) Warren and Scott (1930) (Approved Lists, 1980). Int. J. Syst. Bacteriol., 49: 927-930.
- Falush, D., M. Torpdahl, X. Didelot, D.F. Conrad, D.J. Wilson and M. Achtman, 2006. Mismatch induced speciation in *Salmonella*: Model and data. Phil. Trans. R. Soc. B, 361: 2045-2053.
- Grimont, P.A.D. and F.X. Weill, 2007. Antigenic formulae of the *Salmonella* serovars. WHO Collaborating Centre for Reference and Research on *Salmonella*, Institut Pasteur, Paris, France.
- Guibourdenche, M., P. Roggentin, M. Mikoleit, P.I. Fields, J. Boekemuhl, P.A.D. Grimont and F.X. Weill, 2010. Supplement 2003-2007 (No. 47) to the white-kauffmann-le minor scheme. Res. Microbiol., 161: 26-29.
- Kauffman, F., 1966. The Bacteriology of Enterobacteriaceae. The Willimans and Wilkins Co., Baltimore.
- Le Minor, L. and M.Y. Popoff, 1987. Designation of *Salmonella enterica* sp. nov., nom. rev., as the type and only species of the genus *Salmonella*: Request for an opinion. Int. J. Syst. Bacteriol., 37: 465-468.
- Le Minor, L., R. Rohde and J. Taylor, 1970. Nomenclature des *Salmonella*. Ann. Inst. Pasteur (Paris), 119: 206-210.
- Lim, H., K.H. Lee, C.H. Hong, G.J. Bahk and W.S. Choi, 2005. Comparison of four molecular typing methods for the differentiation of *Salmonella* spp. Int. J. Food Microbiol., 105: 411-418.
- May, C.G. and K. Goodner, 1927. Cultural and antigenic studies on *Salmonella gallinarum* and *Salmonella pullorum*. J. Bacteriol., 13: 129-146.
- Miller, S.I. and A. David, 2000. *Salmonella* species, including *Salmonella typhi*. In: Mandell, Douglas and Bennette Principle and Practice of Infectious Diseases, Mandell, G.L. J.E. Bennett and R. Dolin (Eds.). 5th Edn., Churchill Livingstone, Philadelphia, pp: 2346-2356.
- Pol-Hofstad, I.E., W.F. Jacobs-Reitsma, H. Maas, E. de Pinna, D. Mevius and K.A. Mooijman, 2012. ECDC technical report: Third external quality assurance scheme for *Salmonella* typing. European Food and Waterborne Diseases and Zoonoses Network.

- Popoff, M.Y. and L. Le-Minor, 2001. Antigenic Formulas of the Salmonella Serovars. 8th Rev. Edn., WHO Collaborating Centre for Reference and Research on Salmonella, Institut Pasteur, Paris.
- Popoff, M.Y., J. Bockemuhl and L.L. Gheesling, 2004. Supplement 2002 (No. 46) to the Kauffmann-White scheme. Res. Microbiol., 155: 568-570.
- Porwollik, S., E.F. Boyd, C. Choy, P. Cheng, L. Florea, E. Proctor and M. McClelland, 2004. Characterization of *Salmonella enteric* subspecies I genovars by use of microarrays. J. Bacteriol., 186: 5883-5898.
- Salmonella* Subcommittee of the Nomenclature Committee of the International Society for Microbiology, 1934. The genus *Salmonella* lignieres 1900. J. Hyg., 34: 333-350.
- SANCO, 2009. SANCO Workshop on *Salmonella* control in pigs. With the support of the European Food Safety Authority. CCAB, Brussels, 26 February 2009.
- Shelobolina, E.S., S.A. Sullivan, K.R. O'Neill, K.P. Nevin and D.R. Lovley, 2004. Isolation, characterization and U(VI)-reducing potential of a facultatively anaerobic, acid-resistant bacterium from low-pH, nitrate- and U(VI)-contaminated subsurface sediment and description of *Salmonella subterranean* sp. Appl. Environ. Microbiol., 70: 2959-2965.
- Skerman, V.B.D., V. McGowan and P.H.A. Sneath, 1980. Approved lists of bacterial names. Int. J. Syst. Bacteriol., 30: 225-420.
- Skerman, V.B.D., V. McGowan and P.H.A. Sneath, 1989. Approved Lists of Bacterial Names (Amended). American Society of Microbiology, Washington DC.
- Smith, T., 1894. The hog-cholera group of bacteria. US Bur. Anim. India Bull., 6: 6-40.
- Su, L.H. and C.H. Chiu, 2007. *Salmonella*: Clinical importance and evolution of nomenclature. Chang Gung Med. J., 30: 210-219.
- Tindall, B.J., P.A.D. Grimont, G.M. Garrity and J.P. Euzéby, 2005. Nomenclature and taxonomy of the genus *Salmonella*. Int. J. Syst. Evol. Microbiol., 55: 521-524.
- Truper, H.G., 2005. The type species of the genus *Salmonella* Lignieres 1900 is *Salmonella enteric* (exKauffmann and Edwards 1952) Le Minor and Popoff 1987, with the type strain LT2<sup>T</sup> and conservation of the epithet *enteric* in *Salmonella enteric* over all earlier epithets that may be applied to this species. Int. J. Syst. Evol. Microbiol., 55: 519-520.
- White, P.B., 1926. Further studies of the *Salmonella* group. Med. Res. Council Special Rep 103: 3-160.
- Wise, M.G., G.R. Siragusa, J. Plumblee, M. Healy, P.J. Cray and B.S. Seal, 2009. Predicting *Salmonella enterica* serotypes by repetitive sequence-based PCR. J. Microbiol. Methods, 76: 19-24.



### 1.1.3 Χαρακτηριστικά των *Salmonella* spp.

Τα στελέχη της οικογένειας Enterobacteriaceae που ανήκουν στο γένος *Salmonella* είναι Gram αρνητικά μη σπορογόνα, ευθέα βακτήρια διαστάσεων 0,7-1,5 x 2,0-5,0 μm, με περίτριχη μαστιγοφορία, άρα χαρακτηρίζονται από κίνηση. Εξαιρέση αποτελούν οι προσαρμοσμένοι στα πτηνά ορότυποι Gallinarum και Pullorum, οι οποίοι είναι ακίνητοι, άρα δεν φέρουν μαστίγια.

Είναι προαιρετικά αναερόβιοι μικροοργανισμοί με άριστη θερμοκρασία ανάπτυξης τους 37° C και εύρος διακύμανσης από 5-45° C (ICMSF 1996). Η D-γλυκόζη, καθώς και άλλοι υδατάνθρακες (L- αραβινόζη, μαλτόζη, D-μανιτόλη, D-μανόζη, L-ραμνόζη, D-σορβιτόλη, D-ξυλόζη, τρεχαλόζη) καταβολίζονται με την σύγχρονη παραγωγή οξέος και συχνά αερίου. Επίσης είναι θετικοί στην καταλάση, στο κόκκινο του μεθυλενίου και στα κιτρικά του Simmons, ενώ είναι αρνητικοί στις δοκιμές της οξειδάσης, της ινδόλης και του Voges-Proskauer. Τέλος, χαρακτηρίζονται από την παραγωγή H<sub>2</sub>S, την αναγωγή των νιτρικών σε νιτρώδη και τη μη υδρόλυση της ουρίας (Holt et al. 1994). Αναλυτικά τα βιοχημικά χαρακτηριστικά των *Salmonella* spp. παρουσιάζονται στον Πίνακα 1.

Μερικοί, όμως, ορότυποι παρουσιάζουν κάποιες ιδιαιτερότητες (Holt et al. 1994) όπως:

- οι Typhi, Paratyphi και Dublin φέρουν ειδικό ελυτροειδές περίβλημα.
- οι Gallinarum και Pullorum είναι ακίνητες (δεν φέρουν μαστίγια), ενώ συχνά παρατηρούνται και μη κινητά (μη μαστιγοφόρα) μεταλλαγμένα στελέχη φυσιολογικά κινητών (μαστιγοφόρων) οροτύπων.
- ο Paratyphi A δεν παράγει H<sub>2</sub>S, δεν αποκαρβοξυλιώνει τη λυσίνη και δεν αναπτύσσεται στα κιτρικά άλατα του Simmons.
- Οι Choleraesuis και Abortusequi δεν παράγουν H<sub>2</sub>S.
- Τα υποείδη *arizonae* και *diarizonae* μπορούν να ζυμώσουν τη λακτόζη. Μερικά στελέχη του υποείδους *arizonae* ζυμώνουν τη λακτόζη αργά, ενώ άλλα τη ζυμώνουν γρήγορα (Edwards et al. 1959).

- Ο ορότυπος Typhi κατέχει μερικά μοναδικά βιοχημικά χαρακτηριστικά, που του επιτρέπουν να διαφοροποιείται από τους άλλους οροτύπους (Cowan & Steel 1993). Αυτά είναι:
  - Παράγει ίχνη H<sub>2</sub>S στο TSI άγαρ.
  - Δεν αποκαρβοξυλιώνει την ορνιθίνη.
  - Δεν αναπτύσσεται στα κιτρικά άλατα του Simmons.
  - Δεν παράγει αέριο από τη γλυκόζη.

**Πίνακας 1.1: Διαφοροποιητικά βιοχημικά χαρακτηριστικά ειδών και υποειδών *Salmonella* spp. (Grimont & Weill 2007).**

Είδος	<i>S. enterica</i>					<i>S. bongori</i>	
	<i>enterica</i>	<i>salamae</i>	<i>arizonae</i>	<i>diarizonae</i>	<i>houtanae</i>	<i>indica</i>	
<b>Υποείδος</b>							
<i>Characters</i>							
Dulcitol	+	+	-	-	-	d	+
ONPG (2h)	-	-	+	+	-	d	+
Malonate	-	+	+	+	-	-	-
Gelatinase	-	+	+	+	+	+	-
Sorbitol	+	+	+	+	+	-	+
Growth with KCN	-	-	-	-	+	-	+
L(+)- tartrate <sup>1</sup>	+	-	-	-	-	-	-
Galacturonate	-	+	-	+	+	+	+
γ-Glutamyltransferase	+	+	-	+	+	+	+
β-Glucuronidase	d	d	-	+	-	d	-
Mucate	+	+	+	-(70%)	-	+	+
Salicine	-	-	-	-	+	-	-
Lactose	-	-	-(75%)	+(75%)	-	d	-
Lysed by phage O1	+	+	-	+	-	+	d
Συνήθης ξενιστής	<b>Θερμόαιμα ζώα</b>			<b>Ψυχρόαιμα ζώα</b>			

<sup>1</sup>:Typhimurium d, Dublin –

+ : >90% θετική αντίδραση

- : >90% αρνητική αντίδραση

d : διαφορετικές αντιδράσεις ανάλογα με τον ορότυπο

#### 1.1.4 Αντιγονική σύνθεση

Τα αντιγόνα των *Salmonella* spp. είναι συστατικά του κυττάρου και διακρίνονται σε τρεις κατηγορίες: σωματικά αντιγόνα (O), αντιγόνα μαστιγίου (flagellar) (H) και αντιγόνα επιφάνειας (Vi) ή κάψας (K). Η αντιγονική δομή των *Salmonella* spp. έχει αποκαλυφθεί κυρίως μέσω της ικανότητάς τους να αντιδρούν με αντίστοιχους αντιορούς, γεγονός που είχε ως αποτέλεσμα την υποδιαίρεση των ανωτέρω αντιγόνων σε διαφορετικές κατηγορίες.

**Σωματικά αντιγόνα (αντιγόνα O):** Τα αντιγόνα O είναι λιποπολυσακχαρίτες που είναι συστατικά του κυτταρικού τοιχώματος. Είναι θερμοάντοχα (2 ½ ώρες σε 100° C), δεν καταστρέφονται από την αλκοόλη και τα οξέα, είναι ανθεκτικά σε συγκέντρωση αιθανόλης 96% στους 37 °C για 4 ώρες και επίσης ανθεκτικά σε φορμαλδεύδη 0,2%. Αποτελούνται από διαφορετικά αντιγονικά συστατικά, που χαρακτηρίζονται με αραβικούς αριθμούς 1,2,3 (Parija 2012).

Τα Gram (-) βακτήρια, άρα και τα *Salmonella* spp., διαθέτουν τρία στρώματα πολυμερών μορίων που βρίσκονται στην εξωτερική επιφάνεια της στοιβάδας της πεπτιδογλυκάνης του κυτταρικού τοιχώματος. Τα στρώματα αυτά είναι ένα στρώμα λιποπρωτεΐνης που ακολουθείται από μία εξωτερική μεμβράνη και ένα στρώμα διαφόρων λιποπολυσακχαριτών (LPS). Ο LPS, που ονομάζεται «ενδοτοξίνη» των Gram (-) βακτηρίων, βοηθάει την επιβίωση του μικροβίου γιατί το προστατεύει από το περιβάλλον, ενώ είναι τοξικός για τα ζώα. Η ενδοτοξίνη ελευθερώνεται μόνο όταν το βακτηριακό κύτταρο υποστεί λύση.

Ο λιποπολυσακχαρίτης είναι αμφιπαθής. Δηλαδή, διαθέτει υδρόφιλα και υδρόφοβα στοιχεία στο ίδιο μόριο. Αποτελείται από τρία μέρη: το λιπίδιο A (Lipid A), στο οποίο μεταβιβάζεται η τοξικότητα, έναν κεντρικό πολυσακχαρίτη (core polysaccharide) και ένα πολυμερές επαναλαμβανόμενων ολιγοσακχαριτών, που αποτελούν την O-πλευρική αλυσίδα (O-side chain) ή το O-αντιγόνο (Raetz & Whitfield 2002).

Η δομή της O-πλευρικής αλυσίδας και η ικανότητά της να προκαλεί ανοσοαπόκριση έχει αξιοσημείωτες επιδράσεις στη χυμική ανοσία και στην



αποτελεσματικότητα της φαγοκυττάρωσης (Rycroft 2000). Στα παθογόνα βακτήρια, ο LPS καθορίζει τον βαθμό αλληλεπίδρασης βακτηρίου και ξενιστή, επηρεάζοντας σημαντικά την αποτελεσματικότητα του ανοσοποιητικού συστήματος. Το λιπίδιο A είναι, όπως προαναφέρθηκε, το τμήμα πρόκλησης ενδοτοξικών βλαβών, ενώ η πλευρική αλυσίδα (το O- αντιγόνο) είναι το κύριο τμήμα ανοσοδιέγερσης. Αναλυτικότερα,

- Η O-πλευρική αλυσίδα είναι υπεύθυνη για την ειδικότητα του O-αντιγόνου. Καθορίζει δε την παθογένεια των Gram (-) βακτηρίων. Στελέχη με ατελή την O-πλευρική αλυσίδα, που δεν έχουν τρισακχαρίδια και τους λείπει ένα μέρος των ολιγοσακχαριδίων, είναι γνωστά ως “rough” στελέχη. Τα “rough” στελέχη είναι λιγότερο παθογόνα ή απαθογόνα σε σχέση με τα “smooth” στελέχη, τα οποία έχουν πλήρη την O-πλευρική αλυσίδα. Τα “smooth” στελέχη έχουν πολυσακχαριδικούς σχηματισμούς (whiskers) οι οποίοι προβάλλουν από την κυτταρική επιφάνεια και φέρουν τα O-αντιγόνα. Τα O- αντιγόνα είναι οι κύριοι στόχοι της δράσης του συμπληρώματος, καθώς και των αντισωμάτων του ξενιστή. Όταν η αντίδραση λαμβάνει χώρα στις άκρες των πολυσακχαριδικών αλυσίδων, δηλαδή σε μεγάλη απόσταση από τη βακτηριακή κυτταρική επιφάνεια, το συμπλήρωμα χάνει τη φυσιολογική λυτική του δράση. Αυτά τα βακτήρια είναι λοιμογόνα εξαιτίας της αντίστασης που παρουσιάζουν στους αμυντικούς μηχανισμούς του ξενιστή. Αν μειωθεί το μήκος των πολυσακχαριδικών αλυσίδων ή αυτές απομακρυνθούν, τα αντισώματα αντιδρούν με τα αντιγόνα πάνω στη βακτηριακή επιφάνεια ή πολύ κοντά σε αυτή με αποτέλεσμα να ενεργοποιείται η λυτική δράση του συμπληρώματος (έτσι εξηγείται το γεγονός ότι τα “rough” στελέχη δεν είναι λοιμογόνα).

- Η δράση της ενδοτοξίνης (λιπίδιο A), που είναι το ενδοτοξικό τμήμα του κυτταρικού τοιχώματος, είναι ένας άλλος σημαντικός παράγοντας παθογένειας του γένους *Salmonella*. Οι ενδοτοξίνες, γενικώς, αν και είναι ισχυρά αντιγονικές ουσίες, σπάνια προκαλούν μόνιμη ανοσολογική κάλυψη, ώστε να παρέχεται προστασία στο ζώο σε περίπτωση μελλοντικής προσβολής του από την ίδια ενδοτοξίνη (Clark 2015, Parija 2012).

**Αντιγόνα Μαστιγίου (Αντιγόνα H):** Τα περισσότερα στελέχη των *Salmonella* spp. είναι κινητά, διότι φέρουν μαστίγια. Τα μαστίγια είναι λεπτές (12-30nm) και επιμήκεις δομές που φτάνουν ακόμη και το δεκαπλάσιο της διαμέτρου του βακτηριακού κυττάρου. Στην

περίπτωση των *Salmonella* spp. αναλογούν 5-10 μαστίγια ανά βακτήριο (Macnab 1996). Τα μαστίγια είναι δομημένα από μια πρωτεΐνη που ονομάζεται μαστιγίνη ή «φλατζελίνη» (flagellin) και κωδικοποιούνται από περίπου 40 διαφορετικά γονίδια. Τα μαστίγια έχουν αντιγονική ικανότητα, τα δε αντιγόνα τους καλούνται αντιγόνα ‘H’, και αντιδρούν με τα αντίστοιχα αντισώματα.

Τα H- αντιγόνα είναι ουσίες πρωτεϊνικής φύσης ευαίσθητες στη θερμότητα, στην αλκοόλη και τα οξέα, αλλά διατηρούνται σε φορμαλδεύδη 0,2%-0,4% (Macnab 1996, 2003). Τα αντιγόνα μαστιγίου αποτελούνται από διαφορετικά αντιγονικά συστατικά, που χαρακτηρίζουν τα διαφορετικά στελέχη των *Salmonella* spp.

Οι περισσότεροι ορότυποι των *Salmonella* spp. μπορούν να παράγουν μαστίγια με δύο διαφορετικές αντιγονικές ειδικότητες, γεγονός που θα μπορούσε να βοηθήσει τον μικροοργανισμό να επιβιώσει από τους μηχανισμούς άμυνας του ξενιστή του. Σε αυτή την περίπτωση το H-αντιγόνο καλείται διφασικό (Macnab 1987). Ελάχιστοι ορότυποι, μεταξύ των οποίων οι Enteritidis και Typhi παράγουν μαστίγια τα οποία έχουν πάντα την ίδια αντιγονική ειδικότητα. Αυτά τα αντιγόνα καλούνται μονοφασικά. Στα διφασικά H-αντιγόνα, τα γονίδια που κωδικοποιούν τα δύο είδη είναι κατά κάποιο τρόπο όμοια, αλλά όχι πανομοιότυπα, πιθανώς διότι έχουν προέλθει από την αντιγραφή ενός ομόλογου πρόδρομου γονιδίου. Έτσι οι ορότυποι των *Salmonella* spp. χωρίζονται σε δύο ομάδες. Στους οροτύπους της ομάδας της φάσης 1 (ειδική φάση) και σε αυτούς της φάσης 2 (μη ειδική φάση). Τα αντιγόνα μαστιγίου φάσης 1 και φάσης 2 καθορίζονται από τα γονίδια H1 και H2, τα οποία κωδικοποιούν την πρωτεΐνη «μαστιγίνη» ή «φλατζελίνη». Η σύνθεση της H2 «φλατζελίνης» ελέγχεται από έναν ανασυνδυασμό, ο οποίος αναστρέφει το τμήμα του χρωμοσώματος, που περιέχει το H2 γονίδιο. Όταν το H2 γονίδιο ενεργοποιείται, ένα άλλο παρακείμενο γονίδιο επίσης ενεργοποιείται και συνθέτει έναν αναστολέα ο οποίος εμποδίζει την έκφραση του H1 γονιδίου (Silverman et al. 1979).

Ο μηχανισμός αλλαγής φάσης των *Salmonella* spp. γίνεται κατανοητός μέσω τριών κυρίως βημάτων :

1. Ανάπτυξη ενός *in vitro* συστήματος για την εύρεση των μεταλλαγμένων στελεχών: Μέσα στην καλλιέργεια εκφράζονται τα περισσότερα στελέχη που διαθέτουν αντιγόνα τόσο της φάσης 1, όσο και της φάσης 2. Ωστόσο πρώιμες (fresh) απομονωθείσες μονήρεις αποικίες ίσως εκφράσουν μόνο τη μία φάση. Για τον καθορισμό της άλλης

φάσης πρέπει να πραγματοποιήσουμε αναστροφή φάσης. Αυτό πραγματοποιείται με τον ενοφθαλμισμό του στελέχους που μας ενδιαφέρει σε άγαρ που ελέγχει την κινητικότητα του μικροοργανισμού (motility agar), το οποίο περιέχει γνωστό H-αντιγό που προκαλεί οροσυγκόλληση. Τα αντισώματα θα κινητοποιήσουν τα κύτταρα, τα οποία εκφράζουν το αρχικό H-αντιγόνο (σε οποιαδήποτε δεδομένη στιγμή εκφράζεται μόνο ένα αντιγόνο), αλλά όχι τα κύτταρα που έχουν υποστεί αναστροφή φάσης και επομένως εκφράζουν ένα καινούριο αντιγόνο. Οι απόγονοι των τελευταίων απομακρύνονται από το σημείο του ενοφθαλμισμού. Αυτά τα κύτταρα μπορούν να απομονωθούν και έτσι να καθοριστεί το νέο H-αντιγόνο. Αν δεν αναπτυχθούν κινητά κύτταρα παρουσία του H-αντιορού, το στέλεχος αυτό είναι μονοφασικό (τα μονοφασικά είναι τα μεταλλαγμένα στελέχη).

2. Εύρεση των εμπλεκόμενων γονιδίων με χρήση μεθόδων μοριακής και κυτταρικής βιολογίας, κλωνοποίηση και αλληλούχηση των γονιδίων αυτών.

3. Ανασύσταση του μηχανισμού αλλαγής φάσης μέσω της έκφρασης των μη μεταλλαγμένων πρωτεϊνών στα μεταλλαγμένα στελέχη.

Ο μηχανισμός αυτός εμπλέκει την αναστροφή ενός τμήματος DNA το οποίο βρίσκεται προσκολλημένο στο H2 οπερόνιο και λειτουργεί ως υποκινητής. Όταν αυτή η περιοχή του υποκινητή έχει 5'→3' προσανατολισμό (φάση 1), εκφράζονται οι δύο πρωτεΐνες που κωδικοποιούνται από το H2 οπερόνιο: η H2 πρωτεΐνη του μαστιγίου και ο rH1, ένας ειδικός αναστολέας, που εμποδίζει την μεταγραφή του H1 γονιδίου, το οποίο βρίσκεται σε διαφορετική περιοχή του γονιδιώματος της *Salmonella*. Περίπου κάθε 1000 κυτταρικές διαιρέσεις, το τμήμα που περιέχει τον υποκινητή του H2 γονιδίου αναστρέφεται, με αποτέλεσμα ούτε το H2 ούτε και το rH1 να εκφράζονται (φάση II). Απουσία του αναστολέα rH1, το H1 γονίδιο μεταφράζεται και παράγεται η H1 πρωτεΐνη (Lodish et al. 2000).

Έτσι, τα υπογένη I, II, IIIa και VI είναι διφασικά, ικανά για την παραγωγή δύο (και μερικές φορές τριών) λειτουργικά ισοδύναμων, αλλά ανοσολογικά διαφορετικών υπομονάδων της φλατζελίνης (μαστιγίνης).

**Αντιγόνο (Vi):** Το αντιγόνο Vi είναι ένα επιφανειακό αντιγόνο, που επικαλύπτει το O-αντιγόνο. Είναι ένα γραμμικό ομοπολυμερές του  $\alpha$ -1,4 2-deoxy-2- N-acetyl galactosamine uronic acid, το οποίο μπορεί εύκολα να υποστεί O-ακετυλίωση στην

θέση C3 (Daniels et al. 1989). Είναι ο μόνος αληθής πολυσακχαρίτης της κάψας που παράγεται από τα *Salmonella* spp. Ανακαλύφθηκε το 1934 από τους Felix και Pitt και ορίστηκε ως αντιγόνο Vi εξαιτίας της σχέσης του με την παθογένεια. Είναι ανάλογο των K αντιγόνων των κολοβακτηριδίων. Καταστρέφεται υπό την επίδραση της φαινόλης, αν θερμανθεί για μία ώρα στους 60 °C, αλλά παρουσιάζει ανθεκτικότητα σε φορμαλδεΰδη 0,25% και στην αλκόολη. Παράγεται μόνο από στελέχη των ορότυπων Typhi, Paratyphi C και Dublin, αλλά και του *Citrobacter freundii*. Ο ρόλος του Vi – αντιγόνου δεν είναι ακόμα απόλυτα ξεκαθαρισμένος. Πιστεύεται ότι προστατεύει τον μικροοργανισμό από τη δράση του συμπληρώματος καλύπτοντας την εξωτερική επιφάνειά του, όταν αυτός βρίσκεται στο εξωκυτταρικό περιβάλλον, σε αντίθεση δηλαδή με το ενδοκυτταρικό περιβάλλον στο οποίο αναπτύσσεται φυσιολογικά (Parija 2012).

### 1.1.5 Ειδικότητα ξενιστή

Τα είδη του γένους *Salmonella* απαντώνται παντού στο φυσικό περιβάλλον, ενώ μπορούν να απομονωθούν σχεδόν από όλα τα σπονδυλωτά, καθώς και από τα έντομα. Για τον λόγο αυτό αναφέρονται ως «οικουμενικοί παθογόνοι μικροοργανισμοί»- [universal pathogens (Falkow & Mekalanos 1990)]. Τα *Salmonella* spp. ως αίτια νοσημάτων παρουσιάζουν διαφορετική παθογένεια στα διάφορα είδη ζώων, που οφείλεται κυρίως στο γεγονός ότι ορισμένα από αυτά έχουν την ικανότητα να προσαρμόζονται λιγότερο ή περισσότερο σε διάφορους ξενιστές. Συνέπεια αυτής της προσαρμογής είναι η υπέρμετρη αύξηση της λοιμογόνου δύναμης και της παθογένειας των *Salmonella* spp. απέναντι στο είδος του ζώου στο οποίο προσαρμόζονται και η σύγχρονη ελάττωση ή η πλήρης απώλεια της λοιμογόνου δύναμης και της παθογένειάς τους απέναντι σε άλλα είδη ζώων. Αυτές οι διαφορές περικλείονται στην έννοια «εξειδίκευση-ειδικότητα ξενιστή» ή αλλιώς «προσαρμογή ξενιστή» (Uzzau et al. 2001).

Μελέτες έχουν δείξει ότι συγκεκριμένοι ορότυποι σχετίζονται με συγκεκριμένα σύνδρομα. Επί παραδείγματι, ο ορότυπος *Salmonella enterica* ser. Dublin συνδέεται κυρίως με νόσο στα βοοειδή, ενώ ο ορότυπος *Salmonella enterica* ser. Choleraesuis ευθύνεται για το μεγαλύτερο ποσοστό σαλμονελλώσεων στους χοίρους (Kingsley & Baumler 2000). Ασφαλώς, η φύση και η δριμύτητα των σαλμονελλώσεων διαφέρει στα

διάφορα είδη ζώων και επηρεάζεται από πολλούς παράγοντες στους οποίους περιλαμβάνονται ο ορότυπος, η λοιμογόνος δύναμη του στελέχους, η μολύνουσα δόση, το είδος, η ηλικία και η ανοσολογική κατάσταση του ξενιστή, καθώς και η γεωγραφική περιοχή (Wallis 2005). Η στενή συγγένεια του DNA των οροτύπων του γένους *Salmonella* αποτελεί απόδειξη της κοινής καταγωγής τους από έναν «πρόγονο» που υπήρξε περίπου 25 με 40 εκατ. χρόνια πριν (Baumler et al. 1998). Ωστόσο, περιβαλλοντικοί και γενετικοί παράγοντες οδήγησαν στην απόκλιση του γένους *Salmonella* από τον κοινό τους πρόγονο και στην ανάδυση οροτύπων που διαφέρουν ως προς το εύρος των ξενιστών τους.

Έτσι, με βάση την «προτίμηση» ξενιστή, οι ορότυποι που προκαλούν την πλειοψηφία των σαλμονελλώσεων των ανθρώπων και των ζώων μπορούν να διακριθούν σε τρεις ομάδες:

Η **πρώτη** ομάδα περιλαμβάνει τους οροτύπους που παρουσιάζουν εξειδίκευση ξενιστή (host specific serovars ή host adapted serovars). Αυτοί οι ορότυποι επικρατούν σε ένα συγκεκριμένο είδος ξενιστή, αλλά μπορούν να προκαλέσουν συστηματική νόσο και σε ένα περιορισμένο αριθμό φυλογενετικά συγγενικών ειδών. Επί παραδείγματι, οι ορότυποι Dublin και Choleraesuis σχετίζονται γενικά με σοβαρή συστηματική νόσο στα βοοειδή και στον χοίρο αντίστοιχα, αλλά μπορούν επίσης να προκαλέσουν νόσο και σε άλλα θηλαστικά συμπεριλαμβανομένου και του ανθρώπου (Nnalue 1991, Uzzau et al. 2001). Τα ζώα που προσβάλλονται με αυτούς τους οροτύπους συχνά γίνονται κλινικά ασυμπτωματικοί φορείς.

Η **δεύτερη** ομάδα περιλαμβάνει τους οροτύπους εκείνους που είναι περιορισμένοι σε κάποιο ξενιστή (host restricted serovars). Δηλαδή, οι ορότυποι αυτοί σχετίζονται σχεδόν αποκλειστικά με ένα συγκεκριμένο είδος ξενιστή. Για παράδειγμα, οι ορότυποι Typhi, Gallinarum, Typhisuis και Abortusovis σχετίζονται με συστηματική νόσο στον άνθρωπο και στα ανώτερα πρωτεύοντα, τα πτηνά, τον χοίρο και τα πρόβατα αντίστοιχα (Wallis 2005).

Τέλος, η **τρίτη** ομάδα περιλαμβάνει τους ευρέως διαδεδομένους οροτύπους του υποείδους *enterica*, όπως οι Typhimurium και Enteritidis, οι οποίοι συνήθως προκαλούν αυτοπεριοριζόμενη γαστρεντερίτιδα σε μεγάλο φάσμα ξενιστών, που δεν σχετίζονται μεταξύ τους (un-restricted serovars) (Clarke & Gyles 1993). Αυτοί οι ορότυποι

σχετίζονται συχνότερα με νόσο στα νεαρά παρά στα ενήλικα ζώα, δηλώνοντας ότι δεν έχουν αναπτύξει τους μηχανισμούς που θα τους επιτρέψουν να αντιμετωπίσουν ένα ώριμο ανοσοποιητικό σύστημα (Baumler et al. 1998).

Παρά τη μεγάλη πρόοδο που σημειώθηκε στην κατανόηση των βασικών μηχανισμών της παθογένειας του είδους *S. enterica*, οι γνώσεις μας σχετικά με τα γονίδια και τους μηχανισμούς που εμπλέκονται στην έκφραση του φαινομένου «εξειδίκευση-ειδικότητα-προσαρμογή ξενιστή» είναι ακόμα περιορισμένες. Η μελέτη της εκλεκτικής πίεσης επιλογής που ασκείται στους παθογόνους μικροοργανισμούς από το ανοσοποιητικό σύστημα του ξενιστή, οδήγησε στο συμπέρασμα ότι η «προσαρμογή ξενιστή» οδηγεί σε μια φυσική ισορροπία κατά την οποία ο προσαρμοσμένος ορότυπος αποκλείει ανταγωνιστικά την «κυκλοφορία» άλλων οροτύπων στους πληθυσμούς ενός συγκεκριμένου ζωικού είδους. Σε αυτή την περίπτωση η αύξηση του βαθμού προσαρμογής μπορεί να συσχετιστεί με μεγαλύτερο ρυθμό απέκκρισης του παθογόνου μικροοργανισμού, καθώς και με μεγαλύτερη μεταδοτικότητα στους πληθυσμούς του συγκεκριμένου ξενιστή. Επιπλέον, η ικανότητα ενός παθογόνου οροτύπου να προκαλεί νόσο σε ένα ζωικό είδος εξαρτάται σημαντικά από τον βαθμό προσαρμογής τον οποίο εκδηλώνει αυτός στο βιολογικό του περιβάλλον. Αυτή η ικανότητα καθορίζει επίσης την «εμμονή» του οροτύπου στον ξενιστή. Επί παραδείγματι, ο προσαρμοσμένος στον χοίρο ορότυπος Choleraesuis, ο οποίος αν και δεν προκαλεί δριμύτερη νόσο στον χοίρο σε σχέση με τον άνθρωπο, εμμένει στους χοίρους καθιστώντας τους δεξαμενές του συγκεκριμένου οροτύπου.

Αναμφίβολα, η κατανόηση του τρόπου με τον οποίο οι παθογόνοι μικροοργανισμοί εγκαταστάθηκαν σε νέους ξενιστές στο παρελθόν, μπορεί να χρησιμοποιηθεί ως βάση για την πρόβλεψη της εξέλιξης των λοιμωδών νοσημάτων στο μέλλον. Ειδικότερα, η εφαρμογή βελτιωμένων μοριακών τεχνικών σε οροτύπους που απαντώνται συχνά στα ζώα, αλλά σπανίως στον άνθρωπο, μπορεί να δώσει νέες πληροφορίες ως προς τη δυνατότητα επιβίωσής τους σε ένα νέο ζωικό είδος, και επιπλέον να συνδράμει στη δημιουργία αυτεμβολίων για τους οροτύπους που ενδημούν σε μια εκτροφή. Συνεπώς, η μελέτη της «εξειδίκευσης-ειδικότητας ή προσαρμογής ξενιστή» που παρουσιάζουν οι ορότυποι του γένους *Salmonella* στον χοίρο μπορεί να

ρίξει φως στην προέλευση των σημερινών σαλμονελλώσεων, οι οποίες έχουν άμεσο αντίκτυπο στη Δημόσια Υγεία.

Η υποενότητα 1.1.5 περιγράφεται αναλυτικά στις εργασίες:

1. Ευαγγελοπούλου Γ.Δ, Γκόβαρης Α., Κρήτας Σ., Μπουριέλ Α. **Η έννοια της «προσαρμογής-εξειδίκευσης ξενιστή» στα είδη του γένους *Salmonella* και ο ρόλος της στις χοιροτροφικές μονάδες.**

(Πανελλήνιο Συνέδριο Κρέατος MEAT DAYS 2012- Το Κρέας και τα Προϊόντα του «Από το στάβλο στο Πιάτο». Αθήνα 29,30 Σεπτεμβρίου- 1 Οκτωβρίου 2012). σελ 105-111.

2. Evangelopoulou G, Kritas S, Govaris A, Burriel AR. 2013. **Animal salmonellosis: A brief review of “Host Adaptation and Host Specificity” of *Salmonella* spp.** Veterinary World 6(10), 703-708.

## Η έννοια της “προσαρμογής-εξειδίκευσης ξενιστή” στα είδη του γένους *Salmonella* και ο ρόλος της στις χοιροτροφικές μονάδες

Γ.Δ. Ευαγγελοπούλου<sup>1</sup>, Α. Γκόβαρης<sup>2</sup>, Σ. Κρήτας<sup>3</sup>, Α. Μπουριέλ<sup>4</sup>

<sup>1</sup>Υποψήφια Διδάκτωρ, Εργαστήριο Μικροβιολογίας και Παρασιτολογίας, Τμήμα Κτηνιατρικής, Σχολή Επιστημών Υγείας, Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας, Τρικάλων 224, 431 00 Καρδίτσα, E-mail:matinavet@hotmail.com

<sup>2</sup>Αναπληρωτής Καθηγητής, Εργαστήριο Υγιεινής Τροφίμων Ζωικής Προέλευσης, Τμήμα Κτηνιατρικής, Σχολή Επιστημών Υγείας, Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας, Τρικάλων 224, 431 00 Καρδίτσα

<sup>3</sup>Αναπληρωτής Καθηγητής, Εργαστήριο Μικροβιολογίας και Λοιμωδών Νοσημάτων, Κτηνιατρική Σχολή Α.Π.Θ., 541 24 Θεσσαλονίκη

<sup>4</sup>Καθηγήτρια, Εργαστήριο Μικροβιολογίας και Παρασιτολογίας, Τμήμα Κτηνιατρικής, Σχολή Επιστημών Υγείας, Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας, Τρικάλων 224, 431 00 Καρδίτσα

**Περίληψη:** Το γένος *Salmonella* περιλαμβάνει παθογόνα βακτηρίδια με παγκόσμια σημασία στην οικονομία και στη Δημόσια Υγεία. Στο είδος *Salmonella enterica* ανήκουν πάνω από 2.500 ορότυποι που απασχολούν την ιατρική και την κτηνιατρική επιστήμη. Οι ορότυποι αυτοί διαφέρουν σημαντικά ως προς το εύρος των ξενιστών τους, καθώς και ως προς τη φύση της νόσου που είναι ικανοί να προκαλέσουν. Αυτές οι διαφορές περικλείονται στην έννοια “εξειδίκευση-ειδικότητα ξενιστή” ή αλλιώς “προσαρμογή ξενιστή”. Η πρόσφατη ανάδειξη των τροφιμογενών παθογόνων, όπως είναι είδη του *Salmonella* spp., έχει προκαλέσει αυξανόμενο ενδιαφέρον για τον τρόπο με τον οποίο οι μικροοργανισμοί αυτοί προκαλούν νοσήματα όταν εισβάλλουν, επιβιώνουν και εξαπλώνονται σε νέους ξενιστές. Για να αλλάξουν το φάσμα των ξενιστών τους, οι παθογόνοι μικροοργανισμοί χρειάζονται προσαρμογές, οι οποίες θα εξασφαλίσουν την “κυκλοφορία” τους στο νέο ζωικό είδος. Αυτές οι προσαρμογές φαίνεται να έχουν αποκτηθεί αρκετές φορές εντός του γένους *Salmonella*, γεγονός που αποδεικνύεται από το ότι οι υπάρχοντες ορότυποι *Salmonella* διαφέρουν σημαντικά ως προς το εύρος των ξενιστών τους. Έτσι, ο ορότυπος *Salmonella* Typhii είναι ίσως εκείνος που παρουσιάζει σε μεγαλύτερο βαθμό την εξειδίκευση ξενιστή, αφού προκαλεί νόσο μόνο στον άνθρωπο και στα ανώτερα πρωτεύοντα. Αντίθετα, άλλοι ορότυποι έχουν την ικανότητα να προκαλούν νόσο και να εμμένουν σε πολλά διαφορετικά ζωικά είδη, παρουσιάζοντας μεγάλο εύρος ξενιστών. Ο τρόπος που τα βακτηρίδια μπορούν να υπερνικούν τα εμπόδια του κάθε ζωικού είδους και να προσαρμόζονται σε νέους ξενιστές είναι καθοριστικός για την κατανόηση τόσο της προέλευσης των λοιμωδών νοσημάτων, όσο και της ανάδειξης των νέων παθογόνων. Η κατανόηση αυτή θα επιτευχθεί αν απαντηθεί ένα βασικό ερώτημα: τι καθορίζει το εύρος ξενιστών των *Salmonella* spp. και ποια συγκεκριμένα σύνδρομα σχετίζονται με ένα δεδομένο ορότυπο *Salmonella*; Η ανάλυση των λοιμογόνων παραγόντων που διαθέτουν και χρησιμοποιούν οι διάφοροι ορότυποι *Salmonella*, μπορεί να αποτελέσει ένα ισχυρό εργαλείο για τη μελέτη των μηχανισμών της “προσαρμογής-εξειδίκευσης ξενιστή”, επειδή αυτά τα παθογόνα έχουν μελετηθεί επαρκώς από την άποψη της φυσιολογίας και προσφέρονται πλέον για γενετική ανάλυση.

**Λέξεις ευρετηρίασης:** *Salmonella*, ξενιστής, προσαρμογή



## ΕΙΣΑΓΩΓΗ

Τα είδη του γένους *Salmonella* απαντώνται παντού στο φυσικό περιβάλλον, ενώ μπορούν να απομονωθούν σχεδόν από όλα τα σπονδυλωτά, καθώς και από τα έντομα. Για το λόγο αυτό αναφέρονται ως "οικουμενικοί παθογόνοι μικροοργανισμοί" -[universal pathogens (Falkow and Mekalanos 1990)]. Τα *Salmonella* spp. ως αίτια νοσημάτων παρουσιάζουν στα διάφορα είδη ζώων διαφορετική παθογένεια, που οφείλεται κυρίως στο γεγονός ότι ορισμένα από αυτά έχουν την ικανότητα να προσαρμόζονται λιγότερο ή περισσότερο σε διάφορους ξενιστές. Συνέπεια αυτής της προσαρμογής είναι η υπέρμετρη αύξηση της λοιμογόνου δύναμης και της παθογένειας των *Salmonella* spp. απέναντι στο είδος του ζώου στο οποίο προσαρμόζονται και η σύγχρονη ελάττωση ή η πλήρης απώλεια της λοιμογόνου δύναμης και της παθογένειάς τους απέναντι σε άλλα είδη ζώων. Αυτές οι διαφορές περικλείονται στην έννοια "εξειδίκευση-ειδικότητα ξενιστή" ή αλλιώς "προσαρμογή ξενιστή" (Uzzau et al. 2001).

Η γνώση ότι οι ορότυποι του γένους *Salmonella* προσαρμόζονται στους ξενιστές τους, βασίζεται σε επιδημιολογικά αποδεικτικά στοιχεία. Μελέτες που αναφέρονται στη συσχέτιση οροτύπων με δεδομένους ξενιστές καθώς και με συγκεκριμένες νόσους, αποκαλύπτουν ότι οι συγκεκριμένοι ορότυποι σχετίζονται με συγκεκριμένα σύνδρομα. Επί παραδείγματι, ο ορότυπος *Salmonella enterica* ser. Dublin συνδέεται κυρίως με νόσο στα βοοειδή, ενώ ο ορότυπος *Salmonella enterica* ser. Choleraesuis ευθύνεται για το μεγαλύτερο ποσοστό σαλμονελλώσεων στους χοίρους (Kingsley and Baumler 2000). Ασφαλώς, η φύση και η δριμύτητα των σαλμονελλώσεων διαφέρει στα διάφορα είδη ζώων και επηρεάζεται από πολλούς παράγοντες στους οποίους περιλαμβάνονται ο ορότυπος, η λοιμογόνος δύναμη του στελέχους, η μολύνουσα δόση, το είδος, η ηλικία και η ανοσολογική κατάσταση του ξενιστή, καθώς και η γεωγραφική περιοχή. Όλοι αυτοί οι παράγοντες είναι πιθανό να αλληλεπιδρούν μεταξύ τους (Wallis T.S 2005). Εν τούτοις, η βιολογική βάση της εξειδίκευσης ξενιστή παραμένει ασαφής, κυρίως λόγω της έλλειψης πληροφοριών σχετικά με την παθογένεια αυτών των οροτύπων σε ζωικά είδη εκτός του ποντικού (Uzzau et al. 2001). Ωστόσο, η στενή συγγένεια του DNA των οροτύπων του γένους *Salmonella*, αποτελεί απόδειξη της κοινής καταγωγής τους από έναν "πρόγονο" που υπήρξε περίπου 25 με 40 εκατ. χρόνια πριν (Baumler

et al. 1998). Στο σημείο αυτό γεννάται το ερωτημα: "ποιοι ήταν οι παράγοντες που οδήγησαν στην απόκλιση του γένους *Salmonella* από τον κοινό του πρόγονο και στην ανάπτυξη οροτύπων που διαφέρουν ως προς το εύρος των ξενιστών τους;"

Εξαπτίας της μεγάλης ποικιλίας των βιολογικών φαινομένων που αποδίδονται στην έννοια "προσαρμογή-εξειδίκευση ξενιστή" απαιτείται η αποσαφήνιση αυτής της έννοιας και η διερεύνηση του βαθμού στον οποίο η εξειδίκευση ξενιστή συνδέεται με συγκεκριμένα χαρακτηριστικά που αφορούν την προσκόλληση και τον πολλαπλασιασμό του μικροοργανισμού σε ένα δεδομένο ξενιστή. Με αυτό τον τρόπο θα μπορούσαμε να κατανοήσουμε καλύτερα την πολυπλοκότητα της σχέσης ξενιστή-μικροοργανισμού, η οποία χαρακτηρίζει τις σαλμονελλώσεις.

## ΟΡΙΣΜΟΣ ΤΗΣ ΕΝΝΟΙΑΣ "ΠΡΟΣΑΡΜΟΓΗ-ΕΞΕΙΔΙΚΕΥΣΗ ΞΕΝΙΣΤΗ" ΤΟΥ ΓΕΝΟΥΣ *Salmonella*.

Τα στελέχη που ανήκουν στο γένος *Salmonella* πληρούν όλα τα κριτήρια της οικογένειας των Εντεροβακτηριοειδών (Enterobacteriaceae). Είναι Gram-, μη σπορογόνα, ευθέα βακτηρίδια, προαιρετικά αναερόβια, διαστάσεων 0.7-1.5 μm x 2-5 μm, γενικά κινητά, με περίτριχη μαστιγοφορία και άριστη θερμοκρασία ανάπτυξης τους 37°C (Bergey's Manual 2000). Τουλάχιστον 2500 διαφορετικοί ορότυποι έχουν απομονωθεί και έχουν καταμετρηθεί σε δύο είδη: τα *S. enterica* (είδος αναφοράς) και *S. bongori*. Το είδος *S. enterica* αποτελείται από έξι υποείδη: α) I, *S. enterica* subsp. *enterica*, β) II, *S. enterica* subsp. *salamae*, γ) IIIa, *S. enterica* subsp. *arizonae*, δ) IIIb, *S. enterica* subsp. *diarizonae*, ε) IV, *S. enterica* subsp. *houtanae* και στ) VI, *S. enterica* subsp. *indica* (Lin-Hui and Cheng-Hsun 2007). Η πλειοψηφία των στελεχών που απομονώνονται από τα ζώα και τον άνθρωπο ανήκουν στο υποείδος *enterica*. Οι ορότυποι του συγκεκριμένου υποείδους αντιπροσωπεύουν παραπάνω από το 99,5% του συνόλου των απομονωθέντων στελεχών του γένους *Salmonella* και απαντώνται κυρίως στα θερμόαιμα ζώα, ενώ τα άλλα υποείδη συνδέονται κυρίως με τα ψυχρόαιμα ζώα (De Lappe 2009). Οι περισσότεροι από τους οροτύπους του υποείδους *enterica* προκαλούν οξεία γαστρεντερίτιδα, η οποία χαρακτηρίζεται από μικρό χρόνο επώασης και εντοπισμένη εντερική, παρά συστηματική νόσο, καθώς και τη δημιουργία ζώων-φορέων. Ένας πολύ μικρός



αριθμός οροτύπων προκαλεί σοβαρή συστηματική νόσο στα ζώα και τον άνθρωπο, η οποία χαρακτηρίζεται από σηψαιμία, πυρετό και/ή αποβολή. Αυτοί οι ορότυποι, τις περισσότερες φορές συνδέονται με ένα ή λίγους ξενιστές (Uzzau et al. 2001). Το βέβαιον είναι ότι όλα τα ζωικά είδη είναι ευάλωτα στις σαλμονελλώσεις, υπό κατάλληλες συνθήκες, αλλά η κλινική νόσος είναι συνυφασμένη περισσότερο με κάποια ζωικά είδη (πτηνά, χοίρος, άλογο, βοοειδή) σε σχέση με άλλα (σκύλος, γάτα).

Με τη στενή έννοια του όρου, όλοι οι παθογόνοι παράγοντες θα μπορούσαν να θεωρηθούν ότι παρουσιάζουν εξειδίκευση ξενιστή. Ωστόσο, υπάρχουν βασικές επιδημιολογικές διαφορές, ώστε κάποιοι μικροοργανισμοί να έχουν ένα και μοναδικό, ευαίσθητο σε αυτούς, ξενιστή, ενώ άλλοι να παρουσιάζουν μεγαλύτερο φάσμα ξενιστών. Για να ορίσουμε την έννοια "εξειδίκευση-ειδικότητα-προσαρμογή ξενιστή" πρέπει πρώτα να καθορίσουμε τις ιδιότητες του συγκεκριμένου οροτύπου που είναι υπεύθυνοι για το εύρος των ξενιστών του, που παρατηρείται κατά τις επιδημιολογικές μελέτες. Έτσι, με βάση την "προτίμηση" ξενιστή, οι ορότυποι που προκαλούν την πλειοψηφία των σαλμονελλώσεων των ανθρώπων και των ζώων μπορούν να διακριθούν σε τρεις ομάδες:

Η πρώτη ομάδα περιλαμβάνει τους οροτύπους που παρουσιάζουν εξειδίκευση ξενιστή (host specific serovars ή host adapted serovars-HA). Αυτοί οι ορότυποι επικρατούν σε ένα συγκεκριμένο είδος ξενιστή, αλλά μπορούν να προκαλέσουν συστηματική νόσο και σε ένα περιορισμένο αριθμό φυλογενετικά συγγενικών ειδών. Επί παραδείγματι, οι ορότυποι Salmonella Dublin και Salmonella Choleraesuis σχετίζονται γενι-

κά με σοβαρή συστηματική νόσο στα βοοειδή και στο χοίρο αντίστοιχα, αλλά μπορούν επίσης να προκαλέσουν νόσο συχνά και σε άλλα θηλαστικά συμπεριλαμβανομένου και του ανθρώπου (Nhalue 1991, Uzzau et al. 2001). Τα ζώα που προσβάλλονται με αυτούς τους οροτύπους συχνά γίνονται κλινικά ασυμπτωματικοί φορείς. Αυτά τα προσβεβλημένα ζώα συνιστούν δεξαμενή του μικροοργανισμού και αποτελούν κίνδυνο για την Δημόσια Υγεία, αφού επιμολύνουν το περιβάλλον τους και αυξάνουν τον αριθμό των προσβεβλημένων ατόμων (Uzzau et al. 2001). Ο βαθμός αυτής της εξειδίκευσης-προσαρμογής των οροτύπων των Salmonella spp. μπορεί να ποικίλει.

Για την αποφυγή σύγχυσης και αντιφάσεων στην βιβλιογραφία, προέκυψε η δεύτερη ομάδα, που περιλαμβάνει τους οροτύπους εκείνους που είναι περιορισμένοι σε κάποιο ξενιστή (host restricted serovars-HR). Δηλαδή, οι ορότυποι αυτοί σχετίζονται σχεδόν αποκλειστικά με ένα συγκεκριμένο είδος ξενιστή. Για παράδειγμα, οι ορότυποι Salmonella Typhi, Salmonella Gallinarum και Salmonella Abortusovis σχετίζονται με συστηματική νόσο στον άνθρωπο και στα ανώτερα πρωτεύοντα, τα πτηνά και τα πρόβατα αντίστοιχα (Wallis T.S. 2005).

Τέλος, η τρίτη ομάδα περιλαμβάνει τους ευρέως διαδεδομένους οροτύπους του υποείδους S. enterica, όπως οι Salmonella Typhimurium και Salmonella Enteritidis, οι οποίοι συνήθως προκαλούν αυτοπεριοριζόμενη γαστρεντερίτιδα σε μεγάλο φάσμα ξενιστών, που δεν σχετίζονται μεταξύ τους (un-restricted serovars) (Πίνακας 1) (Clarke and Gyles 1993). Αυτοί οι ορότυποι σχετίζονται συχνότερα με νόσο στα νεαρά παρά στα ενήλικα ζώα, δηλώνοντας ότι δεν έχουν

Πίνακας 1: (Ellermeier C. D. and Schlauch J. M.): Το εύρος ξενιστών των οροτύπων του υποείδους Salmonella enterica subsp. enterica

Ταξινόμηση	Ορότυπος	Φυσικός Ξενιστής	Άλλος πιθανός ξενιστής
Host restricted-HR	Typhi	Άνθρωπος	-
	Paratyphi A και C	Άνθρωπος	-
	Sendai	Άνθρωπος	-
	Abortusovis	Πρόβατα	-
	Gallinarum	Πτηνά	-
	Typhisuis	Χοίρος	-
	Abortusequi	Ιπποειδή	-
Host adapted-HA	Choleraesuis	Χοίρος	Άνθρωπος
	Dublin	Βοοειδή	Άνθρωπος και πρόβατα
Un-restricted	Typhimurium	Άνθρωπος, πτηνά, χοίρος, βοοειδή, τρωκτικά	-
	Enteritidis	Άνθρωπος, πτηνά, τρωκτικά	Χοίρος και βοοειδή

αναπτύξει τους μηχανισμούς που θα τους επιτρέψουν να αντιμετωπίσουν ένα ώριμο ανοσοποιητικό σύστημα (Baumler et al. 1998).

Έτσι, πιο γενικά, η "προσαρμογή στον ξενιστή" θα μπορούσε να οριστεί ως η ικανότητα του παθογόνου μικροοργανισμού να "κυκλοφορεί" και να προκαλεί νόσο σε ένα συγκεκριμένο πληθυσμό ξενιστών, μια ιδιότητα που είναι άσχετη με την παθογένειά του σε άλλους ξενιστές. Για παράδειγμα, ο ορότυπος *Salmonella Choleraesuis* θεωρείται ότι παρουσιάζει εξειδίκευση στο χοίρο, όχι επειδή προκαλεί πιο σοβαρή νόσο στο χοίρο σε σχέση με τον άνθρωπο, αλλά γιατί εμμένει στους πληθυσμούς του χοίρου, πολλές φορές χωρίς την εκδήλωση των συμπτωμάτων της νόσου, μέσω της άμεσης μετάδοσης (Kingsley and Baumler 2000).

#### ΑΙΤΙΟΛΟΓΙΚΟΙ ΠΑΡΑΓΟΝΤΕΣ ΤΟΥ ΦΑΙΝΟΜΕΝΟΥ ΤΗΣ "ΠΡΟΣΑΡΜΟΓΗΣ-ΕΞΕΙΔΙΚΕΥΣΗΣ ΞΕΝΙΣΤΗ" ΣΤΑ *Salmonella* spp.

Περιβαλλοντικές και γενετικές διαφορές: Παρόλο που οι ακριβείς μηχανισμοί της "εξειδίκευσης ξενιστή" δεν έχουν πλήρως διασαφηνιστεί, είναι προφανές ότι αυτοί λειτουργούν σε διαφορετικές φάσεις της λοίμωξης και δρουν ανεξάρτητα μεταξύ τους. Κατά τη διάρκεια της πορείας αυτής της προσαρμογής κάθε HA και πιο συγκεκριμένα κάθε HR ορότυπος, βρέθηκε αντιμέτωπος με την εξέλιξη μιας εντυπωσιακής σειράς ειδικών και μη ειδικών ανοσολογικών μηχανισμών του ξενιστή. Για να πετύχουν την παθογόνο δράση τους οι HA ορότυποι, προσαρμόστηκαν στην φυσιολογία των φυσικών τους ξενιστών και ανέπτυξαν μεθόδους επιβίωσης και επικράτησης σε αυτούς. Συγκεκριμένα, οι ορότυποι του υποείδους *Salmonella enterica* subsp. *enterica* απέκτησαν την ικανότητα να ξεπερνούν τους μηχανισμούς ανοσίας των θερμόαιμων ζώων. Κλειδί της εξέλιξης αυτών των προσαρμογών υπήρξε η τροποποίηση των φυσιολογικών λειτουργιών του ξενιστή, όπως η ενδοκυτταρική εγκόλπωση, η απόπτωση, η μεταφορά των αντιγόνων από τα M κύτταρα και η μετακίνηση των μακροφάγων και των λεμφοκυττάρων στο δικτυοενδοθηλιακό σύστημα (Baumler et al. 1998). Έτσι, έχει βρεθεί ότι η ικανότητα συγκεκριμένων ορότυπων να διατηρούνται και να πολλαπλασιάζονται στα μακροφάγα συγκεκριμένων ζώων μπορεί να συμβαδίσει με την εξειδίκευση ξενιστή. Για παράδειγμα, η σύγκριση της πρόσληψης και της παραμονής του οροτύπου *Salmonella Typhimurium* στα μακροφά-

γα του ανθρώπου και του ποντικού συμβαδίζει με την παθογένεια αυτού του οροτύπου στον άνθρωπο, αλλά όχι και στον ποντικό (Alruiche et al. 1995, Knodler and Finlay 2001). Συνεπώς, λόγω της φύσης αυτών των λειτουργιών και της ποικιλομορφίας των λεμφικών ιστών των διαφόρων θερμόαιμων ζώων, τα αποτελέσματα της επιτυχούς αλληλεπίδρασης με έναν ειδικό, για το παθογόνο στέλεχος, ξενιστή δεν θα είναι τα ίδια αν το ίδιο στέλεχος προσβάλλει άλλο μη συγγενικό ξενιστή, λόγω της αδυναμίας του να επιφέρει τις ίδιες τροποποιήσεις.

Άλλοι ερευνητές υποθέτουν ότι τα HR στελέχη μπορούν να δρομολογήσουν ειδικές καταστάσεις στους φυσικούς ξενιστές τους. Επί παραδείγματι, οι ορότυποι *Salmonella Typhimurium*, *Salmonella Gallinarum* και *Salmonella Abortusovis* δείχνουν μεγάλο βαθμού τροπισμό στα λεμφικά όργανα του ξενιστή τους, που απαιτούνται για την ανάπτυξη των B-κυττάρων (μυελός των οστών, θύλακος του Fabricius και πλάκες του Peyer αντίστοιχα). Μιας και το αποτέλεσμα αυτών των αλληλεπιδράσεων, ιδιαίτερα στα ενήλικα ζώα, φαίνεται να είναι η εγκατάσταση χρόνιας λοίμωξης, η διασπορά των μικροοργανισμών μπορεί να συμβεί μέσω της αποβολής σχετικά χαμηλού μικροβιακού φορτίου για μεγάλο χρονικό διάστημα. Σε αυτή την περίπτωση, η επαγωγή σοβαρής γαστρεντερίτιδας δεν είναι απαραίτητη, γεγονός που μπορεί να επηρεάσει αρνητικά την αποτελεσματική μετάδοση του μικροοργανισμού. Αντίθετα, η διασπορά των HA οροτύπων και εκείνων που είναι ευρέως διαδεδομένοι, διευκολύνεται από την ικανότητα αυτών των στελεχών να προκαλούν βαριά εντερίτιδα (Rubino et al 1993, Reynolds and Morris 1983).

Κάθε HR/HA ορότυπος έχει πιθανόν εξελιχθεί ανεξάρτητα. Παρόλα αυτά, τα στελέχη αυτά είναι όλα αυξοτροφα και οι ίδιες ενεργειακές απαιτήσεις απαντούν σε διαφορετικούς οροτύπους (π.χ. κυστεΐνη, θιαμίνη, νικοτινικό οξύ). Η έλλειψη ειδικών μεταβολικών οδών, ωστόσο, μπορεί να ευνοήσει την εξειδίκευση (Uzza et al. 2000).

Επιπλέον, η εξειδίκευση των οροτύπων *Salmonella Typhimurium*, *Salmonella Enteritidis*, *Salmonella Choleraesuis*, *Salmonella Gallinarum*, *Salmonella Pullorum* και *Salmonella Abortusovis*, *Salmonella Paratyphi C* και *Salmonella Dublin* πιστεύεται ότι επιτυγχάνεται και μέσω του λοιμογόνου πλασμιδίου. Επίσης, προτάθηκε ότι η εξειδίκευση ξενιστή μπορεί



να οφείλεται στην εξάλειψη γονιδίων, τα οποία απαντούν στους ευρέως διαδεδομένους οροτύπους των *Salmonella* spp. (Clarke and Gyles 1993). Η κριτική εκτίμηση της σημασίας και άλλων παθογόνων παραγόντων, όπως των ινιδίων προσκόλλησης και των βακτηριοφάγων μπορεί να λειτουργήσει ως σημαντικό μοντέλο μελέτης των μηχανισμών της ειδικότητας ξενιστή (Uzzau et al. 2000).

Η εξειδίκευση ξενιστή μπορεί να συμβεί και σε οροτύπους του ίδιου οροτύπου (Clarke and Gyles 1993). Η μελέτη της σχέσης των διαφόρων φαγοτύπων του οροτύπου *Salmonella* Typhimurium με τους ξενιστές, έδειξε ότι συγκεκριμένοι φαγότυποι είχαν πολύ περιορισμένο εύρος ξενιστών, άλλοι λιγότερο περιορισμένο, ενώ η πλειοψηφία των φαγοτύπων παρουσίαζε μεγάλο εύρος ξενιστών. Οι περισσότεροι φαγότυποι του οροτύπου *Salmonella* Typhimurium, ωστόσο, προσέβαλαν τους ανθρώπους, καθώς και ένα μεγάλο αριθμό ζώων. Έτσι, προτάθηκε ότι η εξειδίκευση ξενιστή μπορεί να προκαλείται από τη μεταφορά λοιμογόνων γονιδίων μέσω φάγων.

Ελάχιστοι μόνο ορότυποι του υποείδους *Salmonella enterica* subsp. *enterica* σχετίζονται με την πλειοψηφία των νόσων που παρατηρούνται σε θηλαστικά και πτηνά. Αυτοί οι ορότυποι δείχνουν διαφορετικό βαθμό προσαρμογής. Οι ορότυποι που στερούνται εξειδίκευσης, όπως οι ορότυποι *Salmonella* Typhimurium και *Salmonella* Enteritidis τείνουν να συνδέονται πιο συχνά με ασθένειες νεαρών ζώων, υποδηλώνοντας ότι δεν είναι πλήρως προσαρμοσμένοι ώστε να αντιμετωπίσουν ένα ώριμο ανοσοποιητικό σύστημα. Αντίθετα, οι HR ορότυποι σχετίζονται με την πρόκληση συστηματικής νόσου και υψηλότερα ποσοστά θνησιμότητας ενηλίκων ζώων, αφού έχουν αποκτήσει την ικανότητα να καταστέλλουν τους αμυντικούς μηχανισμούς ενηλίκων ατόμων (Baumler et al. 1998). Επιπλέον, αυτοί οι ορότυποι είναι λιγότερο εντεροπαθογόνοι σε σχέση με τους προηγούμενους, δηλαδή έχουν μειωμένη ικανότητα πρόκλησης φλεγμονώδους αντίδρασης στον εντερικό σωλήνα (Watson et al. 1998). Κοινό χαρακτηριστικό των HR οροτύπων είναι η προσβολή των αναπαραγωγικών ιστών, που οδηγεί στην προσβολή των αυγών των πτηνών και στην πρόκληση αποβολών των θηλαστικών. Τα *Salmonella* spp. πολλαπλασιάζονται σε μεγάλο βαθμό στους εμβρυϊκούς ιστούς, γεγονός που οδηγεί στην αποβολή και την επακόλουθη διασπορά μεγάλου αριθμού βακτηρίων στο περι-

βάλλον (Wallis T.S 2005).

Παρά την μεγάλη πρόοδο στην μελέτη των οροτύπων HA/HR, οι γνώσεις μας για τους μηχανισμούς και τα γονίδια που εμπλέκονται στην εκφραση της "ειδικότητας ξενιστή" είναι ακόμα περιορισμένες. Οι έρευνες στην κατανομή των ζωνών παθογένειας (*Salmonella* Pathogenic Islands-SPIs), των ινιδιακών οπερονίων και των λοιμογόνων πλασμιδίων δείχνουν ότι κατά τη διάρκεια της εξέλιξης, νέοι συνδυασμοί των λοιμογόνων καθοριστών προέκυψαν, μέσω μεταλλάξεων και των διαδικασιών της οριζόντιας μετάδοσης, γεγονός που μπορεί να οδήγησε στην ανάπτυξη της "ειδικότητας ξενιστή" (Σχήμα 1) (Baumler et al. 1998). Συμπεραίνουμε λοιπόν ότι η προσαρμογή σε ένα συγκεκριμένο είδος ξενιστή είναι ένα πολύπλοκο φαινόμενο, που αναμφίβολα εμπλέκει ένα μεγάλο αριθμό γονιδιακών προϊόντων. Σε βάθος γνώση της αλληλεπίδρασης των οροτύπων των *Salmonella* spp. με τους φυσικούς ξενιστές τους μπορεί να επιτευχθεί με την συγκριτική ανάλυση της ανατομίας και φυσιολογίας των διαφόρων ξενιστών και την μελέτη της βιολογίας των κυττάρων τους.

## Η "ΕΞΕΙΔΙΚΕΥΣΗ ΞΕΝΙΣΤΗ" ΣΤΟ ΧΟΙΡΟ

Οι λοιμώξεις των χοίρων από οροτύπους του γένους *Salmonella* έχουν γίνει το αντικείμενο εκτεταμένης έρευνας και επιτήρησης, καθώς συχνά επιμολυσμένο με *Salmonella* χοίρειο κρέας και προϊόντα αυτού, έχουν αποτελέσει κίνδυνο για την Δημόσια Υγεία. Πολλοί ορότυποι έχουν απομονωθεί από το χοίρο, από τους οποίους κάποιοι παρουσιάζουν προσαρμογή στον ξενιστή τους και κάποιοι όχι. Πιο συγκεκριμένα:

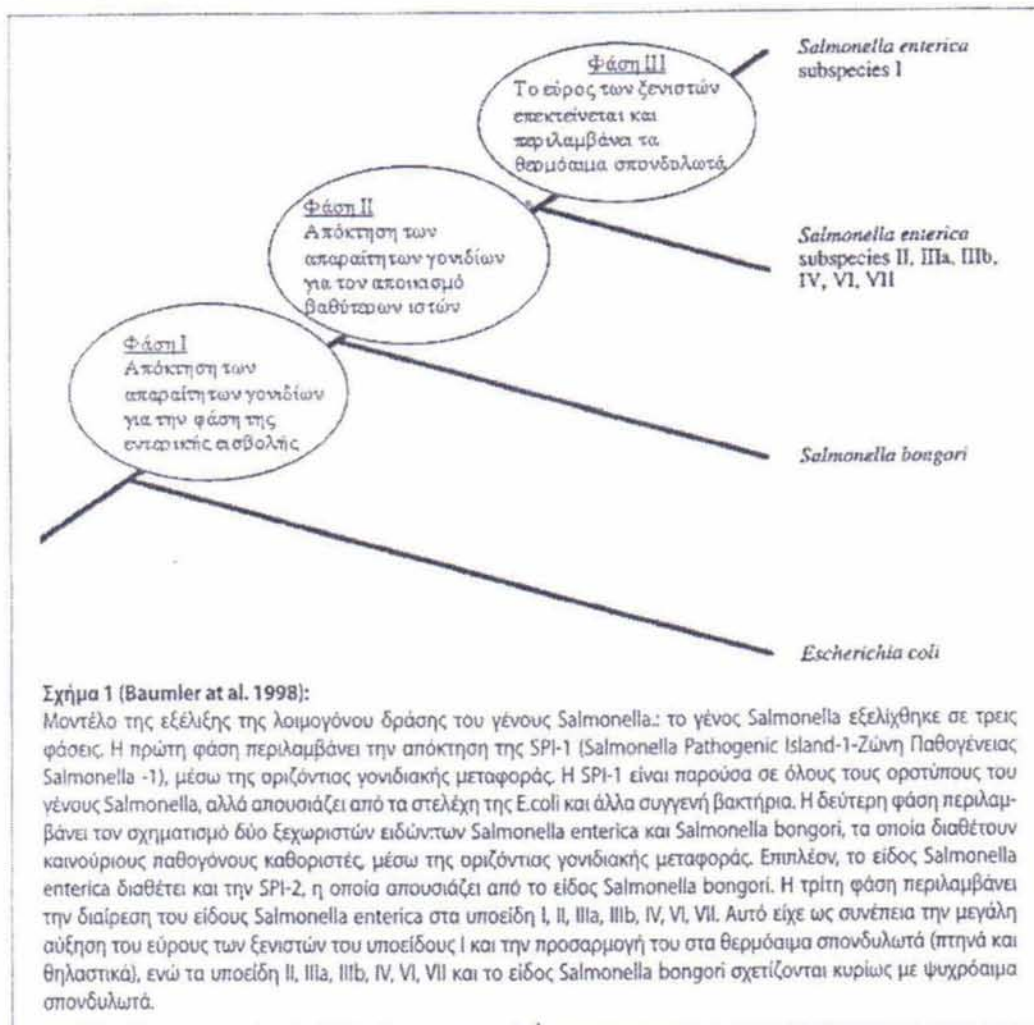
*Salmonella* Typhisuis (host restricted serovar-HR): ο συγκεκριμένος ορότυπος προσβάλλει μόνο το χοίρο και για αυτό το λόγο θεωρείται περιορισμένος σε αυτόν. Συνδέεται γενετικά και είναι σχεδόν ταυτόσημος αντιγονικά με τον ορότυπο *Salmonella* Choleraesuis. Αν και οι δύο ορότυποι έχουν κοινό φυσικό ξενιστή το χοίρο, διαφέρουν σημαντικά σε πολλά φαινοτυπικά χαρακτηριστικά, καθώς και στην κλινική εκδήλωση της νόσου. Ο ορότυπος *Salmonella* Typhisuis είναι ο αιτιολογικός παράγοντας του χρόνιου παράτυφου του χοίρου. Πρόκειται για μια νόσο που εξελίσσεται προοδευτικά και καταλήγει στο θάνατο μετά από αρκετές εβδομάδες. Όπως συμβαίνει με όλους τους HR οροτύπους και αυτός ο ορότυπος δεν προκαλεί οξεία εντερίτιδα, αλλά μεταναστεύει γρήγορα από τον εντερικό

σωλήνα στο δικτυοσενδοθηλιακό σύστημα του χοίρου, όπου παραμένει, αυξάνοντας την πιθανότητα δημιουργίας ζώων-φορέων (Uzzau at al. 2000).

*Salmonella Choleraesuis* (host adapted serovar-HA): αυτός ο ορότυπος θεωρείται προσαρμοσμένος στο χοίρο για το λόγο ότι 99% των περιπτώσεων απομόνωσής τους σχετίζεται με αυτό τον ξενιστή. Ωστόσο, μπορεί να προσβάλλει και άλλους ξενιστές, όπως τον άνθρωπο, προκαλώντας του συνήθως σηψαιμία. Στο φυσικό του ξενιστή προκαλεί εντερίτιδα και συστηματική νόσο, η οποία μπορεί να είναι θανατηφόρος στα νεαρά, αλλά όχι στα ενήλικα ζώα (Clarke and Gyles 1993, Uzzau at al. 2000). Το γεγονός ότι ο χοίρος αποτελεί δεξαμενή του συγκεκριμένου ορότυπου προκαλεί ανησυχία, όχι μόνο λόγω της πιθανότητας πρό-

κλησης νόσου στα νεαρά χοιρίδια, αλλά και εξαιτίας των επιπτώσεών του στην Δημόσια ανθρώπινη Υγεία (Griffith et al. 2006).

*Salmonella Typhimurium* (unrestricted serovar): η εντεροκολίτιδα του χοίρου τυπικά σχετίζεται με τη λοίμωξη του ζώου από τον ορότυπο *Salmonella Typhimurium*, ενώ μπορεί να συνυπάρχει και ο ορότυπος *Salmonella Choleraesuis*, που χαρακτηρίζεται από υδαρή κίτρινη διάρροια χωρίς αίμα και βλέννη που διαρκεί 3-7 ημέρες. Η μεταδοτικότητα μεταξύ των χοίρων είναι μεγάλη, αλλά η θνησιμότητα μικρή. Ωστόσο, η νοσηρότητα μπορεί είναι αυξημένη εντός λίγων ημερών από την μόλυνση της εκτροφής. Πολλοί χοίροι αναρρώνουν, αλλά παραμένουν καθυστερημένοι στην ανάπτυξη και καθίστανται φορείς (Griffith et al. 2006).





### ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ

Παρά τη μεγάλη πρόοδο που σημειώθηκε στην κατανόηση των βασικών μηχανισμών της παθογένειας του είδους *S. enterica*, οι γνώσεις μας σχετικά με τα γονίδια και τους μηχανισμούς που εμπλέκονται στην έκφραση του φαινομένου "εξειδίκευση-ειδικότητα-προσαρμογή ξενιστή", είναι ακόμα περιορισμένες. Η μελέτη της εκλεκτικής πίεσης επιλογής που ασκείται στους παθογόνους μικροοργανισμούς από το ανοσοποιητικό σύστημα του ξενιστή, οδήγησε στο συμπέρασμα ότι η "προσαρμογή ξενιστή", οδηγεί σε μια φυσική ισορροπία κατά την οποία ο προσαρμοσμένος ορότυπος αποκλείει ανταγωνιστικά την "κυκλοφορία" άλλων ορότυπων στους πληθυσμούς ενός συγκεκριμένου είδους ζώου. Σε αυτή την περίπτωση η αύξηση του βαθμού προσαρμογής μπορεί να συσχετιστεί με μεγαλύτερο

ρυθμό απέκκρισης του παθογόνου μικροοργανισμού, καθώς με μεγαλύτερη μεταδοτικότητα στους πληθυσμούς του συγκεκριμένου ξενιστή.

Η κατανόηση του τρόπου με τον οποίο οι παθογόνοι μικροοργανισμοί εγκαταστάθηκαν σε νέους ξενιστές στο παρελθόν, μπορεί να χρησιμοποιηθεί ως βάση για την πρόβλεψη της εξέλιξης των λοιμωδών νοσημάτων στο μέλλον. Συνεπώς, η μελέτη της "εξειδίκευσης-ειδικότητας ή προσαρμογής ξενιστή" που παρουσιάζουν οι ορότυποι του γένους *Salmonella* στο χοίρο μπορεί να ρίξει φως στην προέλευση των σημερινών σαλμονελλώσεων, οι οποίες έχουν άμεσο αντίκτυπο στη Δημόσια Υγεία. Αναμφίβολα, απαιτείται περαιτέρω έρευνα της γενετικής βάσης της "προσαρμογής" ξενιστή, η οποία θα δώσει απαντήσεις στα αναπάντητα ερωτήματα αυτού του πολύπλοκου φαινομένου.

## "Host Adoption- Host specificity" in *Salmonella* spp. and its role in pig farms

Evangelopoulou G.D<sup>1</sup>, Govaris A.<sup>2</sup>, Kritas S.<sup>3</sup>, Burriel A.R<sup>4</sup>

<sup>1</sup> PhD Student, Laboratory of Microbiology and Parasitology, Faculty of Veterinary Medicine, School of Health Science, University of Thessaly, Trikalon 224, Karditsa 431 00, Greece, E-mail:matinavet@hotmail.com

<sup>2</sup> Associate Professor, Laboratory of Hygiene of Foods of Animal Origin, Faculty of Veterinary Medicine, School of Health Science, University of Thessaly, Trikalon 224, Karditsa 431 00, Greece

<sup>3</sup> Associate Professor, Laboratory of Microbiology and Infectious Diseases, School of Veterinary Medicine, Aristotelian University, Thessaloniki 541 24, Greece

<sup>4</sup> Professor, Laboratory of Microbiology and Parasitology, Faculty of Veterinary Medicine, School of Health Science, University of Thessaly, Trikalon 224, Karditsa 431 00, Greece

**Summary:** The genus *Salmonella* includes a large number of zoonotic species and serovars of worldwide economic and health importance. Within the species *Salmonella enterica* there are over 2,500 different serovars, many of which have great veterinary and medical significance, although they differ widely in their host range, within mammals and birds, and in the nature of disease that may cause. These differences are referred as "serovar-host specificity or serovar host adaption". The emergence of food-borne pathogens, such as *Salmonella* spp., has generated increasing interest in the way infectious diseases are developing, persist and spread within new host populations. To alter their host range, pathogens adapt to ensure their survival in a new animal population. The genus *Salmonella* has acquired many times the ability to adapt in different populations of vertebrate hosts. This is evident that *Salmonella* serovars differ greatly in regard to host range. For example, *Salmonella* Typhi appears as the most highly host-adapted pathogen of this group, causing disease only in humans and higher primates, while other serovars have the ability to cause disease and persist in different species having a broad host range. The way the bacteria are able to overcome species' barriers and adapt to new hosts is central to the understanding of both the origin of infectious diseases, in general, and the emergence of new pathogens. To achieve this understanding, the fundamental question "what determines the host range and specific disease syndrome associated with a given *Salmonella* serovar" should be answered. Thus, the analysis of virulence factors used by different *Salmonella* serovars can serve as a powerful tool in studying the mechanisms of host adaptation, due to the fact that these pathogens are of well characterized genetically, thus could become models for genetic analysis of pathogenicity.

**Keywords:** *Salmonella*, host, adoption, evolution

### Βιβλιογραφία

- Alpujch-Aranda, C. M., Berthiaume, E. P., Mock, B., Swanson, J. A. and Miller, S. I. (1995). Spacious phagosome formation within mouse macrophages correlates with *Salmonella* serotype pathogenicity and host susceptibility. *Infect Immun*, 63, 4456-62.
- Bäumler, A.J., Tsolis, R.M., Ficht, T.A. and Adams, L.G. (1998) Evolution of host adaptation in *Salmonella enterica*. *Infection and Immunity* 66, 4579-4587.
- *Bergey's Manual of Determinative Bacteriology* 9nd ed, (2000) by Lippincott Williams & Wilkins (Baltimore), 186-187.
- Clarke, R.C. and Gyles, C.L. (1993) *Salmonella*. In: Gyles, C.L. and Thoen, C.O. (eds) *Pathogenesis of Bacterial Infections in Animals*, 2nd edn. Iowa State University Press, Ames, Iowa, pp. 133-153

- De Lappe N. (2009) *Salmonella Taxonomy*. Version 1. Ref NSRLFM041, Dept of Medical Microbiology, Division of Clinical Microbiology, Galway University Hospitals [http://www.nuigalway.ie/research/salmonella\\_lab/downloads/salmonella\\_taxonomy.pdf](http://www.nuigalway.ie/research/salmonella_lab/downloads/salmonella_taxonomy.pdf)
- Ellermeier C. D. and Schlauch J. M. (2006) The Genus *Salmonella*. In: Dworkin M., Falkow S., Rosenberg E., Schleifer K.H, Stackebrandt E (eds) *The Prokaryotes A Handbook on the Biology of Bacteria*, 3rd Edition, Springer Science+Business Media, LLC, Volume 6: Proteobacteria: Gamma Subclass, pp. 123-158
- Falkow, S. and Mekalanos, J. (1990) The enteric bacilli and vibrios. In: Davis, B., Dulbecco, R., Eisen, H. And Ginsberg, H. (eds) *Microbiology*, 4th edn. J.B. Lippincott, Philadelphia, pp. 576-579
- Griffith R.W., Schwartz K.J., Meyerholz D.K. (2006) *Salmonella*. In: Straw B. E., Zimmerman J. J., D'Allaire S., Taylor D.J. (eds) *Diseases Of Swine*, 9th Edition Blackwell Publishing Ltd, pp. 739-754
- Kingsley R. A and BaEumler AJ (2000) Host adaptation and the emergence of infectious disease: the *Salmonella* paradigm. *Molecular Microbiology* 36(5), 1006-1014
- Knodler, L. A., and B. B. Finlay. (2001). *Salmonella* and apoptosis; to live or let die; *Microbes Infect.* 3:1321-1326
- Lin-Hui S, Cheng-Hsun C (2007) *Salmonella* nomenclature. *Chang Gung Med J* 30(3):210-219
- Nnalue NA. Relevance of inoculation route to virulence of three *Salmonella* spp. strains in mice. *Microb Pathog* (1991); 11: 11-8.
- Reynolds JD, Morris B. The evolution and involution of Peyer's patches in fetal and postnatal sheep. *Eur J Immunol* (1983); 13: 627-35.
- Rubino S, Leori G, Rizzu P, Erre G, Colombo M M, Uzzau S, Masala G and Cappuccinelli P (1993) *TnphoA Salmonella abortusovis* mutants unable to adhere to epithelial cells and with reduced virulence in mice. *Infect Immun*; 61 (5): 1786-92.
- Uzzau S., Brown D. J., Wallis T., Rubino S., Leori G., Bernard S., Casadesus J., Platt D. J. and Olsen J. E. (2000) Host adapted serotypes of *Salmonella enterica*. *Epidemiol. Infect.* (2000), 125, 229-255.
- Uzzau S., Leori G.S, Petruzzi V., Watson P. R., Schianchi G, Bacciu D., Mazzarello V., Wallis T. S, And Rubino S. (2001) *Salmonella enterica* Serovar-Host Specificity Does Not Correlate with the Magnitude of Intestinal Invasion in Sheep. *Infection And Immunity*, 69, (5) pp. 3092-3099
- Wallis T.S (2005) Host-specificity of *Salmonella* infections in animal species. In: Mastroeni P. and Maskell D. (eds) '*Salmonella*' Infections: Clinical, Immunological and Molecular Aspects, Cambridge University Press, pp. 57-80
- Watson, P. R., Galyov, E. E., Paulin, S. M., Jones, P. W. and Wallis, T. S. (1998). Mutation of *invH*, but not *stn*, reduces *Salmonella*-induced enteritis in cattle. *Infect Immun*, 66, 1432-8.



## Animal salmonellosis: a brief review of "host adaptation and host specificity" of *Salmonella* spp.

Grammato Evangelopoulou<sup>1</sup>, Spyridon Kritas<sup>2</sup>, Alexander Govaris<sup>3</sup> and Angeliki R. Burriel<sup>1</sup>

1. Laboratory of Microbiology and Parasitology, Faculty of Veterinary Medicine, School of Health Science, University of Thessaly, Trikalon 224, Karditsa 43100, Greece, Tel.: +30-2441066088, Fax: +30-2441066088, e-mail: matinavet@hotmail.com; 2. Department of Microbiology and Infectious Diseases, School of Veterinary Medicine, Aristotle University, 54124 Thessaloniki, MKD, Greece; 3. Laboratory of Hygiene of Foods of Animal Origin, Faculty of Veterinary Medicine, School of Health Science, University of Thessaly, Trikalon 224, Karditsa 43100, Greece, e-mail: agovaris@vet.auth.gr

Corresponding author: Grammato Evangelopoulou, e-mail: matinavet@hotmail.com

Received: 20-05-2013, Revised: 05-06-2013, Accepted: 05-06-2013, Published online: 31-07-2013

doi: 10.14202/vetworld.2013.703-708

How to cite this article: Evangelopoulou G, Kritas S, Govaris A and Burriel AR (2013) Animal salmonellosis: A brief review of "Host Adaptation and Host Specificity" of *Salmonella* spp., *Veterinary World* 6(10): 703-708.

### Abstract

*Salmonella enterica*, the most pathogenic species of the genus *Salmonella*, includes more than 2,500 serovars, many of which are of great veterinary and medical significance. The emergence of food-borne pathogens, such as *Salmonella* spp., has increased knowledge about the mechanisms helping microorganisms to persist and spread within new host populations. It has also increased information about the properties they acquire for adapting in the biological environment of a new host. The differences observed between serovars in their host preference and clinical manifestations are referred to as "serovar-host specificity" or "serovar-host adaptation". The genus *Salmonella*, highly adaptive to vertebrate hosts, has many pathogenic serovars showing host specificity. Serovar *Salmonella* Typhi, causing disease to man and higher primates, is a good example of host specificity. Thus, understanding the mechanisms that *Salmonella* serovars use to overcome animal species' barriers or adapt to new hosts is also important for understanding the origins of any other infectious diseases or the emergence of new pathogens. In addition, molecular methods used to study the virulence determinants of *Salmonella* serovars, could also be used to model ways of studying the virulence determinants used by bacteria in general, when causing disease to a specific animal species.

**Keywords:** adaptation, evolution, host, *Salmonella*

### Introduction

*Salmonella* spp., belonging to the family of *Enterobacteriaceae*, are Gram negative, facultative anaerobic, straight rods, with peritrichous flagella. The genus includes the species *S. enterica* (the type species) and *S. bongori*, which are divided into more than 2,500 serovars. Worth noting is that, the previously known subspecies of *S. enterica* referred to as subspecies I, II, IIIa, IIIb, IV and VI are currently named as *S. enterica* subsp. *enterica* (subspecies I), *S. enterica* subsp. *salamae* (subspecies II), *S. enterica* subsp. *arizonae* (subspecies IIIa), *S. enterica* subsp. *diarizonae* (subspecies IIIb), *S. enterica* subsp. *hountanae* (subspecies IV) and *S. enterica* subsp. *indica* (subspecies VI) [1]. The genus *Salmonella*, recovered from nearly all vertebrates and many insects, is considered a "universal pathogen" [2]. The pathogenic specificity of *Salmonella* serovars depends on each serovar's ability to adapt to the environment of its host. This adaptation is regulated by various microbial characteristics, which also assist the expression of specific clinical manifestations in a specific host species. In addition to the virulence determinants of a serovar, important are also the

infectious dose, the animal species infected, their age and individual immune response [3]. They and, perhaps, many other, yet unknown, virulence determinants are molecularly studied, as new pathogenic *Salmonella* serovars emerge. The accumulated evidence show that a mechanism making a serovar virulent for one animal species could make this serovar less or completely avirulent for another animal species. This acquired phenomenon is called "serovar host specificity" or "serovar host adaptation" [4]. Two *Salmonella* examples indicative of host specificity in animals are *Salmonella enterica* ser. Dublin, usually associated with disease in cattle, and *Salmonella enterica* ser. Choleraesuis consistently responsible for only pig salmonellosis [5]. However, regardless of the accumulated information on host specificity and adaptation, a clear understanding is yet to be achieved on a serovar's pathogenicity, with regard to an animal host.

Nevertheless, newer and older molecular methods used to epidemiologically study serovars have shown close DNA relatedness between serovars and a common ancestor living 25 to 40 million years ago [4,6,7]. These findings demonstrate that *Salmonella* spp. has, since its divergence from the *E. coli* lineage, most likely evolved in three phases [6].

In the first phase the microorganism acquired, through horizontal gene transfer, the SPI-1 (*Salmonella*

Copyright: The authors. This article is an open access article licensed under the terms of the Creative Commons Attribution License (<http://creativecommons.org/licenses/by/2.0>) which permits unrestricted use, distribution and reproduction in any medium, provided the work is properly cited.



Pathogenic Island-1) pathogenicity determinant. The SPI-1 encodes genes helping the microorganism to invade host cells [8] and it is present in all *Salmonella* serovars, but absent in *E.coli* and other relative bacteria.

During the second phase, two distinct species of *Salmonella* emerged by horizontal gene transfer. They are *Salmonella enterica* acquiring also the SPI-2, which is helping it to survive within host cells, such as the macrophages [9] and *Salmonella bongori*. Both species are possessing pathogenic determinants helping them to colonize deeper tissue. In addition to the two major virulence determinants of *S. enterica* (SPIs 1 and 2), there are also 14 different pathogenicity islands present in varying numbers within different serovars [10].

The third phase of the microorganism's evolution is related to the division of *Salmonella* spp. into subspecies and the adaptation of subspecies I (subspecies *enterica*) to warm-blooded vertebrates (birds and mammals), thus adaptation within an increased range of animal hosts. The remaining subspecies and *Salmonella bongori* are mainly adapted to cold-blooded vertebrates. Therefore, one couldn't but question the nature of the mechanisms helping *Salmonella* serovars diverge from their common ancestor and emerge as serovars differing in their host range.

For understanding the many biological characteristics leading to serovar development, essential is the understanding of the mechanisms helping a particular serovar to adhere and proliferate in the tissue of a given host. Thus, research has focused on the microorganism's acquired ability for "host specificity and adaptation".

#### **Host specificity - host adaptation of the genus *Salmonella***

The majority (99.5%) of the isolated serovars from animals and man belong to *S. enterica* subsp. *enterica*. The other subspecies are associated mainly with cold-blooded animals. All animal species are susceptible to various *Salmonella* serovars under certain circumstances, but not all are as severely affected clinically. Clinical severity is associated with specific serovars affecting specific animal species [11]. Most of the serovars belonging to subspecies *enterica* cause acute, localized gastroenteritis of short duration rather than systematic disease. Only a small number of serovars are causes of severe systemic disease in man and animals, manifested as septicaemia, fever and/or abortion. The latter serovars, although due to their limited number are extensively studied molecularly, they haven't yet fully revealed the factors of their adaptation [4].

Scientifically, all pathogens could, perhaps, be considered as host-adapted pathogens, regardless of observed epidemiological differences between similar microorganisms showing some as having a single host

susceptible to them and others having a greater number. Thus, attempting to define the importance of "host specificity-host adaptation" in *Salmonella* infections, the properties of pathogenicity characterizing a specific serovar, epidemiologically observed in a sensitive host, should be defined. Such attempts of defining the pathogenicity determinants of *Salmonella* serovars causing infections in man and animals have resulted in grouping serovars in three major groups.

One group includes serovars, such as Dublin and Choleraesuis, proven to cause systemic disease respectively in cattle and pigs only, while other animal species or man could be infected accidentally [12, 4]. However, in the latter hosts, infection is frequently subclinical, making them carrier animals, thus "symptomless excretors" and reservoirs of the infecting serovars. These animals cause environmental contamination, becoming a risk to susceptible animal species [4].

The second group includes serovars, such as Typhi, Gallinarum, Abortusovis, Typhisuis and Abortusequi, which are highly host adapted, thus, they are almost exclusively associated with systemic disease when they infect man, fowl, ovine, pigs and equine, respectively. These serovars, referred to as host-restricted (HR) serovars, are strictly associated with one very specific host species [3, 13].

The third group of serovars consists of non-host adapted serovars called unrestricted serovars posing a risk to many animal species and man. The most clinically important serovars in this group are *Salmonella* Typhimurium and *Salmonella* Enteritidis. They are of a greater epidemiological importance, compared to the previous ones, although they cause a relatively mild enteric disease to their hosts [13, 14]. These serovars are also associated with more severe disease in young hosts, compared to adults. Perhaps, they lack mechanisms helping them to invade the mature immune system of older hosts [6].

In summarizing the above, host adaptation in many ways, is the ability of a pathogen to cause disease in a particular animal population, regardless of the degree of pathogenicity it exhibits for a different animal host. For example, serovar Choleraesuis is considered a porcine adapted serovar, not because it causes the severest disease in swine compared to man, but because it persists in pig populations infected by direct transmission, making them a natural host for this serovar, thus its reservoir [5]. What are, therefore, the known factors determining "host specificity and adaptation"?

#### **Factors within the genus *Salmonella* determining host specificity and adaptation**

Although the exact mechanisms leading to "host specificity" have not been fully understood, the existing evidence shows that they act independently of each other at the various phases of an infection. During the process of adaptation, the expression of a serovar's



pathogenicity is influenced by the environmental and genetic factors influencing each host [15]. During the course of this adaptation, each host adapted/host restricted serovar (HA/HR) must overcome the encountered specific and non-specific immune mechanisms. Thus, pathogenicity of HA serovars results from the development of ways helping their survival in a host. Examples to this are serovars of *Salmonella enterica* subsp. *enterica*, which have developed the ability to evade the immune mechanisms of warm-blooded animals. They have, during their evolution, acquired the ability to modify to their favor, the physiological functions of their host, such as intracellular engulfment, apoptosis, transfer of antigens by M cells, migration of macrophages and lymphocytes in the reticuloendothelial system and others [6]. A well known serovar belonging to this group of serovars, is *Salmonella* Typhi, pathogenic to man, but not, for e.g., to mice. Its acquired ability to survive and divide in only human macrophages, makes it pathogenic to man, but not to mice [16, 17]. Serovars such as the HR *Salmonella* Typhi, *Salmonella* Gallinarum and *Salmonella* Abortusovis, showing high tropism for the lymphatic organs of their hosts, are, perhaps, regulating their natural hosts' biological environment, in their favor [15]. They, by attaching to cells of the bone marrow, bursa of Fabricius and Peyer's patches are affecting the development of B-cells, thus immune response. The result of such interactions, particularly in adult animals, help the establishment of chronic or subclinical infection and, thus prolonged subclinical excretion, but they do not help the development of severe gastroenteritis [18, 19]. Serovars not fully adapted to evade mature immune system, lack specificity, causing deadly systemic disease in adult animals by invading their defense mechanisms compared to HR serovars [6]. The latter are mildly enteropathogenic compared to the unrestricted serovars, thus, they do not cause intestinal inflammation [20]. A common characteristic of HR serovars is their ability to infect the reproductive system, affecting egg production in poultry and causing abortions in mammals. They greatly proliferate in fetal tissues, which when aborted, disseminate a large number of microorganisms in the environment [3].

It has also been shown that the ability of a serovar to metabolize a wide range of amino acids adds to its virulence [21, 22]. Although, serovars metabolizing for their multiplication the same metabolites (e.g. cysteine, thiamin, nicotinic acid) are thought as closely related, each HR or HA serovar has most likely evolved independently. On the other hand, the heterogeneity of serovars in relation to different metabolic profiles, facilitates either the completion of the pathway to infection [23] or, when lacking specificity, it is favoring host adaptation [15].

The process of *Salmonella* host adaptation is believed that either it involves acquisition of novel genetic elements encoding specific virulence factors or loss of genes, thus a liability observed frequently in

pathogenic strains. Best examples of host specificity dependent on gene deletions are, perhaps, serovars *Salmonella* Typhimurium, Enteritidis, Choleraesuis, Gallinarum, Pullorum, Abortusovis, Paratyphi C and Dublin [14]. Studies using genome sequencing of host-adapted/host-restricted serovars, such as Typhi, Gallinarum, Choleraesuis and the newly emerging in sub-Saharan Africa invasive strains of *Salmonella* Typhimurium, revealed that these serovars have undergone extensive gene deletion and truncation [24-28]. In systemically non-invasive *Salmonella*, the majority of lost genes have functional orthologs, which play a key role in intestinal colonization. Thus, these lost genes have resulted in loss of an intestinal multiplication cycle for narrowly host adapted *Salmonellae* followed by a concurrent acquisition of mechanisms helping the microorganism to survive in a systemic niche [27]. Point mutations, the target of positive selection, together with horizontal gene transfer and genome degradation could be responsible for a differential pathoadaptive evolution of some *Salmonella* serovars [29]. It appears from the analysis of the mannose-sensitive fimbrial adhesin FimH that even single amino acid replacement, resulting in specific structural mutations in FimH variants of host-adapted (systemically invasive) serovars, play an important role in the differential adaptive evolution of *Salmonella* spp. Thus, activation or inactivation of mannose-specific adhesive properties in different systemically invasive serovars of *Salmonella* reflects the dynamic trajectories of adaptation of a serovar to the biological environment of a specific host. Furthermore, phylogenetic analysis has indicated that these mutations are, most likely, of a convergent nature (common pathogenic traits incorporated into different genetic backgrounds) and occur under strong positive selection, illustrative of the role of point amino acid changes for a host-adapted *Salmonella*.

Certainly, in depth study is needed for the molecular composition of flagella, chemotaxis genes [30], fimbriae, bacteriophages, the presence of virulence plasmids and subtypes of each specific serovar, to understand mechanisms of pathogenicity and host specificity [14, 15]. Studies correlating some phage types of *Salmonella* Typhimurium with their hosts have shown marked host specificity [31]. However, the majority of phage types studied had a broad host range, perhaps, suggesting a phage transfer of virulent genes between hosts, leading eventually to host specificity. The unrestricted serovar Typhimurium may comprise a spectrum of variants differing in regard to virulence and reflecting a summation of the spatial and/or temporal selective pressures within a particular host [32]. In this study, all Typhimurium strains deriving from animal clinical cases were virulent also in mice, whereas many Typhimurium strains deriving from man clinically ill lacked this ability. Of interest was that many of the Typhimurium strains deriving from human gastroenteritis lacked the *Salmonella* virulence plasmid, present in all animal strains and strains



isolated from human bacteremia. Furthermore, some strains of serovar Typhimurium isolated from man and harboring the *Salmonella* virulence plasmid were avirulent in mice, and the opposite was observed with those deriving from animals and phenotypically exhibiting virulent determinants. These findings suggest that *Salmonella* isolates of the same serovar deriving from human salmonellosis are distinctly different from those isolated from animals. This means, that selective pressure within a particular host, may give rise to bacterial strain variants that exhibit different pathogenicity determinants, thus varying degree of pathogenicity.

Similarly, serovars of *Salmonella enterica* subsp. *enterica*, associated with disease in mammals and birds, show different degrees of adaptability. Perhaps, pathogenicity determinants, such as the FimH adhesins play an important role. For example, the type 1 FimH adhesins are expressed by serovars of *S. enterica* isolated from mammalian and avian hosts, while the type 2 FimH is expressed exclusively by the avian-adapted serovar Gallinarum. Consequently, these data show that allelic variation of the *S. enterica* FimH adhesin directs host-cell-specific recognition, thus selective binding to mammalian or avian receptors. This allele-specific binding parallels the host specificity of the respective FimH-expressing pathogen [33].

However, regardless of the progress in the study of HA/HR serovars, the mechanisms and genes involved in the expression of “host specificity” are yet to be fully clarified. Research about the distribution of *Salmonella* Pathogenic Islands (SPIs), fimbriae operons and virulence plasmids has shown that, various combinations of virulent determinants, formed during the evolution of the microorganism, are needed for a variant to become pathogenic in a particular range of host species. Mutations horizontally transmitted could have helped the development of “host specificity” [6] by helping *Salmonella* serovars to harbour unique virulence factors [34]. Molecular and phylogenetic analyses of the SPIs' genes, showed that these genes encode for translocon proteins (SipD, SseC and SseD) present on both *Salmonella* pathogenicity islands (SPI-1 and SPI-2) and also encode an effector protein inhibiting the pathway of the host cells mitogen-activated protein kinase (*sptP* gene) [35]. In addition, they encode effector proteins (SseF and SifA) important in placing the *Salmonella*-containing vacuole in a juxtannuclear position. The products of these genes directly interact with the host cell and modulate its functions, thus favoring host specificity. Another study of the SPI genes has shown the close evolutionary relatedness between serovars Gallinarum and Enteritidis [36], although the former is highly adapted (restricted) to poultry and is the only known non-motile serovar, while serovar Enteritidis is an unrestricted serovar. Analysis of the functions of genes associated to SPI-1 to -5 showed that virulence genes might have evolved under positive selection imposed by a serovar's

respective host(s) contributing to the different host-specificity observed between different serovars. Undoubtedly, as information accumulates, a better understanding would be achieved concerning the mechanisms helping closely related serovars to show different host specificities.

This information has revealed that a close similarity of core regions exist, both within and among the genomes of various serovars [37]. Some examples are evidence of recombination and rearrangement, genomic degradation, pseudogenes and clonal diversity. In particular, genomic comparisons of host-restricted and host-adapted serovars show that genomic degradation is a common evolutionary mechanism for host adaptation and increased pathogenicity [37, 38]. Others have shown that host restriction and change of ecological niche (site of attachment or type of diseases) are linked to the accumulation of large numbers of pseudogenes and an overall reduction in genome size [28]. Examples are serovars Typhi and Paratyphi A, restricted to man and causing a similar systemic disease. Genome sequence similarity between Typhi and Paratyphi A serovars and their different pathogenicity when compared to the unrestricted serovars of *S. enterica*, has been attributed to a relatively recent recombination of a quarter of their genomes, making the accumulation of pseudogenes a key feature of convergent evolution for these and other host-adapted pathogens [29]. Another example supporting the role of convergent evolution among the typhoid agents is serovar Paratyphi C, which has diverged from the same ancestor as serovar Choleraesuis, by accumulating genomic novelty during its adaptation process to man. The genomic analysis of these two *Salmonella* serovars has revealed a highly similar genomic construction between the two and their distinct pathogenic features, making them excellent models for studying *Salmonella*'s host adaptation and pathogenic divergence [37].

Hence, *Salmonella* adaptation to a particular host species is a complex phenomenon, which depends, apparently, on a large number of gene products. The mastery of understanding the interactions between *Salmonella* serovars and their natural hosts needs comparative analysis of the interactions between the physiology of various animal species and their genetic composition.

## Conclusions

Despite the efforts of understanding the fundamental mechanisms of *S. enterica*'s pathogenesis, the specific genes involved and the mechanisms needed for a serovar to express “host adaptation-host specificity” are yet to be defined. However, research on the mechanisms involved when pathogens exert selective pressure on the host's immune system has led to the conclusion that “host adaptation” of a serovar helps it to competitively exclude other serovars in a given animal population. In addition, as the degree of



adaptation increases, evasion of the immune system increases, helping multiplication, thus the increasing excretion of the pathogen, infecting eventually an increasingly larger number of animal species.

Some believe that *Salmonella* spp. was a commensal microorganism of the reptile gastrointestinal tract long before man appeared and this is why all serovars are easily adapted within herpetofauna, no matter how selective they have become for other animal species [39]. Thus, to better understand the evolution of *Salmonella* infections, one should study the mechanisms helping the pathogen to be established in a new host. This is possible if “host adaptation-host specificity” are studied during the extensive surveillance and research of animal salmonellosis caused by serovars having a Public Health importance. Those that have attempted it [40] by the analysis of available genome sequences indicate that the broad host range of foodborne serovars is correlated to the maintenance of a wide number of intact genes found in host-restricted or host-adapted variants.

However, the precise nature of a serovar's potential zoonotic and epidemic characteristics is still unknown. The identification of such characteristics is vital for assessing the risk posed to man by *S. enterica* serovars found in animals, needing effective strategies for protecting Public Health. Improvements in the methods of molecular sequencing can be expected to yield new insights in this area, particularly if applied to epidemic variants and hitherto serovars, that although frequently isolated from animals, they rarely appear in man, thus considered of lesser importance [41]. A good understanding of *Salmonella*'s host specificity could also be a useful tool for the designing of autogenous vaccines effective against the prevalent serovars in a farm, thus improving the efficacy of vaccination. Research should, therefore, be focused on the genetic origins of host adaptation and host specificity, enabling researchers to “predict” a serovar's survival in a new animal population, eventually helping them to design the best strategies against serovars causing epidemics in livestock and man.

## References

- Lin-Hui, S. and Cheng-Hsun, C. (2007) *Salmonella*: Clinical Importance and Evolution of Nomenclature. *Chang Gung Med. J.* 30(3): 210–219.
- Fedoraka, P. J. - Cray, T., Gray, J.T, Wray, C. (2000) *Salmonella* Infections in Pigs In: Wray, C., Wray, A., editor. *Salmonella* in domestic animals. CABI Publishing, New York. 191-208.
- Wallis, T.S. (2005) Host-specificity of *Salmonella* infections in animal species. In: Mastroeni, P., Maskell, D., editors. *'Salmonella' Infections: Clinical, Immunological and Molecular Aspects*, Cambridge University Press. 57-80.
- Uzzau, S., Leori, G.S., Petruzzi, V., Watson, P. R., Schianchi, G, Bacciu, D., Mazzarello, V., Wallis, T. S. and Rubino, S. (2001) *Salmonella enterica* Serovar-Host Specificity Does Not Correlate with the Magnitude of Intestinal Invasion in Sheep. *Infect. Immun.*, 69(5):3092–3099.
- Kingsley, R. and Baumler, A.J. (2000). Host adaptation and the emergence of infectious disease: the *Salmonella* paradigm. *Mol. Microbiol.* 36(5): 1006-1014.
- Bäumler, A.J., Tsolis, R.M., Ficht, T.A. and Adams, L.G. (1998) Evolution of host adaptation in *Salmonella enterica*. *Infect. Immun.* 66:4579–4587.
- Retchless, A.C. and Lawrence, J. G. (2010) Phylogenetic incongruence arising from fragmented speciation in enteric bacteria. *PNAS.* 107: 11453–11458.
- Collazo, C.M. and Galan, J.E. (1997) The invasion-associated type-III protein secretion system in *Salmonella*-a review. *Gene.* 192:51–59.
- Hensel, M. (2000) *Salmonella* pathogenicity island 2. *Mol. Microbiol.* 36:1015–1023.
- Karasova, D., Sebkova, A., Havlickova, H., Sisak, F., Volf, J., Faldyna, M., Ondrackova, P., Kummer, V. and Rychlik, I. (2010) Influence of 5 major *Salmonella* pathogenicity islands on NK cell depletion in mice infected with *Salmonella enterica* serovar Enteritidis. *BMC Microbiol.* 10:75.
- De Lappe, N. (2009) *Salmonella* Taxonomy. Version 1. Ref NSRLFM041, Dept of Medical Microbiology, Division of Clinical Microbiology, Galway University Hospitals. [http://www.nuigalway.ie/research/salmonella\\_lab/downloads/salmonella\\_taxonomy.pdf](http://www.nuigalway.ie/research/salmonella_lab/downloads/salmonella_taxonomy.pdf). Accessed on 5/06/2013.
- Nnalue, N.A. (1991) Relevance of inoculation route to virulence of three *Salmonella* spp. strains in mice. *Microb. Pathog.* 11: 11-8.
- Ellermeier, C. D. and Schlauch, J. M. (2006) The Genus *Salmonella* In: Dworkin, M., Falkow, S., Rosenberg E., Schleifer, K.H, Stackebrandt, E., editors. *The Prokaryotes A Handbook on the Biology of Bacteria*, 3rd Edition, Springer Science and Business Media, LLC, 6: 123–158.
- Clarke, R.C. and Gyles, C.L. (1993) *Salmonella*. In: Gyles, C.L., Thoen, C.O., editors. *Pathogenesis of Bacterial Infections in Animals*, 2nd edn. Iowa State University Press, Ames, Iowa. 133–153.
- Uzzau, S., Brown D. J., Wallis, T., Rubino, S., Leori, G., Bernard S., Casadesus J., Platt, D. J. and Olsen, J. E. (2000) Host adapted serotypes of *Salmonella enterica*. *Epidemiol. Infect.* 125: 229-255.
- Alpuche-Aranda, C. M., Berthiaume, E. P., Mock, B., Swanson, J. A. and Miller, S. I. (1995) Spacious phagosome formation within mouse macrophages correlates with *Salmonella* serotype pathogenicity and host susceptibility. *Infect. Immun.* 63:4456–62.
- Knodler, L. A. and Finlay, B. B. (2001) *Salmonella* and apoptosis; to live or let die? *Microbes Infect.* 3: 1321–1326.
- Rubino, S., Leori, G., Rizzo, P., Erre, G., Colombo, M. M., Uzzau, S., Masala, G. and Cappuccinelli, P. (1993) *TyphoA* *Salmonella abortusovis* mutants unable to adhere to epithelial cells and with reduced virulence in mice. *Infect. Immun.* 61(5): 1786-92.
- Reynolds, J.D. and Morris, B. (1983) The evolution and involution of Peyer's patches in fetal and postnatal sheep. *Eur. J. Immunol.* 13: 627-35.
- Watson, P. R., Galyov, E. E., Paulin, S. M., Jones, P. W. and Wallis, T. S. (1998) Mutation of *invH*, but not *stn*, reduces *Salmonella*-induced enteritis in cattle. *Infect. Immun.*, 66:1432–8.
- Pan, Z., Carter, B., Nunez-Garcia, J., Abuoun, M., Fookes, M., Ivens, A., Woodward, M.J. and Anjum, M.F. (2009) Identification of genetic and phenotypic differences associated with prevalent and non-prevalent *Salmonella* Enteritidis phage types: analysis of variation in amino acid transport. *Microbiology.* 155:3200-3213.
- Gantois, I., Ducatelle, R., Pasmans, F., Haesebrouck, F. and Van Immerseel, F. (2008) *Salmonella enterica* serovar Enteritidis genes induced during oviduct colonization and egg contamination in laying hens. *Appl Environ Microbiol.* 74(21):6616-6622.
- Guard, J., Shah, D.H., Morales, C.A. and Call, D.R. (2011) Evolutionary Trends Associated with Niche Specialization as Modelled by Whole Genome Analysis of Egg-contaminating *Salmonella enterica* serovar Enteritidis. In: Porwollik, S., editor. *Salmonella: From Genome to Function*.



- San Diego, CA: Caister Academic Press. 91-106.
24. Chiu, C.H., Tang, P., Chu, C., Hu, S., Bao, Q., Yu, J., Chou, Y.Y., Wang, H.S. and Lee, Y.S. (2005) The genome sequence of *Salmonella enterica* serovar Choleraesuis, a highly invasive and resistant zoonotic pathogen. *Nucleic Acids Res.* 33: 1690–1698.
  25. McClelland, M., Sanderson, K.E., Clifton, S.W., Latreille, P., Porwollik, S., Sabo, A., Meyer, R., Bieri, T., Ozersky, P., McLellan, M., Harkins, C.R., Wang, C., Nguyen, C., Berghoff, A., Elliott, G., Kohlberg, S., Strong, C., Du, F., Carter, J., Kremizki, C., Layman, D., Leonard, S., Sun, H., Fulton, L., Nash, W., Miner, T., Minx, P., Delehaanty, K., Fronick, C., Magrini, V., Nhan, M., Warren, W., Florea, L., Spieth, J. and Wilson, R.K. (2004) Comparison of genome degradation in Paratyphi A and Typhi, human-restricted serovars of *Salmonella enterica* that cause typhoid. *Nat. Genet.* 36: 1268–1274.
  26. Holt, K.E., Thomson, N.R., Wain, J., Langridge, G.C., Hasan, R., Bhutta, Z.A., Quail, M.A., Norbertczak, H., Walker, D., Simmonds, M., White, B., Bason, N., Mungall, K., Dougan, G. and Parkhill, J. (2009) Pseudogene accumulation in the evolutionary histories of *Salmonella enterica* serovars Paratyphi A and Typhi. *BMC Genomics.* 10: 36.
  27. Thomson, N.R., Clayton, D.J., Windhorst, D., Vernikos, G., Davidson, S., Churcher, C., Quail, M.A., Stevens, M., Jones, M.A., Watson, M., Barron, A., Layton, A., Pickard, D., Kingsley, R.A., Bignell, A., Clark, L., Harris, B., Ormond, D., Abdellah, Z., Brooks, K., Cherevach, I., Chillingworth, T., Woodward, J., Norbertczak, H., Lord, A., Arrowsmith, C., Jagels, K., Moule, S., Mungall, K., Sanders, M., Whitehead, Chabalgoity, J.A., Maskell, D., Humphrey, T., Roberts, M., Barrow, P.A., Dougan, G., and Parkhill, J. (2008) Comparative genome analysis of *Salmonella* Enteritidis PT4 and *Salmonella* Gallinarum 287/91 provides insights into evolutionary and host adaptation pathways. *Genome Res.* 18: 1624–1637.
  28. Kingsley, R.A., Msefula, C.L., Thomson, N.R., Kariuki, S., Holt, K.E., Gordon, M.A., Harris, D., Clarke, L., Whitehead, S., Sangal, V., Marsh, K., Achtman, M., Molyneux, M.E., Cormican, M., Parkhill, J., MacLennan, C.A., Heyderman, R.S. and Dougan, G. (2009) Epidemic multiple drug resistant *Salmonella* Typhimurium causing invasive disease in sub-Saharan Africa have a distinct genotype. *Genome Res.* 19: 2279–2287.
  29. Kisiela, D.I., Chattopadhyay, S., Libby, S.J., Karlinsey, J.E., Fang, F.C., Tchesnokova, V., Kramer, J.J., Beskhlebnaya, V., Samadpour, M., Grzymajlo, K., Ugorski, M., Lankau, E.W., Mackie, R.I., Clegg, S. and Sokurenko, E.V. (2012) Evolution of *Salmonella enterica* Virulence via Point Mutations in the Fimbrial Adhesin. *PLoS Pathog.* 8(6): e1002733.
  30. Olsen, J.E., Hoegh-Andersen, K.H., Casadesús, J., Rosenkranz, J., Chadfield, M.S. and Thomsen, L.E. (2013) The role of flagella and chemotaxis genes in host pathogen interaction of the host adapted *Salmonella enterica* serovar Dublin compared to the broad host range serovar *S.* Typhimurium. *BMC Microbiology.* 13:67.
  31. Rabsch, W., Andrews, H. L., Kingsley, R. A., Prager, R., Tschäpe, H., Adams, L. G., and Baumler, A. J. (2002) *Salmonella enterica* serotype Typhimurium and its host-adapted variants. *Infect. Immun.* 70: 2249–2255.
  32. Heithoff, D.M., Shimp, W.R., Lau, P.W., Badie, G., Enioutina, E.Y., Daynes, R. A., Byrne, B.A., House, J.K. and Mahan, M.J. (2008) Human *Salmonella* Clinical Isolates Distinct from Those of Animal Origin. *Appl. Environ. Microbiol.* 74(6): 1757–1766.
  33. Guo, A., Cao, S., Tu, L., Chen, P., Zhang, C., Jia, A., Yang, W., Liu, Z., Chen, H. and Schifferli, D.M. (2009) FimH alleles direct preferential binding of *Salmonella* to distinct mammalian cells or to avian cells. *Microbiology.* 155: 1623–33.
  34. De Jong, H.K., Parry, C.M., van der Poll, T. and Wiersinga, W.J. (2012). Host-Pathogen Interaction in Invasive Salmonellosis. *PLoS Pathogens.* 8(10): e1002933.
  35. Eswarappa, S.M., Janice, J., Nagarajan, A.G., Balasundaram, S.V., Karnam G, Dixit, N.M. and Chakravorty, D. (2008) Differentially Evolved Genes of *Salmonella* Pathogenicity Islands: Insights into the Mechanism of Host Specificity in *Salmonella*. *PLoS ONE* 3(12): e3829.
  36. Eswarappa, S.M., Janice, J., Balasundaram, S.V., Dixit, N.M. and Chakravorty, D. (2009) Host-specificity of *Salmonella enterica* serovar Gallinarum: insights from comparative genomics. *Infect. Genet. Evol.* 9: 468–473.
  37. Liu, W.Q., Feng, Y., Wang, Y., Zou, Q.H., Chen, F., Guo, J.T., Peng, Y.H., Jin, Y., Li, Y.G., Hu, S.N., Johnston, R.N., Liu, G.R. and Liu, S.L. (2009) *Salmonella* Paratyphi C: Genetic Divergence from *Salmonella* Choleraesuis and Pathogenic Convergence with *Salmonella* Typhi. *PLoS ONE* 4(2): e4510.
  38. Chen, H.M., Wang, Y., Su, L.H. and Chiu, C.H. (2013) Nontyphoid *Salmonella* Infection: Microbiology, Clinical Features, and Antimicrobial Therapy. *Pediatrics and Neonatology.* 54(3): 147–152.
  39. Scheelings, T.F., Lightfoot, D. and Holz, P. (2011) Prevalence of *Salmonella* in Australian reptiles. *J. Wildl. Dis.* 47: 1–11.
  40. Richardson, E.J., Limaye, B., Inamdar, H., Datta, A., Manjari, K.S., Pullinger, G.D., Thomson, N.R., Joshi, R.R., Watson, M. and Stevens, M.P. (2011) Genome Sequences of *Salmonella enterica* Serovar Typhimurium, Choleraesuis, Dublin, and Gallinarum Strains of Well-Defined Virulence in Food-Producing Animals. *J. Bacteriol.* 193(12): 3162–3163.
  41. Stevens, M.P., Humphrey, T.J. and Maskell, D.J. (2009) Molecular insights into farm animal and zoonotic *Salmonella* infections. *Phil. Trans. R. Soc. B.* 364: 2709–2723.

\*\*\*\*\*



## 1.2 ΣΑΛΜΟΝΕΛΛΩΣΗ ΤΟΥ ΧΟΙΡΟΥ ΚΑΙ ΔΗΜΟΣΙΑ ΥΓΕΙΑ

### 1.2.1 Επιδημιολογία - Παράγοντες κινδύνου στην εκτροφή

Ο μικροοργανισμός μπορεί να εισέλθει σε οποιοδήποτε σημείο της τροφικής αλυσίδας, δηλαδή στη ζωοτροφή και στη χοιρομονάδα, κατά τη μεταφορά και παραμονή στο σφαγείο, κατά τη διαδικασία της σφαγής, στις μονάδες επεξεργασίας και στα σημεία πώλησης του κρέατος, καθώς και στους χώρους μαζικής εστίασης, αλλά και κατά την οικιακή προετοιμασία του φαγητού (Boyen et al. 2008). Επιπλέον, η ικανότητα των *Salmonella* spp. να επιβιώνουν σε ποικίλες περιβαλλοντικές καταστάσεις και να πολλαπλασιάζονται εκτός ξενιστή για μεγάλο χρονικό διάστημα υπό ευνοϊκές συνθήκες θερμοκρασίας και υγρασίας (επιβίωση του οροτύπου *S. Choleraesuis* για τουλάχιστον 30 μήνες σε αποξηραμένα κόπρανα), υποδηλώνει ότι πρέπει να τα αποδεχτούμε ως ένα περιβαλλοντικό μικροοργανισμό του οποίου η διασπορά είναι πιθανό να συνεχιστεί ή και να αυξηθεί στο μέλλον (Hutchison et al. 2005, Arrus et al. 2006).

Όσον αφορά την είσοδο των *Salmonella* spp. στην εκτροφή, ο αριθμός των δυνητικών πηγών μόλυνσης είναι σχεδόν ατελείωτος. Ένας μεγάλος αριθμός συντελεστών, που έχουν μελετηθεί σε επιδημιολογικές έρευνες, περιλαμβάνονται σε αυτούς, όπως: ο τύπος της ζωοτροφής, η χρήση αντιβιοτικών, οι σύγχρονες λοιμώξεις, το μέγεθος του ζωικού κεφαλαίου, οι πρακτικές υγιεινής, η ποιότητα του πόσιμου ύδατος, ο τύπος του δαπέδου, η επαφή των χοίρων, ο αριθμός των προμηθευτών χοίρων, η παρουσία τροφικών, η εγγύτητα με άλλες χοιρομονάδες, η περίοδος πάχυνσης, τα διαχωριστικά μεταξύ των κελιών και οι διαδικασίες καθαρισμού-εξυγίανσης. Ας δούμε πιο αναλυτικά μερικούς από αυτούς:

Οι συνηθέστεροι οδοί εισαγωγής της *Salmonella* στην εκτροφή είναι μέσω της αγοράς και ανάμειξης ζώων από διαφορετικές εκτροφές, της άγριας πανίδας και της ζωοτροφής (van der Wolf et al. 2001). Η εισαγωγή υποκλινικά προσβεβλημένων χοίρων είναι μια από τις κυριότερες πηγές εισαγωγής και διασποράς της *Salmonella* στην εκτροφή. Χοίροι που προέρχονται αυστηρά από εκτροφές τελικής πάχυνσης έχουν 2,5 φορές μεγαλύτερη πιθανότητα να μολυνθούν με *Salmonella* σε σχέση με εκείνους που προέρχονται από κάθετες εκτροφές. Επίσης, οι εκτροφές που εφαρμόζουν το σύστημα

της συνεχόμενης παραγωγής εμφανίζουν μεγαλύτερο κίνδυνο σαλμονελλώσεων σε σχέση με εκείνες που εφαρμόζουν το σύστημα «όλα μέσα-όλα έξω» (all- in/all out) (Lo Fo Wong et al. 2004). Αλλά και το μέγεθος της εκτροφής σχετίζεται θετικά με τη συχνότητα εμφάνισης της *Salmonella*. Οι μεγάλες εκτροφές εκτός από τη μεγαλύτερη συχνότητα εισαγωγής νέων ζώων και τον μεγαλύτερο αριθμό προμηθευτών, απασχολούν περισσότερο εργατικό δυναμικό, το οποίο αυξάνει τον κίνδυνο των διασταυρούμενων μολύνσεων μεταξύ των κτιρίων, όταν δεν εφαρμόζονται αυστηρά μέτρα υγιεινής και βιοασφάλειας (Casal et al. 2007). Επίσης, οι εκτροφές που συνεργάζονται με περισσότερους από τρεις προμηθευτές έχουν περισσότερες πιθανότητες να είναι οροθετικές σε σχέση με εκείνες που εκτρέφουν μόνες τους το ζωικό κεφάλαιο αντικατάστασης ή συνεργάζονται με λιγότερους από τρεις προμηθευτές (Lo Fo Wong et al. 2004), διότι μεγαλώνει ο κίνδυνος εισαγωγής στην εκτροφή του μικροοργανισμού μέσω της αγοράς και της μεταφοράς χοίρων.

Η άγρια πανίδα, καθώς και τα κατοικίδια ζώα που ζουν στην εκτροφή ή στο περιβάλλον γύρω από αυτή, μπορούν να εισαγάγουν και να διασπείρουν τον μικροοργανισμό είτε άμεσα μέσω της επαφής τους με τους χοίρους, είτε έμμεσα μέσω της επιμόλυνσης της ζωοτροφής και του εξοπλισμού με τα κόπρανά τους. Επίσης, η ζωοτροφή μπορεί να αποτελέσει πιθανή πηγή εισόδου της *Salmonella* στην εκτροφή, αφού βρέθηκε στο 46,7% των ζωοτροφών των χοιρομονάδων (Harris et al. 1997). Ακόμη και η ελάχιστη επιμόλυνση σε αυτό το σημείο μπορεί να προκαλέσει τη μόλυνση πολλών εκτροφών. Αλλά και ο τύπος της ζωοτροφής μπορεί να επηρεάσει τη φυσιολογία του εντέρου συντελώντας στη δημιουργία ενός λιγότερο ή περισσότερο ευνοϊκού περιβάλλοντος για τον πολλαπλασιασμό της *Salmonella*. Βρέθηκε ότι, οι πληθυσμοί των οξεογαλακτικών βακτηρίων στο στομαχικό περιεχόμενο ήταν μικρότεροι όταν η τροφή προσφερόταν σε μορφή συμπήκτων (pellets), και συνεπώς η οξύτητα του στομάχου ήταν μικρότερη σε σχέση με τη χοντροαλεσμένη τροφή, γεγονός που συμβάλλει στην επιβίωση των προσλαμβανόμενων μικροοργανισμών και στην εγκατάστασή τους στον ξενιστή (Hedemann et al. 2005). Αντίθετα, η κατανάλωση υγρής ζωοτροφής –υγρά σίτιση (ιδιαίτερα αυτής που έχει υποστεί ζύμωση) προκαλεί πτώση του pH, λόγω της παραγωγής γαλακτικού και οξικού οξέος από οξεογαλακτικά βακτήρια και της

ανάπτυξης ζυμών, δημιουργώντας ένα εχθρικό περιβάλλον για την επιβίωση και την εγκατάσταση της *Salmonella* (Hotes et al. 2010).

Τέλος, η χορήγηση αντιβιοτικών αποτελεί παράγοντα που επηρεάζει την ανθεκτικότητα των βακτηριδίων, οδηγώντας στη δημιουργία ανθεκτικών στελεχών ενός οροτύπου σε πολλές χημειοθεραπευτικές ουσίες (Emborg et al. 2008). Στην Ελλάδα, ο κίνδυνος οροθετικότητας βρέθηκε να είναι τέσσερις φορές μεγαλύτερος σε χοίρους στους οποίους χρησιμοποιούνται ως αυξητικοί παράγοντες συνδυασμός χλωροτετρακυκλίνης, προκαϊνούχου πενικιλλίνης και σουλφαμεθαζίνης, κατά τη διάρκεια της τελικής πάχυνσης, συγκριτικά με εκείνους που διατρέφονταν με εγκεκριμένους αυξητικούς παράγοντες ή με προβιοτικά (Leontides et al. 2003).

### **1.2.2 Ανάλυση της κατανομής των οροτύπων των *Salmonella* spp. στην ΕΕ**

Η ανάλυση των παραγόντων κινδύνου επιτρέπει την εξαγωγή των παρακάτω συμπερασμάτων, που αφορούν την κατανομή των οροτύπων *Salmonella* spp. στην ΕΕ:

Οι ορότυποι Typhimurium και Derby είναι οι κυρίαρχοι και οι πιο διαδεδομένοι στα περισσότερα Κράτη-Μέλη της ΕΕ, ενώ άλλοι, όπως οι London, Infatis και Rinsen απομονώθηκαν συχνότερα στη Δυτική Ευρώπη και η παρουσία τους δεν έχει ακόμη γενικευτεί σε όλη την ΕΕ (EFSA 2010a). Η ετερογενής γεωγραφική κατανομή των οροτύπων των *Salmonella* spp. στην ΕΕ αποτελεί ένδειξη ύπαρξης κοινών πηγών μόλυνσης μεταξύ των διαφόρων περιοχών, όπως είναι οι μολυσμένες πολλαπλασιαστικές αγέλες, η μολυσμένη ζωοτροφή και το εμπόριο χοίρων αναπαραγωγής. Η γεωγραφική ομαδοποίηση συμβαδίζει επίσης με το ενδεχόμενο της κλωνικής διασποράς ενός συγκεκριμένου οροτύπου, μετά από την εισαγωγή του στις εκτροφές μιας περιοχής μέσω της ζωοτροφής ή των οχημάτων μεταφοράς των ζώων. Αυτό μπορεί επίσης να σχετίζεται με διαφορές που παρατηρούνται στον επιπολασμό και στους οροτύπους μεταξύ Δυτικών χωρών, που έχουν βιομηχανοποιημένη παραγωγή χοίρων, εξειδικευμένες αγέλες αναπαραγωγής, μεγάλης κλίμακας εμπορία χοίρων αναπαραγωγής, υψηλό ετήσιο ρυθμό αντικατάστασης ζωικού κεφαλαίου και ευρεία παράθεση τροφής με τη μορφή συμπύκτων, και Ανατολικών, στις οποίες η παραγωγή χοίρου είναι οργανωμένη κυρίως σε μικρές αυτόνομες εκμεταλλεύσεις. Σε συγκεκριμένες περιοχές και άλλοι παράγοντες,

όπως η θερμοκρασία και η επιβολή προγραμμάτων ελέγχου μπορεί να εμπλέκονται. Τέλος, η ετερογενής γεωγραφική κατανομή των οροτύπων των *Salmonella* spp. στην ΕΕ μπορεί επίσης να αντικατοπτρίζει μια εκλεκτική πίεση επιλογής συγκεκριμένων οροτύπων η οποία προήλθε π.χ. από την προτίμηση χορήγησης ορισμένων αντιμικροβιακών ουσιών σε κάποιες περιοχές (EFSA 2011a). Κράτη-Μέλη που παρουσιάζουν συχνότητα εμφάνισης συγκεκριμένων οροτύπων πρέπει να προσπαθήσουν να αναγνωρίσουν τους παράγοντες κινδύνου ή/και πρόληψης, εφαρμόζοντας κατάλληλα μέτρα ελέγχου στη χώρα τους.

### 1.2.3 Παθογένεια

Η *Salmonella* εισάγεται στον ξενιστή-χοίρο κυρίως δια μέσω της πεπτικής οδού, ως αποτέλεσμα της κατανάλωσης επιμολυσμένης τροφής ή νερού, ενώ έχει αναφερθεί και η αερογενής μετάδοση του μικροοργανισμού (Fedorka-Cray et al. 1994, Fedorka-Cray et al. 1995, Boyen et al. 2008). Ο μικροοργανισμός εγκαθίσταται στις πλάκες του Peyer, που εντοπίζονται κυρίως στην περιοχή του ειλεού, εξαπλώνεται γρήγορα κατά μήκος της γαστρεντερικής οδού, απ' όπου δύναται να μολύνει άλλα όργανα (λεμφαδένες, χολυδόχο κύστη) και αποβάλλεται με τα κόπρανα μόλις εντός δύο ωρών μετά τη μόλυνση (Loynachan et al. 2004, Liebler-Tenorio & Pabst 2006). Οι πιο καθοριστικοί παράγοντες για την εγκατάσταση της λοίμωξης φαίνεται να είναι η μολύνουσα δόση και ο ορότυπος (Boughton et al. 2007). Βέβαια, οι ασυμπτωματικές λοιμώξεις του χοίρου είναι πολύ περισσότερο συχνές σε σχέση με την εμφάνιση της κλινικής νόσου. Η διαλείπουσα αποβολή του μικροοργανισμού με τα κόπρανα, χωρίς την παρουσία συμπτωμάτων, χαρακτηρίζει τους περισσότερους υποκλινικά προσβεβλημένους χοίρους παγκοσμίως. Έτσι, αυτοί οι χοίροι αποτελούν εν δυνάμει κίνδυνο για την ασφάλεια των τροφίμων για πολύ καιρό μετά την αρχική τους μόλυνση, αφού αποβάλλουν τον μικροοργανισμό με τα κόπρανά τους ή και τον «φιλοξενούν» σε διάφορους ιστούς, ιδιαίτερα του πεπτικού συστήματος (Boyen et al. 2008).

Η βασική λοιμογόνος δράση των *Salmonella* spp. είναι η προσβολή του εντερικού βλεννογόνου και ο πολλαπλασιασμός τους στον εντερικό λεμφικό ιστό (gut-associated lymph tissue-GALT). Ωστόσο, η πεπτική οδός συνιστά ένα εχθρικό

περιβάλλον για τους εισερχόμενους μικροοργανισμούς, προβάλλοντας εμπόδια, τα οποία θα πρέπει να καταφέρουν να ξεπεράσουν. Έτσι, ο πρώτος αμυντικός μηχανισμός του ξενιστή, μετά την κατάποση, είναι ο όξινος φραγμός του στομάχου. Συνθήκες που αυξάνουν το γαστρικό pH μειώνουν τη λοιμογόνο δράση των *Salmonella* spp., γεγονός που υποδηλώνει ότι η γαστρική οξύτητα αντιπροσωπεύει έναν αξιόλογο αρχικό φραγμό στη λοίμωξη (Giannella et al. 1972). Όσα από τα βακτήρια επιβιώσουν οδηγούνται στο λεπτό έντερο, το οποίο διαθέτει προστατευτικούς αντιμικροβιακούς παράγοντες και μηχανισμούς, όπως τα χολικά άλατα, την εντερική βλέννη, λυσοζύμη, λακτοφερίνη και οργανικά οξέα (Clarke & Gales 1993). Όπως και τα άλλα εντεροβακτήρια έτσι και τα *Salmonella* spp. είναι καλά προσαρμοσμένα, ώστε να ανταπεξέρχονται σε τέτοιες στρεσογόνες καταστάσεις. Μια ακόμα μεγαλύτερη πρόκληση, από την επιβίωση στον αυλό του λεπτού και του παχέως εντέρου, εμφανίζεται να είναι η αντίσταση στις περισταλτικές κινήσεις του εντέρου (Clarke & Gales 1993). Τελικά, περίπου το 15% του μικροβιακού φορτίου παραμένει εντοπισμένο στον αυλό του τυφλού και του παχέως εντέρου και μόνο το 5% κατορθώνει να διαπεράσει το τοίχωμα του λεπτού εντέρου και να καταλήξει στον GALT (Carter & Collins 1974). Επιπλέον, η άφθονα εγκατεστημένη φυσιολογική χλωρίδα του παχέως εντέρου αποτελεί ένα σοβαρό εμπόδιο στον αποικισμό από τα *Salmonella* spp (Hentges 1970). Παράγοντες που βλάπτουν την εντερική φυσιολογική χλωρίδα, όπως η θεραπεία με αντιβιοτικά, η διαίτα και η στέρηση ύδατος, προδιαθέτουν τον εντερικό αποικισμό και την εκδήλωση της νόσου του ξενιστή (Que & Hentges 1985).

Ο κύριος τρόπος αντιμετώπισης των βακτηριακών αλληλεπιδράσεων από τα *Salmonella* spp. είναι η «διαφυγή» από το ανταγωνιστικό περιβάλλον του εντέρου μέσω της διείσδυσης στον εντερικό βλεννογόνο, με μια διαδικασία που ονομάζεται «μακροπυνοκύττωση» (Takeuchi 1968, Frances et al. 1993). Ουσιαστικά, με την προσκόλληση των βακτηριδίων στην επιφάνεια των εντεροκυττάρων, συμβαίνουν βαθιές ανακατατάξεις στον κυτταροσκελετό της ακτίνης του κυττάρου του ξενιστή. Αυτό έχει ως αποτέλεσμα τη διάσπαση της φυσιολογικής ψυκτροειδούς παρυφής του επιθηλίου και την πυροδότηση του σχηματισμού αναδιπλώσεων της κυτταρικής μεμβράνης, οι οποίες περικλείουν τα προσκολλημένα βακτηρίδια σε μεγάλα κενοτόπια (*Salmonella*-containing vacuole-SCV), τα οποία είναι σημαντικά για την επιβίωση των *Salmonella* spp. και τη

μεταφορά τους στα επιθηλιακά κύτταρα, αλλά και μέσα στα φαγοκύτταρα (Goosney et al. 1999). Τα κενοτόπια μεταφέρονται στη βάση του κυττάρου, ο μικροοργανισμός αλληλεπιδρά με τα μακροφάγα των πλακών του Peyer και εισέρχεται σε αυτά (Galan 2001, Knodler & Steele-Mortimer 2003).

Από τον προσβεβλημένο εντερικό βλενογόνο οι παθογόνοι μικροοργανισμοί παροχετεύονται στους επιχώριους λεμφαδένες, όπου τα μακροφάγα που επενδύουν τους λεμφόκολπους σχηματίζουν έναν πρώτο αποτελεσματικό φραγμό, ο οποίος αποτρέπει την παραπέρα μετάδοση. Αν αυτοί οι αμυντικοί μηχανισμοί του ξενιστή καταφέρουν να περιορίσουν τη βακτηριακή επέκταση, η λοίμωξη παραμένει εντοπισμένη στο έντερο και στον GALT, προκαλώντας εντοπισμένη νόσο, η οποία εκδηλώνεται ως οξεία γαστρεντερίτιδα. Επί παραδείγματι, ο μη προσαρμοσμένος ορότυπος *S. Typhimurium* προκαλεί στους χοίρους εντοπισμένη νόσο, η οποία χαρακτηρίζεται από οξεία υδαρή, κίτρινη, διάρροια, ανορεξία, λήθαργο, πυρετό και υψηλή νοσηρότητα με μικρή, όμως, θνησιμότητα (Miller & Pegues 2000).

Στην περίπτωση που τα μακροφάγα των λεμφογαγγλίων δεν μπορέσουν να περιορίσουν τη διασπορά, το παθογόνο (κυρίως οι προσαρμοσμένοι ορότυποι) δύναται να προκαλέσει συστηματική νόσο. Κατά τη διάρκεια της συστηματικής λοίμωξης οι μικροοργανισμοί διασπείρονται από τον GALT μέσω των απαγωγών λεμφαγγείων και του θωρακικού πόρου στην πρόσθια κοίλη φλέβα. Το σύστημα των τριχοειδών αγγείων του ήπατος και της σπλήνας συνιστούν ένα αποτελεσματικό σύστημα φιλτραρίσματος, το οποίο επικεντρώνει τη λοίμωξη στα όργανα αυτά. Συνήθη συμπτώματα των σηψαιμικών χοίρων είναι η ανορεξία, ο λήθαργος, η πυρεξία, ακόμη και συμπτώματα από το αναπνευστικό σύστημα, ενώ η διάρροια δεν αποτελεί χαρακτηριστική κλινική εκδήλωση (Baumer et al. 2000, Fedorka-Cray et al. 2000, Rychlik & Barrow 2005).

Θα πρέπει να τονιστεί ότι ένα από τα ιδιαίτερα χαρακτηριστικά της λοίμωξης από τα *Salmonella* spp. είναι η εκλεκτική εισβολή στους λεμφικούς αδένες που εντοπίζονται στο εντερικό τοίχωμα του ειλεού (Carter & Collins 1974, Hohmann et al. 1978). Στα θηλαστικά οι λεμφαδένες του λεπτού εντέρου συναθροίζονται σε όργανα γνωστά ως πλάκες του Peyer. Οι πλάκες του Peyer λειτουργούν ως η κύρια πύλη εισόδου των *Salmonella* spp. και ο αποικισμός τους συμβάλλει στην εξέλιξη της νόσου, τόσο κατά τη διάρκεια της εντοπισμένης όσο και της συστηματικής λοίμωξης. Η διάτρηση του εντέρου



στην περιοχή των πλακών του Peyer είναι η συχνότερη αιτία θανάτου κατά τη διάρκεια του τυφοειδούς πυρετού (Bitar & Tarpley 1985). Παρά τη μεγάλη σπουδαιότητα αυτού του σταδίου κατά τη διάρκεια της λοίμωξης, λίγα είναι γνωστά για τους παράγοντες που εμπλέκονται στον τροπισμό των οροτύπων της *Salmonella* προς τις πλάκες του Peyer.

Επιπρόσθετα, η προσβολή του χοίρου από τα *Salmonella* spp., εκτός από τους μηχανισμούς της μη ειδικής ανοσίας, επάγει επίσης τη χυμική και την κυτταρική ανοσία (Eisenstein 1998), η οποία καθορίζεται από την οδό εισόδου, τη μολύνουσα δόση, τη λοιμογόνο ικανότητα του οροτύπου, καθώς και από την ηλικία του ζώου. Πειραματικές μελέτες με τον ορότυπο *S. Choleraesuis* έδειξαν ότι η μέγιστη συγκέντρωση των ανοσοσφαιρινών παρατηρείται μία εβδομάδα μετά τη μόλυνση και παραμένουν σε υψηλά επίπεδα για διάστημα 2-3 μηνών (Gray et al. 1996). Σε περίπτωση αναμόλυνσης του ζώου η απόκριση των αντισωμάτων διεγείρεται άμεσα. Ωστόσο, το ζώο παραμένει φορέας του μικροοργανισμού, τον οποίο διασπείρει στο περιβάλλον, γεγονός που αποτελεί κίνδυνο για τη Δημόσια Υγεία. Επί παραδείγματι, στην περίπτωση του τυφοειδούς πυρετού στον άνθρωπο, ο κύριος μηχανισμός διάδοσης φαίνεται να είναι η ικανότητα του οροτύπου *S. Typhi* να μεταφέρεται στη χοληδόχο κύστη και να αποβάλλεται με τη χολή. Η ροή μολυσμένης χολής επαναμολύνει το λεπτό έντερο, προκαλείται φλεγμονή και διάρροια κατά την οποία αποβάλλονται μεγάλες ποσότητες βακτηρίων (Monack et al. 2004).

Συμπερασματικά, η ικανότητα των *Salmonella* spp. να προκαλούν είτε εντοπισμένη είτε συστηματική νόσο εξαρτάται από μια σειρά πολύπλοκων λοιμογόνων παραγόντων, οι οποίοι περιλαμβάνουν ένα μεγάλο αριθμό γονιδίων. Τα γονίδια αυτά συνιστούν τους «καθοριστές λοιμογόνου ικανότητας», οι οποίοι εμπλέκονται στην προσκόλληση του μικροοργανισμού στο κύτταρο του ξενιστή, στην εισβολή και στην αντίσταση στους μηχανισμούς ενδοκυτταρικού θανάτου του μικροοργανισμού (φαγοκύτταρα, συμπλήρωμα, ειδικά αντισώματα, λοιπά στοιχεία του ανοσοποιητικού συστήματος) και συναθροίζονται σε συγκεκριμένες περιοχές του χρωμοσώματος, που ονομάζονται νησίδια παθογένειας (Pathogenic islands-PIs) (Groisman & Ochman 1996). Οι καθοριστές λοιμογόνου ικανότητας που είναι απαραίτητοι για την επιβίωση του μικροοργανισμού σε στρεσογόνες καταστάσεις έξω από τα κύτταρα του ξενιστή θεωρούνται ως «γονίδια βασικών λειτουργιών» και απαντούν τυπικά και σε άλλα

συγγενή βακτήρια, όπως η *E.coli*. Μια άλλη κατηγορία γονιδίων, τα «ρυθμιστικά γονίδια» ρυθμίζουν τόσο την απόκριση στα περιβαλλοντικά σήματα του ξενιστή, όσο και την έκφραση των «γονιδίων βασικών λειτουργιών» και «συγκεκριμένων γονιδίων, ειδικά για τα *Salmonella* spp.», τα οποία κωδικοποιούν εκλεκτικά σχεδιασμένες προσαρμογές του μικροοργανισμού (Baumer et al. 2000, Fedorka-Cray et al. 2000).

#### 1.2.4 Αντιμικροβιακή αντοχή

Τα αντιμικροβιακά έχουν χρησιμοποιηθεί στην κτηνιατρική πράξη για θεραπευτικούς σκοπούς, με σκοπό τη διαφύλαξη της υγείας των ζώων, καθώς επίσης και ως αυξητικοί παράγοντες (Gustafson & Bowen 1997, Gorbach 2001). Με βάση τον μηχανισμό δράσης τους τα αντιμικροβιακά μπορούν να ταξινομηθούν σε τέσσερις ομάδες. Αυτοί οι μηχανισμοί περιλαμβάνουν (Tenover 2006):

α) Αναστολή σύνθεσης του κυτταρικού τοιχώματος. Στην κατηγορία αυτή ανήκουν τα β-λακταμικά αντιμικροβιακά (πενικιλίνες, κεφαλοσπορίνες, αναστολείς β-λακτατάσης, καρβαπενέμες, μονοβακτάμες) και τα γλυκοπεπτίδια (βανκομυκίνη, τεϊκοπλανίνη), τα οποία αναστέλλουν τον σχηματισμό σε διάφορα στάδια της πεπτιδογλυκάνης του κυτταρικού τοιχώματος των βακτηρίων. Δρουν κυρίως έναντι των Gram θετικών, αλλά και Gram αρνητικών μικροβίων.

β) Αναστολή πρωτεϊνικής σύνθεσης. Στην κατηγορία αυτή ανήκουν η σπεκτινομυκίνη, οι λινκοσαμίδες, οι τετρακυκλίνες, η χλωραμφαινικόλη, οι αμινογλυκοσίδες και τα μακρολίδια, τα οποία δρουν μέσα στο κυτταρόπλασμα, αναστέλλοντας την πρωτεϊνοσύνθεση σε διάφορα στάδιά της. Διαταράσσουν κυρίως τη ριβοσωμική λειτουργία. Τα ριβοσώματα των μικροβίων με βάση το μέτρο πυκνότητας κατατάσσονται στην 70S ομάδα, ενώ των θηλαστικών στην 80S. Οι δύο αυτοί τύποι ριβοσωμάτων χωρίζονται σε υποομάδες που διαφέρουν ως προς τη χημική σύνθεση και τη λειτουργία τους. Έτσι εξηγείται και η επιλεκτική δράση των αντιμικροβιακών στα μικροβιακά κύτταρα χωρίς να δρουν στα κύτταρα του ξενιστή μακροοργανισμού.

γ) Αναστολή σύνθεσης πυρηνικών οξέων. Στην κατηγορία αυτή ανήκουν οι σουλφοναμίδες, η νοβοβοκίνη, η τριμεθοπρίμη, η ριφαμπικίνη και οι κινολόνες. Οι

αντιμικροβιακοί αυτοί παράγοντες παρεμβαίνουν σε κάποιο στάδιο της σύνθεσης των πυρηνικών οξέων αναστέλλοντας τη σύνθεσή τους.

δ) Αναστολή της λειτουργίας της κυτταρικής μεμβράνης. Στην κατηγορία αυτή ανήκουν η πολυμυξίνη Β, η αμφοτερικίνη Β, η πολυμυξίνη Ε (κολιστίνη), η νυστατίνη και η τυροσετίνη, τα οποία παρεμποδίζουν με διάφορους τρόπους τη λειτουργία της μικροβιακής κυτταρικής μεμβράνης. Διαταραχή της λειτουργίας της προκαλεί καταστροφή του μικροβιακού κυττάρου. Το γεγονός, ότι η δομή της μεμβράνης αυτής διαφέρει μεταξύ μικρό- και μακρο-οργανισμού αποτελεί τη βάση της επιλεκτικής δράσης των αντιμικροβιακών επί των διάφορων μικροβίων.

Ωστόσο, ανησυχία για την ανθρώπινη υγεία αποτελεί η ανάδυση πολυανθεκτικών στελεχών *Salmonella*, ιδιαίτερα του οροτύπου Typhimurium, γεγονός που προέκυψε από την εκλεκτική πίεση επιλογής, λόγω της κατάχρησης των αντιβιοτικών τις περασμένες δεκαετίες (van Duijkereen et al. 2002, Canton & Morosini 2011). Οι κτηνοτροφικές πρακτικές φέρουν μεγάλο μερίδιο ευθύνης σε αυτό, αφού η χορήγηση αντιμικροβιακών ουσιών γίνεται σε μεγαλύτερες ποσότητες στα παραγωγικά ζώα σε σχέση με τον άνθρωπο (Mellon et al. 2001). Το μέγεθος ανάπτυξης μικροβιακής αντοχής είναι ανάλογο της εκτεταμένης βακτηριακής έκθεσης στα αντιμικροβιακά, δηλαδή ανάλογο του συνολικού όγκου των χρησιμοποιούμενων αντιμικροβιακών, και επηρεάζεται από τους τρόπους χορήγησής τους (Canton & Morosini 2011). Αυτή η ανάπτυξη μικροβιακής αντοχής είναι αναπόφευκτη, αν λάβουμε υπ' όψη ότι οι ίδιες κατηγορίες «κλασικών» αντιμικροβιακών ουσιών κατά των σαλμονελλώσεων του ανθρώπου, όπως η αμικικιλίνη, τριμεθοπρίμη-σουλφομεθοξαζόλη, φλουκινολόνες και η τρίτης γενεάς κεφαλοσπορίνες, χορηγούνται συγχρόνως και στα ζώα (Joint FAO/OIE/WHO 2003). Συνεπώς, και σύμφωνα με το “Food and Drug Administration Guidance #213” (FDA 2013), η βελτίωση της διαχείρισης της χρήσης αντιμικροβιακών ουσιών στα παραγωγικά ζώα από τους κτηνιάτρους, ιδιαίτερα η μείωση της χορήγησης εκείνων που είναι «κρίσιμης σημασίας» για την ιατρική του ανθρώπου, καθώς και η εφαρμογή στρατηγικών διαχείρισης κινδύνου από τις αρχές, είναι σημαντικά βήματα προς τη μείωση της συχνότητας εμφάνισης ανθεκτικών στελεχών στις εκτροφές, διατηρώντας έτσι τα οφέλη των αντιμικροβιακών ουσιών για τον άνθρωπο.

Έτσι, η παρατηρούμενη πολυανθεκτικότητα σε διάφορες κατηγορίες αντιμικροβιακών ουσιών (AMR) των οροτύπων του γένους *Salmonella*, η οποία μπορεί να σχετίζεται με την αυξημένη λοιμογόνο δύναμη του στελέχους ή/και με την μικρή ανταπόκριση στην αγωγή, προκαλεί παγκόσμια ανησυχία, διότι υπονομεύεται η δυνατότητα αντιμετώπισης αντίστοιχων λοιμώξεων του ανθρώπου (Helms et al. 2005, Gebreyes et al. 2006, Boyen et al. 2008), ιδίως των ανοσοκατεσταλμένων ατόμων, καθιστώντας το κοινωνικοοικονομικό βάρος των σαλμονελλώσεων ιδιαίτερα μεγάλο.

Η εμφάνιση των πολυανθεκτικών στελεχών *Salmonella* συχνά είναι συνδεδεμένη με γενετικούς παράγοντες, οι οποίοι έχουν την ικανότητα να μεταφέρονται μεταξύ των βακτηριακών πληθυσμών, είτε μέσω γενετικής μετάλλαξης είτε μέσω μεταφοράς γονιδίων αντοχής από άλλα βακτήρια (Sefton 2002, Butaye et al. 2006). Στην περίπτωση γενετικής μετάλλαξης δημιουργείται μια αλλαγή στο βακτηριακό DNA, που έχει ως αποτέλεσμα το γενετικό υλικό να μπορεί να μεταφερθεί σε άλλα βακτήρια με τρόπους, όπως η σύζευξη (conjugation), η μεταμόρφωση (transformation) και η μεταγωγή (transduction) (Alanis 2005). Η εκδήλωση αντιβιοαντοχής των *Salmonella* spp. γίνεται μέσω μιας ποικιλίας μηχανισμών, στους οποίους περιλαμβάνονται α) η αδρανοποίηση των αντιμικροβιακών με παραγωγή υδρολυτικών ή τροποποιητικών ενζύμων, όπως οι β-λακταμάσες, β) η ελαττωμένη κυτταρική διαπερατότητα (ελαττωμένη διαπερατότητα του βακτηριακού τοιχώματος) στα αντιμικροβιακά, γ) η ενεργητική απέκκριση του αντιβιοτικού μέσω αντλιών ενεργητικής αποβολής (efflux pumps) και δ) η αλλαγή του βιολογικού στόχου δράσης (αλλαγή διαμόρφωσης των σημείων δράσης) του αντιμικροβιακού παράγοντα π.χ. πενικιλινοδεσμευτικές πρωτεΐνες – PBPs (Sefton 2002). Ειδικά η ικανότητα των *Salmonella* spp. να παράγουν β-λακταμάσες έχει αποδειχθεί ένας σημαντικός και κοινός μηχανισμός ανθεκτικότητας στις πενικιλίνες και κεφαλοσπορίνες, αιτία ανησυχίας όσον αφορά τη δημόσια υγεία (Revathi et al. 1998).

Έτσι, ο χοίρος έχει αναγνωριστεί ως μια πρωτογενής δεξαμενή πολυανθεκτικών βακτηρίων (Wedel 2005, EFSA & ECDC 2014) αυξημένης λοιμογόνου ικανότητας, τα οποία εισέχονται στην τροφική αλυσίδα, επιβαρύνοντας το κόστος στη βιομηχανία του χοίρου (Helms et al. 2005, Boyen et al. 2008, EFSA 2009).

### 1.2.5 Οικονομικές επιπτώσεις στη χοιροτροφία και στη Δημόσια Υγεία

Η σαλμονέλλωση αποτελεί μια από τις συχνότερα αναφερόμενες ζωοανθρωπονόσους παγκοσμίως, ειδικά κατά την τελευταία δεκαετία. Αυτό ίσως είναι το αποτέλεσμα της ύπαρξης εξελιγμένων συστημάτων παρακολούθησης και αναφοράς, αυξανόμενου ενδιαφέροντος και αφύπνισης των καταναλωτών για την ασφάλεια των τροφίμων, αλλαγής των διατροφικών συνηθειών των καταναλωτών, αλλά και της ευρείας διασποράς οροτύπων *Salmonella* spp. παθογόνων για τον άνθρωπο. Η έκθεση του ανθρώπου στο παθογόνο μέσω των χοιρινών προϊόντων σχετίζεται τόσο με την άμεση κατανάλωση χοιρινού κρέατος (ατελώς μαγειρεμένου), όσο και με την έμμεση, μέσω της διασταυρούμενης επιμόλυνσης άλλων τροφίμων που μπορεί να καταναλωθούν χωρίς περαιτέρω θερμική επεξεργασία.

Στις περιπτώσεις που αναφερόμαστε στις οικονομικές επιπτώσεις των σαλμονελλώσεων, θα πρέπει να λαμβάνονται υπ' όψην τόσο οι απώλειες στη βιομηχανία του χοίρου, όσο και το κόστος στην ανθρώπινη υγεία. Η κλινική νόσος στους χοίρους είναι σπάνια και ως εκ' τούτου, η μειωμένη παραγωγικότητά τους είναι κυρίως το αποτέλεσμα της υποκλινικής λοίμωξης. Μελέτες έδειξαν ότι η μόλυνση με *Salmonella* μειώνει σημαντικά την ημερήσια αύξηση βάρους και αυξάνει τον δείκτη μετατρεψιμότητας της τροφής (ΔΜΤ). Στη Δανία, η απώλεια βάρους αντιστοιχεί περίπου στα 3 kg ανά χοίρο (Lo Fo Wong & Hald 2000). Αυτές οι απώλειες υπολογίζονται σε χώρες με ποσοστά οροθετικότητας <10%, οι οποίες δηλαδή εφαρμόζουν αποτελεσματικά προγράμματα ελέγχου (Gorton et al. 2000, McNamara et al. 2003). Αντιστοίχως, σε κράτη χωρίς προγράμματα επιτήρησης και ελέγχου τα ποσοστά οροθετικότητας είναι υψηλότερα, επηρεάζοντας δυσμενώς την παραγωγικότητα και αυξάνοντας το κόστος θεραπείας. Έτσι, με βάση το δεδομένο ότι τα περιθώρια κέρδους στην παραγωγή χοίρου είναι περιορισμένα, ακόμη και οι υποκλινικές λοιμώξεις μπορεί να έχουν αξιοσημείωτες αρνητικές επιπτώσεις στα έσοδα της παραγωγής, ενώ διαιωνίζουν τη διασπορά του μικροοργανισμού στα ζώα και στο περιβάλλον της εκτροφής με τελικό αποτέλεσμα την κατάληξη παθογόνων οροτύπων στον καταναλωτή.

Σύμφωνα με τον WHO, οι σαλμονελλώσεις του ανθρώπου έχουν σημαντικό κόστος για την ανθρώπινη υγεία. Το κόστος στο δημόσιο τομέα περιλαμβάνει το κόστος

εξακρίβωσης των περιστατικών και τα έξοδα της θεραπείας. Το κοινωνικό κόστος περιλαμβάνει το κόστος της νόσου στο άτομο ξεχωριστά, τη μείωση της παραγωγικότητάς του, καθώς και τις επιπτώσεις στη βιομηχανία του χοίρου, στην περίπτωση που ένα συγκεκριμένο προϊόν συσχετιστεί με κρούσμα σαλμονελλώσεως (Socket 1991). Οι παγκόσμιες ανθρώπινες απώλειες λόγω των σαλμονελλώσεων, οι οποίες οφείλονται κυρίως στους οροτύπους Enteritidis και Typhimurium, υπολογίζονται στους 155.000 θανάτους ετησίως και στην πλειοψηφία τους αφορούν παιδιά ηλικίας κάτω των 4 ετών. Τα δε δηλωθέντα κλινικά περιστατικά είναι πιθανό να αντιπροσωπεύουν μόνο ένα πολύ μικρό ποσοστό του συνολικού αριθμού των ανθρωπίνων σαλμονελλώσεων. Στην ΕΕ παρατηρήθηκε μια μείωση των επιβεβαιωμένων ανθρωπίνων περιστατικών κατά τα τελευταία πέντε χρόνια συλλογής δεδομένων. Τα χρόνια αυτά τα υψηλότερα ποσοστά κοινοποίησης αφορούν την Τσεχοσλοβακία, Σλοβακία και Λιθουανία ( $\geq 70$  ανά 100.000) και τα μικρότερα την Πορτογαλία, Ελλάδα και Ρουμανία ( $\leq 5$  ανά 100.000), οι οποίες μάλιστα ανέφεραν τα υψηλότερα ποσοστά νοσηλείας ( $> 85\%$ ) (EFSA AND ECDC 2014a). Η συγκεκριμένη μείωση ήταν μεγαλύτερη μεταξύ των ετών 2008 και 2010, όπου ο αριθμός των κρουσμάτων έπεσε από 131.468 σε 99.020, λόγω της επιβολής των Ευρωπαϊκών Κανονισμών, ειδικά στην πτηνοτροφία (EFSA 2012a, EFSA 2014 AND ECDC 2014a).

Παρά τη μείωση, στην Ευρώπη ο χοίρος παραμένει σημαντική πηγή των ανθρωπίνων σαλμονελλώσεων, με συνολική εκτιμώμενη συμβολή 10-20%, ενώ σε μερικά κράτη είναι υπεύθυνος μέχρι και για το 56% αυτών των περιστατικών (EFSA 2012b, VLA 2010). Έτσι, το συνολικό κόστος των ανθρωπίνων περιστατικών και των απωλειών παραγωγικότητας των χοίρων υπολογίζεται περίπου στα 600 εκατατομμύρια ευρώ στην ΕΕ, εκ των οποίων περίπου 90 εκατατομμύρια ευρώ προκύπτουν από την απόσυρση επιμολυσμένων χοιρινών προϊόντων, ενώ οι δαπάνες στη δημόσια υγεία εκτιμώνται στα 86 εκατατομμύρια ευρώ ετησίως ή στα 600-800 ευρώ ανά ατομικό περιστατικό (Roberts et al. 2010, FCC 2010, 2011, Scharff 2012).

Το μέγεθος αυτών των υπολογισμών θέτει το θέμα της εφαρμογής αποτελεσματικών και παράλληλα οικονομικά προσιτών λύσεων για τη μείωση των ανωτέρω μεγεθών.



### 1.2.6 Μέτρα ελέγχου των *Salmonella* spp. στις εκτροφές χοίρου

Από τα ανωτέρω γίνεται προφανές ότι οι υποκλινικές λοιμώξεις του χοίρου που μπορούν να συμβούν κατά τα στάδια της μεταφοράς και σφαγής των ζώων συνιστούν κίνδυνο για τη Δημόσια Υγεία (Rowe et al. 2003). Τα κρούσματα των ανθρωπίνων σαλμονελλώσεων της τελευταίας εικοσαετίας έχουν ωθήσει πολλές χώρες στην προσπάθεια μείωσης του επιπολασμού των *Salmonella* spp. σε επίπεδο εκτροφής (όπως η Δανία, η Σουηδία, η Γερμανία και το Βέλγιο) (Mousing et al 1997, Nielsen et al. 2001, Osterkorn et al. 2001).

Κάθε κρίκος της τροφικής αλυσίδας έχει το δικό του μερίδιο ευθύνης στην πρόκληση αυτών των τροφολοιμώξεων (Davies et al. 1999). Συνεπώς, ο έλεγχος των *Salmonella* spp. για να είναι αποτελεσματικός πρέπει να γίνεται σε όλη την αλυσίδα παραγωγής του χοιρινού κρέατος, δηλαδή από την εκτροφή μέχρι το τραπέζι του καταναλωτή (SANCO 2010). Βέβαια, η εξάλειψη του προβλήματος στα πρώιμα στάδια της παραγωγής έχει βαρύνουσα σημασία και είναι ιδιαίτερα επιθυμητή, αφού αποβλέπει στη μείωση του κινδύνου εισαγωγής επιμολυσμένων χοίρων στο σφαγείο, άρα και στην αύξηση της αποτελεσματικότητας των μέτρων που λαμβάνονται εκεί. Πράγματι, σε χώρες όπου έχει εφαρμοστεί εθνικό πρόγραμμα επιτήρησης των *Salmonella* spp., ο αριθμός των ανθρωπίνων περιστατικών έχει μειωθεί σημαντικά (Mousing et al 1997, Anon. 2004). Στην ΕΕ τα Κράτη – Μέλη έχουν την υποχρέωση να καθιερώσουν αποτελεσματικά εθνικά προγράμματα, προσαρμοσμένα στις ιδιαιτερότητες κάθε χώρας (Anon. 2003, Anon. 2005). Βέβαια, λαμβάνοντας υπ' όψη ότι ο μικροοργανισμός είναι ευρέως διαδεδομένος στο περιβάλλον και ότι μπορεί να εισέλθει σε οποιοδήποτε σημείο της τροφικής αλυσίδας, είναι πρακτικά αδύνατο να επιτευχθεί μηδενική παρουσία του στην αλυσίδα παραγωγής χοιρινών. Εν τούτοις, είναι εφικτή μια πιστοποιημένη διαδικασία παραγωγής που να προστατεύει ικανοποιητικά τους καταναλωτές.

Για την προστασία του καταναλωτή, οι προσπάθειες ελέγχου των *Salmonella* spp. στις χοιρομονάδες πρέπει να είναι συνδυασμός στρατηγικών μείωσης του κινδύνου εισαγωγής, μεταφοράς και διασποράς του παθογόνου στη μονάδα, αλλά και ταυτόχρονα αύξησης της αντίστασης των ζώων στον μικροοργανισμό. Τα προγράμματα ελέγχου της *Salmonella* θα πρέπει να βασιστούν κυρίως σε αυστηρά μέτρα βιοασφάλειας (δίνοντας

ιδιαίτερη έμφαση στο επίπεδο μόλυνσης της ζωοτροφής) και υγιεινής της χοιρομονάδας. Ο έλεγχος σε αυτό το σημείο μπορεί να αποτελέσει βασικό μέρος των Ολοκληρωμένων Συστημάτων Ελέγχου Ποιότητας των χοιρινών (Integrated Quality Control-IQC Systems). Ο τελικός σκοπός αυτών των προγραμμάτων δεν είναι η εξάλειψη των *Salmonella* spp., αλλά η αποφυγή εισόδου του μικροοργανισμού στις εκτροφές που εφοδιάζουν την τροφική αλυσίδα. Συνοπτικά, ένα τέτοιο IQC σύστημα μεταξύ των άλλων πρέπει να συνίσταται από τα κάτωθι (Evangelopoulou et al. 2015a):

- Λήψη μέτρων **βιοασφάλειας**: αναζήτηση ζώων και ζωοτροφών από προμηθευτές των οποίων το επίπεδο *Salmonella* είναι γνωστό (μηδενικό ή πολύ χαμηλό), εφαρμογή υγειονομικών κανόνων εργασίας από το προσωπικό, παροχή ευκολιών υγιεινής σε αυτό, λήψη μέτρων διαχείρισης των άρρωστων ζώων κ.ά.
- Συστήματα διαχείρισης: **σύστημα «όλα μέσα-όλα έξω» (All-in All-out systems)**, μέγεθος της εκτροφής, τύπος δαπέδου, πυκνότητα του ζωικού κεφαλαίου της περιοχής.
- Τύπος **Ζωοτροφής**: χοντροαλεσμένη έναντι συμπήκτων, οξυνοποίηση (π.χ. προσθήκη ορού γάλακτος), γεύμα σε υγρή μορφή (υγρά σίτιση).
- **Εμβολισμός** χοιρομητέρων.
- **Ανταγωνιστικός αποκλεισμός**.

Από όλα τα ανωτέρω γίνεται ξεκάθαρο, ότι κάθε παρέμβαση σε επίπεδο εκτροφής θα πρέπει να είναι προσαρμοσμένη και να ταιριάζει στις ιδιαιτερότητές της. Μεμονωμένα και αποσπασματικά μέτρα δεν επαρκούν για να απομακρύνουν ή και να μειώσουν την εισαγωγή και την παρουσία των *Salmonella* spp. σε μια χοιρομονάδα. Για τον λόγο αυτό συνίσταται η οργάνωση τακτικών ελέγχων και παρεμβάσεων που να βασίζονται στον συνδυασμό πρακτικών και οικονομικά εφικτών μέτρων. Μιας και κάθε χοιρομονάδα έχει τα δικά της αδύναμα σημεία, όσον αφορά την εισαγωγή και διάδοση των *Salmonella* spp., δεν συνίσταται η επιβολή σταθερών παρεμβάσεων. Σε πρώτη φάση μια προσέγγιση, όμοια με το HACCP, με καθορισμένα όρια, όπου κάθε μονάδα θα μπορεί να επικεντρωθεί στις αδυναμίες της, είναι περισσότερο «οικονομικο-αποτελεσματική» και ικανή να επιτύχει μεγαλύτερο επίπεδο ασφάλειας. Ωστόσο, βασική προϋπόθεση επιτυχίας της υλοποίησης των ανωτέρω, είναι η εκπαίδευση των

χοιροτρόφων στην κατανόηση της σπουδαιότητας εφαρμογής αυτών των μέτρων, που θα έχει ως τελικό αποτέλεσμα την αύξηση της ανταγωνιστικότητας των προϊόντων τους.

Οι υποενότητες 1.2.1, 1.2.2, 1.2.5 και 1.2.6 περιγράφονται αναλυτικά στις εργασίες:

1. Ευαγγελοπούλου Γ.Δ., Γκόβαρης Α., Κρήτας Σ., Μπουριέλ Α. **Εκτροφή χοίρων απαλλαγμένων από *Salmonella* spp.**

(Πανελλήνιο Συνέδριο Κρέατος MEAT DAYS 2012- Το Κρέας και τα Προϊόντα του «Από το στάβλο στο Πιάτο». Αθήνα 29, 30 Σεπτεμβρίου- 1 Οκτωβρίου 2012). Σελ 135-147.

2. Evangelopoulou G, Kritas S, Christodoulopoulos G, Burriel AR. 2015. **The commercial impact of pig *Salmonella* spp. infections in border-free markets during an economic recession.** Veterinary World 8(3), 257-272.

## Εκτροφή χοίρων απαλλαγμένων από *Salmonella* spp.

Γ.Δ. Ευαγγελοπούλου<sup>1</sup>, Α. Γκόβαρης<sup>2</sup>, Σ. Κρήτας<sup>3</sup>, Α. Μπουριέλ<sup>4</sup>

<sup>1</sup>Υποψήφια Διδάκτωρ, Εργαστήριο Μικροβιολογίας και Παρασιτολογίας, Τμήμα Κτηνιατρικής, Σχολή Επιστημών Υγείας, Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας, Τρικάλων 224, 431 00 Καρδίτσα, E-mail:matinavet@hotmail.com

<sup>2</sup>Αναπληρωτής Καθηγητής, Εργαστήριο Υγιεινής Τροφίμων Ζωικής Προέλευσης, Τμήμα Κτηνιατρικής, Σχολή Επιστημών Υγείας, Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας, Τρικάλων 224, 431 00 Καρδίτσα

<sup>3</sup>Αναπληρωτής Καθηγητής, Εργαστήριο Μικροβιολογίας και Λοιμωδών Νοσημάτων, Κτηνιατρική Σχολή Α.Π.Θ., 541 24 Θεσσαλονίκη

<sup>4</sup>Καθηγήτρια, Εργαστήριο Μικροβιολογίας και Παρασιτολογίας, Τμήμα Κτηνιατρικής, Σχολή Επιστημών Υγείας, Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας, Τρικάλων 224, 431 00 Καρδίτσα

**Περίληψη:** Τα είδη του γένους *Salmonella* είναι παθογόνοι μικροοργανισμοί ικανοί να προσβάλλουν τα περισσότερα σπονδυλωτά. Οι λοιμώξεις του ανθρώπου και των ζώων, που οφείλονται σε είδη του γένους *Salmonella* εξακολουθούν να αποτελούν ένα σοβαρό παγκόσμιο πρόβλημα, λόγω του άμεσου οικονομικού κόστους, που προκύπτει από τα ποσοστά θνησιμότητας και θνητότητας, καθώς και των ανυπολόγιστων απωλειών σε ζωοκομικά προϊόντα. Σύμφωνα με τις εκτιμήσεις της Ευρωπαϊκής Αρχής Ασφάλειας των Τροφίμων (European Food Safety Authority-EFSA) οι χοίροι και το χοιρινό κρέας ευθύνονται για το 10-20% των ανθρωπίνων σαλμονελλώσεων στην ΕΕ. Οι υποκλινικά μολυσμένοι χοίροι, συνιστούν την κυριότερη πηγή εισόδου των *Salmonella* spp. στην τροφική αλυσίδα, ενώ παράλληλα διασπείρουν με τα κόπρανά τους τον μικροοργανισμό στο περιβάλλον, επιμολύνοντας τα μη προσβεβλημένα ζώα. Συνεπώς, ο έλεγχος των *Salmonella* spp. θα πρέπει να επικεντρωθεί σε αυτά τα ζώα. Κανένα μεμονωμένο και αποσπασματικό μέτρο δεν μπορεί να εγγυηθεί τον απόλυτο έλεγχο, αλλά μια σειρά παρεμβάσεων, η εφαρμογή των οποίων στην πράξη θα ενέχει πολλές προκλήσεις. Δια τούτο, απαιτείται η αναθεώρηση και ο εκσυγχρονισμός των προγραμμάτων ελέγχου. Παράλληλα, οι παραγωγοί θα πρέπει να εφαρμόσουν μακροπρόθεσμες και οικονομικο-αποτελεσματικές παρεμβάσεις, προσαρμοσμένες στις ιδιαιτερότητες των μονάδων τους. Η βιομηχανία του χοίρου οφείλει να κατανοήσει ότι η μείωση του επιπολασμού των *Salmonella* spp. θα έχει σημαντική θετική επίπτωση σε ολόκληρη την αλυσίδα παραγωγής χοιρινού κρέατος (παραγωγός, σφαγείο, σημεία μεταποίησης-πώλησης, καταναλωτής), οδηγώντας τελικά στην ισχυροποίηση της θέσης του χοιρινού κρέατος και των προϊόντων του στην αγορά. Αναμφίβολα, το εγχείρημα ανάπτυξης στρατηγικών ικανών να ελέγξουν την εξάπλωση των *Salmonella* spp. είναι επίπονο και χρονοβόρο και εξαρτάται από την καταβαλόμενη προσπάθεια και την ευσυνειδησία των εμπλεκόμενων κάθε σταδίου.

**Λέξεις ευρετηρίασης:** *Salmonella*, χοίρος, κίνδυνος, μέτρα πρόληψης-ελέγχου



## ΕΙΣΑΓΩΓΗ

Το γένος *Salmonella* είναι ένα από τα πιο παθογόνα μέλη της οικογένειας των Εντεροβακτηριοειδών για τον άνθρωπο και τα ζώα. Πολλοί ορότυποι αυτού του γένους ευθύνονται για την πρόκληση του τυφοειδούς πυρετού και της οξείας διαρροϊκής νόσου του ανθρώπου, ενώ στα ζώα προκαλούν διάφορα συμπτώματα, που ποικίλουν ανάμεσα στην υποκλινική και την οξεία κλινική εντερική νόσο (Acheson and Keusch 1997, Kyhns 2010). Διάφορες επιδημιολογικές μελέτες έχουν αναγνωρίσει το χοίρο και τα προϊόντα του ως πηγή σαλμονελλώσεων του ανθρώπου με σοβαρές επιπτώσεις στη Δημόσια Υγεία και παράλληλα υψηλό κοινωνικό κόστος (Murase et al. 2000, Deïrepech et al. 1998, Lo Fo Wong et al. 2002). Στην ΕΕ η σαλμονελλώση αποτελεί τη δεύτερη σε συχνότητα εμφάνισης ζωοανθρωπονόσο (μετά την καμπυλοβακτηριδίαση) με τους οροτύπους *Salmonella* Enteritidis και *Salmonella* Typhimurium να σχετίζονται συχνότερα με αυτή (Anon 2010a, Galanis et al 2006). Ο Παγκόσμιος Οργανισμός Υγείας (World Health Organization-WHO) (WHO 1993), η ΕΕ (EC-2160/2003), οι εθνικές αρχές και η βιομηχανία του χοίρου δείχνουν αυξανόμενο ενδιαφέρον για τα επίπεδα *Salmonella* στο χοίρειο πληθυσμό, συμβαδίζοντας με την επιθυμία των καταναλωτών για ένα υγιεινοοικονομικά ασφαλές προϊόν.

Οι υποκλινικές λοιμώξεις του χοίρου συνιστούν κίνδυνο για την Δημόσια Υγεία λόγω των επιμολύνσεων που μπορούν να συμβούν κατά τα στάδια της μεταφοράς και σφαγής των ζώων (Rowe et al. 2003). Η Ευρωπαϊκή Αρχή Ασφάλειας των Τροφίμων (European Food Safety Authority-EFSA) έχει υπολογίσει τους κινδύνους για την Δημόσια Υγεία από τις σαλμονελλώσεις του χοίρου και τα αποτελέσματα των πιθανών μέτρων ελέγχου. Σύμφωνα με αυτές τις εκτιμήσεις οι χοίροι και το χοιρινό κρέας ευθύνονται για το 10-20% όλων των ανθρωπίνων σαλμονελλώσεων στην ΕΕ (Anon. 2010b), ενώ τα ετήσια περιστατικά των τροφολοιμώξεων από τα *Salmonella* spp. ανέρχονται στα 80,3 εκατ παγκοσμίως (Majowicz et al. 2010). Τα κρούσματα των ανθρωπίνων σαλμονελλώσεων της τελευταίας εικοσαετίας έχουν ωθήσει πολλές χώρες στην προσπάθεια μείωσης του επιπολασμού των *Salmonella* spp. σε επίπεδο εκτροφής (όπως η Δανία, η Σουηδία, η Γερμανία και το Βέλγιο) (Mousing et al 1997).

Κάθε κρίκος της τροφικής αλυσίδας έχει το δικό του μερίδιο ευθύνης στην πρόκληση των τροφολοι-

μώξεων (Davies et al. 1999). Συνεπώς, ο έλεγχος των *Salmonella* spp. για να είναι αποτελεσματικός πρέπει να γίνεται σε όλη την αλυσίδα παραγωγής του χοιρινού κρέατος, δηλαδή από την εκτροφή μέχρι το τραπέζι του καταναλωτή (SANCO 2010). Βέβαια, η εξάλειψη του προβλήματος στα πρώιμα στάδια της παραγωγής έχει βαρύνουσα σημασία και είναι ιδιαίτερα επιθυμητή, αφού αποβλέπει στη μείωση του κινδύνου εισαγωγής επιμολυσμένων χοίρων στο σφαγείο. Πράγματι, σε χώρες όπου έχει εφαρμοστεί εθνικό πρόγραμμα επιτήρησης των *Salmonella* spp. (Mousing et al 1997), ο αριθμός των ανθρωπίνων περιστατικών έχει μειωθεί σημαντικά (Anon. 2004). Στην ΕΕ τα Κράτη - Μέλη έχουν την υποχρέωση να καθιερώσουν αποτελεσματικά εθνικά προγράμματα, προσαρμοσμένα στις ιδιαιτερότητες κάθε χώρας (Anon. 2003, Anon. 2005). Βέβαια, η ανάπτυξη στρατηγικών ικανών να ελέγξουν την εξάπλωση των *Salmonella* spp. προσαπαιτεί πρωτίστως την συνεργασία σε παγκόσμιο επίπεδο, καθώς και την γνώση βασικών επιδημιολογικών δεδομένων, όπως τις πηγές προέλευσης, τον επιπολασμό και την κατανομή των παθογόνων μικροοργανισμών στα ζώα και στις παραγωγικές μονάδες.

Μέχρι τώρα η προσοχή είχε επικεντρωθεί στην πτηνοτροφία. Σήμερα, η ανάγκη ελέγχου των σαλμονελλώσεων του χοίρου επιβάλλεται όλο και περισσότερο (Anon. 2010b).

## ΕΠΙΔΗΜΙΟΛΟΓΙΑ ΤΩΝ *Salmonella* spp.- ΠΑΡΑΓΟΝΤΕΣ ΚΙΝΔΥΝΟΥ ΣΤΗΝ ΕΚΤΡΟΦΗ

Η *Salmonella* μπορεί να εισέλθει σε οποιοδήποτε σημείο της τροφικής αλυσίδας, δηλαδή στη ζωοτροφή και στην χοιρομονάδα, κατά τη μεταφορά και παραμονή στο σφαγείο, κατά τη διαδικασία της σφαγής, στις μονάδες επεξεργασίας και στα σημεία πώλησης του κρέατος, καθώς και στους χώρους μαζικής εστίασης, αλλά και κατά την οικιακή προετοιμασία του φαγητού (Boyen et al. 2008). Έτσι, μια από τις μεγαλύτερες προκλήσεις είναι η σχεδίαση και η εφαρμογή προγραμμάτων επιτήρησης και ελέγχου. Για να υλοποιηθούν αυτά τα προγράμματα, απαραίτητη προϋπόθεση είναι η γνώση της σχέσης των παραγόντων κινδύνου με την εμφάνιση των σαλμονελλώσεων, αλλά και η κατανόηση της δυναμικής των μολύνσεων των χοιροτροφικών μονάδων που προμηθεύουν τα σφαγεία.

Τα *Salmonella* spp. εισάγονται στον ξενιστή-χοίρο κυρίως δια μέσω της πεπτικής οδού, ως αποτέλεσμα



## ΕΙΣΑΓΩΓΗ

Το γένος *Salmonella* είναι ένα από τα πιο παθογόνα μέλη της οικογένειας των Εντεροβακτηριοειδών για τον άνθρωπο και τα ζώα. Πολλοί ορότυποι αυτού του γένους ευθύνονται για την πρόκληση του τυφοειδούς πυρετού και της οξείας διαρροϊκής νόσου του ανθρώπου, ενώ στα ζώα προκαλούν διάφορα συμπτώματα, που ποικίλουν ανάμεσα στην υποκλινική και την οξεία κλινική εντερική νόσο (Acheson and Keusch 1997, Kyhns 2010). Διάφορες επιδημιολογικές μελέτες έχουν αναγνωρίσει το χοίρο και τα προϊόντα του ως πηγή σαλμονελλώσεων του ανθρώπου με σοβαρές επιπτώσεις στη Δημόσια Υγεία και παράλληλα υψηλό κοινωνικό κόστος (Murase et al. 2000, Deïrepech et al. 1998, Lo Fo Wong et al. 2002). Στην ΕΕ η σαλμονελλώση αποτελεί τη δεύτερη σε συχνότητα εμφάνισης ζωοανθρωπονόσο (μετά την καμπυλοβακτηριδίαση) με τους ορότυπους *Salmonella* Enteritidis και *Salmonella* Typhimurium να σχετίζονται συχνότερα με αυτή (Anon 2010a, Galanis et al 2006). Ο Παγκόσμιος Οργανισμός Υγείας (World Health Organization-WHO) (WHO 1993), η ΕΕ (EC-2160/2003), οι εθνικές αρχές και η βιομηχανία του χοίρου δείχνουν αυξανόμενο ενδιαφέρον για τα επίπεδα *Salmonella* στο χοίρειο πληθυσμό, συμβαδίζοντας με την επιθυμία των καταναλωτών για ένα υγιεινοοικονομικά ασφαλές προϊόν.

Οι υποκλινικές λοιμώξεις του χοίρου συνιστούν κίνδυνο για την Δημόσια Υγεία λόγω των επιμολύνσεων που μπορούν να συμβούν κατά τα στάδια της μεταφοράς και σφαγής των ζώων (Rowe et al. 2003). Η Ευρωπαϊκή Αρχή Ασφάλειας των Τροφίμων (European Food Safety Authority-EFSA) έχει υπολογίσει τους κινδύνους για την Δημόσια Υγεία από τις σαλμονελλώσεις του χοίρου και τα αποτελέσματα των πιθανών μέτρων ελέγχου. Σύμφωνα με αυτές τις εκτιμήσεις οι χοίροι και το χοιρινό κρέας ευθύνονται για το 10-20% όλων των ανθρωπίνων σαλμονελλώσεων στην ΕΕ (Anon. 2010b), ενώ τα ετήσια περιστατικά των τροφολοιμώξεων από τα *Salmonella* spp. ανέρχονται στα 80,3 εκατ παγκοσμίως (Majowicz et al. 2010). Τα κρούσματα των ανθρωπίνων σαλμονελλώσεων της τελευταίας εικοσαετίας έχουν ωθήσει πολλές χώρες στην προσπάθεια μείωσης του επιπολασμού των *Salmonella* spp. σε επίπεδο εκτροφής (όπως η Δανία, η Σουηδία, η Γερμανία και το Βέλγιο) (Mousing et al 1997).

Κάθε κρίκος της τροφικής αλυσίδας έχει το δικό του μερίδιο ευθύνης στην πρόκληση των τροφολοι-

μώξεων (Davies et al. 1999). Συνεπώς, ο έλεγχος των *Salmonella* spp. για να είναι αποτελεσματικός πρέπει να γίνεται σε όλη την αλυσίδα παραγωγής του χοιρινού κρέατος, δηλαδή από την εκτροφή μέχρι το τραπέζι του καταναλωτή (SANCO 2010). Βέβαια, η εξάλειψη του προβλήματος στα πρώιμα στάδια της παραγωγής έχει βαρύνουσα σημασία και είναι ιδιαίτερα επιθυμητή, αφού αποβλέπει στη μείωση του κινδύνου εισαγωγής επιμολυσμένων χοίρων στο σφαγείο. Πράγματι, σε χώρες όπου έχει εφαρμοστεί εθνικό πρόγραμμα επιτήρησης των *Salmonella* spp. (Mousing et al 1997), ο αριθμός των ανθρωπίνων περιστατικών έχει μειωθεί σημαντικά (Anon. 2004). Στην ΕΕ τα Κράτη - Μέλη έχουν την υποχρέωση να καθιερώσουν αποτελεσματικά εθνικά προγράμματα, προσαρμοσμένα στις ιδιαιτερότητες κάθε χώρας (Anon. 2003, Anon. 2005). Βέβαια, η ανάπτυξη στρατηγικών ικανών να ελέγξουν την εξάπλωση των *Salmonella* spp. προσαπαιτεί πρωτίστως την συνεργασία σε παγκόσμιο επίπεδο, καθώς και την γνώση βασικών επιδημιολογικών δεδομένων, όπως τις πηγές προέλευσης, τον επιπολασμό και την κατανομή των παθογόνων μικροοργανισμών στα ζώα και στις παραγωγικές μονάδες.

Μέχρι τώρα η προσοχή είχε επικεντρωθεί στην πτηνοτροφία. Σήμερα, η ανάγκη ελέγχου των σαλμονελλώσεων του χοίρου επιβάλλεται όλο και περισσότερο (Anon. 2010b).

## ΕΠΙΔΗΜΙΟΛΟΓΙΑ ΤΩΝ *Salmonella* spp.- ΠΑΡΑΓΟΝΤΕΣ ΚΙΝΔΥΝΟΥ ΣΤΗΝ ΕΚΤΡΟΦΗ

Η *Salmonella* μπορεί να εισέλθει σε οποιοδήποτε σημείο της τροφικής αλυσίδας, δηλαδή στη ζωοτροφή και στην χοιρομονάδα, κατά τη μεταφορά και παραμονή στο σφαγείο, κατά τη διαδικασία της σφαγής, στις μονάδες επεξεργασίας και στα σημεία πώλησης του κρέατος, καθώς και στους χώρους μαζικής εστίασης, αλλά και κατά την οικιακή προετοιμασία του φαγητού (Boyen et al. 2008). Έτσι, μια από τις μεγαλύτερες προκλήσεις είναι η σχεδίαση και η εφαρμογή προγραμμάτων επιτήρησης και ελέγχου. Για να υλοποιηθούν αυτά τα προγράμματα, απαραίτητη προϋπόθεση είναι η γνώση της σχέσης των παραγόντων κινδύνου με την εμφάνιση των σαλμονελλώσεων, αλλά και η κατανόηση της δυναμικής των μολύνσεων των χοιροτροφικών μονάδων που προμηθεύουν τα σφαγεία.

Τα *Salmonella* spp. εισάγονται στον ξενιστή-χοίρο κυρίως δια μέσω της πεπτικής οδού, ως αποτέλεσμα

- την διάδοσή του ανάμεσα στους χοίρους και
- την ικανότητα επιβίωσης και πολλαπλασιασμού του σε κάθε ζώο ξεχωριστά.

Ο αριθμός των δυναμικών πηγών μόλυνσης μιας εκτροφής με *Salmonella* spp. είναι σχεδόν ατελείωτος. Ένας μεγάλος αριθμός συντελεστών, που έχουν μελετηθεί σε επιδημιολογικές έρευνες, περιλαμβάνονται σε αυτούς τους παράγοντες, όπως: ο τύπος της ζωοτροφής, η χρήση αντιβιοτικών, οι σύγχρονες λοιμώξεις, το μέγεθος του ζωικού κεφαλαίου, οι πρακτικές υγιεινής, ο τύπος του δαπέδου, η επαφή των χοίρων, ο αριθμός των προμηθευτών χοίρων, η παρουσία τρωκτικών, η περίοδος πάχυνσης κ.ά.

Ο Stegea et al (2001) συνόψισε τους παράγοντες κινδύνου ως εξής (Πίνακας 1):

1. Οι κλειστές εκτροφές, οι οποίες έχουν την ελάχιστη δυνατή επαφή με εξωτερικούς παράγοντες, παρουσιάζουν μειωμένο κίνδυνο εισαγωγής των *Salmonella* spp. μέσω των ζώων, των ανθρώπων και των αντικειμένων.
2. Η μετακίνηση και η ανάμειξη ζώων αυξάνει την διασπορά των *Salmonella* spp. στις μολυσμένες εκτροφές.
3. Το σύστημα διατροφής σχετίζεται με τον επιπολασμό των *Salmonella* spp. Η αγορασμένη ξηρά τροφή σε μορφή συμπήκτων αυξάνει την συχνότητα απομόνωσης των *Salmonella* spp. στις μολυσμένες εκτροφές.
4. Η αύξηση του μεγέθους της εκτροφής αυξάνει τον επιπολασμό των *Salmonella* spp.
5. Τα διαχωριστικά μεταξύ των κελιών, ο τύπος του δαπέδου και οι διαδικασίες καθαρισμού-εξυγίανσης σχετίζονται την παρουσία των *Salmonella* spp.
6. Η χορήγηση αντιβιοτικών (συμπεριλαμβανομένων και των αυξητικών παραγόντων) συνδέεται με την συχνότητα εμφάνισης των *Salmonella* spp.

#### ΠΑΡΑΓΟΝΤΕΣ ΠΟΥ ΚΑΘΟΡΙΖΟΥΝ ΤΗΝ ΕΞΥΓΙΑΝΣΗ ΤΩΝ ΜΟΝΑΔΩΝ

Όταν αναφερόμαστε στο θέμα ελέγχου της *Salmonella* στην παραγωγή χοίρου, δεν υπάρχει χρυσός κανόνας. Κάθε χοιρομονάδα παρουσιάζει τα δικά της ιδιαίτερα προβλήματα. Λαμβάνοντας υπ' όψην ότι ο μικροοργανισμός είναι "πανταχού παρόν" στο περιβάλλον και ότι μπορεί να εισέλθει σε οποιοδήποτε σημείο της τροφικής αλυσίδας, συμπεραίνουμε ότι είναι πρακτικά αδύνατο να επιτύχουμε και να διατηρήσουμε μηδε-

νικό επιπολασμό σε ολόκληρη την αλυσίδα παραγωγής χοιρινών. Εν τούτοις, είναι εφικτή μια πιστοποιημένη διαδικασία παραγωγής που να ικανοποιεί τις απαιτήσεις των καταναλωτών σχετικά με την παρουσία της *Salmonella* στα χοιρινά προϊόντα. Για το λόγο αυτό, έχουν μελετηθεί πολλές στρατηγικές μείωσης του επιπολασμού του μικροοργανισμού, καθώς και πολλά πειστικά σενάρια βελτίωσης της ασφάλειας των τροφίμων, αναφορικά με αυτόν. Όλα τα παραπάνω καταλήγουν στο συμπέρασμα: αποτελεσματικός έλεγχος που οδηγεί σε ικανοποιητική μείωση της παρουσίας του μικροοργανισμού στο τελικό προϊόν, απαιτεί τη συμμετοχή ολόκληρης της αλυσίδας παραγωγής, περιλαμβάνοντας συνδυασμό μέτρων από την χοιρομονάδα μέχρι το τραπέζι του καταναλωτή (Lammerding and Fazil 2000).

Το 1980 ο WHO διατύπωσε τρεις γραμμές άμυνας ενάντια στα *Salmonella* spp., οι οποίες ακόμα και σήμερα συνιστούν ισχυρές στρατηγικές προσέγγισης στην άμβλυση του κινδύνου (WHO 1980):

1. Η πρώτη προσέγγιση επικεντρώνεται στον έλεγχο της *Salmonella* στα παραγωγικά ζώα (pre-harvest control).
2. Η δεύτερη προσέγγιση αναφέρεται στη βελτίωση της υγιεινής κατά τη διαδικασία της σφαγής και κατά την περαιτέρω επεξεργασία του κρέατος (harvest control).
3. Η τρίτη προσέγγιση στοχεύει στην τελική παρασκευή του τροφίμου, μέσω της εκπαίδευσης της βιομηχανίας τροφίμων και των καταναλωτών σχετικά με τις ορθές πρακτικές υγιεινής (post-harvest control).

Η παρούσα ανασκόπηση επικεντρώνεται στα μέτρα ελέγχου και πρόληψης που μπορούν να ληφθούν σε επίπεδο εκτροφής.

#### Έλεγχος στην εκτροφή (pre-harvest control)

Οι προσπάθειες ελέγχου των *Salmonella* spp. στις χοιρομονάδες πρέπει να είναι συνδυασμός στρατηγικών μείωσης του κινδύνου εισαγωγής, μεταφοράς και διασποράς στην μονάδα, αλλά και ταυτόχρονα αύξησης της αντίστασης των ζώων στον μικροοργανισμό. Ο έλεγχος σε αυτό το σημείο μπορεί να αποτελέσει βασικό μέρος των Ολοκληρωμένων Συστημάτων Ελέγχου Ποιότητας των χοιρινών (Integrated Quality Control-IQC Systems). Ο τελικός σκοπός αυτών των προγραμμάτων δεν είναι η εξάλειψη των *Salmonella* spp.. Ο



Πίνακας 2: Μια σύνοψη για τον έλεγχο της Salmonella (MAFF 2000)		
<b>Σημείο ελέγχου Χοιρομονάδα</b>	<b>Αποφυγή εισόδου</b> Για τις νεοσύστατες μονάδες-μακριά από άλλες χοιρομονάδες (κυρίως) Συχνή καθαριότητα-απολύμανση και τάξη Περιμετρικός φράχτης Παροχή δυνατοτήτων ατομικής υγιεινής Ποδόλουτρα	<b>Έλεγχος της εξάπλωσης</b> Καθαριότητα και τάξη Συχνή απολύμανση Παροχή δυνατοτήτων ατομικής υγιεινής
<b>Ζωικό κεφάλαιο</b>	Εισαγωγή προγράμματος ελέγχου των των Salmonella spp. Εφαρμογή του συστήματος All-in All-out	Εφαρμογή του συστήματος All-in All-out Διαχωρισμός ομάδων Απομόνωση άρρωστων ζώων/ μολυσμένων ομάδων
<b>Προσωπικό</b>	Αγορά ζώων από αξιόπιστη πηγή Απομόνωση των νεοεισαχθέντων ζώων Εκπαίδευση και ενημέρωση Φύλαξη των ρούχων εργασίας σε ειδικό κτίριο Τακτικό πλύσιμο και απολύμανση των ρούχων εργασίας	Φύλαξη των ρούχων εργασίας σε ειδικό κτίριο Τακτικό πλύσιμο και απολύμανση των ρούχων εργασίας
<b>Έλεγχος επιβλαβών ζώων</b>	Αποτελεσματικό πρόγραμμα ελέγχου	Επιβεβαίωση της αποτελεσματικότητας των ελέγχων. Παροχή καθαρής προστατευτικής στολής
<b>Επισκέπτες</b>	Περιορισμός εισερχομένων Βιβλίο επισκεπτών Παροχή καθαρής προστατευτικής στολής	
<b>Ζωοτροφή</b>	Αξιόπιστη πηγή/ελεγμένη για Salmonella Ασφαλής-καθαρή αποθήκευση μακριά από τους χοίρους Ανάμειξη/παρασκευή ζωοτροφών μακριά από τους χοίρους	Έλεγχος για σημάδια επιμόλυνσης Έλεγχος για την ασφάλεια των αποθιγίων
<b>Νερό</b>	Αστικό δίκτυο ή ελεγμένη πηγή	Έλεγχος για σημάδια επιμόλυνσης Κλειστό σύστημα ύδρευσης
<b>Ζωικά απόβλητα</b>	Προσεκτική απόρριψη μακριά από την εκτροφή	Αποθήκευση των αποβλήτων τουλάχιστον για 4 εβδομάδες Διανομή της κόπρου σε καλλιεργήσιμες εκτάσεις, αλλά όχι κοντά στη συγκομιδή
<b>Εξοπλισμός</b>	Αποφυγή δανεισμού εξοπλισμού Τακτικός καθαρισμός και απολύμανση	Καθαρισμός μεταξύ των τομέων της εκτροφής Τακτικός καθαρισμός και απολύμανση

στόχος είναι να εμποδίσουμε τον μικροοργανισμό να εισαχθεί στις εκτροφές που εφοδιάζουν την τροφική αλυσίδα (Blaaha 2000). Ένα τέτοιο IQC σύστημα πρέπει να περιλαμβάνει:

### Βιοασφάλεια

“Τα μέτρα που λαμβάνονται για την προστασία ενός βιολογικού συστήματος από την προσβολή εν δυνάμει παθογόνων μικροοργανισμών, οι οποίοι μπορεί να μειώσουν το επίπεδο της υγείας του ανθρώπου και των ζώων” (Hardy 2002).

Οι εκτροφές δεν είναι κλειστά συστήματα, αλλά υποβάλλονται συνεχώς στην εισαγωγή ζωοτροφών και

νέου ζωικού κεφαλαίου, με άμεσο κίνδυνο την εισαγωγή και την μεταφορά του μικροοργανισμού στις χοιρομονάδες. Για πολλές χοιρομονάδες ο έλεγχος της οριζόντιας μετάδοσης της μόλυνσης αποτελεί “Συμπίφειο έργο”. Η βιοασφάλεια παίζει καθοριστικό ρόλο στη διαδικασία ελέγχου. Ξεκινώντας από το ζωικό κεφάλαιο, ο στόχος πρέπει να είναι η αναζήτηση ζώων και ζωοτροφών από προμηθευτές των οποίων το επίπεδο Salmonella είναι γνωστό, και είναι είτε μηδενικό, είτε πολύ χαμηλό (Blanchard and Burch 2008). Η διατροφή των χοίρων με ζωοτροφές ελεύθερες Salmonella μπορεί να οδηγήσει σε μείωση του επιπολασμού της κατά 10-20% σε Κράτη-Μέλη με υψηλό επιπολασμό,



και κατά 60-70% σε Κράτη-Μέλη με χαμηλό επιπολασμό (Gill and Bryant 1993). Επιπρόσθετα, ο αριθμός των προμηθευτών πρέπει να περιορίζεται στο ελάχιστο δυνατό (<3) (Lo Fo Wong et al. 2002). Τα μέτρα ελέγχου (Πίνακας 2) περιλαμβάνουν την αλλαγή ρουχισμού και υποδημάτων από τους επισκέπτες, ποδόλουτρα ενεργών απολυμαντικών έξω από τους θαλάμους εκτροφής, περιορισμό στην είσοδο επισκεπτών και οχημάτων, προγράμματα μυοκτονίας, απεντόμωσης και ελέγχου άγριων ζώων και πτηνών, καθώς και την απομάκρυνση των κατοικίδιων ζώων (γάτες-σκύλοι) από τους θαλάμους εκτροφής (Wray 2001). Επιπλέον, επιβάλλεται η ύπαρξη ψηλών διαχωρισμάτων μεταξύ των κελιών, η λήψη μέτρων διαχείρισης των άρρωστων ζώων και η παροχή ευκολιών υγιεινής του προσωπικού, όπως υγιεινομικές εγκαταστάσεις για το πλύσιμο των χεριών και την αλλαγή ρουχισμού και υποδημάτων (Lo Fo Wong et al. 2002). Το μέγεθος της εκτροφής, αλλά και η πυκνότητα του ζωικού κεφαλαίου μιας περιοχής επηρεάζουν αρνητικά το επίπεδο μιας εκτροφής στα *Salmonella* spp., πιθανώς προδιαθέτοντας την διασπορά του μικροοργανισμού εντός και μεταξύ των χοιρομονάδων (Wray 2001). Βασική προϋπόθεση επιτυχίας της υλοποίησης των ανωτέρω, είναι η εκπαίδευση του προσωπικού στην κατανόηση των μέτρων της βιοασφάλειας, η οποία προστατεύει την εκτροφή τόσο από την εξωτερική είσοδο των παθογόνων μικροοργανισμών, όσο και από την εσωτερική διασπορά εντός της εκτροφής.

Τελικά, η βιοασφάλεια ενισχύει την αποδοτικότητα των ζώων (βελτίωση της ημερήσιας αύξησης βάρους και του ΔΜΤ), ελαχιστοποιεί την εμφάνιση νόσου, μειώνει τις δαπάνες ιατροφαρμακευτικής περίθαλψης και γενικά βελτιώνει την διασφάλιση ποιότητας στη γραμμική παραγωγή χοιρινών, όχι μόνο σε ότι αφορά τα *Salmonella* spp., αλλά και άλλους σημαντικούς παθογόνους μικροοργανισμούς (Anon 2006).

#### Σύστημα "όλα μέσα-όλα έξω" (All-in All-out systems-AIAOI)

Το σύστημα αυτό μπορεί να μην αποτρέψει την εισαγωγή της μόλυνσης στην εκτροφή, αλλά είναι ικανό να εμποδίσει την διασταυρούμενη μόλυνση μεταξύ των εκτρεφόμενων ομάδων, λόγω του ότι διευκολύνει να γίνεται αποτελεσματικότερα ο καθαρισμός και η απολύμανση, τα οποία αποτελούν σημαντικούς παράγοντες ελέγχου της νόσου (Lo Fo Wong et

al 2004). Είναι γενικά παραδεκτό ότι, οι χοιρομονάδες θα πρέπει να εφαρμόζουν την πολιτική του "όλα μέσα-όλα έξω"-AIAOI, και παράλληλα επαρκή καθαρισμό και απολύμανση μετά την εκκένωση του κελιού (Somyanontanagul et al 2008).

#### Τύπος ζωτροφής

Η παράθεση της ζωτροφής με τη μορφή συμπύκτων έχει συσχετιστεί με μεγαλύτερη αποδοτικότητα (Eisemann and Argenzio 1999), αλλά παράλληλα με αυξημένο κίνδυνο μόλυνσης με *Salmonella* σε σχέση με την υγρή (Beloeil et al. 2004, Lo Fo Wong et al 2004). Η εξυγίανσή της απαιτεί τη θερμική επεξεργασία στους 85°C για τουλάχιστο 4 λεπτά, ενώ το ποσοστό υγρασίας πρέπει να είναι 14,5-15%. Η μεγάλη πλειοψηφία των εργοστασίων παραγωγής ζωτροφών αδυνατεί να εναρμονιστεί με αυτές τις συνθήκες. Αλλά και στην περίπτωση που πληρούνται αυτά τα δεδομένα, ο κίνδυνος της επιμόλυνσης παραμένει (Doyle 2007). Για το λόγο αυτό, τα τελευταία χρόνια, παρατηρείται αυξημένο ενδιαφέρον για "φυσικές μεθόδους" που αναστέλλουν την διάδοση των παθογόνων βακτηριδίων στα παραγωγικά ζώα. Εμπορικά σκευάσματα που περιέχουν διαφορετικά είδη οργανικών οξέων φαίνεται να βελτιώνουν όχι μόνο τη μετατρεψιμότητα της ζωτροφής και την ανάπτυξη των ζώων, αλλά επίσης ελέγχουν τη διασπορά των παθογόνων μικροοργανισμών, όπως έχει δείξει η χρήση τους στην πτηνοτροφία (Van Immerseel et al. 2004).

Έτσι, στην περίπτωση που η *Salmonella* είναι παρούσα στην εκτροφή, ως μέσο ελέγχου ή τρόπος παρέμβασης, μπορεί να χρησιμοποιηθεί κάποια μορφή οξυνοποίησης της τροφής ή του πόσιμου ύδατος (2 ml μίγματος οξέων/l νερού) (Somyanontanagul et al. 2008). Η οξυνοποίηση της τροφής επιτυγχάνεται με την προσθήκη οργανικών οξέων ή ορού γάλακτος (Lo Fo Wong et al 2002). Πράγματι, ο Creus et al. (2005) έδειξε ότι μια διατροφή που περιελάμβανε 0,4% γαλακτικό και 0,4% μυρμηγκικό οξύ μείωνε σημαντικά την οροθετικότητα των ζώων σε *Salmonella* spp. σε σχέση με μια διατροφή χωρίς πρόσθετα. Επίσης, παρατηρήθηκε ότι η προσθήκη 10% ξηρού πολτού ζαχαροτεύτλων μείωνε την παρουσία των οροθετικών ζώων και δρούσε ευεργετικά στην λειτουργία του γαστρεντερικού συστήματος, ενώ η παράθεση ενσιρώματος που περιείχε χαμηλές συγκεντρώσεις βασικών ουσιών (αμμωνίας, βασικών αμινοξέων, βιογενών αμινών) αύξησε την



λειτουργία των μηχανισμών άμυνας σε τέτοιο βαθμό, ώστε να εξασφαλίζεται αρκετή προστασία στις μολύνσεις από *Salmonella* (Zheng et al 2007). Η παράθεση χοντροαλεσμένου γεύματος (μέγεθος 903 μm έναντι 639 μm) εκτός από την πτώση του pH που προκαλεί στο στομάχι, λόγω της ανάπτυξης οξεογαλακτικών βακτηρίων (Hedemann et al. 2005), καθυστερεί και την διόδο της τροφής από το στομάχι στο έντερο, με αποτέλεσμα οι παθογόνοι μικροοργανισμοί να έρχονται σε επαφή με το γαστρικό υγρό για μεγαλύτερο χρονικό διάστημα και να είναι ανίκανοι πλέον να προκαλέσουν βλάβη στο έντερο (Somyanontanagul et al. 2008, Smith 2003). Έτσι, αλλαγές στη μορφή της ζωοτροφής (γέυμα-χοντροαλεσμένη έναντι συμπιέκτων) ή στις πηγές προέλευσης (παρασκευασμένη στην εκτροφή έναντι της βιομηχανοποιημένης) είναι δυνατό να μειώσουν τον επιπολασμό των *Salmonella* spp. (Ανοπ. 2011).

#### Ανταγωνιστικός αποκλεισμός

Ο ανταγωνιστικός αποκλεισμός έχει χρησιμοποιηθεί με επιτυχία για τον έλεγχο των *Salmonella* spp. στην πτηνοτροφία. Όμως, θετικά αποτελέσματα από τη χρήση καλλιεργιών ανταγωνιστικού αποκλεισμού (π.χ. προβιοτικά) έχουν αναφερθεί και στη χοιροτροφία. Οι μηχανισμοί καταστολής μέσω των οποίων η φυσιολογική εντερική μικροχλωρίδα αναστέλλει τον αποικισμό και τον πολλαπλασιασμό της *Salmonella* περιλαμβάνουν:

- τη δημιουργία δυσμενούς περιβάλλοντος για τη *Salmonella*
- τον ανταγωνισμό των θρεπτικών ουσιών
- τον ανταγωνισμό των θέσεων υποδοχής και
- την παραγωγή μεταβολιτών όμοιων με αντιβιοτικά

Η ενσωμάτωση οργανικών οξέων στη ζωοτροφή, που προαναφέρθηκε, έχει αυτή τη δράση (Schneitz and Mead 2000). Ωστόσο, οι περιορισμένες μέχρι σήμερα, βιβλιογραφικές αναφορές δείχνουν ότι η χρήση του ανταγωνιστικού αποκλεισμού πρέπει να αρχίζει σε πολύ νεαρή ηλικία (τις πρώτες ώρες της ζωής), για να έχει ευεργετική δράση και ότι το όφελός της αφορά κυρίως στον περιορισμό της μόλυνσης, παρά στην πλήρη πρόληψη από τον μικροοργανισμό (Wales et al 2011).

#### Εμβολιασμός

Ο εμβολιασμός έναντι παθογόνων μικροοργανισμών ο οποίος στοχεύει στην πρόληψη δημιουργίας ζώνωφορέων, επιτυγχάνεται πολύ δυσκολότερα σε σχέση με εκείνον που αποβλέπει στην πρόληψη εκδήλωσης της νόσου. Αυτό οφείλεται στο ότι, στη συγκεκριμένη περίπτωση απαιτείται όχι μόνο η εγκατάσταση της τοπικής ανοσοαπόκρισης, η οποία θα εμποδίσει τον αποικισμό του βλεννογόνου, αλλά επίσης απαιτείται η μείωση ή η εξάλειψη της παρουσίας του μικροοργανισμού σε επίπεδο εκτροφής, για την αποφυγή των διασταυρούμενων μολύνσεων στο σφαγείο (Meeusen et al 2007). Επιπρόσθετα, ένα τέτοιο εμβόλιο θα πρέπει να επάγει την πρόκληση μιας χυμικής ανοσοαπόκρισης η οποία να είναι εύκολα διακριτή από εκείνη που προκαλείται σε περίπτωση μόλυνσης από *Salmonella* (Haesebrouck et al. 2004).

Προς το παρόν τα ζωντανά εμβόλια θεωρείται ότι παρέχουν καλύτερη προστασία στα *Salmonella* spp. σε σχέση με τα αδρανοποιημένα, πιθανόν λόγω της μεγαλύτερης κυτταρικής ανοσοαπόκρισης και της παραγωγής της IgA (Meeusen et al 2007, Haesebrouck et al. 2004). Παρόλα αυτά, καλά τεκμηριωμένες μελέτες, που να αποδεικνύουν ξεκάθαρα την αποτελεσματικότητα του εμβολιασμού, δεν υπάρχουν (Denagamage et al 2007). Τα ζωντανά ελαττωμένης λοιμογόνου δύναμης εμβόλια, χορηγούμενα από το στόμα, θεωρείται ότι ενεργοποιούν την κυτταρική ανοσία έναντι των οροτύπων που παρουσιάζουν εξειδίκευση ξενιστή. Ωστόσο, για τους υπόλοιπους οροτύπους τα ίδια εμβόλια φαίνεται να είναι λιγότερο αποτελεσματικά. Μελέτη στην οποία χρησιμοποιήθηκαν στις χοιρομητέρες αδρανοποιημένα εμβόλια "εξειδικευμένα" για την συγκεκριμένη εκτροφή, έδειξε ότι στα χοιρίδια η αποβολή του μικροοργανισμού με τα κόπρανα μειώθηκε σημαντικά (Roesler et al 2006). Έχει υποστηριχτεί ότι διασταυρούμενη ανοσία μεταξύ των οροτύπων δεν συμβαίνει. Ωστόσο, βρέθηκε ότι η χρήση ζωντανού εμβολίου για τον ορότυπο *Salmonella* Choleraesuis, οδήγησε σε σημαντική μείωση του ποσοστού των οροθετικών στη *Salmonella* ζώνω (Maes et al 2001). Θεωρητικά ο εμβολιασμός μπορεί να πραγματοποιηθεί σε οποιοδήποτε στάδιο της ανάπτυξης των χοίρων, περιλαμβάνοντας τα γαλουχούμενα χοιρίδια ή τα παχυνόμενα, αλλά για οικονομικούς λόγους, αναφέρεται στα ζώα αναπαραγωγής και ειδικά στις χοιρομητέρες.

Από την άλλη πλευρά, λαμβάνοντας υπ' όψη το χαμη-



λό περιθώριο κέρδους της χοιροτροφίας, ο συστηματικός εμβολιασμός δεν αποτελεί ιδιαίτερα οικονομικά συμφέρουσα πολιτική, αφού το κόστος του υπολογίζεται στα 50.85/χοίρο (Miller et al. 2005). Παρ' όλα αυτά, η καθιέρωση του εμβολιασμού στις αναπαραγωγικές αγέλες, για μια ορισμένη χρονική περίοδο, σε συνδυασμό με τα κατάλληλα μέτρα βιοασφάλειας και τις αντίστοιχες τακτικές διαχείρισης, μπορεί να συμβάλει αποφασιστικά στη μείωση του επιπολασμού των *Salmonella* spp. στους παχυνόμενους χοίρους.

### Μέτρα κατά τη γαλουχία

Η εξασφάλιση λήψης πρωτογάλακτος (παθητική ανοσία) με την εφαρμογή παρεμβάσεων κατά την περίοδο της γαλουχίας όπως η εξισορρόπηση των τοκετοσμάδων, η απομάκρυνση των αδύναμων χοιριδίων και εκείνων που παρουσιάζουν καθυστέρηση στην ανάπτυξη, η θέρμανση και η διευκόλυνση του θηλασμού, μπορεί να μειώσει την πιθανότητα δημιουργίας ζώων φορέων. Ωστόσο, η προστατευτική επίδραση της μητρικής παθητικής ανοσίας επηρεάζεται από την γαλακτοπαραγωγική ικανότητα της χοιρομητέρας, από το ενδιάμεσο της για τα χοιρίδια (καλή μητρική συμπεριφορά) και από τον βαθμό εγκατάστασης της νόσου στην αναπαραγωγική αγέλη (Wales et al 2011).

Από όλα τα ανωτέρω γίνεται ξεκάθαρο, ότι κάθε παρέμβαση σε επίπεδο εκτροφής θα πρέπει να είναι προσαρμοσμένη και να ταιριάζει στις ιδιαιτερότητες της. Μεμονωμένα και αποσπασματικά μέτρα δεν επαρκούν για να απομακρύνουν ή και να μειώσουν την εισαγωγή και την παρουσία των *Salmonella* spp. σε μια χοιρομονάδα. Για το λόγο αυτό συνίσταται η οργάνωση τακτικών ελέγχων και παρεμβάσεων που να βασίζονται στο συνδυασμό πρακτικών και οικονομικά εφικτών μέτρων. Μιας και κάθε χοιρομονάδα έχει τα δικά της αδύναμα σημεία, όσον αφορά την εισαγωγή και διάδοση των *Salmonella* spp., δεν συνίσταται η επιβολή σταθερών παρεμβάσεων. Σε πρώτη φάση μια προσέγγιση, όμοια με το HACCP, με καθορισμένα όρια, όπου κάθε μονάδα θα μπορεί να επικεντρωθεί στις αδυναμίες της είναι περισσότερο "οικονομικο-αποτελεσματική" και ικανή να επιτύχει μεγαλύτερο επίπεδο ασφάλειας.

### ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ

Τα μέτρα που αναφέρθηκαν για την μείωση του επιπολασμού των *Salmonella* spp. ποικίλουν και η εφαρ-

μογή του καθενός ξεχωριστά εξαρτάται από το βαθμό διασποράς του μικροοργανισμού, αλλά και από τα κίνητρα που θα δοθούν για την εφαρμογή τους. Τα μέτρα και οι παρεμβάσεις μπορούν να εφαρμοστούν στην εκτροφή (pro-harvest), στο σφαγείο (harvest) ή καλύτερα παράλληλα. Ωστόσο, έχει αναγνωριστεί ότι, ο έλεγχος των *Salmonella* spp. σε επίπεδο εκτροφής έχει ιδιαίτερη σημασία, αφού οδηγεί σε μείωση του εισερχομένου μικροβιακού φορτίου στο σφαγείο και συνεπώς σε αύξηση της αποτελεσματικότητας των μέτρων ελέγχου που λαμβάνονται εκεί. Στην πραγματικότητα, η εμπειρία του δανέζικου προγράμματος επιτήρησης και ελέγχου έδειξε ότι ο συνδυασμός των μέτρων εκτροφής και σφαγείου είναι κρίσιμος για την αποτελεσματική μείωση της συχνότητας εμφάνισης της *Salmonella* (Wegener 2010).

Για την ανάπτυξη αποτελεσματικών παρεμβάσεων και μέτρων ελέγχου σε επίπεδο εκτροφής, απαιτείται πρωταρχικά η αναγνώριση των κυριότερων παραγόντων κινδύνου, πράγμα αρκετά δύσκολο λόγω της πολυπλοκότητας της δυναμικής της *Salmonella* στους πληθυσμούς του χοίρου. Συνεπώς και ο έλεγχος της *Salmonella* σε επίπεδο εκτροφής παραμένει δύσκολος, αποτελώντας μια συνεχή πρόκληση στην παγκόσμια βιομηχανία του χοίρου. Με βάση τα δεδομένα που έχουμε μέχρι στιγμής, τα προγράμματα ελέγχου της *Salmonella* θα πρέπει να βασιστούν κυρίως σε αυστηρά μέτρα βιοασφάλειας (δίνοντας ιδιαίτερη έμφαση στο επίπεδο μόλυνσης της ζωοτροφής) και υγιεινής της χοιρομονάδας. Βέβαια, η εφαρμογή αυτών των προγραμμάτων θα είναι αδύνατη δίχως την κατάλληλη εκπαίδευση των χοιροτρόφων.

Θα πρέπει να σημειωθεί ότι, όλα τα οικονομικά μοντέλα που αποβλέπουν μόνο στη μείωση του επιπολασμού των *Salmonella* spp., δεν επιδρούν σημαντικά στην αύξηση της αποδοτικότητας των ζώων και συνεπώς ο παραγωγός δεν έχει άμεσο οικονομικό όφελος. Μέχρι σήμερα στην γραμμή παραγωγής χοίρου δεν υπάρχει σύστημα ελέγχου των *Salmonella* spp. και διαφοροποίηση της τιμής πώλησης με βάση την επιμόλυνση του προϊόντος με αυτά. Συνεπώς, δεν υπάρχει άμεσο κίνητρο στον παραγωγό για την μείωση του επιπολασμού του μικροοργανισμού. Εξάλλου, καθώς οι περισσότερες μολύνσεις με *Salmonella* είναι υποκλινικές, ο παραγωγός αισθάνεται ότι δε θα αποκομίσει κέρδος από την προσπάθεια μείωσής της. Ωστόσο, υπάρχουν έμμεσα κίνητρα για την μείωση του επιπο-

λασμού των *Salmonella* spp., όπως το αυξημένο ενδι-  
αφέρον για την ασφάλεια των τροφίμων και η ανάγκη  
παραγωγής ανταγωνιστικά ισχυρών προϊόντων στην  
παγκόσμια αγορά. Η τελευταία παράμετρος αποκτά  
ιδιαίτερη σημασία σήμερα, που λόγω της παρούσας  
οικονομικής κατάστασης, ο καταναλωτής θα στραφεί  
στο χοιρινό κρέας, ως μια οικονομικότερη λύση σε  
σχέση με το μοσχαρίσιο κρέας. Τα παραπάνω ζητή-  
ματα θέτουν νέες προκλήσεις για τη βιομηχανία χοιρι-  
νού κρέατος, υπογραμμίζοντας τη σπουδαιότητα της  
παραγωγής προϊόντων υψηλής ποιότητας με το χαμη-  
λότερο δυνατό κόστος. Αυτό προϋποθέτει την εφαρ-  
μογή αποτελεσματικών προγραμμάτων επιτήρησης  
που θα αποτελέσουν αναπόσπαστο μέρος στην αλυ-  
σίδα παραγωγής του χοίρου. Θα πρέπει να σημειωθεί,  
ότι για την περίπτωση των χοιρομονάδων που παρου-  
σιάζουν μακροχρόνια επιμόλυνση με ενδημικά στελέ-  
χη *Salmonella* και παράλληλα δεν εφαρμόζουν σωστή  
οικονομική διαχείριση, τα παραπάνω εντατικά μέτρα  
ελέγχου είναι δύσκολο να εφαρμοστούν αποτελεσμα-  
τικά, λόγω του κόστους τους και των απαιτήσεών τους  
σε εργατικό δυναμικό (Wales et al 2009).

Κάποια Κράτη-Μέλη της ΕΕ, αναγνωρίζοντας το χοί-  
ρο και τα προϊόντα του ως πηγή σαλμονελλώσεως του  
ανθρώπου, έχουν ήδη εφαρμόσει προγράμματα ελέγ-  
χου ή/και επιτήρησης (π.χ. Δανία, Σουηδία, Γερμανία,  
Βέλγιο), ενώ άλλα όχι (π.χ. Πορτογαλία, Ισπανία, Γαλλία,  
Ελλάδα). Ωστόσο, επειδή οι άνθρωποι και οι οικονο-  
μικοί πόροι είναι περιορισμένοι, αλλά ταυτόχρονα οι  
κίνδυνοι που απειλούν τη Δημόσια Υγεία πρέπει να  
αντιμετωπιστούν, απαιτείται η επαναξιολόγηση των  
προγραμμάτων ελέγχου, ώστε να βρεθούν περισσό-  
τερο "οικονομικο-αποτελεσματικές" λύσεις. Η επιτυχία  
των προγραμμάτων ελέγχου θα στηριχτεί στο συνε-  
χή διάλογο επιστημονικής κοινότητας, βιομηχανίας  
του χοίρου, κρατικών αρχών και καταναλωτών. Επι-  
πλέον, θα πρέπει να δοθούν κίνητρα στον παραγωγό  
να ενισχύσει και όχι να εγκαταλείψει τα μέτρα ελέγχου  
και πρόληψης. Μια πολυπαραγοντική μόλυνση, όπως  
είναι η σαλμονέλλωση, απαιτεί πολύπλευρη προσέγγι-  
ση τόσο εντός και μεταξύ των χοιρομονάδων, όσο και  
σε επίπεδο χοίρων και εξαρτάται από την καταβαλόμε-  
νη προσπάθεια των εμπλεκόμενων κάθε σταδίου. Με  
τον τρόπο αυτό δεν θα διασφαλιστεί μόνο η ασφάλεια  
του τελικού προϊόντος, αλλά θα επιτευχθούν υψηλότε-  
ρα επίπεδα ποιότητας και υπηρεσιών, εξοικονόμηση  
δαπανών και καλύτερη θέση στην αγορά.



## Producing Salmonella-free pigs

Evangelopoulou G.D<sup>1</sup>, Govaris A.<sup>2</sup>, Kritas S.<sup>3</sup>, Burriel A.R<sup>4</sup>

<sup>1</sup>PhD Student, Laboratory of Microbiology and Parasitology, Faculty of Veterinary Medicine, School of Health Science, University of Thessaly, Trikalon 224, Karditsa 431 00, Greece, E-mail:matinavet@hotmail.com

<sup>2</sup>Associate Professor, Laboratory of Hygiene of Foods of Animal Origin, Faculty of Veterinary Medicine, School of Health Science, University of Thessaly, Trikalon 224, Karditsa 431 00, Greece

<sup>3</sup>Associate Professor, Laboratory of Microbiology and Infectious Diseases, School of Veterinary Medicine, Aristotelian University, Thessaloniki 541 24, Greece

<sup>4</sup>Professor, Laboratory of Microbiology and Parasitology, Faculty of Veterinary Medicine, School of Health Science, University of Thessaly, Trikalon 224, Karditsa 431 00, Greece

**Summary:** Salmonella spp. is one of the most important zoonotic pathogens. Human and animal salmonellosis remain a serious global problem, because of the direct economic costs resulting from morbidity and mortality, and, thus, considerable losses in other pig products. According to EFSA, pig meat may be responsible for 10 to 20% of all human cases of salmonellosis in the EU – with some differences between countries. Most important are subclinically infected pigs, which represent the most likely route for Salmonella entering the food chain. They, also shed the organism into the environment, infecting pen mates maintaining the infection in a farm. Thus, these animals should be targeted for successful control of infection. No single treatment or management technique is perfect to fully control the existence of the microorganism, but there are a plenty of options to be considered, many of which are a challenge to implement in practical implementation. Therefore, control plans need to be reviewed and updated continuously. Moreover, producers should consider the most practical ways of minimizing Salmonella entering their facilities through cost-effective and long-term interventions, adjusted according to the weak points of their units. The pig industry realizing that reduction in Salmonella prevalence has significant benefits for the whole of the production chain (producer, abattoir operator, retailer, consumer) will strengthen confidence in pork meat, thus income. Undoubtedly, the attempt to maintain Salmonella control programs is likely to be high and ongoing and will depend on the amount of effort and diligence required from all the participants.

**Keywords:** Salmonella, pig, risk factors, control measures

### Βιβλιογραφία

- Acheson DW and Keusch GT (1997) Intestinal infections with Salmonella and Yersinia species. In: LaMont JT editor. Gastrointestinal Infections: diagnosis and management. New York: Marcel Dekker Inc. pp 149-189.
- Anon. (2010a). The community Summary report on trends and sources of zoonoses, zoonotic agents and food-borne outbreaks in the European Union in 2008. The EFSA Journal 1496, 1-288.
- Anon. (2003). Commission Regulation (EC) No 2160/2003 of the European Parliament and of the Council of 17 November 2003 on the control of Salmonella and other specified food-borne zoonotic agents. Official Journal of the European Union, L 325.
- Anon. (2004). Annual Report on Zoonoses in Denmark 2003. Danish Zoonosis Centre, Copenhagen, Denmark, 31 pp.
- Anon. (2005). Commission Regulation (EC) No 2073/2005 of November 2005 on microbiological

- criteria for foodstuffs. Official Journal of the European Union 338, -26.
- Anon. (2006). Opinion of the Scientific Panel on Biological Hazards on "Risk assessment and mitigation options of Salmonella in pig production", The EFSA Journal (2006), 341, 1-131
  - Anon. (2010b). EFSA assesses risk of Salmonella from pig meat (2010) Press Release <http://www.efsa.europa.eu/en/press/news/biohaz100419.htm>
  - Anon., (2011) Analysis of the baseline survey on the prevalence of Salmonella in holdings with breeding pigs, in the EU, 2008. Part B: factors associated with Salmonella pen positivity. EFSA Journal (2011);9(7):2329
  - Arrus K.M., Holley R.A., Ominski K.h., Tenuta M., Blank G. (2006) Influence of temperature on Salmonella survival in hog manure slurry and seasonal temperature profiles in farm manure storage reservoirs. *Livestock Science* 102,226-236
  - Beloeil, P. A., Fravallo, P., Fablet, C., Jolly, J. P., Eveno, E., Hascoet, Y., et al. (2004). Risk factors for Salmonella enterica subsp. enterica shedding by market-age pigs in French farrow-to-finish herds. *Preventive Veterinary Medicine*, 63, 103-120.
  - Blaha, T. (2000): Salmonella's Impact on Pork Production. [http://nationalhogfarmer.com/mag/farming\\_salmonellas\\_impact\\_pork](http://nationalhogfarmer.com/mag/farming_salmonellas_impact_pork)
  - Blanchard, P., and D. Burch (2008): Improve gut health to cut Salmonella infection. <http://www.octagon-services.co.uk/articles/salmonella.pdf>
  - Boughton, C., Egan, J., Kelly, G., Markey, B., & Leonard, N. (2007). Rapid infection of pigs following exposure to environments contaminated with different levels of Salmonella Typhimurium. *Foodborne Pathogens and Disease*, 4(1), 33-40.
  - Boyen, F., Haesebrouck, F., Maes, D., Van Immerseel, F., Ducatelle, R., & Pasmans, F. (2008). Non-typhoidal Salmonella infections in pigs: A closer look at epidemiology, pathogenesis and control. *Veterinary Microbiology*, 130, 1-19.
  - Creus, E., Perez, J.F., Mateu, E., (2005). Effect of an acidified diet on Salmonella prevalence during the last term of fattening period. *Proceedings of the 6th International Symposium on the Epidemiology and Control of Foodborne Pathogens in Pork*, California, Sep 6-9, pp. 287-288.
  - Dahl, J. (2008) Feed related interventions in pig herds with a high salmonella seroprevalence - the Danish experience. *Pig Journal* 61, 6-11
  - Davies, P.R., Funk, J.A., Morrow, W.E.M. (1999). Fecal shedding of Salmonella by a cohort of finishing pigs in North Carolina. *Swine Health Prod.* 7, 231-234.
  - Delpech, V., McAnulty, J. and Morgan, K. 1998. A salmonellosis outbreak linked to internally contaminated pork meat. *Australian and New Zealand Journal of Public Health* 22, 243-246
  - Denagamage, T.N., O'Connor, A.M., Sargeant, J.M., Rajic, A., McKean, J.D., (2007). Efficacy of vaccination to reduce Salmonella prevalence in live and slaughtered swine: a systematic review of literature from 1979 to 2007. *Foodborne Pathogens and Disease* 4, 539-549
  - Doyle A. (2007). Eliminating Salmonella in pigs starts with clean feed [http://www.wattagnet.com/Eliminating\\_Salmonella\\_in\\_pigs\\_starts\\_with\\_clean\\_feed.html](http://www.wattagnet.com/Eliminating_Salmonella_in_pigs_starts_with_clean_feed.html)
  - Eisemann, J.H., and R.A. Argenzio (1999): Effects of diet and housing density on growth and stomach morphology in pigs. *J. Anim. Sci.* 77, 2709-2714
  - Falkow, S. and Mekalanos, J. (1990) The enteric bacilli and vibrios. In: Davis, B., Dulbecco, R., Eisen, H. And Ginsberg, H. (eds) *Microbiology*, 4th edn. J.B. Lippincott, Philadelphia, pp. 576-579
  - Galanis, E., Lo Fo Wong, D.M.A., Patrick, M.E., Binsztein, N., Cieslik, A., Chalermchaikit, T., Aidara-Kane, A., Ellis, A., Angulo, F.J., Wegener, H.C., (2006). Web-based surveillance and global Salmonella distribution, 2000-2002. *Emerging Infectious Diseases* 12, 381-388.
  - Gill, C.O., Bryant, J., (1993). The presence of Escherichia coli, Salmonella and Campylobacter in pig carcass dehairing equipment. *Food Microbiol.* 10, 337-344
  - Haesebrouck, F., Pasmans, F., Chiers, K., Maes, D., Ducatelle, R., Decostere, A., (2004). Efficacy of vaccines against bacterial diseases in swine: what can we expect; *Vet. Microbiol.* 100, 255-268.
  - Hardy, B. (2002): Biosecurity on pig farms. <http://www.nutrivisioninc.com/biosecurity.html>
  - Hedemann MS, Mikkelsen LL, Naughton PJ, and Jensen BB, (2005). Effect of feed particle size and feed processing on morphological characteristics in the small and large intestine of pigs and on adhesion of Salmonella enterica serovar Typhimurium DT12 in the ileum in vitro. *Journal of Animal Science.* 83:1554-1562.



- Hutchison, M.L., Walters, L.D., Moore, A., Avery, S.M., (2005). Decline of zoonotic agents in liquid livestock wastes stored in batches on-farm. *J. Appl. Microbiol.* 99, 58 - 65.
- Kuhns MD (2010) Salmonella Infections [www.history.amedd.army.mil/booksdocs/wwii/PM4/CH18.Salmonella.htm](http://www.history.amedd.army.mil/booksdocs/wwii/PM4/CH18.Salmonella.htm), accessed 6-7-2010
- Lammerding, A.M., Fazil, A., (2000). Hazard identification and exposure assessment for microbial food safety risk assessment. *International Journal of Food Microbiology* 58(3), pp 147-157.
- Lo Fo Wong, D. M. A., Dahl, J., Stege, H., van der Wolf, P. J., Leontides, L., von Altröck, A., et al. (2004). Herd-level risk factors for subclinical Salmonella infection in European finishing-pig herds. *Preventive Veterinary Medicine*, 62, 253-266.
- Lo Fo Wong, D.M.A., Hald, T., van der Wolf, P.J., Swanenburg, M., (2002). Epidemiology and control measures for Salmonella in pigs and pork. *Livest. Prod. Sci.* 76, 215-222.
- Loynachan, A. T., Nugent, J. M., Erdman, M. M., & Harris, D. L. (2004). Acute infection of swine by various Salmonella serovars. *Journal of Food Protection*, 67(7), 1484-1488.
- Maes, D., Gibson, K., Trigo, E., Saszak, A., Grass, J., Carlson, A., Blaha, T., (2001). Evaluation of cross-protection afforded by a Salmonella Choleraesuis vaccine against Salmonella infections in pigs under field conditions. *Berliner und Münchener Tierärztliche Wochenschrift* 114, 339-341.
- MAFF, Ministry of Agriculture, Fisheries and Food (2000): Code of practice for the prevention and control of Salmonella on pig farms. [http://www.defra.gov.uk/animalh/diseases/zoonoses/zoonoses\\_reports/pig.pdf](http://www.defra.gov.uk/animalh/diseases/zoonoses/zoonoses_reports/pig.pdf)
- Majowicz, S. E., Musto, J., Scallan, E., Angulo, F. J., Kirk, M., O'Brien, S. J., et al. (2010). The global burden of nontyphoidal Salmonella gastroenteritis. *Clinical Infectious Diseases*, 50(6), 882-889.
- Meeusen, E.N., Walker, J., Peters, A., Pastoret, P.P., Jungersen, G., (2007). Current status of veterinary vaccines. *Clin. Microbiol. Rev.* 20, 489-510.
- Miller, G.Y., Liu, X., McNamara, P.E., Barber, D.A. (2005). Influence of Salmonella in pigs preharvest and during pork processing on human health costs and risks from pork. *J Food Prot.* 68(9):1788-1798.
- Mousing, J., Thode Jensen, P., Halgaard, C., Bager, F., Feid, N., Nielsen, B., Nielsen, J.P., Bech-Nielsen, S. (1997). Nation-wide Salmonella enterica surveillance and control in Danish slaughter swine herds. *Prev. Vet. Med.* 29, 247-261.
- Murase, T., Yamada, M., Muto, T., Matsushima, A. and Yamai, S. (2000) Fecal excretion of Salmonella enterica serovar Typhimurium following a food-borne outbreak. *Journal of Clinical Microbiology* 38, 3495-3497
- Nollet, N., Houf, K., Dewulf, J., De Kruif, A., De Zutter, L. & Maes, D. (2005) Salmonella in sows: a longitudinal study in farrow-to-finish pig herds. *Veterinary Research* 36, 645-656
- Oliveira, C. J., Carvalho, L. F., & Garcia, T. B. (2005). Experimental airborne transmission of Salmonella Agona and Salmonella Typhimurium in weaned pigs. *Epidemiology and Infection*, 134, 199-209.
- Pfeiffer D.U. (2002) Veterinary Epidemiology- An Introduction. Epidemiology Division Department of Veterinary Clinical Sciences, The Royal Veterinary College, University of London
- Roesler, U., Heller, P., Waldmann, K.H., Truyen, U., Hensel, A., (2006). Immunization of sows in an integrated pig-breeding herd using a homologous inactivated Salmonella vaccine decreases the prevalence of Salmonella Typhimurium infection in the offspring. *Journal of Veterinary Medicine B* 53, 224-228.
- Rowe, T.A., F.C. Leonard, G. Kelly, P.B. Lynch, J. Egan, A.M. Quirke And P.J. Quinn (2003) Salmonella serotypes present on a sample of Irish pig farms. *Vet. Record*, 153, 453-456
- SANCO Workshop on Salmonella Control in Pigs 26 February 2009, November 2010 [http://ec.europa.eu/food/food/biosafety/salmonella/other\\_act\\_en.htm](http://ec.europa.eu/food/food/biosafety/salmonella/other_act_en.htm),
- Schneitz, C., Mead, G., (2000). Competitive exclusion. In: Wray, C., Wray, A. (Eds.), *Salmonella in domestic animals*. CABI Publishing, New York, pp. 301-322.
- Smith, J.L. (2003). The role of gastric acid in preventing foodborne disease and how bacteria overcome acid conditions. *J. Food Prot.* 66, 1292-1303
- Somyanontanagul N., Nathues H., Tegeler R., Blaha T. (2008): Comparison between detecting Salmonella spp. by bacteriological method and Real-Time PCR assay in samples from pig herds. In: Oral Proceedings of the 20th International Pig Veterinary Society Congress, Durban, South Africa, 2008, 176

- Stegea H., Christensen J., Nielsen J.P., Willeberg P., (2001) Data-quality issues and alternative variable screening methods in a questionnaire-based study on subclinical *Salmonella enterica* infection in Danish pig herds. *Preventive Veterinary Medicine* (48), 35-54
- Van Immerseel, F., De Buck, J., Boyen, F., Bohez, L., Pasmans, F., Volf, J., Sevcik, M., Rychlik, I., Haesebrouck, F., Ducatelle, R., (2004). Medium-chain fatty acids decrease colonization and invasion through hila suppression shortly after infection of chickens with *Salmonella enterica* serovar Enteritidis. *Appl. Environ. Microbiol.* 70, 3582-3587.
- Wales, A. D., McLaren, I. M., Bedford, S., Carrique-Mas, J. J., Cook, A. J. C. & Davies, R. H. (2009) Longitudinal survey of the occurrence of *Salmonella* in pigs and the environment of nucleus breeder and multiplier pig herds in England. *Veterinary Record* 165, 648-657
- Wales, A. D., Cook A. J. C., Davies R. H. (2011) Producing *Salmonella*-free pigs: a review focusing on interventions at weaning. *Veterinary Record* 168, 267-276
- Wegener, H. C. (2010). Danish initiatives to improve the safety of meat products. *Meat Science*, 84, 276-283.
- WHO, WORLD HEALTH ORGANIZATION (1980): Report of the WHO/World Association of Veterinary Food Hygienists (WAVFH) round table conference on the present status of the *Salmonella* problem (prevention and control), Bilthoven, the Netherlands, 6-10 October. WHO/VPH/81.27. WHO, Bilthoven
- WHO, WORLD HEALTH ORGANIZATION (1993): Report of the WHO Consultation on Control of *Salmonella* Infections in Animals. Prevention of Food - borne *Salmonella* Infections in Man Jena Germany 21-26 Nov. 1993
- Wray, C. (2001): Review of research into *Salmonella* infections in pigs. <http://v2.mlc.org.uk/downloads/pdfs/Salmonella%20review.pdf>
- Zheng D.M., Bonde M., Sorensen J.T., (2007) Associations between the proportion of *Salmonella* seropositive slaughter pigs and the presence of herd level risk factors for introduction and transmission of *Salmonella* in 34 Danish organic, outdoor (non-organic) and indoor finishing-pig farms. *Livestock Science* 106,189-199.



## The commercial impact of pig *Salmonella* spp. infections in border-free markets during an economic recession

G. Evangelopoulou<sup>1</sup>, S. Kritas<sup>2</sup>, G. Christodoulouopoulos<sup>3</sup> and A. R. Burriel<sup>1</sup>

1. Laboratory of Microbiology and Parasitology, Faculty of Veterinary Medicine, School of Health Sciences, University of Thessaly, Karditsa, Greece; 2. Department of Microbiology and Infectious Diseases, Faculty of Veterinary Medicine, Aristotle University, Thessaloniki, MKD, Greece; 3. Department of Clinical Veterinary Medicine, Faculty of Veterinary Medicine, School of Health Sciences, University of Thessaly, Karditsa, Greece.

**Corresponding author:** G. Evangelopoulou, e-mail: [matinavet@hotmail.com](mailto:matinavet@hotmail.com), SK: [skritas@vet.uth.gr](mailto:skritas@vet.uth.gr), GC: [gc@vet.uth.gr](mailto:gc@vet.uth.gr), ARB: [aburriel@vet.uth.gr](mailto:aburriel@vet.uth.gr)

**Received:** 01-12-2014, **Revised:** 15-01-2015, **Accepted:** 21-01-2015, **Published online:** 05-03-2015

**doi:** 10.14202/vetworld.2015.257-272. **How to cite this article:** Evangelopoulou G, Kritas S, Christodoulouopoulos G, Burriel AR (2015), The commercial impact of pig *Salmonella* spp. infections in border-free markets during an economic recession, *Veterinary World* 8(3):257-272.

### Abstract

The genus *Salmonella*, a group of important zoonotic pathogens, is having global economic and political importance. Its main political importance results from the pathogenicity of many of its serovars for man. Serovars *Salmonella* Enteritidis and *Salmonella* Typhimurium are currently the most frequently associated to foodborne infections, but they are not the only ones. Animal food products contaminated from subclinically infected animals are a risk to consumers. In border free markets, an example is the EU, these consumers at risk are international. This is why, economic competition could use the risk of consumer infection either to restrict or promote free border trade in animals and their products. Such use of public health threats increases during economic recessions in nations economically weak to effectively enforce surveillance. In free trade conditions, those unable to pay the costs of pathogen control are unable to effectively implement agreed regulations, centrally decided, but leaving their enforcement to individual states. Free trade of animal food products depends largely on the promotion of safety, included in "quality," when traders target foreign markets. They will overtake eventually the markets of those ineffectively implementing agreed safety regulations, if their offered prices are also attractive for recession hit consumers. Nations unable to effectively enforce safety regulations become disadvantaged partners unequally competing with producers of economically robust states when it comes to public health. Thus, surveillance and control of pathogens like *Salmonella* are not only quantitative. They are also political issues upon which states base national trade decisions. Hence, the quantitative calculation of costs incurring from surveillance and control of animal salmonellosis, should not only include the cost for public health protection, but also the long term international economic and political costs for an individual state. These qualitative and quantitative costs of man and animal *Salmonella* infections should be calculated in the light of free trade and open borders. Understandably, accurate calculation of the economic and political costs requires knowledge of the many factors influencing nationally the quality and safety of pork products and internationally free trade. Thus, how *Salmonella* pig infections affect commerce and public health across open borders depends on a state's ability to accurately calculate costs for the surveillance and control of animal salmonellosis in general, and pig infections as a particular example.

**Keywords:** control, economic crisis, pig, *Salmonella*, salmonellosis.

### Introduction

*Salmonella* spp., a pathogenic genus of Enterobacteriaceae, have serovars causing from sub-clinical to severe clinical infections in animals and typhoid fever and severe diarrhea in humans [1]. Foodborne *Salmonella* infections are equally important worldwide, similar to those of *Campylobacter* spp., and pork is one of the important sources of pathogenic to man serovars [2,3]. Serovars Enteritidis and Typhimurium have become the most prevalent, replacing previously important serovars [3-5]. The reported prevalence of *Salmonella* spp., although varied among European Member States, implicates pork meat as a potential risk to human health [6,7]. About 93.8 million cases of foodborne salmonellosis occur annually worldwide [8], costing the various

national health authorities a mean above US\$1000 per case [9,10]. Costs for treating human cases are the actual incentives for some nations, such as Denmark, Sweden, Germany, Belgium and others in undertaking control measures, aiming at the reduction of *Salmonella* prevalence in their pig farms. They are also states inspiring to internationally promote as safe their national products. Their programs have shown that reductions in human *Salmonella* prevalence result from reductions in various points of food production of animal origin and poultry and pork meat are their targets [6,7,11-13].

Such states, members of open border unions, have influenced and will continue influencing the making of uniformed regulations for food safety across borders and examples are various EU regulations [14-16] for effective control pathogens such as *Salmonella* to each member state, thus each state's ability to bear the costs incurred [6,11-13]. Such programs are, suppose easily adjusted to each country's burden of disease.

Copyright: The authors. This article is an open access article licensed under the terms of the Creative Commons Attribution License (<http://creativecommons.org/licenses/by/2.0>) which permits unrestricted use, distribution and reproduction in any medium, provided the work is properly cited.



They emphasize the benefits to meat producers, if a state can economically subsidize a national control program [7]. However, if a state cannot for economic reasons enforce such community regulations, perhaps due to a recession, a nation's food chain is exposed to an unfair open border competition on issues of safety. In a union such as the EU (and others to come), where suppose reciprocity is the building block, measures for enforcing community regulations should be incentives, centrally managed and financed, rewarding pig farmers for producing *Salmonella* free pork. Otherwise, winners are big producers, national or international, forcing smaller holdings to a final closing down by offering consumers good prices and safer product. Safety food regulations are in free trade areas supranational and based on punishments; rewards for compliance are national choices. If a nation cannot protect the interests of its food producing business, others will dominate it, perhaps, with long-term political consequences for the receiving economy. Thus, the decision on the form and actual size of rewards to regulated farmers is a political decision influenced by economic and political interests, many of which are passing national borders. In international commerce conditions, economic recessions give space to international competitors able to absorb losses from lower prices [17,18].

Therefore, for small economies, the national final cost of inaction on food safety could be much larger than the actual costs of action. For the protection of national interests, state authorities and pork producers should aim for a consensus on safety avoiding the long-term costs of state inaction. Availability and accumulation of capital is not just an individual responsibility, when it comes to national products, upon which depends on the survival of a nation's population in times of expected turmoil and economic insecurity [2,19-21]. They are a state priority if national security is the objective of its politicians. However, in the name of economic and political unity of culturally and economically different states, such as in the EU, food safety regulations could increase trading gaps between partners. In such a union, the economic inability to control animal pathogens increases trade inequality if recessions do not promote reciprocity for market harmonization. Thus, lack of reciprocity is one of the many reasons small economies in large unions should subsidize their food production to remain free of important pathogens.

#### Reasons for Controlling *Salmonella* spp. Infections in Pig Production

The impact of *Salmonella* spp. control on public health, evidenced in many EU nations and elsewhere by continuous epidemiological surveillance in man and animals [2,3,8,22], is a paradigm on the benefits gained when rewards are offered to farmers for producing *Salmonella* free pork [23]. *Salmonella* prevalence across a border free EU is influenced by freely traded

live pigs, pig meat and pork products, national consumption habits and the type of a pig farm management [24]. Consumption of undercooked pork and cross-contamination of consumer products during processing of pork products are high-risk factors [25]. Thus, the protection of public health depends on reliable rules of monitoring and reporting animal *Salmonella* infections and retailing facilities contamination, but also the undertaking of educational programs for increasing the awareness of food workers and consumers on food safety during food preparation [5,22,23].

The worldwide estimated human loss due to salmonellosis is about 155,000 deaths per year, in their majority children up to 4 years of age and mostly caused by serovars Enteritidis and Typhimurium. In the EU, a drop in confirmed human cases was observed the past 5 years of data collection. This reduction was greater between 2008 and 2010, with a drop in confirmed human cases from 131,468 to 99,020 and a further drop after that [7,22]. This apparent improvement in numbers is credited to regulation enforcement especially in poultry. However, other reasons, such as the deepening of the worldwide economic crisis, could logically influence notification rates from individual states. In accumulative reports, small variations are affected by small annual changes in the numbers reported from individual states. Thus, the reported increases in notification rates from an estimated 21.5 cases to 22.2 per 100,000 people could not only be the result of regulation [7,22,26-28]. It could also result from substantial increases in true infections in individual nations.

Highest notification rates were reported from the Czech Republic, Slovakia and Lithuania ( $\geq 70$  per 100,000) and the lowest from Portugal, Greece and Romania ( $\leq 5$  per 100,000) [7]. The last three countries are among those hardest hit by the current economic crisis and the ones reporting the highest hospitalization rates ( $>85\%$ ) due to *Salmonella* infection. Higher hospitalization rates in economically weaker states could result from a combination of reasons, including consumption of unsafe (unregulated) food products. Unfavorable economic conditions couldn't but affect enforcement of regulations (inability of testing) and of incentives to producers for producing safe products. Lower consumption suppresses pork prices, forcing producers to relax quality control in various ways, including cheaper feed stuffs and labor, lowering cleaning and disinfection costs, keeping animals for longer periods of time in facilities, etc., thus increasing the risks to consumers.

A recession also affects the quality of health care [29,30], thus, early detection and effective treatment of infected consumers, hospitalized only with the worsening of their untreated or improperly treated infection. Thus, higher hospitalization rates in states experiencing economic hardship [7] show, perhaps, the negative impact and the spiral effect of economic distresses on the health of consumers, rather than a better state health care system detecting and reporting hospitalized cases.



On average, 45% of confirmed *Salmonella* cases across EU were hospitalized in recent years having a 0.12-0.14% case-fatality [7,27]. The fatal cases are difficult to treat infections, associated to immunocompromised individuals from other existing diseases, or, perhaps, bad nutrition and stress from economic hardships. Regardless, they are a socioeconomic burden for economically hard-hit public health systems, also having to treat multi-resistant to antimicrobials strains of *Salmonella* spp. deriving from carrier animals [31-33].

Regardless, however, of actual reductions in reported confirmed cases, the pig remained an important contributor to human salmonellosis, responsible, in some states, for up to 56% [34] of the confirmed human cases, with an overall estimated contribution between 10% and 20% [28]. Farmers relaxing control measures during hard to face economic losses seek affordable means for protecting their animals, among which is treating animal cases rather by removing them from their herd. Thus, producing eventually either resistant *Salmonella* strains or increasing the number of subclinical carrier animals.

Subclinically infected animals maintain the microorganism on the farm, contaminating their environment, infecting susceptible animals and contaminating carcasses during slaughtering, eventually passing virulent serovars to consumers. In addition, subclinical infections cause reductions in expected productivity from reduced feed conversion rates, thus lower body weight. Body weight losses are estimated by Danish authorities to about 3 kg per pig [35]. These losses are calculated with a seroprevalence below 10% observed only in nations enforcing effective control programs [36,37]. In nations without control programs or reluctantly enforcing them, pig seroprevalence is higher, affecting productivity and increasing animal treatment costs. The accumulated costs of human cases and pig productivity losses are estimated above €600 million for the EU trading area, €90 million of which result from removing contaminated pig food products from the shelf [6]. The public health estimated costs for EU are €86 million per year or €600-800 per human reported case and rising [9,10,38]. Costs per human case occur from costs investigating and treating cases, but also losses from decreased worker productivity. These estimations are calculated from reported notification rates, but the ability of EU nations to fully investigate, thus accurately record and report human cases depends on each state's ability to pay the costs. Are, therefore, notification rates accurate? It remains to be systematically investigated.

Thus, economic difficulties, which negatively affect public health and farmers' income, affect also the investigation of *Salmonella* serovar prevalence, affecting knowledge accumulation on the distribution of virulent serovars in individual nations and eventually the EU.

## Serovars of *Salmonella* spp. infecting pigs and man

### *Salmonella* spp. pathogenicity

*Salmonella* spp. are Gram-negative, facultative anaerobic, straight rods, with peritrichous flagella. The genus, having more than 2,600 serovars, is divided into two species, *Salmonella enterica* (the type species) and *S. bongori*. The previously known subspecies of *S. enterica* referred to as subspecies I, II, IIIa, IIIb, IV and VI are now respectively named *S. enterica* subsp. *enterica*, *S. enterica* subsp. *salamae*, *S. enterica* subsp. *arizonae*, *S. enterica* subsp. *diarizonae*, *S. enterica* subsp. *hountanae* and *S. enterica* subsp. *indica* (subspecies VI). The majority of the isolated serovars belong to subspecies *enterica*, previously known as subspecies I [39].

The genus *Salmonella*, recovered from most vertebrates and many insects, is considered a "universal pathogen" [40]. However, this term does not imply that all of its serovars are particularly pathogenic for their hosts. It rather means that members of the genus have been isolated from virtually all vertebrates and most reptiles regardless of their virulence. In these hosts, the pathogenicity of various *Salmonella* isolates varies and its expression depends on the ability of the infecting serovar to adapt or not to its host's biological environment. The consequence of this adaptation is the expression of various degrees of pathogenicity. Hence, a serovar could be very virulent for some hosts and mildly virulent or completely avirulent for others. Among the many thousands of serovars, the most adaptive are serovars Typhimurium and Enteritidis, thus, they are the most frequently isolated from clinical and subclinical infections. If serovars are organized into groups according to their virulence, three groups will be distinguished [41,42].

One including serovars associated with systemic disease in a limited number of hosts, such as *Salmonella* Dublin and *Salmonella* Choleraesuis, another with highly host adapted serovars, such as *Salmonella* Typhi, *Salmonella* Gallinarum and *Salmonella* Abortusovis and a third of all the non-host adapted serovars, known also as unrestricted serovars [41-44].

The above named serovars of the first group are important for man, cattle and pigs. Animals infected with serovars of this group, frequently become "symptomless excretors," thus are environmental health hazards for susceptible animal species.

The group of highly host adapted serovars, also called "host-restricted serovars," includes serovars exclusively causing systemic disease to their host, as do serovars Typhi, Gallinarum and Abortusovis in humans, fowl and ovine respectively (HR), thus, considered of less importance to other animal species [44].

However, the group of non-host adapted serovars (unrestricted), among which are the most prevalent in human and animal infections *Salmonella* Typhimurium and *Salmonella* Enteritidis, is the most important group for public health. Serovars of this



group infect a wide range of hosts, if the opportunity is given to them, and although they are usually associated with a relatively mild enteric disease, they are the main contributors to state financial losses, as previously mentioned [43,44]. They have the potential to affect animal productivity, and they put a financial burden on a national health system investigating potential human infections.

The ability of a pathogenic serovar to cause disease in an animal species depends largely on the degree of adaptation it exhibits in its host's biological environment. This ability also defines a serovar's persistence in the host. An example is serovar Choleraesuis, a porcine adapted serovar, which, although it does not cause the severest disease in swine compared to man, it persists in pig populations making them the reservoir for this serovar [41].

Thus, effective control of animal salmonellosis aims firstly to the protection of consumers and secondly to the maintenance of animal productivity. Both, however, need documentation of serovar prevalence and knowledge of their epidemiological importance before the costs and source of infection are accurately calculated. Farm animals held for mass production of food products, particularly poultry and pigs, are targeted for *Salmonella* control with public health in mind. Documentation of the prevalence of serovars infecting animals helps explain their presence in man and helps formulate the most effective means of restricting their passing from animals to man. It also helps the accumulation of information effectively helping the mapping of the history of *Salmonella* subspecies and serovars in nature.

#### *Salmonella* spp. infections of pigs and man

In the past, as already mentioned, the most prevalent serovars causing clinical disease to pigs were *Salmonella choleraesuis*, *Salmonella* Typhimurium and *Salmonella* Typhisuis. Each caused a distinct disease syndrome. *S. Choleraesuis*, and particularly variant Kunzendorf, a H<sub>2</sub>S-producing serovar, caused the majority of pig septicaemias [45]. The host unrestricted serovar *Salmonella* Typhimurium, causes acute or chronic enterocolitis, while the rather fastidious serovar *Salmonella* Typhisuis, a host restricted serovar, causes a variety of clinical conditions. Serovar Typhisuis was frequently isolated from cases of mild chronic diarrhea, necrotic colitis, caseous lymphadenopathy, histiocytic interstitial pneumonia and suppurative bronchopneumonia. Although they are very mild clinical manifestations, they are major contributors to animal wasting and loss of productivity [45]. During the years, however, a change in the prevalence of serovars is developing, some of which, although of minor economic importance today, they could become important in the future. Such serovars, isolated with increased frequency from pig feces and pig carcasses, are Dublin, Enteritidis, Copenhagen, Derby, Rissen, Newport, Anatum, Mikawasima, Mbandaka, Agona,

Infantis, Ohio, Brandenburg, Virchow, Livingstone and London [46,47]. The importance of these epidemiological observations in animals could fully be revealed, if similar epidemiological investigations were systematically performed in man, when digestive system problems are investigated.

Retrospective reviews of data reveal, however, that during the 50s and 60s *Salmonella Choleraesuis*, rarely isolated from pigs across Western Europe and elsewhere today, was the predominant virulent serovar [48,49]. Today, the prevalence of serovar Typhimurium and specifically the monophasic *S. Typhimurium*, although with a varied between countries prevalence, is consistently emerging as a health risk to consumers [50]. The monophasic serovar Typhimurium in 2011 was the third most frequently reported serovar from pigs, pork products, but also human hospitalized cases. EU reports between 2007 and 2009 showed serovars Typhimurium (63.1%) and Enteritidis (28.3%) by far the commonest serovars from human cases compared to serovars such as Derby (1.9%), Infantis (1.5%), Newport (0.8%) and others [51].

But, as the epidemiological importance of *Salmonella Choleraesuis* in pigs changed the past 50 years in favor of serovars Typhimurium and Enteritidis, less important serovars, Copenhagen, Derby [3,52], Infantis, Virchow and others [53], could become increasingly important replacing eventually the current ones. Thus, because human serovar prevalence follows the one in animals [54], surveillance programs set by the EFSA Panel on Biological Hazards (BIOHAZ) [27] view all *Salmonella* serovars as potential zoonotic pathogens [55,56]. By documenting the genus *Salmonella* as a potential zoonotic pathogen, states and producers are called to spend for consumer protection, through control of animal salmonellosis. Control of animal *Salmonella* infections reduces costs for treating human cases and losses from lost animal productivity and removal of contaminated products from the shelves. Successful control, however, depends on the recognition of existing risks helping the spreading of virulent serovars through animal and human populations, thus, the measures of inhibiting their action.

#### Risks during pork production

Pork production is affected by a variety of risk factors among which are quality of pig feed, number of subclinical carriers within a farm, conditions during transportation and lairage premises before slaughtering, slaughter line contamination by carrier animals, conditions during processing and retailing of pork products, conditions of handling pork products during catering and home-food preparation [32,57-59]. Apparently, the control of animal salmonellosis, thus reductions in human infections, is multifaceted and difficult in its implementation without collaboration between the various players and most importantly financial support from state authorities and farmers.



For understanding the way risks in pork production are minimized, one must understand how a pig becomes a *Salmonella* carrier maintaining the infecting serovar in the farm and the retailing. Pigs are infected via the fecal - oral route (feed-water) [32] and rarely via the respiratory tract [60]. The two most important factors for the establishment of a pig infection are the infectious dose and, as previously mentioned, the virulence of the infecting serovar [61]. In the presence of the two, the pathogen becomes established in the gastrointestinal tract and is excreted by the feces, mostly in the absence of clinical disease [62]. Asymptomatic carriers become an important risk to food safety either by intermittently shedding *Salmonella* or having it in several of their tissues and passing it to other stages of pork production [32]. In the farm's environment, under favorable temperature and humidity, some serovars survive and multiply for almost a year and others, such as choleraesuis, for more than 2 years [63,64]. Serovar survival in the farm puts at the risk susceptible farm, wild and cold-blooded animals. Animal subclinical infections, including pig infections, are contributing to the infection of man either by contact or infected food consumption. To avoid, therefore, this vicious cycle, having in mind human protection, one must control the pathogen from reaching its animal hosts. In the pig farm, the aim is eliminating factors promoting the maintenance of the pathogen within the farm, thus, the infection of susceptible animals either on the farm, during transportation, lairage, and slaughtering.

Some of the measures for lowering the risk to consumers are of low cost and easily implemented. Others are more costly or needing wider surveillance, thus depend on state intervention. Therefore, there is not "one control system" effective for controlling *Salmonella* in all the points of pork production neither is possible to aim and maintain a zero prevalence of the pork production system. When a state's economic situation permits, it should impose certified pork production for the entire food chain [65]. Otherwise, partially imposed measures become ineffective, thus money losers. State certified pork, promoting the concept "from farm to fork", a new concept in pig production, depends on the strict enforcement of certain guidelines. Such guidelines, firstly formulated by WHO in the 80s [66], are aiming at controlling the pathogen at the three most important stages of pork production; controlling *Salmonella* infection on the farm, called pre-harvest control, during lairage and slaughtering, called harvest control and during pork product processing and consumer handling, called post-harvest control.

Effective control of pig *Salmonella* infections for the benefit of the consumer depends on good knowledge of the risk factors in each of these three stages. Farmers and farm, transportation, and slaughterhouse workers are those best placed to prevent pork contamination and consumer infection. The first step for

promoting the concept "from farm to fork" in pork production is educating those involved in the meat industry on the measures needed for a safer pork product. This concept, internationally promoted through trade agreements and regulations, is the building block of Codex Alimentarius [21] inspiring to regulate the global food trade. Globalized food trade regulations, sounding sensible for the safety of consumers, could be the end of national food security if small national food producers are forced to close by inability to meet set safety rules. Open border trading unions, should be critically scrutinized by citizens, food producers, and ethical politicians. They may eventually realize that the best defence against the loss national food security is a safety, but state sponsored educational programs, educating those involved in meat production on the risks to safety at each production stage. Thus, below are briefly mentioned the most important risks helping the establishment of the pathogen in a host and the best available means of avoiding them at each stage of production.

#### Pre-harvest Control of *Salmonella* spp.

The risk of infection for the consumer of pork meat and products should be eliminated if pig infections were eliminated. Although "universal pathogens" cannot be eliminated, they can surely be controlled, if potential risk factors are effectively controlled. These risks are largely associated with pig feed, use of antibiotics, concurrent infections, the size of the herd, farm cleaning practices, floor type, the number of carrier pigs or other animals, such as rodents, birds and insects and their contact with healthy pigs [57-59,67]. Thus, farmers will promote safety if they are educated on how and where to intervene for risk reduction.

*Salmonella* serovars are usually introduced in a pig herd by subclinically infected replacement stock, pigs for fattening entering "open" herds, wild (rodents - birds) or domestic (cats) carrier animals entering the farm's environment [58,68-70] and even insects (flies) and dust mechanically transferring *Salmonella* serovars from neighboring contaminated environments [71]. However, almost half of pig infections (an estimated 46.7%) result in contaminated feed and water [72,73]. Thus, first aim should be the protection of feed and water from fecal contamination.

Feed stuffs are safe, when they are heated for a minimum of four minutes at temperatures above 85°C and when they maintain a moisture content of about 15%. Few feed mills can ensure such conditions, but even if they were ensured, feed stuffs should further be effectively protected from the feces of birds and rodents during cooling, storing and distribution [2,74]. Water should also be free of the pathogen. Water contamination is best avoided if it is supplied with water nipples and not bowls or drinking troughs exposed to fecal contamination [47,75]. Thus, at greater risk of infection are smaller farms or those of nations badly hit by unfavorable economic conditions forcing



farmers to cut costs, many times at the expense of feed quality.

Regardless of how a *Salmonella* serovar is introduced in a pig herd, infection will be established in the individual pig, if the pathogen adapts to the host's gut. Gut content is a good nutritional substrate for microbial multiplication, if also gut osmolarity, pH and mucin production are favorable. Colonization of the host's gut by the pathogen, thus pathogen survival, is favored by a low digestive tract acidity, inhibiting the multiplication of non-pathogenic microbes acting antagonistically to the establishment of *Salmonella* in the gut [76]. Liquid feeds, particularly fermented ones, produce lactic and acetic acids favoring the multiplication of non-pathogenic microbes. They, restricting the colonization of the gut by virulent serovars, also restrict pathogen survival [77,78]. Whey, cheaply available from the dairy industry [79] and non-pelleted coarse (particle size 903 µm) feed stuffs exhibit a significant protection against *Salmonella* [57,59, 80-83]. Feeds with a particle size 903 µm, compared to finely grounded ones (particle size 639 µm), do not only lower gastric pH, they also slow gastric passage [84,85] giving double protection against the pathogen; inhibiting the pathogens to colonize it and become established, but also minimizing its dissemination.

Dissemination of the pathogen to susceptible animals is further inhibited by the type of the farm and farm flooring type and the density of the pig population. Pigs from finishing farms are 2.5 times more likely to be infected compared to pigs from farrow-to-finish farms. In a farrow-to-finish farming system, there is restricted movement of animals, thus, a minimal risk of mixing healthy with subclinically infected pigs [47]. In a continuous flow system, the risks of infection increase each time weaners are introduced [59]. The same accumulative risk to infection is present when breeder herds keep sows for several years [24], eventually supplying other farms with undetected carrier animals. Seroprevalence among sows is twice as high that of finisher pigs (76.6 vs. 35.4% respectively) [47]. Hence, the rate of infection should increase if fattening pigs remain on contaminated premises for longer than the required time in the hope for a price improvement. This increases the chances of infection due to the spreading of the pathogen through carrier animals or mechanical transfer from older to younger stock. Apparently, an all in-all out system, allowing cleaning, disinfection and the use of sanitary gaps between batches of production, are significantly more effective in minimizing batch cross-infections compared to a continuous system [85].

Equally important is the stocking density. High stocking density statistically increases the risk of infection, because more animals come to contact with potential subclinical carriers. Enlargement of a herd for increasing production outputs, as is the case in "factory type of farming" [86,87], involves a larger

number of pig suppliers and a larger number of workers, both increasing the risk of pathogen introduction and dissemination [59,71,88].

In these farms, the type of flooring at holding boxes is another important risk factor. Slatted floors slow pathogen dissemination compared to solid or partially slatted floors. The first minimize the bacteriological load and are associated to lower seroprevalence [78]. Frequent emptying of the pit below the slatted floor during lactation reduces further the number of *Salmonella* positive pigs [81].

Therefore, there are various critical points at farm level for risk reduction, some of which are of no or low cost, like the above, but having a long term positive effect. The identification of critical points for interventions and their effectiveness depend, as already mentioned, on a farmer's knowledge to good management practices. Farmers having a family type pig farm are the usual losers from imposed costly regulations and their state's chosen indifference during recession times to their problems. Thus, left alone to face problems, they could benefit the most from education on *Salmonella* risk reductions. Their continuous education could be the least costly choice, but having the biggest positive political effect for a state. Continuous education of those involved in meat production of small national economies participating in free trade unions could at the very least sustain national meat production during a recession. If farmers understand how best they can restrict a pathogen's entrance in their farm and most importantly recognize the potential risk subclinical carriers pose to the health of animals and the consumer, they will protect their livelihood and national food security. Hence, the enforcement of strategies for minimizing or inhibiting the establishment of *Salmonella* pathogenic serovars on an individual host or farm depends greatly on knowledgeable farmers, who must be educated on tax payers' money, to safeguard the long-term national interests of food security.

#### Strategies for Restricting the Establishment of Pathogenic Serovars in Individual Pigs

Strategies for minimizing the establishment of the pathogen in a pig, continuously exploited by researchers, are useful if their costs are significantly lower than their benefits. These strategies are targeting the gut's defenses. They could work best if an effective vaccine were commercially available and protective against most of the pathogenic serovars [89]. A vaccine, used at all stages of pig production for best results, should not interfere with the serologic monitoring of a farm, when control programs are in effect [90]. In the worst economic situation, an effective vaccine for routinely vaccinating breeding stock and specifically sows, could prevent vertical transmission of the pathogen [91]. Attempts to commercially produce either attenuated or inactivated effective vaccines, and new technology vaccines, have never seized.



Experimentally, the best protection is observed with live attenuated vaccines. They produce better cellular immune response and mucosal IgA production [89,90] conferring good protection against host-specific serovars and to a lesser extent for non host-specific. Ineffective protection against non host-specific serovars, could, however, lead to a type of selective pressure promoting the spreading of serovars, having today minimal epidemiological importance, but becoming a future threat. They also run, under field conditions, the risk of virulence reversion and they show a reduced immune response against non-host specific serovars. They also need proper transportation and storage, safe handling, withholding of antimicrobial treatments before and after their administration and, of course, they may affect daily weight gain due to a brief pyrexia [92].

A safer and economic alternative to attenuated are inactivated vaccines [79], among which are homologous, thus herd-specific *Salmonella* vaccines. They significantly reduce fecal shedding, apparently reducing horizontal transmission [93], for a cost estimated at only \$0.85/pig [94]. They, however, offer, like attenuated, effective immunity for few serovars, allowing many others to become future threats. The problems from the use of attenuated and inactivated vaccines, favor the experimental exploitation of new technology vaccines [79]. Molecular vaccines are composed of selected virulence determinants common to many of the pathogenic serovars. Examples of such determinants are purified recombinant proteins, synthetic peptides or plasmid DNA. They show promising immune protection for most of the recognized pathogenic serovars [79]. They are also promising candidates for the production of Differentiating Infected from Vaccinated Animals (DIVA) vaccines, thus vaccines DIVA [95]. The last is a major advantage when serological screening of farms is used for their microbiological confirmation in control programs. DIVA vaccines could become major economic tools of animal protection helping economically smaller farmers to meet the demands of mandatory regulations or economically weak nations, affected by border free trade of animal products, to successfully control this pathogen. Until they are commercially produced, thus cost effective, the well-informed farmer has other alternatives for risk reduction. Undoubtedly, a vaccine effective against most of the *Salmonella* serovars, protecting most of the susceptible animals, could gradually minimize the economic and political importance of *Salmonella* spp. Scientists work toward a successful, universally effective vaccine, which could help in the control of farm animal infections, but it cannot be a panacea against the pathogen. With or without a vaccine, the nature of the pathogen and its natural distribution show that continuous and systematic surveillance of its serovars in food production is a necessity.

Feed acidification by the addition of volatile fatty acids and/or the addition of whey [58,96,97] does not

only improve feed conversion and pig growth, but also inhibits pathogen multiplication. A diet having, for the duration of the fattening period, 0.4% lactic and 0.4% formic acids was found to significantly reduce the seroprevalence of *Salmonella* [98,99]. Its drawback is the rising of costs by 2.49 euros per pig [100] and the possible risks from the development of acid tolerant clones of *Salmonella* [101] and clones becoming undetected [102] during field investigations. Exploited cheaper natural alternatives for increasing the defense mechanisms against *Salmonella* infections are the addition in feed of 10% dried sugar beet pulp or the feeding of silage having low concentrations of ammonia, basic amino acids, and biogenous amines [103]. They are also more cost effective for smaller pig herds if these byproducts are locally available from the agricultural industries.

Alternatively, competitive exclusion of the pathogen in the gut is high in the scientific agent at recent times for the reduction of *Salmonella* prevalence. Specifically, the attachment and/or multiplication of *Salmonella* spp. on the gut surface is restricted, either by the multiplication of a non-pathogenic microflora or by the exogenous introduction of such microflora through the feeding of pre- and probiotics. Pre- and probiotics take over gut receptor sites, restricting their access to pathogenic bacteria, thus inhibiting attachment, survival and multiplication of potential pathogens. They also produce antibiotic-like substances or deplete gut substrates essential to pathogen's survival and multiplication. Thus, they exhibit a nutritional and sanitary effect, becoming a promising and attractive alternative to the in-feed use of antibiotics [104]. Their protective role increases further when production practices in a particular farm are of high standards. High farming standards maintained by knowledgeable farmers, protect the viable counts of the fed beneficial microorganisms, which are more effective if they are pig associated [105]. Beneficial bacteria with significant anti-bacterial activity against *Salmonella* are species of *Streptococcus* and *Lactobacillus*, such as *Streptococcus gallolyticus* subsp. *gallolyticus*, *Streptococcus alactolyticus*, *Lactobacillus reuteri*, *Lactobacillus delbrueckii*, *Lactobacillus animalis*, *Lactobacillus salivarius*, *Lactobacillus ruminis* and *Lactobacillus murinus* [106]. Nevertheless, although experimental trials give promising results, more research is needed before they are used as cost-effective treatments for pig salmonellosis [79,105].

Regardless of the means implemented for reducing the risks of infection, the general health of a pig is a critical determinant of its resistance to *Salmonella* infection. Concurrent infections, such as porcine reproductive and respiratory syndrome, correlate positively with higher *Salmonella* prevalence [58,81]. The same is observed with the profuse use of antimicrobial agents to prevent or control various other pig infections, but helping the development of antibiotic-resistant *Salmonella* serovars [107,108]. Pigs,



fed a combination of chlortetracycline, procaine penicillin, and sulphamethazine during finishing, were found four times more seropositive to *Salmonella* spp. than those using a probiotic, as a preventive measure [80,103,107]. Apparently, the strategies for minimizing the risk of a pathogenic serovar are analogous to each farmer's knowledge and attitude.

This farmer must know that salmonellosis, a multi-factorial infection, requires a multi-level approach for its control between and within herds, as well as between and within pigs [2,74]. Therefore, on-farm *Salmonella* control is a major part of the integrated quality control Systems a farmer should know and use for successfully protecting the public from *Salmonella* spp. [58]. The ultimate goal of the pork industry, regardless of size of production, should be the prevention of *Salmonella* serovars entering pig herds, thus the food chain. Measures improving biosecurity, such as the routine testing of new entries, the lowering of stocking densities and the undertaking of beneficial management practices, protect also from many other important pathogens [109,110], but are most effective in the hands of well-informed pig farmers and farm, transportation and slaughterhouse workers. These people are the key to reductions in product contamination, thus increased consumer's safety. None, however, of these measures are without actual financial restraints and limitations. Thus, elimination or minimization of pig infections is impossible without a generous state investment toward the education of farmers and all others involved in meat and meat products production. If this important state contribution and responsibility are neglected, as is apparent in economic recessions, free international commerce will overtake national production, thus the control of national food security.

Farm production is the supplier to business of food product development and distribution. Its extinction will affect jobs and cultural eating habits politically affecting the wellbeing of future generations. Such qualitative costs cannot be precisely calculated for small national economies and are not in the agenda of the robust economies of large trading areas, aiming in expending. Farmers of large trading unions remain also outside a small state's reach for action in cases of broken rules in other stages of production, supplying ready for consumption pork products. Pork products from common commerce areas are offered certified as ready for consumption, thus not routinely investigated for safety in the receiving market. They will be investigated only if public health problems are traced back to a specific pork product. Thus, commercial agreements in border free trading areas, favor the influential makers of safety rules disadvantaging in some ways small national producers of smaller economies needing to comply with the agreed rules.

#### Harvest Control of *Samonella* spp.

The effective elimination or minimization of harvest carcass contamination depends mainly on

rules protecting the welfare of animals and the proper training of slaughterhouse workers. Stress during transportation of *Salmonella* carrier pigs increases the number of infected pigs. Catecholamines, released during stress, decrease gastric acid production, thus the acidity of the digestive system, helping the survival and multiplication of *Salmonella* and the increasing of peristaltic intestinal movement, thus excretion of *Salmonella* spp. in the environment [111]. Prolonged transportation, under stressful conditions, increases the risk of new pig infections, thus of carcass contamination during slaughtering and processing [112,113]. At this stage, *Salmonella*-free pigs could become carriers, if mixed with existing carriers or sheltered in contaminated premises or transferred on trucks not cleaned and disinfected properly between uses [2]. Withholding of feed for 12-18 h maximum before transport reduces defecation, thus fecal contamination of premises, new carriers and eventually carcass contamination [114]. Exceeding, however, this time of fasting may have the reverse effect [115].

Evidence has shown that, a *Salmonella*-contaminated lairage area is a greater risk to carcass contamination than an infected gut or lymph nodes [116]. Thus, cleaning and disinfection of lairage premises, although it may not completely eliminate contamination [117], it minimizes the risk to it. This risk is further minimized if animals are housed on slatted flooring clean from feces. The importance of lairage premises in carcass contamination demands continuous Hazard Analysis Critical Control Point (HACCP) monitoring [116]. Regular qualitative microbial monitoring of these premises shows the effectiveness of cleansing and disinfection methods [2]. The safety of these premises is further ensured when pigs from high-risk herds are transported, housed and slaughtered after pigs from low-risk herds [118].

The importance of transportation and lairage premises on carcass contamination is revealed in investigations comparing isolates from carcasses before evisceration with those in tissues. *Salmonella* isolates present before evisceration differed from those isolated from the mandibular lymph nodes, evidently presumed that carcass contamination originates mainly from lairage [110,119] and the residual microflora on slaughtering equipment (e.g. carcass splitter) [120-122]. Nevertheless, evisceration and incision of the mandibular lymph nodes are also sources of carcass contamination [123]. Thus, carcass decontamination is the only safe means to either eliminate or effectively reduce carcass cross-contamination, through careless handling, dripping of contaminated water, residual microflora of equipment or evidence of bacteria survival during scalding [124-127]. The temperature of the scalding water or the increased presence of organic matter increases the risk of carcass contamination. Singeing at 1,300-1,500°C is also reducing surface carcass contamination, but it is not very effective against *Salmonella* present in hair



follicles [114]. Regardless of actual source for carcass contamination by *Salmonella*, decontamination is effective, if hygiene measures in a slaughterhouse, aiming to minimize the risk from shedders at this stage are meticulously enforced at all critical control points [128]. This protection largely depends on knowledgeable and dedicated slaughterhouse workers handling animals, carcasses and effectively performing regular decontamination of premises.

Three methods of decontamination are applied around the world: (1) Application of hot-water at a temperature of 80°C for 15 s, (2) Hand-held steam vacuum deactivating bacteria in areas of the carcass showing visible fecal contamination and (3) Use of steam ultrasound system killing bacteria at a steam temperature of 130°C and a 30-40 kHz ultrasound [129,130]. Each one of these methods has advantages and disadvantages, and all require an enhancement of their effect by cooling. After decontamination, carcasses must remain in the cooling room for more than 50 h before processing and retailing, because low temperatures and the decline in water activity due to air flow in the cooling room, have a killing effect against *Salmonella* [131].

However, which decontamination method or other interventions during slaughtering are chosen depends on the availability of capital, the cost of energy input, the price of water and the cost of labor [130]. Decontamination costs are calculated to about 1-2% of the total plant costs or €0.19-€0.26 per carcass [129], with the highest cost attributed to hot water decontamination and the lower when a steam vacuum is used [130]. Although costs appear low, smaller facilities or facilities in low-income communities and states cannot, perhaps, afford to have even this low cost added to costs of *Salmonella* control. On the other hand, those having the financial resources can further drop costs of harvest control of *Salmonella*, by selecting and slaughtering serologically negative animals separately from serologically positive. This strategy is low cost when a pre-harvest control program is in effect. Regular surveillance and farm record keeping helps in choosing the right slaughterhouse or manage the time of slaughtering suspect animals from serologically positive farms [6].

The accuracy of serology depends on the sensitivity of the chosen method and specifically the prevalent serovars in an investigated area. It is dependent on the antigenic relatedness of serovars [132] and the site (tissue) colonized by the pathogen [133], but it is a useful tool if carefully chosen for surveillance. Therefore, records kept during surveillance could be used to choose the most effective slaughtering strategy. Thus, costs incurring during pre-harvest and harvest control of *Salmonella* are consolidated, if the two sectors exchange vital information having in mind consumer safety. The benefits to both are even larger if protection measures are expended to include other microorganisms important for public health or important to other stages of pork processing.

### Post-harvest Control of *Salmonella* spp.

A carcass free of important pathogens leaving the slaughterhouse ensures safety of pork products. Manufacturing and retailing of *Salmonella*-free pork products largely depend on the quality of raw materials. This quality is enhanced by the storing of products at temperatures below 7°C, which are inhibiting the growth of *Salmonella*. Further decontamination is also possible by acidification of products, fermentation, curing and smoking, but they are most effective, if the raw material is either *Salmonella* free or having very small loads of pathogens, in general [2]. At post-harvest, there isn't much flexibility for further increasing safety if the raw material is coming from high-risk farms or slaughter premises.

Thus, consumer safety at all stages of production depends on the status of a pig when leaving the farm or of a carcass when leaving the abattoir. A state committed to the safety of its citizens must effectively intervene at the farm first protecting the food chain and the consumer. This intervention will be against its national interest, if it is based only on punishments, because foreign product suppliers, protected by agreements for free commerce, sale their products on their national certification rules and they are responsible for punishing their farmers. Therefore, the national interest of small economies is best served when punishments come together with incentives for their national farmers producing affordable consumer products of competitive quality. However, incentives have an economic cost and punishments multiple political effects, regardless if they aim farmers or retailers.

Retailers are directly related to consumers and, if there is not a reliable tracing system to connect their product with its specific primary source, punishments to regulate retailers are disadvantaging national retail trade. Thus, again international suppliers of ready to consume pork products in border free commerce areas are advantaged compared to national retailers. Furthermore, tracing the problems at retailing to their actual source, when comes to products from other nations, is of no use in ensuring food safety and quality, as various food scandals have shown [134-136]. These types of investigations do not prevent or improve human *Salmonella* prevalence if punishments and incentives in border free trade are not centrally regulated and financed regardless of the size of business. Because they are left to national agencies of individual states, they should look firstly after the welfare and economic wellbeing of their national producers and resist the pressures of trading partners. Partners are imported competition, which seems initially as benefiting consumers of low income, but after extermination of national competitors they will regulate the food market, and the rules applied according to their interests.

Enforcement of HACCP rules through unrealistic punishments without state paid incentives, when



consumer demand decreases, as in an economic recession, will either close smaller producers in favor of larger ones [18] or the final product will not be of the quality regulations demand [137]. Both come with wide national political consequences and economic problems, which should be well considered by individual states in unions promoting commerce between open borders, and in the name of consumer safety, impose on individual states mandatory regulations not considering their economic ability to enforce them. Thus, what is the impact of an economic recession on the control of pig salmonellosis in economically weak states trading under border free conditions?

#### **Outcome of Synergy between Pig *Salmonella* spp. Infections, Border Free Markets and Economic Recessions**

Evidently, the main obstacles to effectively control bacterial zoonoses, such as salmonellosis, are financial rather than scientific or technical. Knowledge and technology are now widely available to producers, regardless of location or size of the facility they manage. They are summarized in WHO regulations [66], trade union regulations [7], Codex Alimentarius [21] and, perhaps, other international agreements to come soon. What is not available to all in enforcing codes and regulations is capital to purchase, replace and maintain technology and thus knowledge. Low consumption lowers prices, thus a producer's income and his ability to use knowledge and technology for the benefit of consumers. Low product and higher energy costs and prices of feed ingredients increasing the cost for fattening pigs and breeders are decreasing the profits of farmers. Between 2007 and 2008 feeding costs rose due to global price increases in raw materials and remain high, adversely affecting intensive pig farming [6]. Lower feed prices are achieved only by big producers buying in bulk for privately owned feed mills and decontamination units. Smaller producers are subjected to fluctuating prices. If they are forced to comply with regulations controlling the emergence and spreading of pathogens, such as *Salmonella* spp. without the benefit of state incentives, especially during economic recessions, they will close down. The same will result from the high prices of privatized energy sources and water. They are currently on the pressure of privatization across the world including the EU in the name of free trade and globalization eventually adding to the price of food [19,138]. A beneficial state incentive could be to fight for lower prices of energy (electricity and petrol) and water. Those deciding upon these issues when participating in unelected forums and consortiums, as are most of the EU agencies, should keep in mind that the future of their national food security may be at stake [137]. State action should consider the long-term national and livestock economic interests, agricultural security policy, food national security and show sensitivities about consumer safety not only through food safety,

but also affordable food availability [20,139]. In the long term, international conditions, developing in a chaotic international political system shadowing sinister actions, disadvantage small nations, which could eventually lose not only their national production systems for the benefit of their nationals, but also their commercial existence, if their politicians give into promises of foreign to them authorities.

Economics, financial inputs/outputs, couldn't but influence the size and the quality of interventions promoting food safety. Choices made must be cost effective under a highly competitive consumer environment demanded by free trade and international political interests. In an open trade market, losers are those unable, under an economic crisis like the present, to effectively implement control measures for securing their national interests. They are small, local meat producers, having high production costs and competing with lower prices offered by international competitors, facing extinction. These competitors, perhaps, highly helped through state incentives, compete unequally for markets in smaller states unable to subsidize the safety of their pork production. If there is a time, a state should adopt a strategy of incentives for maintaining a low *Salmonella* prevalence or better product quality; that is when consumers restrict their spending affecting the national industry's income. At such times, national authorities should view the control of pathogens, such as *Salmonella* spp., as a rather political issue involving the consumers' health and price satisfaction, but also the economic safety of local producers and distributors. Such a dual purpose objective will be successful only through incentives promoting the production of *Salmonella*-free pork and through them pork and pork products free of other important microbes at affordable prices. One important additional reason for such a strategy is that pork meat (and poultry) is, compared to beef meat, more affordable for people, thus its safety and retailing price affects a larger number of people.

Any economic recession poses a challenge to the pork industry worldwide, but mostly for those struggling to produce high quality products at the lowest possible cost. The need to cut costs is evident even in states such as Denmark, having as high priority consumer safety, but also needing to cut the costs for ensuring this safety. Denmark cut these costs from \$14 million per annum [140-142] to \$8.5 million [100], but at a time previous control efforts had lowered the prevalence of the pathogen [6]. When the prevalence of such a pathogen is effectively lowered, the benefits are lower than the costs, thus costs are cut and states minimize their intervention on behalf of the consumer. Thus, the current border free market conditions in the EU do not favor centrally paid help for individual state food safety, because economic and politically robust member states have already increased the safety of their national products. This is why regulatory actions, although mandatory and centrally decided,



are left on the hands of only those who afford their enforcement, thus benefit free commerce. Will they effectively protect the health of consumers, when they eliminate smaller national competitors? This question will correctly be answered, perhaps, in many decades from now.

At times of a recession those unable to support their farmers are small economies of wide border free trading areas, such as the EU. Some Member States, such as Denmark and the Scandinavian countries, in particular Sweden and Finland, have extensively used incentives for monitoring *Salmonella* in pig farms. By choosing this strategy, they aim not only in maintaining a low *Salmonella* prevalence, but also further reducing its prevalence on low risk farms promoting internationally their products taking advantage of border free trade. Similar programs, but with smaller state support, are enforced in the UK, France, Germany, Spain and Italy, all pig meat and meat products producers.

Eastern European countries, however, do not have a consistent history of monitoring and managing *Salmonella* infections perhaps due to continuous economic hardships. They are, thus, good examples of the negative effects economic recessions have on the promotion of nationally produced food under the pressures of free trade. They, economically unable to give incentives, e.g. paid testing of animals before an effective control program is initiated, are leaving the safety of products in the hands of their farmers. They are, however, in the name of free trade, obligated to punish their farmers and retailers when unsafe products reach consumers.

Thus, *Salmonella* control at the present economic and political international environment, regardless of the stage of production, is rather left to the initiative of producers. They must see the benefits and spend accordingly. This is why they should keep in mind that costs for reducing potential hazards, such as *Salmonella*, help also in the reduction of other pathogens of public health importance or product quality [142]. Thus, even small, local producers must, for protecting their future and the interest of future national consumer generations, focus on specific, low cost production weaknesses, to cost-effectively improve pork safety, hence keep their clients until consumption and prices increase. They should remember that *Salmonella* control measures at the pre-harvest stage of production increase the production of pork by about 2.9 pounds per square foot of finisher space (Gorton 2000), increase safety at the harvest stage and help their nation to lower human and animal treatment costs. Thus, although state incentives help local producers during economic recessions and punishments are closing them down, their interests are best served, if they willingly enforce at least those measures with the smallest cost [143] demanding at the very minimum from their national governments free, continuous education. A knowledgeable farmer is a contributor to a consumers' safety.

## Conclusions

The thousands of serovars, their varied pathogenicity for the various animal species and the difficulties to stimulate effective vaccinal immunity for most of the potential pathogenic serovars, are the main contributors to the economic and political importance of *Salmonella* spp.

This pathogen and similar others are the reasons consumers of border free trading areas demand certification of food safety. They demand it through political pressure on their national governments, which on conditions of free trade use their power to formulate the nature of cross-border regulations. Under free trade, economically robust nations couldn't but look after their trade expansion. Mandatory regulations for the safety of food products of animal origin, although protective for many millions of consumers, are also indirect means of promoting the national interests of powerful nations.

*Salmonella* spp. pig infections successfully controlled only if surveillance and risk reduction are aiming at pre-harvest, harvest, and post-harvest stages are infections that could be used for consumer product promotions or trade restrictions serving national interests. Therefore, they need taxpayers' money for control and national trade protection. The stage of production needing the highest money input of *Salmonella* spp. control is the pre-harvest (at the farm). A pig farmer, who has invested in pig feed, buildings, medications, equipment and personal work, unable to meet his financial responsibilities to others and the state due to product price reductions, but higher costs of production, cannot but close its premises in favor of his competitors and against the national food security.

Punishments, low consumption lowering product prices, high energy inputs and even imposed higher income and property taxes extinct national producers leaving their market share to international giants. They are initially offering lower, affordable prices and regulated consumer safety, but no one can really guaranty the same benefits to consumers when local competition is extinct.

The outcome of synergy between pig salmonellosis, free trade and economic recessions in a globalized market of food products is now developing. From the various food safety scandals, the massive increases in individual pig farm outputs (factory pig farming) and the uncontrollable quality (true or false) of available public information (safe - unsafe food), one could conclude that future food issues will be used for or against national interests.

Those able to bear the costs of promotion and food safety is included in promotions, either by truly regulating or effectively hiding their problems will easily overtake foreign consumer markets. All others will leave their national interests exposed to free trade. Can an economically weak nation resist the power of globalization in commerce, thus globalized food problems?



This is a very political question left for answering to those involved in each nation's affairs. Among them are those businessmen inspiring to become larger and local governing bodies and lobbies giving in to either pressures or bribes. Big nations and their business favored by globalization will increasingly use safety of trading food products to promote their national interests. With the loss of the primary food producing sector in smaller nations, one should expect loss of the food processing sector and eventually loss of cultural eating habits.

Thus, regulations such as those forming Codex Alimentarius, attempted from ancient times to become a tool for dominance, has emerged today as a very powerful globalized tool of food safety control, thus, food dominance. It, and other international trade regulations to come, appear rather codes of promoting globalized trading interest, than codes protecting individual consumers or saving cultural eating habits. They, by promoting factory farming products as safer and affordable, indirectly contribute to the extinction of farming communities, thus increases in urbanization and eventually to consumer total dependence on mass food production, food promised quality and promised lower food prices. Recessions can't but affect adversely all the above, thus billions of urbanized free trade dependant peoples. Thus, pathogens, such as *Salmonella* spp., could, in the name of safety, easily regulate the behavior of recession hit states on behalf of international business interests.

#### Authors' Contributions

GE collected information and prepared the initial version of the manuscript as part of the literature review of her PhD thesis work, concerning pig salmonellosis. ARB, SK and GC as principal supervisor and co-guides of the PhD Study incorporated valuable suggestions for the conception, planning and correction of the manuscript. All authors read and approved the final manuscript.

#### Competing Interests

The authors declare that they have no competing interests.

#### References

- Acheson, D.W. and Keusch, G.T. (1997) Intestinal infections with *Salmonella* and *Yersinia* species. In: LaMont, J.T. and editor. *Gastrointestinal Infections: Diagnosis and Management*. Marcel Dekker Inc., New York. p149-189.
- Lo Fo Wong, D.M.A., Hald, T., van der Wolf, P.J. and Swanenburg, M. (2002) Epidemiology and control measures for *Salmonella* in pigs and pork. *Livest. Prod. Sci.*, 76: 215-222.
- EFSA (European Food Safety Authority). (2010a) The community summary report on trends and sources of zoonoses, zoonotic agents and food-borne outbreaks in the European union in 2008. *EFSA J.*, 8(1): 1496, 1-288.
- Galanis, E., Lo Fo Wong, D.M.A., Patrick, M.E., Binsztein, N., Cieslik, A., Chalermchaikit, T., Aidara-Kane, A., Ellis, A., Angulo, F.J. and Wegener, H.C. (2006) Web-based surveillance and global *Salmonella* distribution, 2000-2002. *Emerg. Infect. Dis.*, 12(13): 381-388.
- Su, L.H., Wu, T.L. and Chiu, C.H. (2014) Decline of *Salmonella enterica* serotype Choleraesuis infections, Taiwan [letter]. *Emerg. Infect. Dis.* Available from: <http://www.doi.org/10.3201/eid2004.130240> Accessed on 30-11-2014.
- FCC, Food Control Consultants Ltd Consortium. (2010) Analysis of the costs and benefits of setting a target for the reduction of *Salmonella* in slaughter pigs for European Commission Health and Consumers Directorate-General SANCO/2008/E2/036 Final Report. p1-198.
- EFSA (European Food Safety Authority) and ECDC (European Centre for Disease Prevention and Control). (2014) The European Union Summary Report on Trends and Sources of Zoonoses, Zoonotic Agents and Food-borne Outbreaks in 2012. *EFSA J.*, 12(2): 3547, 312.
- Majowicz, S.E., Musto, J., Scallan, E., Angulo, F.J., Kirk, M., O'Brien, S.J., Jones, T.F., Fazil, A. and Hoekstra, R.M. (2010) The global burden of nontyphoidal *Salmonella* gastroenteritis. *Clin. Infect. Dis.*, 50: 882-889.
- FCC, Food Control Consultants Ltd Consortium. (2011) Analysis of the costs and benefits of setting a target for the reduction of *Salmonella* in breeding pigs for European Commission Health and Consumers Directorate-General SANCO/2008/E2/056 Final Report. p1-91.
- Scharff, R.L. (2012) Economic burden from health losses due to foodborne illnesses in the United States. *J. Food Protect.*, 75: 123-131.
- Mousing, J., Thode Jensen, P., Halgaard, C., Bager, F., Feld, N., Nielsen, B., Nielsen, J.P. and Bech-Nielsen, S. (1997) Nationwide *Salmonella enterica* surveillance and control in Danish slaughter swine herds. *Prev. Vet. Med.*, 29(4): 247-261.
- Davies, P.R., Funk, J.A., Morrow, W.E.M. (1999) Fecal shedding of *Salmonella* by a cohort of finishing pigs in North Carolina. *Swine Health Prod.*, 7: 231-234.
- SANCO Workshop on *Salmonella* Control in Pigs 26 February 2009. Available from: [http://www.ec.europa.eu/food/food/biosafety/salmonella/other\\_act\\_en.htm](http://www.ec.europa.eu/food/food/biosafety/salmonella/other_act_en.htm). Accessed on 30-11-2014.
- EC Commission Regulation No 2160/2003 of the European Parliament and of the Council of 17 November 2003 on the control of *Salmonella* and other specified food-borne zoonotic agents. *Official J. Eur. Union*, L 325:1-15.
- EC Commission Regulation No 2073/2005 of November 2005 on microbiological criteria for foodstuffs. *Official J. Eur. Union* L338: 1-26.
- EC Commission Regulation No 1441/2007 of 5 December 2007 amending Regulation (EC) No 2073/2005 on microbiological criteria for foodstuffs. *Official J. Eur. Union* L322: 1-12.
- Hossain, N., Byrne, B., Campbell, A., Harrison, E., McKinley, B. and Shah P. (2011) The impact of the global economic downturn on communities and poverty in the UK. London: Institute of Fiscal Studies; OpenURL. Available from: <http://www.jrf.org.uk/sites/files/jrf/experiences-of-economic-downturn-full.pdf>. Accessed on 30-11-2014.
- Centre for Retail Research. (2014) Available from: <http://www.retailresearch.org/whosgonebust.php>. Accessed on 30-11-2014.
- The Social Justice Committee (SJC). (2003) Water, Land and Labour: The Impacts of Forced Privatization in Vulnerable Communities. Halifax Initiative Coalition. Available from: [http://www.s-j-c.net/main/english/images/stories/water\\_land\\_labour.pdf](http://www.s-j-c.net/main/english/images/stories/water_land_labour.pdf). Accessed on 30-11-2014.
- von Braun, J. and E. Diaz-Bonilla, editors. (2008) *Globalization of Food and Agriculture and the Poor*. New Delhi: Oxford University Press.
- Winickoff, D.E. and Bushey, D.M. (2010) Science and power in global food regulation: The rise of the codex alimentarius. *Sci. Technol. Hum. Values*, 35: 356-381.
- EFSA (European Food Safety Authority). (2012a) Scientific report of efsa and ECDC. The European union summary



- report on trends and sources of zoonoses, zoonotic agents and food-borne outbreaks in 2010. *EFSA J.*, 10(3): 2597.
23. King, R.P., Ge Backus, B.C. and van der Gaag, M.A. (2007) Incentive systems for food quality control with repeated deliveries: *Salmonella* control in pork production. *Eur. Rev. Agric. Econ.*, 34: 81-104.
  24. EFSA (European Food Safety Authority). (2010b) Scientific opinion on a quantitative microbiological risk assessment of *Salmonella* in slaughter and breeder pigs EFSA panel on biological hazards (BIOHAZ). *EFSAJ.*, 8(4): 1547.
  25. Prendergast, D.M., Duggan, S.J., Gonzales-Barron, U., Fanning, S., Butler, F., Cormican, M. and Duffy, G. (2009) Prevalence, numbers and characterizations of *Salmonella* spp. on Irish retail pork. *Int. J. Food Microbiol.*, 131: 233-239.
  26. EFSA (European Food Safety Authority). (2008a) Scientific opinion of the panel on biological hazards on a request from the European commission on a quantitative microbiological risk assessment on *Salmonella* in meat: Source attribution for human salmonellosis from meat. *EFSAJ.*, 6(2): 1-32.
  27. EFSA (European Food Safety Authority). (2013) Scientific report of EFSA and ECDC. The European union summary report on trends and sources of zoonoses, zoonotic agents and food-borne outbreaks in 2011. *EFSAJ.*, 11(4): 3129.
  28. Veterinary Laboratories Agency. (2010) Quantitative microbiological risk assessment on *Salmonella* in slaughter pigs and breeder pigs: Final Report. p1-413.
  29. AAFP (American Academy of Family Physicians). (2009) National Survey of Family Doctors Shows Recession Takes Startling Toll on Patients. Available from: <http://www.aafp.org/media-center/releases-statements/all/2009/nationalsurvey-familydoctors-recession.html>. Accessed on 30-11-2014.
  30. Sussman, J.B., Halasyamani, L.K. and Davis, M.M. (2010) Hospitals during recession and recovery: Vulnerable institutions and quality at risk. *J. Hosp. Med.*, 5: 302-305.
  31. Helms, M., Ethelberg, S. and Molbak, K. (2005) International *Salmonella* typhimurium DT104 infections, 1992-2001. *Emerg. Infect. Dis.*, 11: 859-867.
  32. Boyen, F., Haesebrouck, F., Maes, D., Van Immerseel, F., Ducatelle, R. and Pasmans, F. (2008) Non-typhoidal *Salmonella* infections in pigs: A closer look at epidemiology, pathogenesis and control. *Vet. Microbiol.*, 130: 1-19.
  33. EFSA (European Food Safety Authority). (2009) Joint opinion on antimicrobial resistance (AMR) focused on zoonotic infections. *EFSAJ.*, 7(11): 1372.
  34. EFSA (European Food Safety Authority). (2012b) EFSA panel on biological hazards (BIOHAZ). Scientific opinion on an estimation of the public health impact of setting a new target for the reduction of *Salmonella* in turkeys. *EFSAJ.*, 10(4): 2616, 89.
  35. Lo Fo Wong, D.M.A. and Hald, T. (2000) *Salmonella* in pork (SALINPORK): Preharvest and Harvest Control Options based on Epidemiological, Diagnostic and Economic Research. Final Report, Contract No: FAIR1 CT95-0400. p1-251.
  36. Gorton, S.J., Kliebensten, J., Beran, G. and Baum D. (2000) Economic analysis of *Salmonella* impacts on swine herds. Staff General Research Papers, Iowa State University, Department of Economics ASL-R1702.
  37. McNamara, P.E., Liu, X. and Miller, G.Y. (2003) The Costs of Human Salmonellosis Attributable to Pork: A Stochastic Farm-to-Fork Analysis. Paper prepared for presentation at the American Agricultural Economics Association Annual Meeting, Montreal, Canada, July 27-30, 2003.
  38. Roberts, J.A., Cumberland, P., Sockett, P.N., Wheeler, J., Rodrigues, L.C., Sethi, D. and Roderick, P.J. (2010) The study of infectious intestinal disease in England: Socio-economic impact. *Epidemiol. Infect.*, 130: 1-11.
  39. Lin-Hui, S. and Cheng-Hsun, C. (2007) *Salmonella*: Clinical importance and evolution of nomenclature. *Chang Gung Med. J.*, 30: 210-219.
  40. Fedorka, P.J., Cray, T., Gray, J.T. and Wray, C. (2000) *Salmonella* infections in pigs. In: Wray, C. and Wray A, editors. *Salmonella* in Domestic Animals. CABI Publishing, New York. 191-208.
  41. Kingsley, R. and Baumler, A.J. (2000) Host adaptation and the emergence of infectious disease: The *Salmonella* paradigm. *Mol. Microbiol.*, 36: 1006-1014.
  42. Evangelopoulou, G., Kritas, S., Govaris, A. and Burriel, A.R. (2013) Animal salmonellosis: A brief review of "host adaptation and host specificity" of *Salmonella* spp. *Vet. World*, 6(10): 703-708.
  43. Clarke, R.C. and Gyles, C.L. (1993) *Salmonella*. In: Gyles, C.L. and Thoen, C.O., editors. *Pathogenesis of Bacterial Infections in Animals*. 2<sup>nd</sup> ed. Iowa State University Press, Ames, Iowa. p133-153.
  44. Uzzau, S., Brown, D.J., Wallis, T., Rubino, S., Leori, G., Bernard, S., Casadesu, J., Platt, D.J. and Olsen, J.E. (2000) Host adapted serotypes of *Salmonella enteric*. *Epidemiol. Infect.*, 125(2): 229-255.
  45. Griffith, R.W., Schwartz, K.J. and Meyerholz, D.K. (2006) *Salmonella*. In: Straw, B., Zimmerman, J.J., D'Allaire, S. and Taylor, D.J., editors. *Diseases of Swine*. 9<sup>th</sup> ed. Blackwell Publishing, Ames, Iowa. p739-754.
  46. Botteldoorn, N., Heyndrickx, M., Rijpens, N., Grijspeerd, K. and Herman, L. (2003) *Salmonella* on pig carcasses: Positive pigs and cross contamination in the slaughterhouse. *J. Appl. Microbiol.*, 95(5): 891-903.
  47. Vico, J.P., Rol, I., Garrido, V., San Roma, N.B., Grillo, M.J. and Mainer-Jaime, R.C. (2011) Salmonellosis in finishing pigs in Spain: Prevalence, antimicrobial agent susceptibilities, and risk factor analysis. *J. Food Protect.*, 74(7): 1070-1078.
  48. EFSA (European Food Safety Authority). (2006a) Opinion of the scientific panel on biological hazards on the request from the commission related to "risk assessment and mitigation options of *Salmonella* in pig production". *EFSAJ.*, 3(1): 1-131.
  49. Mueller-Dobies, D., McLaren, I., Weaver, J. and Davies, R.H. (2011) A study of the distribution of *Salmonella* serovars in an integrated pig company. Proceedings Book, 9<sup>th</sup> International Conference on the Epidemiology and Control of Biological, Chemical and Physical Hazards in Pigs and Pork. 19-22 June 2011. Maastricht, The Netherlands.
  50. Hauser, E., Tietze, E., Helmuth, R., Junker, E., Blank, K., Prager, R., Rabsch, W., Appel, B., Fruth, A. and Malorny B. (2010) Pork contaminated with *Salmonella enterica* serovar 4,[5],12:i:-, an emerging health risk for humans. *Appl. Environ. Microbiol.*, 76(14): 4601-4610.
  51. Pires, S.M., de Kneeg, L. and Hald, T. (2011) Scientific/ Technical Report Submitted to EFSA: Estimation of the Relative Contribution of Different Food and Animal Sources to Human *Salmonella* Infections in the European Union. National Food Institute, Technical University of Denmark.
  52. EFSA (European Food Safety Authority). (2008b) Report of the task force on zoonoses data collection on the analysis of the baseline survey on the prevalence of *Salmonella* in slaughter pigs in the EU, 2006-2007. Part A: *Salmonella* prevalence estimates. *EFSAJ.*, 135: 1-111.
  53. Methner, U., Rammner, N., Fehlhaber, K. and Rosler, U. (2011) *Salmonella* status of pigs at slaughter- Bacteriological and serological analysis. *Int. J. Food Microbiol.*, 151(1): 15-20.
  54. EFSA (European Food Safety Authority). (2011) Analysis of the baseline survey on the prevalence of *Salmonella* in holdings with breeding pigs, in the EU, 2008. Part B: Factors associated with *Salmonella* pen positivity. *EFSAJ.*, 9(7): 2329.
  55. Wollin, R. (2007) A study on invasiveness of different *Salmonella* serovars based on analysis of the enter-net database. *Euro. Surveill.*, 12(39): 3275.
  56. Volf, J., Havlickova, H., Hradecka, H., Ondrackova, P., Matiasovic, J., Faldyna, M. and Rychlik, I. (2010)



- Epidemiology and interaction of *Salmonella enterica* serovar derby, infantis and typhimurium with porcine alveolar macrophages. *Vet. Microbiol.*, 146(1-2): 105-110.
57. Kranker, S., Dahl, J. and Wingstrand, A. (2001) Bacteriological and serological examination and risk factor analysis of *Salmonella* occurrence in sow herds, including risk factors for high *Salmonella* seroprevalence in receiver finishing herds. *Berl. Munch. Tierarztl.*, 114(9-10): 350-352.
  58. van der Wolf, P.J., Wolbers, W.B., Elbers, A.R., van der Heijden, H.M., Koppen, J.M., Hunneman, W.A., van Schie, F.W. and Tielens, M.J. (2001a) Herd level husbandry factors associated with the serological *Salmonella* prevalence in finishing pig herds in The Netherlands. *Vet. Microbiol.*, 78(3): 205-219.
  59. Lo Fo Wong, D.M.A., Dahl, J., Stege, H., van der Wolf, P.J., Leontides, L., von Altrock, A. and Thorberg, B.M. (2004) Herd-level risk factors for subclinical *Salmonella* infection in European finishing-pig herds. *Prev. Vet. Med.*, 62(4): 253-266.
  60. Oliveira, C.J., Carvalho, L.F. and Garcia, T.B. (2006) Experimental airborne transmission of *Salmonella agona* and *Salmonella typhimurium* in weaned pigs. *Epidemiol. Infect.*, 134(1): 199-209.
  61. Loynachan, A.T., Nugent, J.M., Erdman, M.M. and Harris, D.L. (2004) Acute infection of swine by various *Salmonella* serovars. *J. Food Protect.*, 67(7): 1484-1488.
  62. Boughton, C., Egan, J., Kelly, G., Markey, B. and Leonard, N. (2007) Rapid infection of pigs following exposure to environments contaminated with different levels of *Salmonella typhimurium*. *Foodborne Pathog. Dis.*, 4(1), 33-40.
  63. Hutchison, M.L., Walters, L.D., Moore, A. and Avery, S.M. (2005) Decline of zoonotic agents in liquid livestock wastes stored in batches on-farm. *J. Appl. Microbiol.*, 99(1): 58-65.
  64. Arrus, K.M., Holley, R.A., Ominski, K.H., Tenuta, M. and Blank, G. (2006) Influence of temperature on *Salmonella* survival in hog manure slurry and seasonal temperature profiles in farm manure storage reservoirs. *Livest Sci.*, 102(3): 226-236.
  65. Lanmerding, A.M. and Fazil A. (2000) Hazard identification and exposure assessment for microbial food safety risk assessment. *Int. J. Food Microbiol.*, 58(3): 147-157.
  66. WHO (World Health Organization). (1980) Report of the WHO/World Association of Veterinary Food Hygienists (WAVFH) round table conference on the present status of the *Salmonella* problem (prevention and control), Bilthoven, the Netherlands, 6-10 October. WHO/VPH/81.27. WHO, Bilthoven.
  67. Pfeiffer, D.U. (2002) Veterinary Epidemiology- An Introduction. Epidemiology Division Department of Veterinary Clinical Sciences. The Royal Veterinary College, University of London.
  68. Barber, D.A., Bahnsen, P.B., Isaacson, R., Jones, C.J. and Weigel, R.M. (2002) Distribution of *Salmonella* in swine production ecosystems. *J. Food Prot.*, 65(12): 1861-1868.
  69. Leirs, H., Lodal, J. and Knorr, M. (2004) Factors correlated with the presence of rodents in outdoor pig farms in Denmark and suggestions for management strategies. *NJAS-Wagen. J. Life Sci.*, 52(2): 145-161.
  70. Nolle, N., Maes, D., De Zutter, L., Duchateau, L., Houf, K., Huysmans, K., Imberechts, H., Geers, R., de Kruif, A. and van Hoof, J. (2004) Risk factors for the herd-level bacteriological prevalence of *Salmonella* in Belgian slaughter pigs. *Prev. Vet. Med.*, 65(1-2): 63-75.
  71. Funk, J. and Gebreyes, W.A. (2004) Risk factors associated with *Salmonella* prevalence on swine farms. *J. Swine Health Prod.*, 12(5): 246-251.
  72. Harris, I.T., Fedorka-Cray, P.J., Gray, J.T., Thomas, L.A. and Ferris, K. (1997) Prevalence of *Salmonella* organisms in swine feed. *J. Am. Vet. Med. Assoc.*, 210(3): 382-385.
  73. Davies, P.R., Scott Hurd, H., Funk, J.A., Fedorka-Cray, P.J. and Jones, F.T. (2004) The role of contaminated feed in the epidemiology and control of *Salmonella enterica* in pork production. *Foodborne Pathog. Dis.*, 1(4): 202-215.
  74. Doyle, A. (2011) Eliminating *Salmonella* in pigs starts with clean feed. Available from: [http://www.wattagnet.com/Eliminating\\_Salmonella\\_in\\_pigs\\_starts\\_with\\_clean\\_feed.html](http://www.wattagnet.com/Eliminating_Salmonella_in_pigs_starts_with_clean_feed.html). Accessed on 30-11-2014.
  75. Feder, I., Nietfeld, J.C., Galland, J., Yeary, T., Sargeant, J.M., Oberst, R., Tamplin, M.L. and Luchansky, J.B. (2001) Comparison of cultivation and PCR-hybridization for detection of *Salmonella* in porcine fecal and water samples. *J. Clin. Microbiol.*, 39(7): 2477-2484.
  76. Hedemann, M.S., Mikkelsen, L.L., Naughton, P.J. and Jensen, B.B., (2005) Effect of feed particle size and feed processing on morphological characteristics in the small and large intestine of pigs and on adhesion of *Salmonella enterica* serovar typhimurium DT12 in the ileum *in vitro*. *J. Anim. Sci.*, 83(7): 1554-1562.
  77. Farzan, A., Friendship, R.M., Dewey, C.E., Poppe, C. and Funk, J. (2010) Evaluation of the risk factors for shedding *Salmonella* with or without antimicrobial resistance in swine using multinomial regression method. *Zoonoses Public Health*, 57 Suppl 1: 85-93.
  78. Hotes, S., Kemper, N., Traulsen, I., Rave, G. and Krieter, J. (2010) Risk factors for *Salmonella* infection in fattening pigs- An evaluation of blood and meat juice samples. *Zoonoses Public Health*, 57 Suppl 1: 30-38.
  79. Arguello, H., Rubio, P. and Carvajal, A. (2012a) *Salmonella* control measures at farm in swine production. In: Annous, B.A. and Gurtler, J.B. editors. *Salmonella - Distribution, Adaptation, Control Measures and Molecular Technologies*. In Tech, p504. DOI: 10.5772/29531. Available from: <http://www.intechopen.com/books/salmonella-distribution-adaptation-control-measures-and-molecular-technologies/salmonella-control-measures-at-farm-in-swine-production>. Accessed on 30-11-2014.
  80. Leontides, L.S., Grafanakis, E. and Genigeorgis, C. (2003) Factors associated with the serological prevalence of *Salmonella enterica* in Greek finishing swine herds. *Epidemiol. Infect.*, 131(1): 599-606.
  81. Beloeil, P.A., Fravallo, P., Fablet, C., Jolly, J.P., Eveno, E., Hascoet, Y., Chauvin, C., Salvat, G. and Madec, F. (2004a) Risk factors for *Salmonella enterica* subsp. *enterica* shedding by market-age pigs in French farrow-to-finish herds. *Prev. Vet. Med.*, 63(1-2): 103-120.
  82. Rajic, A., O'Connor, B.P., Deckert, A.E., Keenlside, J., McFall, M.E., Re-Smith, R.J., Dewey, C.E. and McEwen, S.A. (2007) Farm-level risk factors for the presence of *Salmonella* in 89 Alberta swine-finishing barns. *Can. J. Vet. Res.*, 71(4): 264-270.
  83. Garcia-Feliz, C., Carvajal, A., Collazos, J.A. and Rubio, P. (2009) Herd-level risk factors for faecal shedding of *Salmonella enterica* in Spanish fattening pigs. *Prev. Vet. Med.*, (1-2): 130-136.
  84. Smith, J.L. (2003) The role of gastric acid in preventing foodborne disease and how bacteria overcome acid conditions. *J. Food Protect.*, 66(7): 1292-1303.
  85. Somyantontanagul, N., Nathues, H., Tegeler, R. and Blaha T. (2008) Comparison between detecting *Salmonella* spp. by bacteriological method and Real-Time PCR assay in samples from pig herds. In: Oral Proceedings of the 20<sup>th</sup> International Pig Veterinary Society Congress, Durban, South Africa, 2008. p176.
  86. Bayer, M. (1999) Factory Farming. Economic Advantage or Ecological Disaster? A Look at the Economic and Ecological Aspects of Industrial Swine Production in the United States. 081-62-0782. Available from: <http://www.sraproject.org/wp-content/uploads/2007/12/factoryfarmingeconomicadvantageorecologicaldisaster.pdf>. Accessed on 30-11-2014.
  87. Boyle, P. (2014) Industrial Meat. Available from: <http://www.pbs.org/wgbh/pages/frontline/shows/meat/industrial/consolidation.html>. Accessed on 30-11-2014.



88. Casal, J., De Manuel, A., Mateu, E. and Martin, M. (2007) Biosecurity measures on swine farms in Spain: Perceptions by farmers and their relationship to current on-farm measures. *Prev. Vet. Med.*, 82: 138-150.
89. Meeusen, E.N., Walker, J., Peters, A., Pastoret, P.P. and Jungersen, G. (2007) Current status of veterinary vaccines. *Clin. Microbiol. Rev.*, 20(3): 489-510.
90. Haesebrouck, F., Pasmans, F., Chiers, K., Maes, D., Ducatelle, R. and Decostere, A. (2004) Efficacy of vaccines against bacterial diseases in swine: What can we expect? *Vet. Microbiol.*, 100(3-4): 255-268.
91. Denagamage, T.N., O'Connor, A.M., Sargeant, J.M., Rajic, A. and McKean, J.D. (2007) Efficacy of vaccination to reduce *Salmonella* prevalence in live and slaughtered swine: A systematic review of literature from 1979 to 2007. *Foodborne Pathog. Dis.*, 4(4): 539-549.
92. Husa, J.A., Edler, R.A., Walter, D.H., Hoick, J.T. and Saltzman, R.J. (2009) A comparison of the safety, cross-protection, and serologic response associated with two commercial oral *Salmonella* vaccines in swine. *J. Swine Health Prod.*, 17(1): 10-21.
93. Roesler, U., Heller, P., Waldmann, K.H., Truyen, U. and Hensel A. (2006) Immunization of sows in an integrated pig-breeding herd using a homologous inactivated *Salmonella* vaccine decreases the prevalence of *Salmonella* typhimurium infection in the offspring. *J. Vet. Med. B.*, 53(5): 224-228.
94. Miller, G.Y., Liu, X., McNamara, P.E. and Barber, D.A. (2005) Influence of *Salmonella* in pigs preharvest and during pork processing on human health costs and risks from pork. *J. Food Protect.*, 68(9): 1788-1798.
95. Leyman, B., Boyen, F., Parys, A., Verbrugge, E., Haesebrouck, F. and Pasmans, F. (2011) Application of the DIVA principle to *Salmonella* Typhimurium vaccines in pigs avoids interference with serosurveillance programmes. Proceedings in International Safepork congress, p: 254-256 Maastricht, The Netherlands, 18-20 June, 2011.
96. Schneitz, C. and Mead G. (2000) Competitive exclusion. In: Wray, C. and Wray, A., editors. *Salmonella* in Domestic Animals. CABI Publishing, New York. p301-322.
97. van der Wolf, P.J., van Schie, F.W., Eibers, A.R., Engel, B., van der Heijden, H.M., Hunneman, W.A. and Tielen, M.J. (2001b) Administration of acidified drinking water to finishing pigs in order to prevent *Salmonella* infections. *Vet. Q.*, 23(3): 121-125.
98. Creus, E., Perez, J.F. and Mateu, E. (2005) Effect of an acidified diet on *Salmonella* prevalence during the last term of fattening period. Proceedings of the 6<sup>th</sup> International Symposium on the Epidemiology and Control of Foodborne Pathogens in Pork. California, Sep 6-9. p287-288.
99. Creus, E., Perez, J.F., Peralta, B., Baucells, F. and Mateu, E. (2007) Effect of acidified feed on the prevalence of *Salmonella* in market-age pigs. *Zoonoses Public Health*, 54(8): 314-319.
100. Friendship, R.M., Mounchili, A., McEwen, S. and Rajic A. (2009) Critical review of on-farm intervention strategies against *Salmonella*. BPEX/ZNPC. Available from: development.bpex.org.uk/downloads/298614/292327/Critical review of onfarm intervention strategies against Salmonella. pdf. Accessed on 23-02-2015.
101. Theron, M.M. and Lues, J.F.R. (2007) Organic acids and meat preservation: A review. *Food Rev. Int.*, 23(2): 141-158.
102. Carrique-Mas, J.J., Bedford, S. and Davies, R.H. (2007) Organic acid and formaldehyde treatment of animal feeds to control *Salmonella*: Efficacy and masking during culture. *J. Appl. Microbiol.*, 103(1): 88-96.
103. Zheng, D.M., Bonde, M. and Sorensen, J.T. (2007) Associations between the proportion of *Salmonella* sero-positive slaughter pigs and the presence of herd level risk factors for introduction and transmission of *Salmonella* in 34 Danish organic, outdoor (non-organic) and indoor finishing-pig farms. *Livest. Sci.*, 106(2): 189-199.
104. Anadón, A., Martínez-Larrañaga, M.R. and Aranzazu Martínez, M. (2006) Probiotics for animal nutrition in the European Union. Regulation and safety assessment. *Regul. Toxicol. Pharm.*, 45(1): 91-95.
105. Jacela, J.Y., DeRouchey, J.M., Tokach, M.D., Goodband, R.D., Nelssen, J.L., Renter, D.G. and Dritz, S.S. (2010) Feed additives for swine: Fact sheets – prebiotics and probiotics, and phytogenics. *J. Swine Health Prod.*, 18(3): 132-136.
106. Collazos, J.A., Samaniego, L.M., Garcia, C., de Castro, L., Carvajal, A. and Rubio P. (2008) Selection and characterization of anti-salmonella lactic acid bacteria of porcine origin. Proceedings of 20<sup>th</sup> International Pig Veterinary Society Congress. Durban, South Africa, 20.25 June, 2008. p317.
107. Gebreyes, W.A., Thakur, S. and Morrow, W.E.M. (2006) Comparison of prevalence, antimicrobial resistance, and occurrence of multidrug-resistant *Salmonella* in antimicrobial-free and conventional pig production. *J. Food Protect.*, 69(4): 743-748.
108. Emborg, H.D., Baggesen, D.L. and Aarestrup, F.M. (2008) Ten years of antimicrobial susceptibility testing of *Salmonella* from Danish pig farms. *J. Antimicrob. Chemother.*, 62(2): 360-363.
109. EFSA (European Food Safety Authority). (2006b) Opinion of the scientific panel on biological hazards on "risk assessment and mitigation options of *Salmonella* in pig production". *EFSA J.*, 341: 1-131.
110. De Busser, E.V., De Zutter, L., Dewulf, J., Houf, K. and Maes, D. (2013) *Salmonella* control in live pigs and at slaughter. *Vet. J.*, 196(1): 20-27.
111. Williams, L.P. Jr. and Newell, K.W. (1967) Patterns of *Salmonella* excretion in market swine. *Am. J. Public Health North.*, 57(3): 466-471.
112. Hurd, H.S., McKean, J.D., Griffith, R.W., Wesley, I.V. and Rostagno, M.H. (2002) *Salmonella enterica* infections in market swine with and without transport and holding. *Appl. Environ. Microbiol.*, 68(5): 2376-2381.
113. Beloeil, P.A., Chauvin, C., Proux, K., Madec, F., Fravallo, P. and Alioum, A. (2004b) Impact of the *Salmonella* status of market-age pigs and the pre-slaughter process on *Salmonella* caecal contamination at slaughter. *Vet. Res.*, 35(5): 513-530.
114. Berends, B.R., Urlings, H.A., Snijders, J.M. and van Knipen, F. (1996) Identification and quantification of risk factors in animal management and transport regarding *Salmonella* spp. in pigs. *Int. J. Food Microbiol.*, 30(1-2): 37-53.
115. Martin-Pelaez, S., Peralta, B., Creus, E., Dalmau, A., Velarde, A., Perez, J.F., Mateu, E. and Martin-Orue, S.M. (2009) Different feed withdrawal times before slaughter influence caecal fermentation and faecal *Salmonella* shedding in pigs. *Vet. J.*, 182(3): 469-473.
116. De Busser, E.V., Maes, D., Houf, K., Dewulf, J., Imberechts, H., Bertrand, S. and De Zutter, L. (2011) Detection and characterization of *Salmonella* in lairage, on pig carcasses and intestines in five slaughterhouses. *Int. J. Food Microbiol.*, 145(1): 279-286.
117. Swanenburg, M., Urlings, H.A., Keuzenkamp, D.A. and Snijders, J.M. (2001) *Salmonella* in the lairage of pig slaughterhouses. *J. Food Protect.*, 64(1): 12-16.
118. Alban, L. and Sorensen, L.L. (2010) Hot-water decontamination - an effective way of reducing risk of *Salmonella* in pork. *Fleischwirtschaft*, 6: 60-64.
119. Kich, J.D., Coldebella, A., Morés, N., Nogueira, M.G., Cardoso, M., Fratamico, P.M., Call, J.E., Fedorka-Cray, P. and Luchansky, J.B. (2011) Prevalence, distribution, and molecular characterization of *Salmonella* recovered from swine finishing herds and a slaughter facility in Santa Catarina, Brazil. *Int. J. Food Microbiol.*, 151(3): 307-313.
120. Baptista, F.M., Dahl, J. and Nielsen, L.R. (2010) Factors influencing *Salmonella* carcass prevalence in Danish pig abattoirs. *Prev. Vet. Med.*, 95(3-4): 231-238.
121. van Hoek, A.H., de Jonge, R., van Overbeek, W.M.,



- Bouw, E., Pielaat, A., Smid, J.H., Malorny, B., Junker, E., Löfström, C., Pedersen, K., Aarts, H.J. and Heres, L. (2012). A quantitative approach towards a better understanding of the dynamics of *Salmonella* spp. in a pork slaughter-line. *Int. J. Food Microbiol.*, 153(1-2): 45-52.
122. Visscher, C.F., Klein, G., Verspohl, J., Beyerbach, M., Stratmann-Selke, J. and Kamphuis J. (2011) Serodiversity and serological as well as cultural distribution of *Salmonella* on farms and in abattoirs in Lower Saxony, Germany. *Int. J. Food Microbiol.*, 146(1): 44-51.
123. Hald, T., Wingstrand, A., Swanenburg, M., von Altrock, A. and Thorberg, B.M. (2003) The occurrence and epidemiology of *Salmonella* in European pig slaughterhouses. *Epidemiol. Infect.*, 131(3): 1187-1203.
124. Gill, C.O. and Bryant, J. (1993) The presence of *Escherichia coli*, *Salmonella* and *Campylobacter* in pig carcass dehairing equipment. *Food Microbiol.*, 10(4): 337-344.
125. Bolton, D.J., Pearce, R., Sheridan, J.J., McDowell, D.A. and Blair, I.S. (2003) Decontamination of pork carcasses during scalding and the prevention of *Salmonella* cross-contamination. *J. Appl. Microbiol.*, 94(6): 1036-1042.
126. Botteldoorn, N., Herman, L., Rijpens, N. and Heyndrickx, M. (2004) Phenotypic and molecular typing of *Salmonella* strains reveals different contamination sources in two commercial pig slaughterhouses. *Appl. Environ. Microbiol.* 70(9): 5305-5314.
127. Alban, L. and Stärk, K.D. (2005) Where should the effort be put to reduce the *Salmonella* prevalence in the slaughtered swine carcass effectively? *Prev. Vet. Med.*, 68(1): 63-79.
128. da Silva, L.E., Dias, V., Ferronato, A., Guerra, P., Berno, L., Triches, N., Kich, J.D., Corbellini, L.G. and Cardoso, M. (2012) Longitudinal dissemination of *Salmonella enterica* clonal groups through the slaughter process of *Salmonella*-positive pig batches. *J. Food Protect.*, 75(9): 1580-1588.
129. Lawson, L.G., Jensen, J.D., Christiansen, P. and Lund, M. (2009) Cost-effectiveness of *Salmonella* reduction in Danish abattoirs. *Int. J. Food Microbiol.*, 134(1-2): 126-132.
130. Baptista, F.M., Halasa, T., Alban, L. and Nielsen, L.R. (2011) Modelling food safety and economic consequences of surveillance and control strategies for *Salmonella* in pigs and pork. *Epidemiol. Infect.*, 139(5): 754-764.
131. Argüello, H., Carvajal, A., Collazos, J.A., García-Feliz, C. and Rubio P. (2012b) Prevalence and serovars of *Salmonella enterica* on pig carcasses, slaughtered pigs and the environment of four Spanish slaughterhouses. *J. Food Res.*, 45(4): 905-912.
132. Arrach, N., Porwollik, S., Cheng, P., Cho, A., Long, F., Choi, S.H. and McClelland, M. (2008) *Salmonella* serovar identification using PCR-based detection of gene presence and absence. *J. Clin. Microbiol.*, 46(8): 2581-2589.
133. Nollet, N., Maes, D., Duchateau, L., Hautekiet, V., Houf, K., van Hoof, J., De Zutter, L., de Kruijff, A. and Geers R. (2005) Discrepancies between the isolation of *Salmonella* from mesenteric lymph nodes and the results of serological screening in slaughter pigs. *Vet. Res.*, 36(4): 545-555.
134. Irish Exporters Association. (2008) Latest information on pork and beef contamination. Available from: <http://www.irishexporters.ie/section/Latestinformationonporkandbeefcontamination>. Accessed on 30-11-2014.
135. WHO (World Health Organization). (2010) Dioxins and their effects on human health. Fact sheet N°225. Available from: <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs225/en/> Accessed on 30-11-2014.
136. Wacker, R. (2013) The European Food Industry's Horse Meat Scandal. Available from: [http://www.foodquality.com/details/article/4753471/The\\_European\\_Food\\_Industrys\\_Horse\\_Meat\\_Scandal.html?tzcheck=1](http://www.foodquality.com/details/article/4753471/The_European_Food_Industrys_Horse_Meat_Scandal.html?tzcheck=1) Accessed on 30-11-2014.
137. Nellemann, C., MacDevette, M., Manders, T., Eickhout, B., Svihus, B., Prins, A.G., Kaltenbom, B.P., editors. (2009) The environmental food crisis – The environment's role in averting future food crises. A UNEP rapid response assessment. United Nations Environment Programme, GRID-Arendal, Birkeland Trykkeri AS, Norway. Available from: <http://www.grida.no>. Accessed on 30-11-2014.
138. Garrido, A. and Calatrava, J. (2010) Agricultural Water Pricing: EU and Mexico. OECD (Organisation For Economic Co-Operation and Development). Available from: <http://www.oecd.org/italy/45015101.pdf>. Accessed on 30-11-2014.
139. Woods, A. (2011) A historical synopsis of farm animal disease and public policy in twentieth century Britain. *Philos. Trans. R. Soc. B.*, 366(1573): 1943-1954.
140. Wegener, H.C., Hald, T., Lo Fo, W.D., Madsen, M., Korsgaard, H., Bager, F., Gerner-Smidt, P. and Molbak, K. (2003) *Salmonella* control programs in Denmark. *Emerg. Infect. Dis.*, 9: 774-780.
141. Wegener, H.C. (2010) Danish initiatives to improve the safety of meat products. *Meat Sci.*, 84(2): 276-283.
142. van der Gaag, M.A. (2004) Epidemiological and economic simulation of *Salmonella* control in the pork supply chain. PhD-Thesis Wageningen University and Applied Research of Animal Science Group.
143. Goldbach, S.G. and Alban, L. (2006) A cost-benefit analysis of *Salmonella*-control strategies in Danish pork production. *Prev. Vet. Med.*, 77(1-2): 1-14.

\*\*\*\*\*

### 1.2.7 Έλεγχος της Σαμονέλλωσης του χοίρου στην Ελλάδα

Παρά τους στόχους που έχουν τεθεί από την ΕΕ, η Ελλάδα δεν έχει υιοθετήσει ακόμα εθνικό Πρόγραμμα Επιτήρησης των σαλμονελλώσεων του χοίρου. Ωστόσο, υπάρχει δημοσιευμένη πληροφόρηση που αφορά τη συχνότητα μόλυνσης των ελληνικών μονάδων χοίρων τελικής πάχυνσης από οροτύπους του είδους *S. enterica*.

Συγκεκριμένα, το 1996 ένα πρόγραμμα άρχισε με σκοπό τη διερεύνηση των διαφόρων παραμέτρων της επιδημιολογίας της σαλμονέλλωσης των χοιροτροφικών μονάδων σε έξι ευρωπαϊκές χώρες, συμπεριλαμβανομένης της Ελλάδας. Η μελέτη ανέφερε τη συχνότητα μόλυνσης (επιπολασμός) οροθετικών χοίρων τελικής πάχυνσης 59 εκτροφών τοκετού - τελικής πάχυνσης και τεσσάρων πολλαπλασιαστικών εκτροφών, τη συχνότητα των μολυσμένων δειγμάτων κοπράνων και ζωοτροφών, τους απομονωθέντες οροτύπους και την αντιμικροβιακή αντοχή ενός επιμέρους δείγματος αυτών των εκτροφών. Στο τμήμα της μελέτης που αφορούσε την εκτροφή απομονώθηκαν τέσσερα στελέχη του οροτύπου *S. Tennessee*, καθώς και ένα ατυποποίητο στέλεχος από δείγματα ζωοτροφών δύο εκτροφών (4,8% των δειγμάτων), ενώ η συχνότητα της παρουσίας μόλυνσης των κοπράνων ήταν 1,2% (4/340 των ληφθέντων δειγμάτων). Τα απομονωθέντα στελέχη ανήκαν στους οροτύπους Typhimurium, Bredeney και London και παρουσίασαν ευαισθησία στους περισσότερους από τους 35 εξετασθέντες αντιμικροβιακούς παράγοντες, όπως σε φλουοροκινολόνες, τετρακυκλίνες και σουλφοναμίδες (Grafanakis et al. 2001). Όσον αφορά τη μελέτη σε επίπεδο σφαγείου ελήφθησαν δείγματα από το περιβάλλον δύο σφαγείων της Β. Ελλάδας, όπως δείγματα επιφανειών, χεριών και μαχαιριών των εκδοροσφαγέων, καθώς και δείγματα επιφανειών των σφάγιων. Τελικά, από τα 1654 δείγματα απομονώθηκαν 138 στελέχη από την ακάθαρτη και καθαρή ζώνη των οροτύπων Derby 31,9%, London (16,7), Typhimurium (13%), Bredeney (10,7%), Infantis (8,7%), Goldcoast (4,3%), Panama (2,9%), Livingstone (1,4%), Mbandaka (0,7%), λοιποί (7,3%) και ατυποποίητοι (2,2%) (Limpitakis et al. 1999). Ωστόσο, τα δεδομένα που εξήχθησαν από το συγκεκριμένο Πρόγραμμα για την Ελλάδα και αφορούσαν τη συχνότητα εμφάνισης της *Salmonella*, τη διασπορά των οροτύπων και φαγοτύπων στους χοίρους, στα τρόφιμα και τον άνθρωπο θεωρήθηκαν ελάχιστα και μη αντιπροσωπευτικά (Lo Fo Wong & Hald 2000).



Μια άλλη μελέτη ακολούθησε τον Μάρτιο του 2003 μέχρι τον Οκτώβριο του 2004, η οποία εστίαζε στη γενετική ποικιλότητα και την αντιμικροβιακή αντοχή σαλμονελλών που απομονώθηκαν από τα κόπρανα ασυμπτωματικών χοίρων 20 εκτροφών τελικής πάχυνσης της Κεντρικής Ελλάδας (Filioussis et al. 2008). Σε αυτή τη μελέτη 5 από τους 400 (1,25%) χοίρους τελικής πάχυνσης βρέθηκαν ασυμπτωματικοί φορείς του οροτύπου Mbandaka, ενώ κανένας άλλος ορότυπος δεν απομονώθηκε. Ως προς την ευαισθησία σε αντιμικροβιακούς παράγοντες και τα πέντε στελέχη εμφάνισαν ανθεκτικότητα στην τετρακυκλίνη, τέσσερα στην τριμεθοπρίμη/σουλφοναμίδη και τρία σε αμικιλίνη και αμοξικιλίνη/κλαβουλανικό οξύ, ενώ όλα παρουσίασαν ευαισθησία στις κεφαλοσπορίνες και τις κινολόνες.

Τα έτη 2006-2007 η Ελλάδα συμμετείχε στην τέταρτη επίσημη βασική έρευνα της ΕΕ με στόχο την εκτίμηση της συχνότητας εμφάνισης της μόλυνσης των χοίρων με *Salmonella* spp. κατά τη σφαγή. Όλα τα συμμετέχοντα Κράτη- Μέλη και η Νορβηγία έλαβαν δείγματα ειλεοκολικών λεμφαδένων από τους επιλεγέντες χοίρους στο σφαγείο. 73 στελέχη απομονώθηκαν από τους λεμφαδένες 345 ελληνικών χοίρων, τα οποία ανήκαν στους οροτύπους του υποείδους *S. enterica* subsp. *enterica*. Αυτοί ήταν οι: Typhimurium (12- 16,4%), Derby (9- 12,3%), Thompson (5- 6,8%), Bredeney, Enteritidis, Kottbus, Montevideo, Umbilo (3- 4,1% ο καθένας), 4,[5],12:i:-, Blockley, Muenster, Oranienburg (2- 2,% ο καθένας), Agona, Anatum, Bovismorbificans, Brandenburg, Carno, Dublin, Hermannswerder, London, Menden, Mishmarhaemek, Newport, Paratyphi B var. Java, Szentes (1- 1,4% ο καθένας) και ατυποποίητοι (11-15%) (EFSA 2008). Η έρευνα αποκάλυψε μεγάλες διαφορές μεταξύ των συμμετεχόντων χωρών με την Ελλάδα δυστυχώς να είναι μία εκ των πέντε Κρατών – Μελών (Ισπανία, Πορτογαλία, Λουξεμβούργο και Ηνωμένο Βασίλειο) που ανέφεραν συχνότητα εμφάνισης μολυσμένων λεμφαδένων > 20% των δειγμάτων.

Τα πιο πρόσφατα αποτελέσματα που αφορούν τη σαλμονέλλωση του χοίρου στην Ελλάδα αναφέρθηκαν από τους Mandilara et al. (2013) για την EFSA. Σε αυτή την μελέτη εξετάστηκαν 119 στελέχη του οροτύπου *S. enterica* 1,4,[5],12:i:- προερχόμενα από ανθρώπους, ζώα και τρόφιμα, τα οποία είχαν απομονωθεί κατά το χρονικό διάστημα 2006-2011. Τα αποτελέσματα έδειξαν ότι στην Ελλάδα κυκλοφορούν πολλαπλοί κλώνοι της πολυανθεκτικής μονοφασικής Typhimurium και ότι ο συχνότερα απαντώμενος

κλώνος σε ανθρώπους και ζώα ήταν ο φαγότυπος DT120, R-type ASSuTSpTm και με PFGE προφίλ STYMXB.0010, υποδεικνύοντας τον χοίρο ως δεξαμενή αυτού του κλώνου στην Ελλάδα.

### 1.3 ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ

Η σαλμονέλλωση είναι η δεύτερη σημαντικότερη τροφιμογενής μόλυνση του ανθρώπου στην ΕΕ, με το χοιρινό κρέας να ευθύνεται για το 10-20% αυτών των περιστατικών. Τα επιδημιολογικά ευρήματα συσχετισμού του κρέατος χοίρου στην σαλμονέλλωση του Ευρωπαϊκού καταναλωτή τις προηγούμενες δεκαετίες, οδήγησαν τις ελεγκτικές αρχές της ΕΕ σε μια προσπάθεια εναρμόνισης της επιτήρησης και ελέγχου της μόλυνσης των μονάδων πρωτογενούς παραγωγής με τον Κανονισμό EC No. 2160/2003. Σε αυτές τις διερευνήσεις ως συχνότερα απαντώμενοι ορότυποι αναδεικνύονται οι Typhimurium και Enteritidis. Στην Ελλάδα, όμως, ενώ οι προσπάθειες επιτήρησης εντατικοποιήθηκαν στις μονάδες πουλερικών, ελάχιστα έχουν γίνει για την επιτήρηση των χοιροτροφικών μονάδων. Ο έλεγχος της μόλυνσης από *Salmonella* spp. των χοιροτροφικών μονάδων προϋποθέτει τη συστηματική επιτήρησή τους, άρα την τακτική καταγραφή της πραγματικής επιδημιολογικής κατάστασης της κάθε μιας, αφού οι υποκλινικά μολυσμένοι χοίροι, συνιστούν την κυριότερη πηγή εισόδου των *Salmonella* spp. στην τροφική αλυσίδα. Τα ζώα αυτά παράλληλα διασπείρουν με τα κόπρανά τους τον μικροοργανισμό στο περιβάλλον, επιμολύνοντας τα μη προσβεβλημένα ζώα. Συνεπώς, ο έλεγχος της μόλυνσης από *Salmonella* spp. θα πρέπει να επικεντρωθεί στις υποκλινικές μολύνσεις. Η απομόνωση του παθογόνου από ζώα φορείς αποτελεί αδιαμφισβήτητη απόδειξη μόλυνσης της εκτροφής, καθιστώντας επιτακτική την εφαρμογή μέτρων ελέγχου, που να στοχεύουν κυρίως στους ορότυπους με τη μεγαλύτερη σημασία στη Δημόσια Υγεία, συνεπώς και στην οικονομία.

Η αναγνώριση των στελεχών και ο καθορισμός της γενεαλογικής γραμμής των παθογόνων μικροοργανισμών, αποτελεί προϋπόθεση για την αντιμετώπιση πολλών ζητημάτων στην κλινική μικροβιολογία και την επιδημιολογία γενικώς, αλλά είναι ιδιαίτερης σημαντικότητας στη μελέτη των σαλμονελλώσεων. Το σύστημα της οροταυτοποίησης των *Salmonella* spp., το οποίο συνεχώς ανανεώνεται καθώς αναδύονται καινούριοι ορότυποι, έχει δημιουργήσει με την πάροδο του χρόνου ένα

σύνολο δεδομένων, που επιτρέπει τη μακροπρόθεσμη επιτήρηση του γένους *Salmonella* στην τροφική αλυσίδα και συνεπακόλουθα και στη Δημόσια Υγεία. Ωστόσο, ο μεγάλος κατάλογος των οροτύπων δεν έχει πλήρως αποσαφηνίσει την κλινική και επιδημιολογική σημασία τους. Για την επίτευξη του συγκεκριμένου στόχου απαιτείται περισσότερη γνώση γύρω από το γενετικό υπόβαθρο των οροτύπων και βελτίωση των σχετικών μοριακών μεθόδων. Η επιτυχής διαχείριση των μοριακών πληροφοριών θα μπορέσει να συσχετίσει την κατανομή και παθογένεια των διαφόρων οροτύπων του γένους *Salmonella* σε σχέση με τα ζώα και τον άνθρωπο.



#### 1.4 ΣΚΟΠΟΣ ΤΗΣ ΔΙΔΑΚΤΟΡΙΚΗΣ ΔΙΑΤΡΙΒΗΣ

Η μελέτη αυτή ξεκίνησε με σκοπό τον καθορισμό της συχνότητας εμφάνισης (επιπολασμός) των *Salmonella* spp. σε παχυνόμενους χοίρους και την οροταυτοποίηση των απομονωθέντων στελεχών, ώστε να διερευνηθεί η σημαντικότητα του χοιρινού κρέατος για τη Δημόσια Υγεία.

Με την παρούσα μελέτη, επιχειρήθηκε να διευρυνθεί η βάση των γνώσεων σχετικά με την κατάσταση που επικρατεί στις ελληνικές χοιροτροφικές μονάδες, όσον αφορά τη μόλυνση των χοιρινών, καθώς και οι ορότυποι που ενδημούν στην περιοχή της Θεσσαλίας.

Για την επίτευξη των επιστημονικών στόχων της διατριβής προγραμματίστηκαν και πραγματοποιήθηκαν οι εξής επιμέρους μελέτες:

- Ορολογική μελέτη του επιπολασμού των *Salmonella* spp. εκτροφών χοίρων από την ελληνική επικράτεια.
- Συσχέτιση της οροθετικότητας με την απομόνωση από σφάγια χοίρων.
- Εφαρμογή ενδεδειγμένης μεθοδολογίας για μικροβιολογική διερεύνηση της μόλυνσης χοίρων από *Salmonella* spp.
- Εντοπισμός προβλημάτων που επηρεάζουν τον καθορισμό του επιπολασμού των σφάγιων, άρα και την εκτίμηση της επικινδυνότητας για τον Έλληνα καταναλωτή.
- Καθορισμός των οροτύπων και υποειδών *Salmonella* spp. στους χοίρους πάχυνσης.
- Έλεγχος του ρόλου του περιβάλλοντος του σφαγείου και της διαδικασίας σφαγής στην επιμόλυνση του κρέατος και
- Έλεγχος της αντιβιοαντοχής των απομονωθέντων στελεχών που αποτελούν παθογόνους παράγοντες για τον καταναλωτή.

## **ΚΕΦΑΛΑΙΟ 2**

### **ΥΛΙΚΑ & ΜΕΘΟΔΟΙ**

## 2.1 Πρόδρομη Ορολογική διερεύνηση *Salmonella* spp. σε χοιρομητέρες και παχυνόμενους χοίρους

Με σκοπό τον τελικό σχεδιασμό της διερεύνησης της σαλμονέλλωσης του χοίρου έγινε μια ευρεία ορολογική διερεύνηση της μόλυνσης. Στο στάδιο αυτό συμμετείχαν 39 εκτροφές χοίρου τοκετού - τελικής πάχυνσης από πέντε γεωγραφικές περιοχές της Ελλάδας (Θεσσαλία, Στερεά Ελλάδα, Β. Ελλάδα, Ήπειρος, Κρήτη), με δυναμικότητα μεγαλύτερη των 20 χοιρομητέρων. Η συμμετοχή των μονάδων ήταν εθελοντική. Συλλέχθηκαν 688 δείγματα αίματος από την έξω σφαγίτιδα φλέβα προερχόμενα από 314 χοιρομητέρες ξηράς περιόδου και από 374 χοίρους τελικής πάχυνσης 3-4 ημέρες προ της σφαγής τους.

Τα δείγματα αίματος φυγοκεντρήθηκαν στις  $1.400 \times g$  για 15 λεπτά και μετά τον διαχωρισμό του ορού διατηρήθηκαν στους  $-80 \text{ }^\circ\text{C}$  μέχρι την εξέτασή τους. Η οροθετικότητα διερευνήθηκε με τη χρήση εμπορικά διαθέσιμης έμμεσης mix-ELISA (Herd-Check Swine Salmonella Antibody Test Kit, Idexx Laboratories, Inc., Maine, USA). Η δοκιμή ανιχνεύει αντισώματα έναντι των πιο κοινών οροτύπων (οροομάδες B, C1, D) που απομονώνονται σε Ευρώπη, Ασία και ΗΠΑ.

Η παρουσία αντισωμάτων προσδιορίστηκε καθορίζοντας την τιμή απορρόφησης στα 650 nm του άγνωστου δείγματος με εκείνη του θετικού μάρτυρα. Η τιμή του λόγου Δείγμα- προς- Θετικός μάρτυρας [Sample-to-Positive (S/P)] συσχετίστηκε με το ποσοστό της Οπτικής Πυκνότητας [Optical Density (OD %)] με τη χρήση ενός συντελεστή 2,5 (Van der Heijden 2001). Συγκεκριμένα η OD % προσδιορίστηκε με βάση τον τύπο:  $OD\% = (S/P) / 2,5 \times 100$ .

Τα δείγματα αξιολογήθηκαν με διαφορετικές διεθνώς αποδεκτές τιμές οπτικής πυκνότητας (OD):

- OD 10%- scientific value [συνιστάται από τον παρασκευαστή-(Idexx Laboratories, Inc., Maine, USA)]
- OD 20% (χρησιμοποιείται στο δανέζικο πρόγραμμα επιτήρησης της *Salmonella* (Alban et al. 2002) και



- OD 40% (είναι η τιμή που χρησιμοποιείται στα περισσότερα προγράμματα ελέγχου (screening programmes) της *Salmonella* (Mousing et al. 1997, Osterkorn et al. 2001))

Ανεξαρτήτως της επιλεγείσας OD, κάθε δείγμα ορού με μέτρηση μικρότερη της επιλεγείσας (cut off) θεωρήθηκε αρνητικό, ενώ θετικά ήταν τα δείγματα ορού αίματος με τιμές ίσες ή μεγαλύτερες του cut off.

## 2.2 Διερεύνηση της σαλμονέλλωσης των χοίρων στο σφαγείο

Με δεδομένα τα ευρήματα της προκαταρκτικής οροδιερεύνησης η συστηματική μελέτη του παθογόνου περιορίστηκε σε δύο σφαγεία της Θεσσαλίας. Εξετάστηκαν 15 εκτροφές τοκετού- τελικής πάχυνσης δυναμικότητας 20 - 500 χοιρομητέρων. Η επιλογή των εκτροφών έγινε με βάση το κριτήριο ότι το χρονικό διάστημα μεταφοράς και παραμονής των ζώων προ της σφαγής στις εγκαταστάσεις των σφαγείων δεν θα ξεπερνούσε τις τρεις ώρες. Οι δειγματοληψίες διήρκησαν 8 μήνες. Κατά την ημέρα των δειγματοληψιών τα προς διερεύνηση ζώα επιλέγονταν τυχαία. Διερευνήθηκαν ορολογικά και μικροβιολογικά 123 σφάγια βάρους 95-100 kg, που αντιστοιχούν περίπου στο 5% (~2.500 χοίροι) των χοίρων που σφάχτηκαν κατά το χρονικό διάστημα της διερεύνησης. Από κάθε σφάγιο έγινε αιμοληψία κατά τη διαδικασία της αφαίμαξης των χοίρων και συλλογή ιστών για μικροβιολογική διερεύνηση. Οι οροί επεξεργάστηκαν ως ανωτέρω (υποενότητα 2.1) και οι ιστοί ως εξής:

### 2.2.1 Συλλογή ιστών

Από κάθε σφάγιο χοίρου από το οποίο είχε γίνει αιμοληψία συλλέχθηκαν:

1. Περιεχόμενο απευθυσμένου με τη χρήση βαμβακοφόρου στυλεού (swab stuart-DELTALAB).
2. Τμήμα ειλεού. Έγινε άσηπτη λήψη δείγματος εντερικού βλεννογόνου με απόξεση.
3. Μεσεντέριοι λεμφαδένες.

4. Χοληδόχοι κύστες. Έγινε άσηπτη διάνοιξη κάθε χολής και λήψη δείγματος με βαμβακοφόρο στυλεό (swab) από το τοίχωμα της χοληδόχου κύστης και του χοληδόχου πόρου.
5. Τεμάχια τραχηλικού μυός. Έγινε άσηπτη λήψη τεμαχίων τραχηλικού μυός (περιοχή αποστράγγισης σφάγιου) μετά τη διχοτόμηση του σφάγιου.

#### 2.2.2. Συλλογή περιβαλλοντικών δειγμάτων σφαγείου

Κατά τη διενέργεια των παραπάνω δειγματοληψιών πραγματοποιήθηκε συγχρόνως συλλογή περιβαλλοντικών δειγμάτων σφαγείου. Σε κάθε ημέρα δειγματοληψίας διεξάγονταν τρεις γύροι δειγματοληψίας: ένας προ της σφαγής και δύο κατά την επεξεργασία των σφάγιων. Η συλλογή των δειγμάτων έγινε από τα χέρια (ή γάντια) και μαχαίρια δύο εκδορέων της ακάθαρτης ζώνης και τριών εκσπλαγχνιστών της καθαρής ζώνης, καθώς και από το πριόνι διχοτόμησης των σφάγιων.

Πιο συγκεκριμένα, διενεργήθηκε δειγματοληψία με τη χρήση swab και στις δύο πλευρές της λεπίδας των μαχαιριών από την κορυφή προς τη βάση, όπως επίσης και στο πριόνι διχοτόμησης. Επιπλέον, η συλλογή των δειγμάτων από τα χέρια πραγματοποιήθηκε με τη χρήση swab σε όλη την παλαμιαία επιφάνεια και των δύο χεριών. Τελικά, συγκεντρώθηκαν 378 περιβαλλοντικά δείγματα.

### 2.3 Μικροβιολογική διερεύνηση της μόλυνσης ιστών και περιβαλλοντικών δειγμάτων

#### 2.3.1 Απομόνωση των *Salmonella* spp.

Η επεξεργασία των δειγμάτων ήταν σύμφωνη με το ISO 6579:2002, Annex D. Αυτό το ISO αφορά την ανίχνευση *Samonella* spp. σε περιττώματα ζώων και σε περιβαλλοντικά δείγματα από στάδια πρωτογενούς παραγωγής (ISO 2002), ακολουθώντας εν συντομία την εξής διαδικασία:

- Τα swab απευθυσμένου, χοληδόχου κύστεως, τα δείγματα ειλεού, καθώς και τα swab των περιβαλλοντικών δειγμάτων σφαγείου μεταφέρονταν άσηπτα σε 10 ml Buffered Peptone Water (BPW) (Oxoid- England).
- Οι μεσεντέριοι λεμφαδένες εμβαπτίζονταν αρχικά για 10 sec σε αιθανόλη 95% και ακολουθούσε φλόγωση για απολύμανση της επιφανείας τους (Carlson & Blaha 2001). Με τον τρόπο αυτό, τα θετικά δείγματα θα αντικατοπτρίζουν τον προσβεβλημένο ιστό (μικροοργανισμοί εσωτερικά) και όχι κάποια διασταυρούμενη επιμόλυνση (μικροοργανισμοί εξωτερικά).
- 25 gr από τα δείγματα των μεσεντέριων λεμφαδένων και των τεμαχίων τραχηλικού μυός μεταφέρονταν άσηπτα σε σακούλες ομογενοποίησης (stomacher bag), όπου προστίθενταν 225 ml BPW (Oxoid- England) και ακολουθούσε ομογενοποίηση για 90 sec.

Τα δείγματα που ενοφθλμίστηκαν σε BPW (Oxoid-England) επώαστηκαν στους 37 °C για 18±2 ώρες (μη εκλεκτικός προεμπλουτισμός). Από αυτή την καλλιέργεια 0,1 ml (3 σταγόνες) ενοφθαλμίστηκαν στο Modified Semisolid Rappaport-Vassiliadis medium (MSRV) (BioKar, France). Ακολούθησε επώαση στους 41.5 ± 1 °C για 24 ± 3 ώρες. Εν συνεχεία, μικροοργανισμοί από το όριο κάθε θολερής ζώνης του MSRV ενοφθαλμίστηκαν σε στερεά υποστρώματα εκλεκτικά για τα *Salmonella* spp. Αυτά ήταν το προτεινόμενο από το ISO Xylose-Lysine-Deoxycholate agar (XLD) (Oxoid – England), το Brilliant Green agar (BGA Oxoid-England) και το Salmonella Shigella agar (SS Merck - Germany). Τα ενοφθαλμισμένα θρεπτικά υποστρώματα επωάζονταν στους 37 °C για 24 ± 3 ώρες. Μετά την παρέλευση του απαιτούμενου χρονικού διαστήματος, αποικίες ύποπτες για *Salmonella* spp. στα εκλεκτικά υποστρώματα μεταφέρονταν σε Columbia blood agar (CBA, Oxoid, England) για τη δημιουργία καθαρών καλλιεργειών. Αν και τα τρία υποστρώματα είχαν ύποπτες αποικίες, μεταφέρονταν σε CBA μόνο αυτές από το XLD.



### 2.3.2 Συντήρηση των απομονωθέντων στελεχών

Από καθαρή 24ωρη καλλιέργεια *Salmonella* spp. στο υπόστρωμα Columbia blood agar λαμβάνονταν 4-5 αποκίες, οι οποίες ενοφθαλμιζόνταν σε 5 ml θρεπτικού ζωμού Brain Heart Infusion Broth (Oxoid, England), στον οποίο είχε προστεθεί γλυκερόλη (Sigma- Aldrich), ώστε το τελικό υπόστρωμα να έχει περιεκτικότητα 20% σε αυτή. Εν συνεχεία γινόταν επώαση στους 37 °C για 14-16 ώρες. Ακολουθούσε διανομή της καλλιέργειας σε αποστειρωμένα κωνικά σωληνάρια 1,5 ml τύπου erpendorf και αποθήκευση στους -80 °C, μέχρι την περαιτέρω επεξεργασία των απομονωθέντων στελεχών.

### 2.3.3 Ταυτοποίηση των *Salmonella* spp.

Οι καθαρές καλλιέργειες διερευνήθηκαν με χρώση Gram, τη δοκιμή της οξειδάσης, με το εκλεκτικό υπόστρωμα Salmonella Chromogenic Agar (SCA-Biolife-Italy) και το Triple Sugar Iron Agar (TSI, Merck- Germany). Όλα τα Gram και οξειδάση αρνητικά στελέχη ταυτοποιήθηκαν βιοχημικά με τα API 20E (Biomérieux, France) και Microgen™ GnA+B-ID (Microgen Bioproducts Ltd, UK) συστήματα.

Τα στελέχη που αναγνωρίστηκαν ως *Salmonella* spp. εξετάστηκαν με τη μέθοδο της οροσυγκόλλησης σε πλάκα με πολυδύναμους αντιορούς ανίχνευσης O- και H-αντιγόνων (Remel Europe Ltd; Dartford, England). Όσα στελέχη ήταν θετικά στους αντιορούς οροταυτοποιήθηκαν πλήρως στο Κτηνιατρικό Εργαστήριο Χαλκίδας (Εθνικό Εργαστήριο Αναφοράς Σαλμονελλών & Μικροβιακής Αντοχής).

Ως εξαίρεση στους κανόνες του ISO για τα δείγματα από σφάγια χοίρων, καλλιέργεια όγκου ενός κρίκου από το BPW ενοφθαλμίστηκε και απ' ευθείας στο XLD, και στη συνέχεια ακολουθήθηκε και για αυτό τον τρόπο η διαδικασία του ISO.

#### 2.3.4 Διερεύνηση άτυπων βιοχημικών αντιδράσεων

Στελέχη *Salmonella* λακτόζη θετικά και H<sub>2</sub>S αρνητικά, μετά από ταυτοποίηση με τις ανωτέρω μεθόδους, καθώς και στελέχη *E. coli* συγκαλλιεργήθηκαν στα υποστρώματα SS και TSI μαζί με τυπικά στελέχη *Salmonella*, ώστε να διερευνηθούν τυχόν σημαντικές αλληλεπιδράσεις.

#### 2.4 Διενέργεια δοκιμών ελέγχου ευαισθησίας σε αντιμικροβιακές ουσίες και αιθέρια έλαια

Όλα τα στελέχη (σύνολο 101) που αναγνωρίστηκαν με τα API 20E, Microgen™ Gna+B-ID και την οροταυτοποίηση ως *Salmonella* spp. διερευνήθηκαν ως προς την αντοχή τους σε 24 αντιμικροβιακές ουσίες. Εξ αυτών, 59 οροταυτοποιηθέντα στελέχη που απομονώθηκαν από σφάγια χοίρων, διερευνήθηκαν για την αντοχή τους και σε τρία αιθέρια έλαια. Οι δοκιμές στα αντιβιοτικά και τα αιθέρια έλαια έγιναν με τη μέθοδο διάχυσης των δίσκων (μέθοδος Kirby-Bauer). Το στέλεχος *Escherichia coli* ATTC 25922 χρησιμοποιήθηκε ως στέλεχος αναφοράς. Οι αντιμικροβιακές ουσίες που χρησιμοποιήθηκαν επιλέχθηκαν με βάση τη χρήση τους στην ιατρική και κτηνιατρική πράξη. Αυτές ήταν: amoxicillin (30 µg), amoxicillin/clavulanic acid (20/10µg), ampicillin (10 µg), ampicillin/sulbactam (10/10 µg), aztreonam (30 µg), cefotaxime (30 µg), cefoxitin (30 µg), ceftazidime (30 µg), ceftiofur (30 µg), ceftriaxone (30 µg), cefuroxime (30 µg), chloramphenicol (30 µg), colistin (50 µg), doripenem (10 µg), enrofloxacin (5 µg), erythromycin (15µg), gentamycin (10 µg), kanamycin (30 µg), nalidixic acid (30 µg), penicillin G (10 µg), rifampin (30 µg), sulfamethoxazole/trimethoprim (23.75/1.25 µg), tetracycline (30 µg) και tigecycline (15 µg). Τα αιθέρια έλαια επιλέχθηκαν με βάση τη χρήση των αντίστοιχων βοτάνων στην τεχνολογία τροφίμων ζωικής προέλευσης.

Συγκεκριμένα, από καθαρή 24ωρη καλλιέργεια *Salmonella* spp. στο υπόστρωμα CBA λαμβάνονταν 2-3 αποκίες, οι οποίες εναιωρούνταν σε 5 ml στείρου υδατικού διαλύματος 0,85% NaCl, με σκοπό τη δημιουργία βακτηριδιακού εναιωρήματος 0,5 της κλίμακας Mc Farland. Εντός 15 min από την παρασκευή του μικροβιακού εναιωρήματος,

γινόταν εμφύσηση στέρου βαμβακοφόρου στειλεού στο μικροβιακό εναιώρημα και απομάκρυνση της περίσσειας ποσότητας με πίεση στα τοιχώματα. Ακολουθούσε επίστρωση σε Mueller-Hinton agar (LMLAB 39-UK). Στη συνέχεια, εντός 5-15 min από την επίστρωση του υλικού γινόταν η τοποθέτηση των αντιβιοτικών δισκίων με διανεμητή. Τα τρυβλία επωάζονταν στους 37 °C για 18-24 ώρες και ακολουθούσε η ανάγνωση των αποτελεσμάτων.

Η ερμηνεία των αποτελεσμάτων έγινε με βάση τις οδηγίες των Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI 2011), European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing (EUCAST 2013) και των Galani et al. (2008). Για εκείνα τα αντιμικροβιακά για τα οποία δεν ήταν διαθέσιμα τα όρια των ζωνών αναστολής, το στέλεχος θεωρούνταν ανθεκτικό, όταν η παρατηρούμενη ζώνη αναστολής του ήταν μικρότερη των 12 mm, ενώ θεωρούνταν ευαίσθητο, όταν παρουσίαζε ζώνη αναστολής μεγαλύτερη των 15 mm (όπως παρατηρείται με τους περισσότερους ευαίσθητους μικροοργανισμούς των πινάκων ευαισθησίας). Στελέχη που παρουσίασαν ευαισθησία σε τουλάχιστον τρεις κατηγορίες αντιμικροβιακών παραγόντων θεωρήθηκαν πολυανθεκτικά (Multi Drug Resistant- MDR) (Schwarz et al. 2010).

Από το σύνολο των στελεχών που διερευνήθηκαν με τα δισκία αντιμικροβιακών ουσιών, επιλέχθηκαν 59 πολυανθεκτικά στελέχη για τη διερεύνηση της αντιμικροβιακής ευαισθησίας τους στα εμπορικά αιθέρια έλαια ριγανέλαιο, θυμαρέλαιο και έλαιο δενδρολίβανου (ΕΚΟΦΑΡΜ ΕΛΛΑΣ ΑΒΕΕΕ). Η ανασχετική δράση των αιθέρων ελαίων προσδιορίστηκε με την εξέταση τριών διαβαθμισμένων αναραιώτων συγκεντρώσεων, σύμφωνα με τους Skandamis et al. (2001). Αποστειρωμένα χάρτινα δισκία (Whatman διαμέτρου 6 mm; Difco, Becton, Dickinson, Sparks, MD) εμποτίστηκαν με 5, 15 και 30 μl από κάθε αιθέριο έλαιο, ενώ η απόλυτη αλκοόλη χρησιμοποιήθηκε ως αρνητικός μάρτυρας.

Από κάθε μικροβιακό στέλεχος παρασκευάστηκε βακτηριδιακό εναιώρημα θολρότητας 0,5 Mc Farland. Τα εναιωρήματα επιστρώθηκαν σε Mueller-Hinton agar (LMLAB 39-UK), όπως και για τις αντιμικροβιακές ουσίες. Στη συνέχεια τα εμποτισμένα δισκία τοποθετήθηκαν με τη χρήση αποστειρωμένης λαβίδας στην επιφάνεια των ενοφθαλμισμένων τρυβλίων και οι καλλιέργειες επωάστηκαν στους 37 °C για 18-24 ώρες.



Η αναστολή της βακτηριακής ανάπτυξης προσδιορίστηκε με βάση τη διάμετρο των ζωνών αναστολής (mm). Έτσι, για την ερμηνεία των αποτελεσμάτων καθορίστηκαν τέσσερις ομάδες, ανάλογα με τη διάμετρο της ζώνης αναστολής (ZA): i) καμία αναστολή ανάπτυξης, ii) μικρή δράση ( $ZA < 12$  mm), iii) ενδιάμεση δράση ( $12 \text{ mm} \geq ZA < 20$  mm) και iv) μεγάλη δράση ( $ZA \geq 20$  mm) (Rota et al. 2008).

## 2.5 Στατιστική Ανάλυση

### 2.5.1 Πρόδρομη ορολογική διερεύνηση *Salmonella* spp. σε χοιρομητέρες και παχυνόμενους χοίρους

Η στατιστική ανάλυση για την εκτίμηση της σχέσης της οροθετικότητας των χοιρομητέρων και των χοίρων τελικής πάχυνσης πραγματοποιήθηκε με τη χρήση του συντελεστή συσχέτισης Pearson και την ANOVA (one factor,  $\alpha=0,05$ ), με το Statistical Package Excel 2007.

### 2.5.2 Οροδιερεύνηση χοίρων στο σφαγείο

Η στατιστική ανάλυση έγινε με το Statistical Package for Social Sciences (SPSS) version 21. Η στατιστική σημαντικότητα για όλες τις δοκιμές ορίστηκε στο  $p < 0.05$ .

Τα ποσοτικά δεδομένα παρουσιάστηκαν ως μέση τιμή και τυπική απόκλιση, ενώ τα ποιοτικά ως συχνότητα και ως ποσοστά. Η εκτίμηση των δεδομένων στην κανονική κατανομή έγινε με τη δοκιμασία Kolmogorov-Smirnov. Οι συγκρίσεις μεταξύ των ομάδων των ποιοτικών δεδομένων διεξήχθησαν χρησιμοποιώντας το Chi-square test, ενώ η σύγκριση κατανομής των ποσοτικών μεταβλητών έγινε με τη χρήση του Mann-Whitney U test.

Η συσχέτιση μεταξύ ELISA, Microgen, API και οροταυτοποίηση εξετάστηκε με το Spearman's rho test.

### 2.5.3 Διενέργεια δοκιμών ελέγχου ευαισθησίας σε αιθέρια έλαια

Η στατιστική ανάλυση έγινε με το Statistical Package for Social Sciences (SPSS) version 21. Η στατιστική σημαντικότητα για όλες τις δοκιμές ορίστηκε στο  $p < 0.05$  ή

$p < 0.001$ . Τα ποσοτικά δεδομένα παρουσιάστηκαν ως μέση τιμή και τυπική απόκλιση, ενώ τα ποιοτικά ως ποσοστά. Ο έλεγχος κανονικότητας έγινε με το Shapiro Wilk test (Marques de Sa 2007), πραγματοποιήθηκαν ανάλυση διακύμανσης επαναλαμβανόμενων μετρήσεων (Repeated Measures Analysis of Variance), η πολυμεταβλητή δοκιμή επαναλαμβανόμενων μετρήσεων γραμμικής παλινδρόμησης (the Multivariate Test GLM Repeated Measures), ενώ η σύγκριση των μέσων των εξαρτημένων μεταβλητών έγινε με το t-Test (Howitt & Cramer 2003, Gnardelis 2006). Επιπλέον, ο μη παραμετρικός έλεγχος Kruskal – Wallis Test χρησιμοποιήθηκε για τη σύγκριση των μέσων των ανεξάρτητων μεταβλητών.

## **ΚΕΦΑΛΑΙΟ 3**

### **ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ**



### 3.1 Πρόδρομη Ορολογική διερεύνηση *Salmonella* spp. σε χοιρομητέρες και παχυνόμενους χοίρους

Στη φάση αυτή της διερεύνησης συμμετείχαν 39 εκτροφές χοίρου τοκετού-τελικής πάχυνσης από πέντε γεωγραφικές περιοχές της Ελλάδας (Θεσσαλία, Στερεά Ελλάδα, Β. Ελλάδα, Ήπειρος, Κρήτη) (Πίνακας 3.1).

**Πίνακας 3.1: Αριθμός ορολογικά εξετασθέντων ζώων ανά εκτροφή**

ΓΕΩΓΡ.ΠΕΡΙΟΧΗ	ΑΡΙΘΜΟΣ ΕΚΤΡΟΦΩΝ	ΑΡΙΘΜΟΣ ΧΟΙΡΟΜΗΤΕΡΩΝ	ΑΡΙΘΜΟΣ ΠΑΧΥΝΟΜΕΝΩΝ	ΑΡΙΘΜΟΣ ΖΩΩΝ
<b>Β. Ελλάδα</b>	14	86	139	225
<b>Θεσσαλία</b>	7	39	71	110
<b>Στερεά Ελλάδα</b>	12	124	93	217
<b>Ήπειρος</b>	5	59	58	117
<b>Κρήτη</b>	1	6	13	19
<b>ΣΥΝΟΛΟ</b>	<b>39</b>	<b>314</b>	<b>374</b>	<b>688</b>

Εξετάστηκαν τρεις συνιστώμενες τιμές οπτικής πυκνότητας OD της ELISA (10%, 20% και 40%) για τον προσδιορισμό του αριθμού των θετικών χοιρομητέρων και των χοίρων τελικής πάχυνσης. Τα αποτελέσματα (Πίνακας 3.2) έδειξαν ότι:

- Για cut off  $OD \geq 10\%$  το ποσοστό των θετικών χοιρομητέρων κυμαινόταν από 73,39% - 100% (μ.ο. 81,53%) και των χοίρων τελικής πάχυνσης από 38,03% -84,95% (μ.ο. 70,32).
- Για cut off  $OD \geq 20\%$  το ποσοστό των θετικών χοιρομητέρων κυμαινόταν από 33,34% - 58,14% (μ.ο. 55,1%) και των χοίρων τελικής πάχυνσης από 12,68 – 64,52% (41,71% μ.ο) και
- Για cut off  $OD \geq 40\%$  το ποσοστό των θετικών χοιρομητέρων κυμαινόταν από 5,08% - 30,77% (μ.ο. 20,38%) και των χοίρων τελικής πάχυνσης από 0 – 31,18% (μ.ο. 15,5%).

**Πίνακας 3.2: Συγκεντρωτικός πίνακας οροθετικότητας χοιρομητέρων και χοίρων τελικής πάχυνσης 39 ελληνικών εκτροφών**

	ΣΥΝΟΛΟ	ΘΕΣΣΑΛΙΑ	Β.ΕΛΛΑΔΑ	ΣΤΕΡΕΑ ΕΛΛΑΔΑ	ΗΠΕΙΡΟΣ	ΚΡΗΤΗ
ΑΡΙΘΜΟΣ ΜΟΝΑΔΩΝ	39	7	14	12	5	1
<b>ΣΥΝΟΛΟ ΖΩΩΝ</b>	<b>688</b>	<b>110</b>	<b>225</b>	<b>217</b>	<b>117</b>	<b>19</b>
ΑΡΙΘΜΟΣ ΧΟΙΡΟΜΗΤΕΡΩΝ	314	39	86	124	59	6
ΑΡΙΘΜΟΣ ΠΑΧΥΝΟΜΕΝΩΝ	374	71	139	93	58	13
<b>ΑΡΙΘΜΟΣ ΖΩΩΝ OD &gt;10%</b>	<b>519- 75,44%</b>	<b>56- 50,1%</b>	<b>177- 78,67%</b>	<b>170- 78,34%</b>	<b>100- 85,47%</b>	<b>16- 84,21%</b>
ΑΡΙΘΜΟΣ ΧΟΙΡΟΜΗΤΕΡΩΝ OD >10%	256- 81,53%	29-74,36%	75-87,2%	91-73,39%	55-93,22%	6-100%
ΑΡΙΘΜΟΣ ΠΑΧΥΝΟΜΕΝΩΝ OD >10%	263- 70,32%	27- 38,03%	102- 73,38%	79- 84,95%	45- 77,59%	10- 76,92%
<b>ΑΡΙΘΜΟΣ ΖΩΩΝ OD &gt;20%</b>	<b>329- 47,82%</b>	<b>31- 28,19%</b>	<b>107- 47,46%</b>	<b>129- 59,45%</b>	<b>56- 47,86%</b>	<b>6- 31,58%</b>
ΑΡΙΘΜΟΣ ΧΟΙΡΟΜΗΤΕΡΩΝ OD >20%	173- 55,1%	22- 56,41%	50- 58,14%	69- 55,65%	30- 50,85%	2- 33,34%
ΑΡΙΘΜΟΣ ΠΑΧΥΝΟΜΕΝΩΝ OD >20%	156- 41,71%	9- 12,68%	57- 41%	60- 64,52%	26- 44,83%	4- 30,77%
<b>ΑΡΙΘΜΟΣ ΖΩΩΝ OD &gt;40%</b> <i>(30 εκτροφές)</i>	<b>122- 17,73%</b>	<b>14- 12,72%</b>	<b>38- 16,89%</b>	<b>59- 27,19%</b>	<b>10- 8,55%</b>	<b>1- 5,26%</b>
ΑΡΙΘΜΟΣ ΧΟΙΡΟΜΗΤΕΡΩΝ OD >40%	64- 20,38%	12- 30,77%	18- 20,93%	30- 24,19%	3- 5,08%	1- 16,67%
ΑΡΙΘΜΟΣ ΠΑΧΥΝΟΜΕΝΩΝ OD >40%	58- 15,5%	2- 2,82%	20- 14,39%	29-3 1,18%	7- 12,07%	-
<b>ΑΡΙΘΜΟΣ ΖΩΩΝ 40%&lt;OD &lt;70%</b> <i>(23 εκτροφές)</i>	<b>111- 16,13%</b>	<b>12- 10,9%</b>	<b>25- 11,11%</b>	<b>57- 26,26%</b>	<b>10- 8,55%</b>	<b>1- 5,26%</b>
ΑΡΙΘΜΟΣ ΧΟΙΡΟΜΗΤΕΡΩΝ	58- 18,47%	10- 25,64%	11- 12,79%	30- 24,19%	3- 5,08%	1- 16,67%

40%<OD <70%						
ΑΡΙΘΜΟΣ ΠΑΧΥΝΟΜΕΝΩΝ 40%<OD <70%	53- 14,17%	2- 2,82%	14- 10,07%	27- 29,03%	7- 12,07%	-
<b>ΑΡΙΘΜΟΣ ΖΩΩΝ OD &gt;70%</b> (7 εκτροφές)	<b>11- 1,6%</b>	<b>2- 1,81%</b>	<b>7- 3,11%</b>	<b>2- 0,9%</b>	-	-
ΑΡΙΘΜΟΣ ΧΟΙΡΟΜΗΤΕΡΩΝ OD >70%	6- 1,91%	2- 5,13%	4- 4,65%	-	-	-
ΑΡΙΘΜΟΣ ΠΑΧΥΝΟΜΕΝΩΝ OD >70%	5- 1,34%	-	3- 2,16%	2- 2,15%	-	-

Η στατιστική ανάλυση των αποτελεσμάτων έδειξε υψηλή θετική συσχέτιση μεταξύ των 5 γεωγραφικών περιοχών υπό διερεύνηση (Πίνακας 3.3). Δηλαδή, σε όλες τις γεωγραφικές περιοχές παρουσιάζεται το ίδιο μοτίβο ποσοτών προσβολής, ανεξαρτήτως της ηλικίας των ζώων με συντελεστή συσχέτισης μεταξύ 0,84 και 0,99. Παρομοίως, η Ανάλυση δεδομένων των αποτελεσμάτων με ανάλυση διακύμανσης κατά ένα παράγοντα (ANOVA one factor,  $\alpha=0,05$ ) έδειξε ότι μεταξύ των ομάδων (χοιρομητέρες-χοίροι τελικής πάχυνσης) δεν υπάρχει στατιστικά σημαντική διαφορά μεταξύ των περιοχών στις τιμές προσβολής για το σύνολο των OD (τιμή-P=0,98) (Πίνακας 3.4).

Με δεδομένα τα ευρήματα της οροδιερεύνησης ο σχεδιασμός της απομόνωσης του παθογόνου περιορίστηκε στη Θεσσαλία, όπου τα ποσοστά των οροθετικών εκτροφών ήταν μεταξύ 0-92,6% (cut off OD $\geq$ 10%) και μεταξύ 0-20% (cut off OD $\geq$ 40%).

**Πίνακας 3.3: Συντελεστές συσχέτισης επί του συνόλου των ζώων των 5 γεωγραφικών περιοχών**

	<i>ΘΕΣΣΑΛΙΑ</i>	<i>Β. ΕΛΛΑΔΑ</i>	<i>ΣΤΕΡΕΑ ΕΛΛΑΔΑ</i>	<i>ΗΠΕΙΡΟΣ</i>	<i>ΚΡΗΤΗ</i>
<b>ΘΕΣΣΑΛΙΑ</b>	1				
<b>Β. ΕΛΛΑΔΑ</b>	0,939072982	1			
<b>ΣΤ.ΕΛΛΑΔΑ</b>	0,84314398	0,941822167	1		
<b>ΗΠΕΙΡΟΣ</b>	0,910475885	0,997138042	0,947632736	1	
<b>ΚΡΗΤΗ</b>	0,930553359	0,996114908	0,916101671	0,994229	1



**Πίνακας 3.4: ANOVA one factor ( $\alpha=0,05$ ) για τη διερεύνηση της σημαντικότητας της ηλικίας και της γεωγραφικής περιοχής ως προς την οροθετικότητα**

<b>ΑΝΑΛΥΣΗ ΔΙΑΚΥΜΑΝΣΗΣ</b>						
<i>Προέλευση διακύμανσης</i>	<i>SS</i>	<i>Βαθμοί ελευθερίας</i>	<i>MS</i>	<i>F</i>	<i>τιμή-P</i>	<i>Κριτήριο F</i>
Μεταξύ ομάδων	0,048969	4	0,012242201	0,096515149	0,982394	2,866081402
Μέσα στις ομάδες	2,536846	20	0,126842278			
<b>Σύνολο</b>	<b>2,585814</b>	<b>24</b>				
<b>ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑ</b>						
<i>Ομάδες</i>	<i>Πλήθος</i>	<i>Άθροισμα</i>	<i>Μέσος όρος</i>	<i>Διακύμανση</i>		
<b>ΘΕΣΣΑΛΙΑ</b>	5	2,208909091	0,441781818	0,13869798		
<b>Β. ΕΛΛΑΔΑ</b>	5	1,711033333	0,342206667	0,109754272		
<b>ΣΤΕΡΕΑ ΕΛΛΑΔΑ</b>	5	1,571089862	0,314217972	0,069574727		
<b>ΗΠΕΙΡΟΣ</b>	5	1,666699145	0,333339829	0,145253273		
<b>ΚΡΗΤΗ</b>	5	1,789494737	0,357898947	0,170931136		

### 3.2 Οροδιερεύνηση χοίρων στο σφαγείο

Στη δεύτερη φάση της έρευνας εξετάστηκαν 123 χοίροι 15 εκτροφών. Το 59,35% των δειγμάτων αίματος είχε OD>10%, το 37,21% είχε OD>20% και το 20,33% παρουσίασε OD> 40%. Από τα ζώα που απομονώθηκε *Salmonella* το 30,23% με cut-off OD 40% και το 65,11% με cut-off OD 10% ήταν συγχρόνως οροθετικά (Πίνακες 3.5 και 3.6).

**Πίνακας 3.5: Αποτελέσματα οροθετικότητας στα *Salmonella* spp. για χοίρους τελικής πάχυνσης**

OD>10%		OD>20%		OD>40%	
No	%	No	%	No	%
73	59,35%	47	37,21%	25	20,33%

**Πίνακας 3.6: Συγκριτικά αποτελέσματα βακτηριολογικών μεθόδων απομόνωσης και ορολογικών μεθόδων διερεύνησης *Salmonella* spp.**

Αριθμός θετικών ζώων				
	TOTAL	OD> 10%	OD> 20%	OD >40%
ΟΡΟΤΑΥΤΟΠΟΙΗΣΗ	43	28 -65,11%	20-46,51%	13-30,23%
MICROGEN	45	31- 68,89%	23-51,11%	13-28,89%
API	50	35- 70%	25-50%	15-30%

### 3.3 Μικροβιολογική διερεύνηση της μόλυνσης ιστών και περιβαλλοντικών δειγμάτων

#### 3.3.1 Απομόνωση των *Salmonella* spp.

Η αξιολόγηση των ύποπτων αποικιών σύμφωνα με το ISO 6579, τους Quinn et al. (1994) και τους παρασκευαστές των επιλεγμένων θρεπτικών υποστρωμάτων έγινε βάση των χαρακτηριστικών του Πίνακα 3.7.

Από τις 615 καλλιέργειες ιστών και κοπράνων (615 δείγματα) σε MSR/V, 64 (10,4%) δεν παρουσίασαν ανάπτυξη, ενώ από τις καλλιέργειες των 378 περιβαλλοντικών δειγμάτων σε MSR/V δεν παρουσιάστηκε ανάπτυξη σε 153. Εκ των λοιπών 776 MSR/V καλλιεργιών οι οποίες διερευνήθηκαν περαιτέρω με τη χρήση των στερεών εκλεκτικών υποστρωμάτων του Πίνακα 3.7 απομονώθηκαν 265 στελέχη τα οποία ήταν Gram και οξειδάση αρνητικά και παρουσίαζαν τα φαινοτυπικά χαρακτηριστικά των υποστρωμάτων (Πίνακας 3.7). Από αυτά 101 στελέχη αναγνωρίστηκαν ως *Salmonella* spp. με το API 20E (Biomérieux, France) και το Microgen™ GnA+B-ID (Microgen Bioproducts Ltd, UK), ενώ τα υπόλοιπα ανήκαν σε άλλα Gram αρνητικά γένη. Τα στελέχη που χαρακτηρίστηκαν βιοχημικά ως *Salmonella* spp. προήλθαν από 50 (μέθοδος API 20E) και 45 (μέθοδος Microgen) χοίρους θετικούς από τουλάχιστον ένα σημείο δειγματοληψίας τους (Πίνακες 3.6 και 3.8).

**Πίνακας 3.7: Υποστρώματα απομόνωσης τυπικών *Salmonella* spp. και οι προτεινόμενες αντιδράσεις τους**

Υπόστρωμα	Χαρακτηριστική εμφάνιση αποικιών και υποστρωμάτων κατά την απομόνωση <i>Salmonella</i> spp.
MSRV	Τα κινητικά <i>Salmonellae</i> δίνουν αποικίες που χαρακτηρίζονται από υπόλευκες αδιαφανείς ζώνες θολερότητας διαμέτρου $\geq 30$ mm, ακτινωτά από το σημείο του ενοφθαλμισμού. Χρώμα υποστρώματος: κυανοπράσινο. Στις περισσότερες περιπτώσεις το υπόστρωμα γίνεται λευκό.
XLD	Ερυθρές αποικίες με (ή χωρίς) μαύρα κέντρα. Χρώμα υποστρώματος από ευθρό σε βαθύτερο ερυθρό.
SS	Αχρόχρωμες αποικίες (λακτόζη αρνητικές) με μαύρα κέντρα. Χρώμα υποστρώματος από ροζ-ερυθρό σε χρώμα άχρου.
BG	Ερυθρές-ροζ-λευκές αδιαφανείς αποικίες περιβαλλόμενες από λαμπρό κόκκινο υπόστρωμα. Χρώμα υποστρώματος από πορτοκαλί-καφέ σε λαμπρό ερυθρό.
SCA	Μωβ-φούξια αποικίες. Χρώμα υποστρώματος από λευκό σε απαλό βιολετί.
παραγωγή H <sub>2</sub> S	Αποικίες με μαύρο κέντρο στα XLD και SS agar, ορατό μαύρο ίζημα στο TSI agar.
TSI	Ερυθρό (αλκαλική αντίδραση στο κεκλιμένο) και κίτρινο (όξινη αντίδραση στον πάτο), παραγωγή H <sub>2</sub> S (μαύρο ίζημα), η μεγάλη παραγωγή του οποίου, τις περισσότερες φορές, επικαλύπτει τελείως την όξινη αντίδραση (κίτρινο) του πάτου.
Αντιοροί O, H	Συγκόλληση



**Πίνακας 3.8: Κατανομή απομονωθέντων οροτύπων από τις διάφορες περιοχές δειγματοληψίας των μολυσμένων ζώων**

<b>A/A ΖΩΟΥ</b>	<b>ΟΡΟΤΥΠΟΣ ΑΠΟ ΚΟΠΡΑΝΑ</b>	<b>ΟΡΟΤΥΠΟΣ ΑΠΟ ΕΙΛΕΟ</b>	<b>ΟΡΟΤΥΠΟΣ ΑΠΟ ΧΟΛΗ</b>	<b>ΟΡΟΤΥΠΟΣ ΑΠΟ ΛΕΜΦΑΔΕΝΕΣ</b>	<b>ΟΡΟΤΥΠΟΣ ΑΠΟ ΜΥΣ ΤΡΑΧΗΛΟΥ</b>
1.	<i>S.enterica</i> subsp. <i>enterica</i> 6,7:k:-				
2.	<i>S.enterica</i> subsp. <i>enterica</i> 6,7:k:-				
3.				<i>S.enterica</i> subsp. <i>enterica</i> . 6,7:k:-	
4.	* <i>S. enterica</i> subsp. <i>arizonae</i>	<i>S.enterica</i> subsp. <i>enterica</i> ser. 4,5,12:i:-			
5.		<i>S.enterica</i> subsp. <i>enterica</i> ser. 4,5,12:i:-	<i>S.enterica</i> subsp. <i>enterica</i> ser. 4,12:i:-		<i>S.enterica</i> subsp. <i>enterica</i> ser. 4,5,12:i:-
6.			<i>S.enterica</i> subsp. <i>enterica</i> ser. 4,12:i:-		
7.				<i>S.enterica</i> subsp. <i>enterica</i> ser. 4,12:i:-	
8.	<i>S. Meleagridis</i>				
9.	<i>S. Typhimurium</i>				
10.			<i>S. enterica</i> subsp. <i>arizonae</i>	<i>S. enterica</i> subsp. <i>houtenae</i> 40:g,t:-	
11.	<i>S. Typhimurium</i>	<i>S. Typhimurium</i>			<i>S. Typhimurium</i>
12.		<i>S. Typhimurium</i>	<i>S. Typhimurium</i>		<i>S. Typhimurium</i>
13.		<i>S. Typhimurium</i>			
14.			<i>S. enterica</i> subsp. <i>enterica</i> ser. 6,14,25: - : 1,2		

15.				Ατυποποίητη	
16.	<i>S. Typhimurium</i>				
17.		<i>S. Typhimurium</i>			<i>S. Typhimurium</i>
18.	<i>S. Typhimurium</i>	<i>S. Typhimurium</i>			
19.				Ατυποποίητη	
20.				<i>S.enterica</i> subsp. <i>enterica</i> ser. 4,12:i:	
21.				<i>S.enterica</i> subsp. <i>enterica</i> ser. 4,12:i:	
22.		<i>S. Cerro</i>	<i>S. enterica</i> subsp. <i>arizonae</i>		
23.				<i>S.enterica</i> subsp. <i>enterica</i> 6,7:k:-	
24.				<i>S.enterica</i> subsp. <i>enterica</i> 6,7:k:-	
25.	<i>S. enterica</i> subsp. <i>diarizonae</i> 61:k:1,5				
26.			<i>S. Bredeney</i>		
27.				<i>S. Bredeney</i>	
28.				<i>S. Bredeney</i>	
29.		Ατυποποίητη			
30.	<i>S. Typhimurium</i>			<i>S. Typhimurium</i>	
31.		Ατυποποίητη			
32.		<i>S.enterica</i> subsp. <i>enterica</i> ser. 4,12:i:-		<i>S.enterica</i> subsp. <i>enterica</i> ser. 4,12:i:-	
33.			<i>S. enterica</i> subsp. <i>arizonae</i>	<i>S.enterica</i> subsp. <i>enterica</i> ser. 4,12:i:-	
34.		<i>S.enterica</i> subsp. <i>enterica</i> ser. 4,12:i:-	<i>S. enterica</i> subsp. <i>arizonae</i>		
35.			<i>S. enterica</i>	<i>S. enterica</i> subsp.	

			subsp. <i>salamae</i> 38:b:1,2	<i>arizonae</i>	
36.				<i>S. Agona</i>	
37.	<i>S. Infantis</i>			<i>S.enterica</i> subsp. <i>enterica</i> 6,7:k:-	
38.		<i>S. Derby</i>			
39.		<i>S. Typhimurium</i>	<i>S.enterica</i> subsp. <i>enterica</i> 6,7:k:-		<i>S. Typhimurium</i>
40.	<i>S. Typhimurium</i>	<i>S. Typhimurium</i>		<i>S. Typhimurium</i>	<i>S. Typhimurium</i>
41.		<i>S.enterica</i> subsp. <i>enterica</i> ser. 4,5,12:i:-			
42.		<i>S.enterica</i> subsp. <i>enterica</i> ser. 4,5,12:i:-			
43.		<i>S.enterica</i> subsp. <i>enterica</i> ser. 4,5,12:i:-			
44.	<i>S. enterica</i> subsp. <i>arizonae</i>		<i>S. enterica</i> subsp. <i>arizonae</i>		
45.	<i>S. enterica</i> subsp. <i>arizonae</i>				
46.		<i>S. enterica</i> subsp. <i>arizonae</i>			
47.	<i>S. enterica</i> subsp. <i>arizonae</i>		<i>S. enterica</i> subsp. <i>arizonae</i>		
48.		<i>S. enterica</i> subsp. <i>arizonae</i>			
49.			* <i>S. enterica</i> subsp. <i>indica</i>		
50.	<i>S. enterica</i> subsp. <i>arizonae</i>				
**ΣΥΝ. ΖΩΩΝ	<b>11-25,56%</b>	<b>18-42%</b>	<b>7-16%</b>	<b>17-40%</b>	<b>6-14%</b>

\* Τα υποείδη *arizonae* και *indica* ταυτοποιήθηκαν βιοχημικά

\*\*Με βάση την οροταυτοποίηση



### 3.3.2 Οροταυτοποίηση των *Salmonella* spp.

Η οροταυτοποίηση (χρυσό πρότυπο) αναγνώρισε ως *Salmonella* spp. συνολικά 86 στελέχη. Από αυτά 59 στελέχη προέρχονταν από 43 χοίρους (Πίνακες 3.8, 3.9α και 3.9β) και 27 από περιβαλλοντικά δείγματα. Εκ των 43 θετικών χοίρων με βάση την οροταυτοποίηση (Πίνακας 3.8), δέκα (23%) ήταν μολυσμένοι σε περισσότερα από ένα σημεία δειγματοληψίας, ενώ τρεις ήταν μολυσμένοι με δύο διαφορετικούς οροτύπους από δύο διαφορετικά σημεία δειγματοληψίας. Συγκεκριμένα, 18 (41,8%) στελέχη απομονώθηκαν από τον ειλεό, 17 (39,8%) από μεσεντέριους λεμφαδένες, 11 (25,56%) από κόπρανα, 7 (16,2%) από χολή και 6 (13,9%) από τραχηλικούς μύες (Πίνακας 3.9α). Τα στελέχη από τραχηλικό μυ απομονώθηκαν όλα από χοίρους που είχαν τουλάχιστο ένα ακόμα θετικό σημείο δειγματοληψίας (Πίνακας 3.8).

Η οροταυτοποίηση κατέταξε τα στελέχη σε 14 οροτύπους. Αυτοί ήταν οι *S. Typhimurium* (21 στελέχη), οι μονοφασικοί τύποι *S. enterica* subsp. *enterica* ser. 4,12:i:- (9 στελέχη), *S. enterica* subsp. *enterica*. 6,7:k:- (7 στελέχη), *S. enterica* subsp. *enterica* ser. 4,5, 12:i:- (6 στελέχη) και *S. enterica* subsp. *enterica* ser. 6,14,25: - : 1,2 (ένα στέλεχος), οι ορότυποι *S. Bredeney* (3 στελέχη) και από ένα στέλεχος για τους οροτύπους *S. Agona*, *S. Derby*, *S. Infantis*, *S. Meleagridis*, *S. Cerro*, *S. enterica* subsp. *diarizonae* 61:k:1,5, *S. enterica* subsp. *salamae* 38:b:1,2 και *S. enterica* subsp. *houtenae* 40:g,t:-. Τέσσερα στελέχη βρέθηκαν ατυποποίητα, ενώ 14 αναγνωρίστηκαν βιοχημικά ως *S. enterica* subsp. *arizonae* και ένα ως *S. enterica* subsp. *indica* (Πίνακας 3.9).

Οι 27 ορότυποι των θετικών περιβαλλοντικών δειγμάτων ήταν οι *S. Typhimurium* (17 στελέχη) και ο μονοφασικός τύπος της *S. enterica* subsp. *enterica* ser. 4,5,12:i:- (10 στελέχη). Αυτά απομονώνονταν συνεχώς από τα ίδια γάντια πολλαπλών χρήσεων ενός εκδορέα σε όλους τους γύρους των δειγματοληψιών.

Η σχέση των απομονωθέντων στελεχών και η σχέση τους με την ορολογική διερεύνηση παρατηρείται στον Πίνακα 3.10.

**Πίνακας 3.9α: Ορότυποι *Salmonella* spp. που απομονώθηκαν από πέντε διαφορετικές περιοχές δειγματοληψίας χοίρων τελικής πάχυνσης**

Ορότυπος	Κόπρανα No	Ειλεός No	Χολή No	Μεσεντέριοι Λεμφαδένες No	Μυς τραχήλου No	Σύνολο στελεχών/ ορότυπο
<i>S. Typhimurium</i>	6	7	1	2	5	21
<i>S. enterica</i> subsp. <i>enterica</i> ser. 4,5,12:i:-	-	5	0	0	1	6
<i>S. enterica</i> subsp. <i>enterica</i> ser. 4,12:i:-	-	2	2	5	-	9
<i>S. Bredeney</i>	-	-	1	2	-	3
<i>S. Agona</i>	-	-	-	1	-	1
<i>S. Derby</i>	-	1	-	-	-	1
<i>S. enterica</i> subsp. <i>enterica</i> . 6,7:k:-	2	-	1	4	-	7
<i>S. Infantis</i>	1	-	-	-	-	1
<i>S. Meleagridis</i>	1	-	-	-	-	1
<i>S. Cerro</i>	-	1	-	-	-	1
<i>S. enterica</i> subsp. <i>enterica</i> ser. 6,14,25: - : 1,2	-	-	1	-	-	1
<i>S. enterica</i> subsp. <i>diarizonae</i> 61:k:1,5	1	-	-	-	-	1
<i>S. enterica</i> subsp. <i>salamae</i> 38:b:1,2	-	-	1	-	-	1
<i>S. enterica</i> subsp. <i>houtenae</i> 40:g,t:-	-	-	-	1	-	1
Ατυποποίητες	-	2	-	2	-	4
<b>ΣΥΝΟΛΟ</b>	11	18	7	17	6	<b>59</b>

**Πίνακας 3.9β: Στελέχη *Salmonella* spp. που αναγνωρίστηκαν βιοχημικά από χοίρους τελικής πάχυνσης**

Υποείδος	Κόπρανα No	Ειλεός No	Χολή No	Μεσεντέριοι Λεμφαδένες No	Σύνολο στελεχών
<i>S. enterica</i> subsp. <i>arizonae</i>	5	2	6	1	14
<i>S. enterica</i> subsp. <i>indica</i>	-	-	1	-	1
<b>ΣΥΝΟΛΟ</b>	5	2	7	1	<b>15</b>

**Πίνακας 3.10: Ορολογικά αποτελέσματα χοίρων από τους οποίους απομονώθηκαν ορότυποι *Salmonella* spp., που δεν ανήκουν στις οροομάδες B, C1 ή D και επομένως δεν θα “έπρεπε” να είχαν ανιχνευτεί με την ορολογική μέθοδο που χρησιμοποιήθηκε**

			Αρ.αρνητικών ορών αίματος (%)	Αρ. θετικών ορών αίματος σε διαφορετικά cut-off		
Ορότυπος	Οροομάδα	Αρ. Ζώων	OD<10%	OD> 10%	OD>20%	OD> 40%
<i>S. Typhimurium</i>	B	10	4 (40%)	6 (60%)	5 (50%)	3 (30%)
S.I. 4,5,12:i:-	B	5	0	5 (100%)	5 (100%)	4 (80%)
S.I. 4,12:i:-	B	8	2 (25%)	6 (75%)	6 (75%)	5 (62,5%)
<i>S. Bredeney</i>	B	3	1 (33,33%)	2 (66,67%)	0	0
<i>S. Agona</i>	B	1	1 (100%)	0	0	0
<i>S. Derby</i>	B	1	0	1 (100%)	1 (100%)	0
S.I. 6,7:k:-	C <sub>1</sub>	7	2 (28,57%)	5 (71,43%)	4 (57,14%)	3 (42,85%)
<i>S. Infantis</i>	C <sub>1</sub>	1	0	1 (100%)	1 (100%)	0
<i>S. Meleagridis</i>	E <sub>1</sub>	1	1 (100%)	0	0	0
<i>S. Cerro</i>	K	1	1 (100%)	0	0	0
S.I.6,14,25:-:1,2	H	1	0	1 (100%)	1 (100%)	0
<i>S. enterica</i> subsp. <i>diarizonae</i> 61:k:1,5	61	1	1 (100%)	0	0	0
<i>S. enterica</i> subsp. <i>salamae</i> 38:b:1,2	P	1	0	1 (100%)	1 (100%)	0
<i>S. enterica</i> subsp. <i>houtenae</i> 40:g,t:-	R	1	1 (100%)	0	0	0
Ατυποποίητες		4	1 (25%)	3 (75%)	0	0
<b>Σύνολο</b>			<b>15</b>	<b>31</b>	<b>24</b>	<b>15</b>

S.I. :*S. enterica* subsp. *enterica*

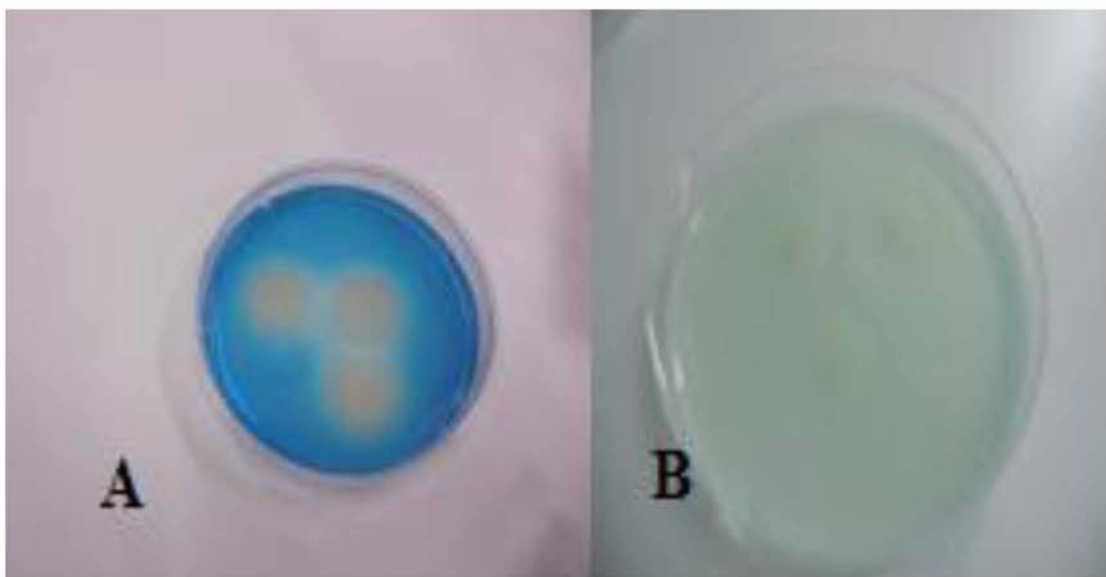


Ωστόσο, κατά την αξιολόγηση των αποικιών στα εκλεκτικά υποστρώματα, παρατηρήθηκαν αρκετές «άτυπες» αντιδράσεις, μερικές από τις οποίες θα μπορούσαν να επηρεάσουν τα τελικά αποτελέσματα, γι' αυτό διερευνήθηκαν περαιτέρω.

### 3.3.3 Άτυπες αντιδράσεις κατά την αξιολόγηση των αποικιών στα θρεπτικά υποστρώματα

Εκ των 59 οροταυτοποιηθέντων σαλμονελλών από ιστούς σφάγιων, οι 47 (79,66%) παρήγαγαν τυπικές αποικίες στα MSR/V, XLD, SS και BG υποστρώματα και 56 (94,92%) στο SCA (Πίνακας 3.11, Εικόνες 1, 2). Συγκεκριμένα, εκ των 615 MSR/V καλλιέργειών από ιστούς και κόπρανα ζώων (615 δείγματα) 47 (7,64%) έδωσαν τυπικές, κατά ISO, αποικίες *Salmonella* και 64 (10,4%) δεν παρουσίασαν ανάπτυξη. Εκ των λοιπών 504 MSR/V καλλιέργειών, 9 (1,8%) ταυτοποιήθηκαν τελικά ως *Salmonella* spp. και 18 έδωσαν αποικίες ύποπτες για *Salmonella* spp. στα στερεά εκλεκτικά υποστρώματα όπου ανακαλλιεργήθηκαν. Οι τελευταίες ταυτοποιήθηκαν ως *E. coli* (12 στελέχη), *Citrobacter freundii* (3 στελέχη), *Trabulsiiella guamensis* (2 στελέχη) και *Klebsiella ozanae* (1 στέλεχος).

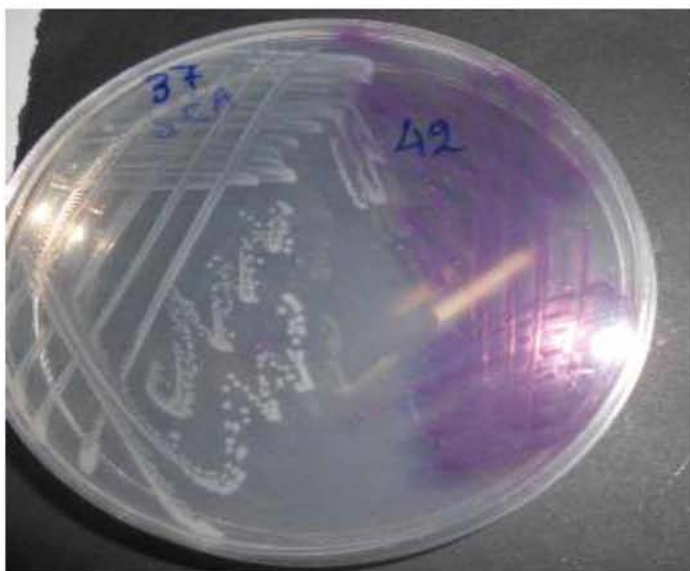
Επίσης, από τα 59 στελέχη *Salmonella* πέντε (5) ήταν λακτόζη θετικά και H<sub>2</sub>S αρνητικά στα XLD, SS και TSI, αλλά ταυτοποιήθηκαν ως *Salmonella* spp. (4 στελέχη) και ως *E. coli* (1 στέλεχος) στις μεθόδους API 20E και Microgen. Όμως, και τα πέντε οροταυτοποιήθηκαν ως *Salmonella* spp. και κατατάχθηκαν στους λιγότερο συχνά απαντώμενους οροτύπους: *S. enterica* subsp. *enterica* 6,14,25:-:1,2 (1), *S. enterica* subsp. *houtenae* 40:g,t:- (1), *S. enterica* subsp. *salamae* (1) και *S. enterica* subsp. *enterica* 6,7:k:- (2). Αυτά τα πέντε (5) στελέχη και τρία (3) στελέχη *E. coli* παρήγαγαν H<sub>2</sub>S μετά από συγκαλλιέργεια (30-48 ωρών ) με τυπικά H<sub>2</sub>S θετικά στελέχη *Salmonella* (Πίνακας 3.11).



**Εικόνα 1. Καλλιέργειες στο MSR**

**A:** *E. coli* σε MSR, το υπόστρωμα δεν αναστέλλει την ανάπτυξη του μικροοργανισμού.

**B:** *Salmonella spp.* σε MSR, το υπόστρωμα «ασπρίζει»



**Εικόνα 2. Καλλιέργειες στο Salmonella Chromogenic Agar**

Τυπικές μωβ αποικίες *S. Typhimurium* (δεξιά)

Διαφανείς αποικίες της *S. enterica subsp. houtenae* 40:g,t:- (αριστερά)

**Πίνακας 3.11: Άτυπες *Salmonella* spp. Φαινοτυπικός χαρακτηρισμός αποικίας και υποστρώματος**

A/A	ISOLATE	MSRV (Ανάπτυξη)	XLD	SS	BG	SCA	H <sub>2</sub> S	TSI	ΑΝΤΙΟΠΟΙ	ΒΙΟΧΗΜΙΚΟ ΠΡΟΦΙΛ
1.	S.I.4,5,12:i:-	-	b	τυπική	τυπική	τυπική	+	τυπική	O(+), H(+)	<i>Salmonella</i> spp.
2.	S. I. 4,12:i:-	+++	b	τυπική	τυπική	τυπική	+	τυπική	O(+), H(+)	<i>Salmonella</i> spp.
3.	S. I. 4,12:i:	++++	b	τυπική	τυπική	τυπική	+	h	O(+), H(+)	<i>Salmonella</i> spp.
4.	S. I. 4,12:i:-	++++	b	τυπική	τυπική	τυπική	+	τυπική	O(+), H(+)	<i>Salmonella</i> spp.
5.	S.I.6,14,25:- :1,2	-	c	d	e	f	+	g	O(+), H(+)	<i>Salmonella</i> spp.
6.	<i>S. enterica</i> subsp. <i>houtenae</i> 40:g,t:-	+	c	d	e	f	+	g	O(+), H(+)	<i>Salmonella</i> spp.
7.	<i>S. enterica</i> subsp. <i>salamae</i> 38:b:1,2	+	c	d	e	f	+	g	O(+), H(+)	<i>Salmonella</i> spp.
8.	S.I. 6,7:k:-	+	c	d	e	τυπική	+	g	O(+), H(+)	<i>E.coli</i>
9.	S.I. 6,7:k:-	+++	c	d	e	τυπική	+	g	O(+), H(+)	<i>Salmonella</i> spp.
10.	S. Cerro	++	τυπική	τυπική	τυπική	τυπική	+	h	O(+), H(+)	<i>E. coli</i> inactive (indole θετική)
11.	<i>S. enterica</i> subsp. <i>diarizonae</i> 61:k:1,5	+++	τυπική	τυπική	τυπική	τυπική	+	h	O(+), H(+)	<i>Salmonella</i> spp.

<sup>b</sup> Διαφανείς ροζ αποικίες με πολύ μικρό μαύρο κέντρο σαν 'κεφαλή καρφίτσας'.

<sup>c</sup> Διαφανείς κίτρινες αποικίες περιβαλλόμενες από άλω χωρίς μαύρα κέντρα.

<sup>d</sup> Κόκκινες αποικίες (λακτόζη θετικές), χωρίς μαύρα κέντρα. Σε συγκαλλιέργεια με τυπικά στελέχη *Salmonella*, εκδήλωσαν προοδευτικά (σε 30 ώρες) την ικανότητα παραγωγής H<sub>2</sub>S, καθώς και την μετατροπή τους σε λακτόζη αρνητικές (αχρόχρωμες) αποικίες, δίνοντας τελικά την φαινοτυπική εμφάνιση τυπικών *Salmonella* spp.

<sup>e</sup> Κίτρινες έως πρασινοκίτρινες αποικίες και υπόστρωμα. Μετατροπή σε ερυθρές αποικίες-υπόστρωμα σε συγκαλλιέργεια με τυπικά στελέχη *Salmonella*.

<sup>f</sup> Διαφανείς αποικίες

<sup>g</sup> Κίτρινος πυθμένας/κεκλιμένη περιοχή και H<sub>2</sub>S τις πρώτες 24 ώρες, αλλά σε 48 ώρες ο πυθμένας άλλαξε σε ερυθρό.

<sup>h</sup> Κίτρινος πυθμένας/κεκλιμένη περιοχή και πολύ ικρή παραγωγή H<sub>2</sub>S.

S.I.: *Salmonella enterica* subsp. *enterica*



### 3.3.4 Στατιστική ανάλυση οροδιερεύνησης και απομονώσεων

Βάση των αναλύσεων της δοκιμασίας  $\chi^2$ , συσχέτιση μεταξύ της ELISA και της οροταυτοποίησης παρατηρήθηκε μόνο όταν η επιλεγείσα τιμή του cut-off ήταν OD 40% ( $p=0,049$ ) έναντι  $p=0,442$  και  $p=0,178$  για τιμές του cut-off OD 10% και 20% αντιστοίχως (Πίνακας 3.12). Το OR (95% CI) για ένα ζώο θετικό στη *Salmonella* για τιμές cut-off 10%, 20% και 40% ήταν 1,452 (0,674 -3,127), 1,707 (0,800- 3,641) και 2,456 (1,004 – 6,007) αντιστοίχως. Επιπλέον, παρατηρήθηκε πολύ σημαντική συσχέτιση μεταξύ της ELISA και των μονοφασικών οροτύπων για cut-off OD 40% ( $p<0,000$ ).

Η ευαισθησία της ELISA για τιμές cut-off 10, 20 και 40% ήταν αντίστοιχα 65,11%, 46,51% και 30,23%, ενώ η ειδικότητα της μεθόδου ήταν 43,75%, 66,25% και 85% (Πίνακας 3.14).

Επιπλέον, τόσο το API 20E (Biomerieux, France) όσο και το Microgen™ GnA+B-ID (Microgen Bioproducts Ltd, UK) παρουσίασαν σημαντική συσχέτιση με τα αποτελέσματα της οροταυτοποίησης ( $p<0,01$ ). Όσον αφορά την ELISA, το Microgen έδειξε σημαντική συσχέτιση με αυτή μόνο για cut-off OD 20% ( $p=0,034$ ), ενώ το API είχε καλή συσχέτιση με τα cut-off OD 20% και OD 40% ( $p=0,037$  και  $p=0,039$  αντίστοιχα) (Πίνακες 3.12, 3.13). Τέλος, η δοκιμασία  $\chi^2$  έδειξε συσχέτιση των μονοφασικών οροτύπων στα cut-off των 20% και 40% ( $p=0,029$  και  $p<0,000$  αντίστοιχα).

**Πίνακας 3.12: Αποτελέσματα της δοκιμασίας  $\chi^2$  για την οροταυτοποίηση, το Microgen και το API**

	NRL	Microgen	API
OD 10%	0,442	0,128	0,062
OD 20%	0,178	0,034	0,037
OD 40%	0,049	0,103	0,039
Microgen	<0,01		
API	<0,01		

**Πίνακας 3.13: Συσχέτιση οροαυτοποίησης, Microgen και API**

		Οροαυτοποίηση	Elisa OD 10%	Elisa OD 20%	Elisa OD 40%	Micro gen	API
Οροαυτοποίηση	Correlation Coefficient	1,000	0,086	0,125	<b>0,180</b>	<b>0,894</b>	<b>0,886</b>
	Sig. (2-tailed)		0,344	0,168	0,046	0,000	0,000
	N	123	123	123	123	123	123

**Πίνακας 3.14: Ευαισθησία - Ειδικότητα της ELISA για διαφορετικές τιμές cut off**

		Οροαυτοποίηση		Σύνολο	ΕΥΑΙΣΘΗΣΙΑ	ΕΙΔΙΚΟΤΗΤΑ
		<i>Salmonella</i>	Υγιή			
ELISA OD 10%	>10	28	45	73	0,651162791	0,4375
	<10	15	35	50		
Σύνολο		43	80	123		
		Οροαυτοποίηση		Σύνολο	ΕΥΑΙΣΘΗΣΙΑ	ΕΙΔΙΚΟΤΗΤΑ
		<i>Salmonella</i>	Υγιή			
ELISA OD 20	>20	20	27	47	0,465116279	0,6625
	<20	23	53	76		
Σύνολο		43	80	123		
		Οροαυτοποίηση		Σύνολο	ΕΥΑΙΣΘΗΣΙΑ	ΕΙΔΙΚΟΤΗΤΑ
		<i>Salmonella</i>	Υγιή			
ELISA OD 40%	>40	13	12	25	0,302325581	0,85
	<40	30	68	98		
Σύνολο		43	80	123		

Τα αναλυτικά αποτελέσματα των ορολογικών και βακτηριολογικών μεθόδων για τα διαφορετικά cut-off δίδονται στους πίνακες 3.5, 3.6, 3.15, 3.16, και 3.17.

**Πίνακας 3.15: Πίνακας 2x2 αποτελεσμάτων Οροταυτοποίησης *Salmonella* και ELISA για τιμή cut-off OD 10%**

	ELISA αρνητικά	ELISA θετικά	Σύνολο
Οροταυτοποίηση αρνητικά	35	45	80
Οροταυτοποίηση θετικά	15	28	43
Σύνολο	50	73	123

**Πίνακας 3.16: Πίνακας 2x2 αποτελεσμάτων Οροταυτοποίησης *Salmonella* και ELISA για τιμή cut-off OD 20%**

	ELISA αρνητικά	ELISA θετικά	Σύνολο
Οροταυτοποίηση αρνητικά	53	27	80
Οροταυτοποίηση θετικά	23	20	43
Σύνολο	76	47	123

**Πίνακας 3.17: Πίνακας 2x2 αποτελεσμάτων Οροταυτοποίησης *Salmonella* και ELISA για τιμή cut-off OD 40%**

	ELISA αρνητικά	ELISA θετικά	Σύνολο
Οροταυτοποίηση αρνητικά	68	12	80
Οροταυτοποίηση θετικά	30	13	43
Σύνολο	98	25	123

### 3.4 Διενέργεια δοκιμών ελέγχου ευαισθησίας σε αντιμικροβιακές ουσίες και αιθέρια έλαια

Τα 101 στελέχη που αναγνωρίστηκαν με τα API 20E, Microgen™ GnA+B-ID και την οροταυτοποίηση ως *Salmonella* spp. διερευνήθηκαν με τη μέθοδο διάχυσης των δίσκων ως προς την ευαισθησία τους σε 24 αντιμικροβιακούς παράγοντες.

Τα ευρήματα έδειξαν υψηλά ποσοστά ανθεκτικότητας στις ουσίες: penicillin G (10 µg) (93%), rifampin (30 µg) (75,24%), tetracycline (30 µg) (68,31%), sulfamethoxazole/trimethoprim (23.75/1.25 µg) (61,38%), ampicillin (10 µg) (54,45%), amoxicillin (30 µg) (53,46%) και μικρότερα σε chloramphenicol (30 µg) (22,77%), kanamycin (30 µg) (14,85%), και colistin (50 µg) (11,88%) (Πίνακας 3.18).

Η *in vitro* αντιβακτηριδιακή δράση των αιθέριων ελαίων έναντι των 59 στελεχών *Salmonella* που δοκιμάστηκαν, αξιολογήθηκε ποιοτικά από την παρουσία ή απουσία ζωνών αναστολής και ποσοτικά από τις διαμέτρους των ζωνών αναστολής. Οι μετρήσεις των ζωνών αναστολής για κάθε μία από τις 3 ποσότητες των αιθέριων ελαίων φαίνονται στον Πίνακα 3.18.

Τα αιθέρια έλαια έδειξαν ευρύ φάσμα αντιμικροβιακής δράσης. Σε όλες τις περιπτώσεις η εφαρμογή των εμποτισμένων δισκίων με τις διαφορετικές ποσότητες (5, 15 και 30 µl) του ριγανέλαιου και θυμαρέλαιου έδωσαν καθαρές ζώνες ανάσχεσης της βακτηριακής ανάπτυξης, οι οποίες κυμαίνονταν από 20 - 40, 23 - 50 και 30 - 60 mm για το ριγανέλαιο και από 11 - 42, 12 - 50 και 30 - 70 mm για το θυμαρέλαιο αντίστοιχα. Ωστόσο, το έλαιο δενδρολίβανου παρουσίασε τη μικρότερη δραστηριότητα (καμία αναστολή ανάπτυξης ή πολύ μικρές ζώνες αναστολής), σε σύγκριση με τα άλλα δύο αιθέρια έλαια, σε όλες τις ποσότητες με ζώνες ανάσχεσης μεταξύ 10-17, 10-30 και 10-50 mm αντίστοιχα (Πίνακας 3.20) (Εικόνα 3). Ο αρνητικός μάρτυρας (η απόλυτη αλκοόλη) δεν είχε ανασχετική δράση για κανένα από τα εξετασθέντα βακτήρια.



**Πίνακας 3.18: Συγκεντρωτικά αποτελέσματα ανθεκτικότητας σε αντιμικροβιακές ουσίες στελεχών *Salmonella* spp. που απομονώθηκαν από χοίρους και περιβαλλοντικά δείγματα αυτών**

	<i>S. Typhimurium</i>	S.I. 4,12:i:-	S.I. 4,5,12:i:-	S.I. 6,7:k:-	<i>S. Bredeney</i>	<i>S. Agona</i>	<i>S. Infantis</i>	<i>S. Derby</i>	<i>S. Meleagridis</i>	<i>S. Cerro</i>	S.I. 6,14,25:- : 1,2	<i>S. enterica</i> subsp. <i>diarizonae</i> 61:k:1,5	<i>S. enterica</i> subsp. <i>salamae</i> 38:b:1,2	<i>S. enterica</i> subsp. <i>hontenae</i> 40:g:t:-	Rough	<i>S. enterica</i> subsp. <i>arizonae</i>	<i>S. enterica</i> subsp. <i>indica</i>	Total No (%) of resistant strains
AML	22	8	10	1	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	3	8	1	54-53.46%
AMC	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1(I)	5	0	5-4.9%
AMP	22	8	10	1	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	3	9	1	55-54.45%
SAM	1(I)	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	2-1.9%
AZT	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	1-1%
CTX	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
FOX	0	1(I)	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	5	0	5-4.9%
CAZ	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	1-1%
EFT	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
CRO	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
CXM	4(I)	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
CT	4	2	0	1	0	0	0	0	0	1	0	1	0	0	0	3	0	12-11.88%
C	8	1	1	1	0	0	0	0	0	0	1	0	1	1	3	5	1	23-22.77%
DOR	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
ENR	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	2	1(I)	2-1.9%
E	38	9	16	7	3	1	1	1	1	1	1	1	1	1	4	14	1	101-100%
CN	1	2	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	4-3.9%
K	4	1	5	1(I)	3	0	0	0	0	0	0	0	1(I)	1(I)	1	1	1(I)	15-14.85%
NA	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	3	1	4-3.9%
P	35	9	16	6	2	1	1	1	0	1	1	0	1	1	4	14	1	94-93%
RD	20, 6(I)	7, 2(I)	16	6, 1(I)	3	1	1	1	1	1, (I)	1	1, (I)	0	1	4	14	1(I)	76-75.24%
SXT	20	7	16	1	0	0	0	0	0	0	1	0	1	1	4	10	1	62-61.38%
TE	22	9	16	1	3	0	0	0	0	0	1	0	1	1	4	10	1	69-68.31%
TGC	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1(I)	0	0	1(I)	0	1	0	1-1%
<b>Total N.</b>	<b>38</b>	<b>9</b>	<b>16</b>	<b>7</b>	<b>3</b>	<b>1</b>	<b>1</b>	<b>1</b>	<b>1</b>	<b>1</b>	<b>1</b>	<b>1</b>	<b>1</b>	<b>1</b>	<b>4</b>	<b>14</b>	<b>1</b>	<b>101</b>

*AML* Amoxicillin, *AMC* Amoxicillin-clavulanic acid, *AMP* Ampicillin, *SAM* Ampicillin-sulbactam, *AZT* Aztreonam, *CTX* Cefotaxime, *FOX* Cefoxitin, *CAZ* Ceftazidime, *EFT* Ceftiofur, *CRO* Ceftriaxone, *CXM* Cefuroxime, *C* Chloramphenicol, *CT* Colistin, *ENR* Enrofloxacin, *E* Erythromycin, *CN* Gentamycin, *K* Kanamycin, *NA* Nalidixic acid, *P* Penicillin G, *RD* Rifampin, *SXT* Sulfamethoxazole/Trimethoprim, *TE* Tetracycline, *TGC* Tigecycline- (I)= Intermediate

Η στατιστική ανάλυση των αποτελεσμάτων έδειξε ότι:

1. Υπήρχε στατιστικώς σημαντική διαφορά μεταξύ των ζωνών αναστολής (ZA) για τις ποσότητες των 5-15 και 15-30 μl για τα τρία αιθέρια έλαια, δηλαδή ότι η αντιμικροβιακή δράση εξαρτάται από την ποσότητα του αιθέριου ελαίου (Γραφήματα 1,2,3):

- ρίγανη: 5 και 15ml, Sig<0,001, 15 και 30ml, Sig<0,001.
- δενδρολίβανο: 5 και 15ml, Sig=0,001, 15 και 30ml, Sig<0,009
- Θυμαρί Sig<0,001 και για τα δύο ζεύγη.

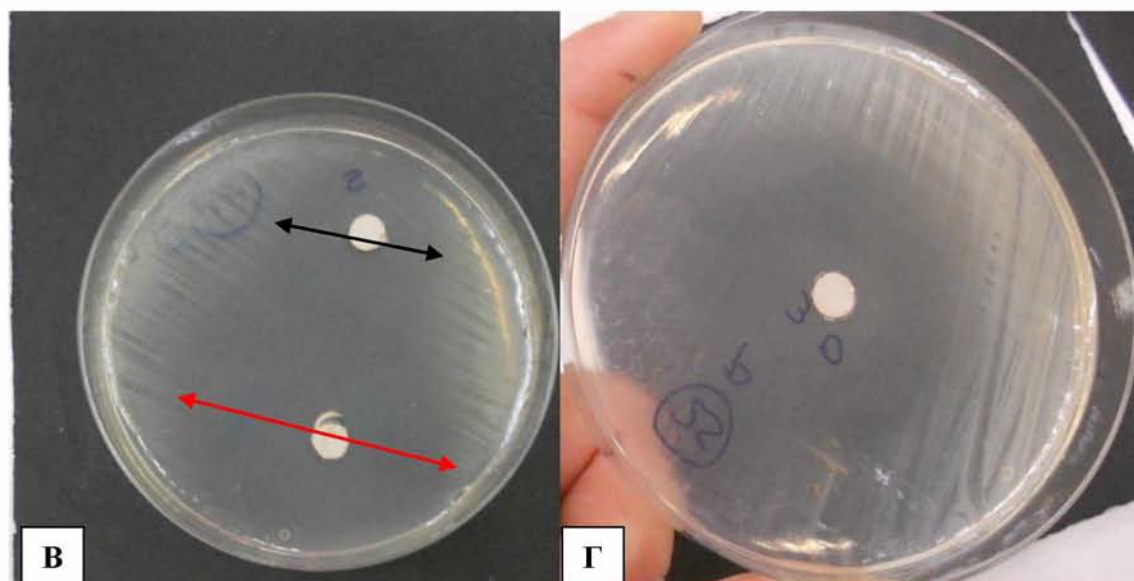
2. Το είδος του αιθέριου ελαίου επηρεάζει σημαντικά το εύρος της ζώνης αναστολής (F=457,8, p<0,001) (Πίνακας 21).

3. Το εύρος των Ζωνών Αναστολής μεταξύ των οροτύπων διέφερε σημαντικά για το ριγανέλαιο 5ml (Sig.=0.003), 30ml (Sig=0,016), για το έλαιο δενδρολίβανου 5 ml (Sig=0,001), και για το θυμαρέλαιο 5ml και 30ml Sig=0,032 και Sig=0,037 αντίστοιχα.

Ωστόσο, δεν μπορούσε να εξεταστεί μεταξύ ποιων οροτύπων ειδικότερα υπάρχει στατιστικά σημαντική διαφορά, διότι οι προϋποθέσεις για την εφαρμογή της one way ANOVA για ανεξάρτητα δείγματα δεν θεωρείται αξιόπιστη, λόγω της ανώμαλης κατανομής των υποομάδων (Γραφήματα 4,5,6).



A



B

Γ

**Εικόνα 3. Αντιμικροβιακή δράση A: Αντιβιοτικών, B: ριγανέλαιου 5 μl (μαύρο βέλος) και 15 μl (κόκκινο βέλος), B: Ριγανέλαιου 30 μl.**

**Πίνακας 3.19: Ζώνες ανάσχεσης (mm) των αιθέριων ελαίων σε 3 διαφορετικές ποσότητες έναντι *Salmonella* spp. στελεχών**

ΟΡΟΤΥΠΟΣ	ΡΙΓΑΛΕΛΑΙΟ			ΕΛΑΙΟ ΔΕΝΔΡΟΛΙΒΑΝΟΥ			ΘΥΜΑΡΕΛΑΙΟ		
	5 μl	15 μl	30 μl	5 μl	15 μl	30 μl	5 μl	15 μl	30 μl
S. Typhimurium	30	40	44	R	R	R	20	21	35
S. Typhimurium	30	42	43	R	R	R	20	28	31
S. Typhimurium	30	40	40	R	R	R	20	25	32
S. Typhimurium	30	32	35	R	R	R	20	35	48
S. Typhimurium	27	30	35	R	R	R	42	45	58
S. Typhimurium	26	32	40	R	R	R	40	42	60
S. Typhimurium	25	30	35	R	R	R	30	42	47
S. Typhimurium	25	32	42	R	R	R	40	41	60
S. Typhimurium	28	33	45	R	R	R	40	42	60
S. Typhimurium	30	32	35	R	R	R	20	40	50
S. Typhimurium	30	32	41	R	10	11	20	28	31
S. Typhimurium	33	34	40	R	11	13	25	33	36
S. Typhimurium	28	35	35	R	R	R	16	34	35
S. Typhimurium	27	40	40	R	R	15	35	50	50
S. Typhimurium	21	23	37	R	R	R	21	40	51
S. Typhimurium	27	37	50	R	R	R	22	22	60
S. Typhimurium	25	31	35	R	R	R	16	26	34
S. Typhimurium	22	30	40	R	R	12	11	12	37
S. Typhimurium	36	38	37	R	R	R	22	23	32
S. Typhimurium	22	31	41	R	11	11	24	33	44
S. Typhimurium	25	30	35	R	R	R	30	41	46
S.I. 4,12:i:-	24	36	40	R	R	R	28	38	40
S.I. 4,12:i:-	30	45	53	R	R	R	38	47	55
S.I. 4,12:i:-	30	42	56	R	R	R	35	43	55
S.I. 4,12:i:-	30	50	60	R	R	R	35	45	60
S.I. 4,12:i:-	32	33	43	R	R	R	40	43	63
S.I. 4,12:i:-	24	30	40	R	R	R	20	28	30
S.I. 4,12:i:-	21	30	38	R	R	R	30	32	40
S.I. 4,12:i:-	25	27	41	R	10	11	24	40	40
S.I. 4,12:i:-	20	30	30	R	R	R	40	40	40
S.I. 4,5,12:i:-	40	42	46	R	R	R	40	44	47
S.I. 4,5,12:i:-	30	40	44	R	R	R	20	22	30
S.I. 4,5,12:i:-	30	30	45	R	10	15	28	32	42
S.I. 4,5,12:i:-	25	38	40	R	10	10	20	21	35
S.I. 4,5,12:i:-	27	32	45	R	R	R	25	42	45
S.I. 4,5,12:i:-	29	30	34	R	R	10	20	22	30
S.I. 6,7:k:-	22	31	35	R	R	R	20	40	50



S.I. 6,7:k:-	22	31	35	R	R	R	20	40	50
S.I. 6,7:k:-	20	32	34	R	R	R	22	41	52
S.I. 6,7:k:-	22	31	41	R	12	12	25	35	40
S.I. 6,7:k:-	20	31	34	R	R	R	22	41	50
S.I. 6,7:k:-	21	31	35	R	R	R	20	40	50
S.I. 6,7:k:-	22	32	38	R	R	R	40	45	58
S. Bredenev	21	30	40	R	R	R	40	42	65
S. Bredenev	21	29	42	R	R	R	40	41	70
S. Bredenev	30	32	35	R	R	R	20	40	50
S. Agona	31	45	47	R	R	R	25	30	40
S. Infantis	27	33	43	R	R	R	35	50	50
S. Derby	27	40	40	R	R	R	25	42	45
S. Meleagridis	38	47	55	R	R	R	38	48	60
S. Cerro	25	30	35	R	R	R	30	33	40
S. enterica subsp. diarizonae 61:k:1,5	38	48	55	13	21	28	38	45	60
S. enterica subsp. salamae 38:b:1,2	40	40	50	17	26	28	30	34	50
S.I. 6,14,25: - : 1,2	30	42	50	14	30	50	40	50	50
S. enterica subsp. houtenae 40:g,t:-	30	44	46	12	15	25	30	44	60
Ατυποποίητητο	25	40	50	R	R	R	40	40	62
Ατυποποίητητο	29	36	40	12	30*	40*	40	40	56
Ατυποποίητητο	29	30	34	R	R	10	20	22	30
Ατυποποίητητο	30	35	42	10	25 *	38 *	40	40	58

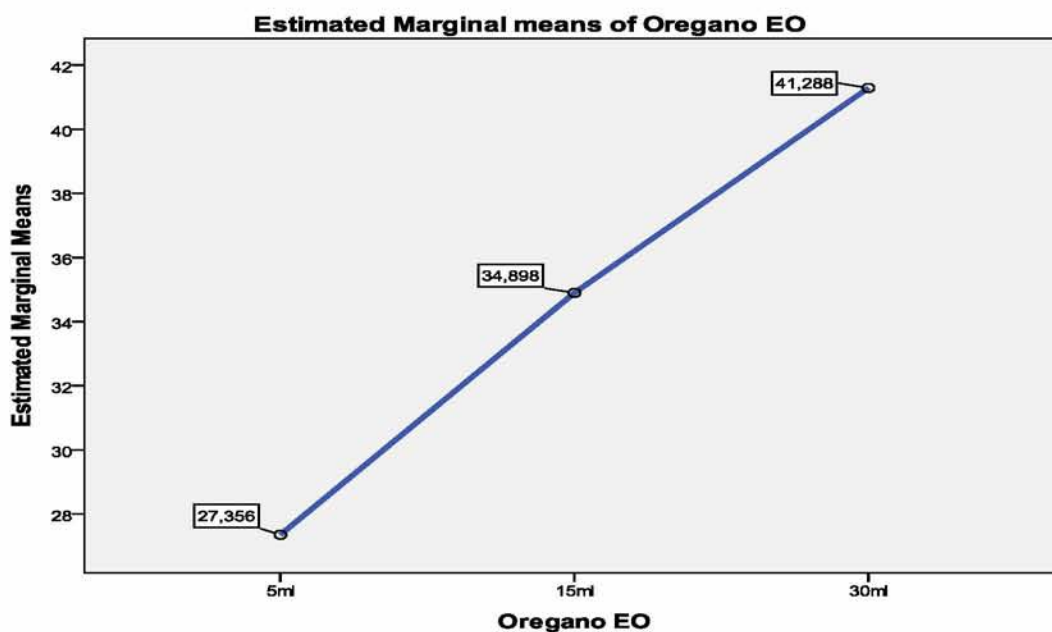
\*Ανθεκτικοί υποπληθυσμοί

**Πίνακας 3.20: Συγκεντρωτικά αποτελέσματα της αντιμικροβιακής δράσης του ριγανέλαιου, έλαιου δενδρολίβανου και θυμαρέλαιου έναντι *Salmonella* spp. που απομονώθηκαν από χοίρους**

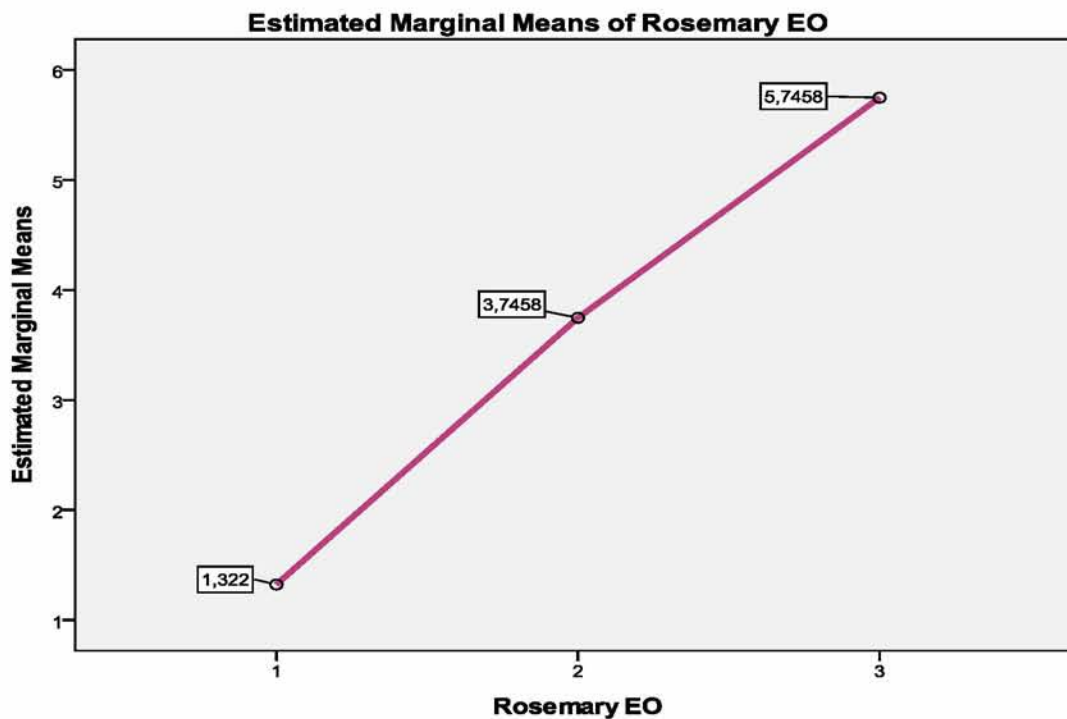
	ΡΙΓΑΝΕΛΑΙΟ			ΕΛΑΙΟ ΔΕΝΔΡΟΛΙΒΑΝΟ			ΘΥΜΑΡΕΛΑΙΟ		
	5μl	15μl	30μl	5μl	15μl	30μl	5μl	15μl	30μl
<b>Αντιμικροβιακή δράση</b>									
<u>Ανθεκτικότητα</u> ( <i>No</i> Στελεχών)	-	-	-	53/59	46/59	42/59	-	-	-
<12 mm:	-	-	-	54/59	52/59	48/59	1/59	-	-
12 mm ≥ ZOI< 20 mm	-	-	-	5/59	2/59	5/59	2/59	1/59	-
≥ 20 mm: <u>μεγάλη δράση</u>	59/59	59/59	59/59	-	5/59	6/59	56/59	58/59	59/59
<b>Range ZOI (mm)</b>	20 – 40	23 – 50	30- <b>60</b>	10-17	10-30	10-50	11 – 42	12 – 50	30- <b>70</b>
<b>Mean ZOI (mm)</b>	27.36	34.90	<b>41.29</b>	1.32	3.75	5.59	28.42	36,69	<b>47,29</b>
<b>Std. Deviation</b>	4,926	5,818	6,457	4,023	8,014	11,264	8,770	8,756	10,830

**Πίνακας 3.21: Στατιστική ανάλυση εκτίμησης επίδρασης του είδους του αιθερίου ελαίου στο εύρος της ζώνης αναστολής**

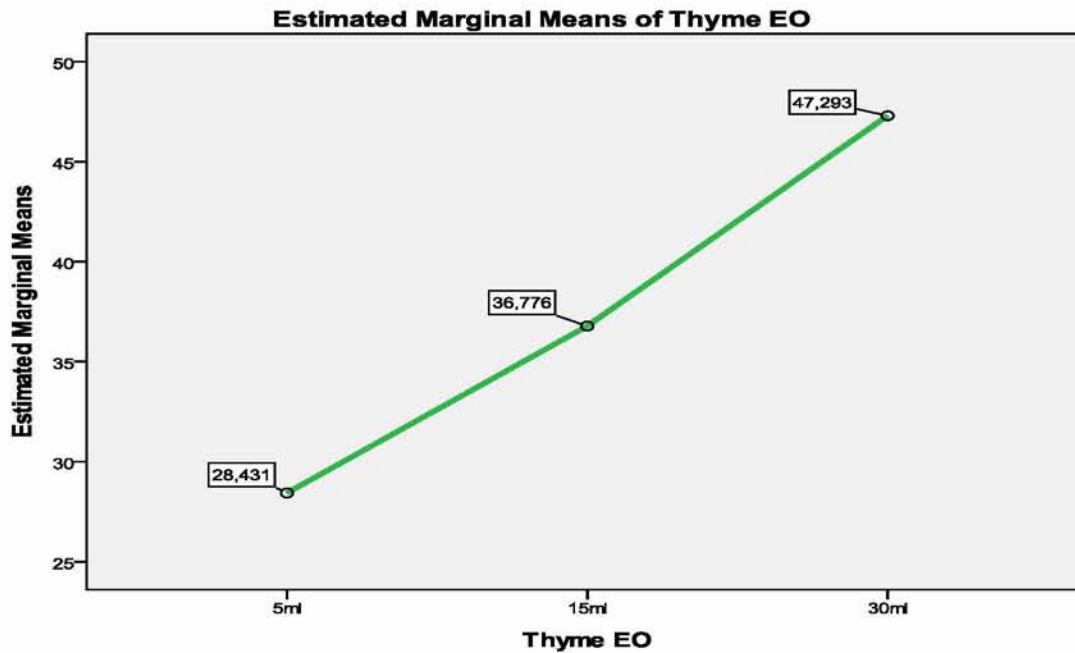
quantity	pairs	t	df	p
5ml	ρίγανη – δενδρολίβανο	40,558	58	<0.001
	ρίγανη - θυμάρι	-0,883	58	0,381
	δενδρολίβανο- θυμάρι	-24.612	58	<0.001
15ml	ρίγανη – δενδρολίβανο	27,006	58	<0.001
	ρίγανη - θυμάρι	-1,414	58	0,163
	δενδρολίβανο- θυμάρι	-22,642	58	<0.001
30 ml	ρίγανη – δενδρολίβανο	23,544	58	<0.001
	ρίγανη - θυμάρι	-4,486	58	<0.001
	δενδρολίβανο- θυμάρι	-21,161	58	<0.001



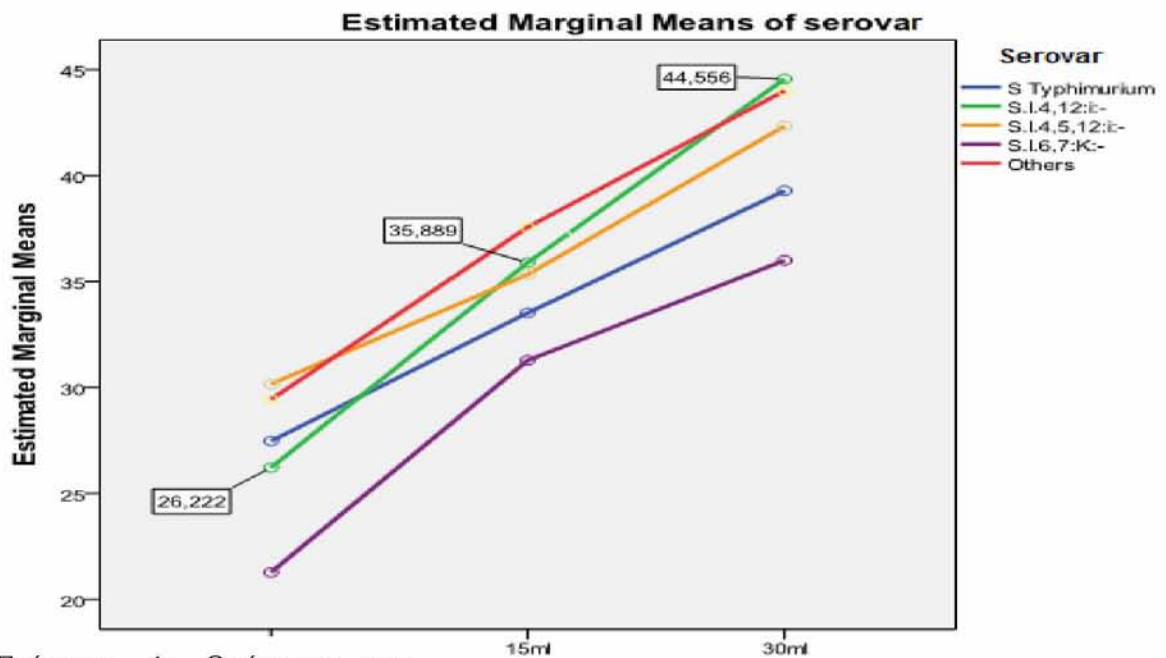
Γράφημα 1: Αντιμικροβιακή δράση ριγανέλαιου και εφαρμοζόμενη ποσότητα



Γράφημα 2: Αντιμικροβιακή δράση έλαιου δενδρολίβανου και εφαρμοζόμενη ποσότητα

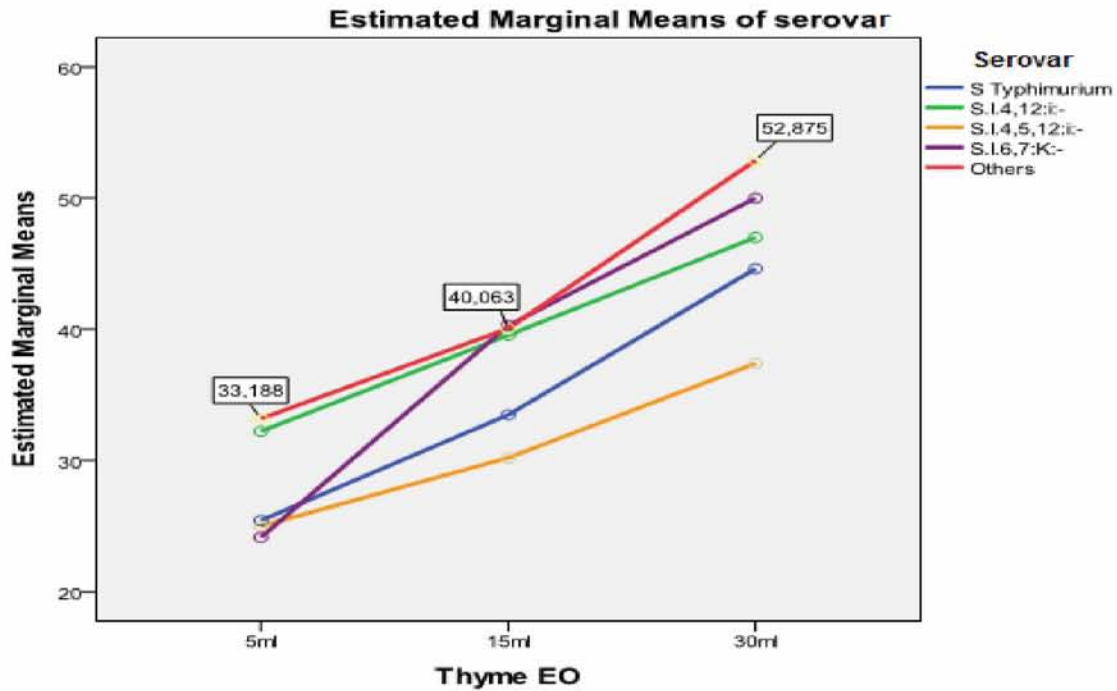


Γράφημα 3: Αντιμικροβιακή δράση θυμαρέλαιου και εφαρμοζόμενη ποσότητα

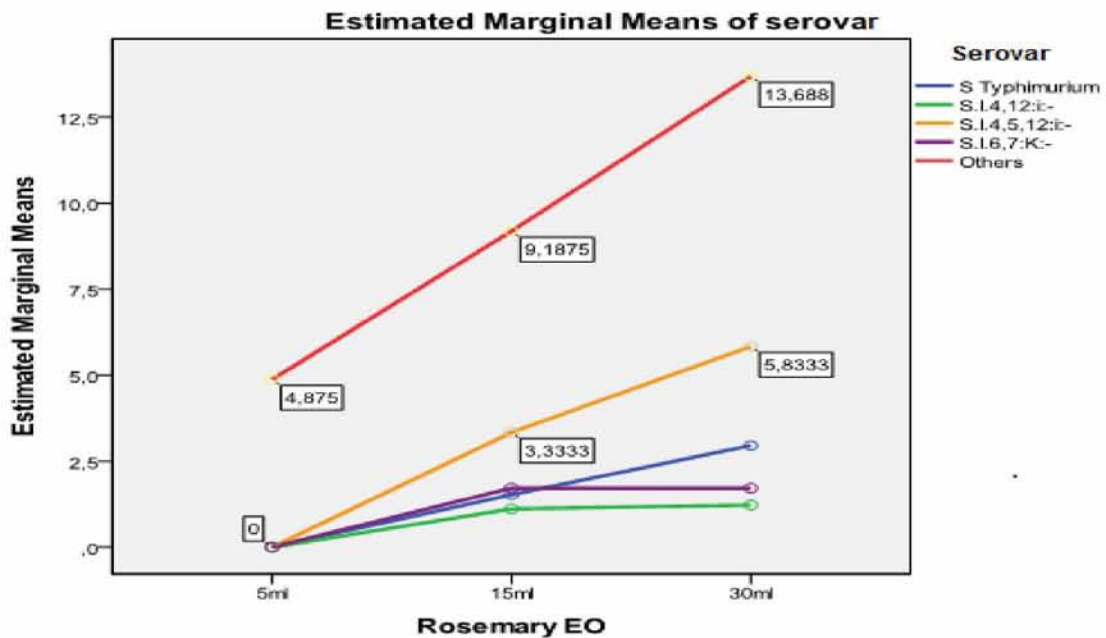


Γράφημα 4: Ορότυπος και αντιμικροβιακή δράση ριγανέλαιου





Γράφημα 5: Ορότυπος και αντιμικροβιακή δράση θυμαρέλαιου



Γράφημα 6: Ορότυπος και αντιμικροβιακή δράση έλαιου δενδρολίβανου

Τα αποτελέσματα έχουν αποτελέσει τις παρακάτω δημοσιευμένες εργασίες:

1. Ευαγγελοπούλου Γ., Κρήτας Σ., Χριστοδουλόπουλος Γ., Μπουριέλ Α. 2015. **Ο χοίρος και το κρέας του ως πιθανές πηγές σαλμονέλλωσης του Έλληνα καταναλωτή** (Πανελλήνιο Συνέδριο- Το Κρέας και τα Προϊόντα του «Από τον Στάβλο στο πιάτο» 2015. Θεσσαλονίκη 27, 28 Φεβρουαρίου- 1 Μαρτίου 2015). σελ. 109- 117.
2. Evangelopoulou G, Kritas S, Govaris A, Burriel AR. 2014. **Pork Meat as a Potential Source of *Salmonella enterica* subsp. *arizonae* Infection of Man.** Journal of Clinical Microbiology 52, 741-744.
3. Evangelopoulou G, Filioussis G, Kritas S, Christodoulopoulos G, Triantafyllou LA, Burriel AR. 2014. Short Communication. **Colonisation of pig gallbladders with *Salmonella* species important to public health.** Veterinary Record doi: 10.1136/vr.102822.
4. Evangelopoulou G, Filioussis G, Kritas S, Christodoulopoulos G, Kantere M Burriel AR. 2015. **Isolation and Antimicrobial Testing of *Aeromonas* spp., *Citrobacter* spp., *Cronobacter* spp., *Enterobacter* spp., *Escherichia* spp., *Klebsiella* spp., and *Trabulsiella* spp. from the Gallbladder of Pigs.** Polish Journal of Microbiology 64(2), 185-188.
5. Evangelopoulou G, Burriel AR. 2015. **The role of H<sub>2</sub>S in the recovery of *Salmonella* spp. from animals.** Global Veterinary Summit. August 31-September 2, 2015 Florida, USA (*poster presentation accepted*).
6. Evangelopoulou G, Kritas S, Christodoulopoulos G, Burriel AR. **Presence of emerging *Salmonella* spp. serovars in pig farms: a risk to public health.** Journal of Agromedicine (*under review*).



## Π.09

### Ο χοίρος και το κρέας του, ως πιθανές πηγές σαλμονέλλωσης του Έλληνα καταναλωτή

Γ.Ευαγγελοπούλου<sup>1</sup>, Σ. Κρήτας<sup>2</sup>, Γ. Χριστοδουλόπουλος<sup>3</sup>, Α. Μπουριέλ<sup>4</sup>

- <sup>1</sup> Υποψήφια Διδάκτωρ, Εργαστήριο Μικροβιολογίας και Παρασιτολογίας, Τμήμα Κτηνιατρικής, Σχολή Επιστημών Υγείας, Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας, Τρικάλων 224, ΤΚ 431 00, Καρδίτσα, E-mail: [matinavet@hotmail.com](mailto:matinavet@hotmail.com)
- <sup>2</sup> Αναπληρωτής Καθηγητής, Εργαστήριο Μικροβιολογίας και Λοιμωδών Νοσημάτων, Κτηνιατρική Σχολή Α.Π.Θ., ΤΚ 541 24, Θεσσαλονίκη
- <sup>3</sup> Καθηγητής, Παθολογική Κλινική, Τμήμα Κτηνιατρικής, Σχολή Επιστημών Υγείας, Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας, Τρικάλων 224, ΤΚ 431 00, Καρδίτσα
- <sup>4</sup> Καθηγήτρια, Εργαστήριο Μικροβιολογίας και Παρασιτολογίας, Τμήμα Κτηνιατρικής, Σχολή Επιστημών Υγείας, Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας, Τρικάλων 224, ΤΚ 431 00, Καρδίτσα

#### Περίληψη

Το γένος *Salmonella* είναι ένα σημαντικότατο παθογόνο των ζώων και του ανθρώπου, που μεταδίδεται κατά κύριο λόγο στους ξενιστές μέσω της διατροφής. Στον άνθρωπο μεταδίδεται κυρίως μέσω του κρέατος πουλερικών και χοίρου. Η σημαντικότητα αυτών των ειδών κρέατος στην μόλυνση του καταναλωτή οδήγησε την Ευρωπαϊκή Ένωση (ΕΕ) στην υποχρεωτική επιτήρηση των μονάδων πρωτογενούς παραγωγής. Στην Ελλάδα, όμως, ενώ οι προσπάθειες επιτήρησης εντατικοποιήθηκαν στις μονάδες πουλερικών, ελάχιστα έχουν γίνει για την επιτήρηση των χοιροτροφικών μονάδων. Από τα βιβλιογραφικά και αδημοσίευτα ερευνητικά ευρήματα, που αφορούν την Ελλάδα, φαίνεται ότι η οροθετικότητα των μονάδων στις διάφορες διερευνημένες περιοχές της Ελληνικής επικράτειας μπορεί να φτάσει μέχρι 76,9%, ενώ αυτή των χοίρων εντός των μολυσμένων μονάδων μέχρι 63,33% (cut off  $\geq 40\%$ ), χωρίς ωστόσο η οροθετικότητα να αντικατοπτρίζει το πραγματικό επίπεδο της μόλυνσης (παρουσίας του μικροοργανισμού).

Σε τελευταία διερεύνηση στην κεντρική Ελλάδα, οι ορότυποι που αναγνωρίστηκαν διέφεραν αυτών, που είχαν απομονωθεί τα προηγούμενα χρόνια από τις ελληνικές εκτροφές. Αυτό, σημαίνει μια πιθανή αλλαγή στην επιδημιολογική εξέλιξη της μόλυνσης, λόγω της ενδοευρωπαϊκής μετακίνησης ζώων και προϊόντων. Όμως, μεταξύ αυτών των οροτύπων αναβρέθηκε και ο νέο-αναδυόμενος στον άνθρωπο μονοφασικός τύπος του οροτύπου Typhimurium. Επιπλέον, η παρατηρούμενη επίδραση αντιμικροβιακών ουσιών έχει δείξει σε κάποιες παλαιότερες διερευνήσεις ευαισθησία σε κινολόνες, τετρακυκλίνες και σουλφοναμίδες, ενώ σε μεταγενέστερες παρατηρήθηκαν ανθεκτικότητες στις δύο τελευταίες κατηγορίες αντιμικροβιακών ουσιών.

**Λέξεις κλειδιά:** *Salmonella*, ανθεκτικότητα, Ελλάδα, ορότυπος, σφαγείο, χοίρος

#### Εισαγωγή

Η σαλμονέλλωση είναι η δεύτερη σημαντικότερη τροφιογενής μόλυνση του ανθρώπου στην ΕΕ (EFSA AND ECDC 2014). Το τυπικό περιβάλλον ύπαρξης παθογόνων μη τυφοειδών οροτύπων *Salmonella* spp. είναι η εντερική οδός πολλών ειδών ζώων σπονδυλωτών και μη. Το παθογόνο εγκαθίσταται στις πλάκες του

Peayer, που εντοπίζονται κυρίως στην περιοχή του ειλεού (Tenorio and Pabst, 2006) και από τη θέση αυτή, υπό συγκεκριμένες συνθήκες, μολύνει άλλα όργανα του ζώου ξενιστή, όπως τους λεμφαδένες και τη χοληδόχο κύστη με αποτέλεσμα την διαλείπουσα απέκκρισή του στο έντερο και από εκεί στο περιβάλλον. Μέσω του περιβάλλοντος το παθογόνο διασπείρεται ταχύτατα σε πολλά ζώα μιας μολυσμένης εκτροφής, που δεν λαμβάνει κατάλληλα





μέτρα αναχαίτισης της εξάπλωσης (Diabac et al., 1997; Gonzalez-Escobedo and Gunn 2013). Οι υποκλινικές, επομένως, μόλυνσεις κυρίως νεοεισερχόμενων χοίρων ή άλλων ειδών ζώων (τρωκτικά – πτηνά) είναι αυτές που συντηρούν το παθογόνο στο περιβάλλον της εκτροφής, άρα και αυτές που εντοπίζονται δυσκολότερα.

Στην ΕΕ το χοιρινό κρέας ενοχοποιείται για το 10-20% των ανθρωπίνων σαλμονελλώσεων (EFSA 2010a) κατά μέσο όρο, ανάλογα με την περιοχή επιδημιολογικής μελέτης της μόλυνσης των περιστατικών στον άνθρωπο (Lo Fo Wong et al., 2002; EFSA, 2010b). Σε αυτές τις διερευνήσεις ως συχνότερα απαντώμενοι ορότυποι αναδεικνύονται οι Enteritidis και Typhimurium. Το χοιρινό κρέας, μάλιστα, έχει ενοχοποιηθεί στην ΕΕ ως η κύρια πηγή σαλμονελλώσεων του ανθρώπου από τον ορότυπο Typhimurium (Galani et al. 2006; EFSA 2010b). Τα επιδημιολογικά ευρήματα συσχετισμού του κρέατος χοίρου στην σαλμονελλώση του Ευρωπαίου καταναλωτή τις προηγούμενες δεκαετίες, οδήγησαν τις ελεγκτικές αρχές της ΕΕ σε μια προσπάθεια εναρμόνισης της επιτήρησης και ελέγχου της μόλυνσης με τον Κανονισμό EC No. 2160/2003.

### Επιτήρηση και έλεγχος των σαλμονελλώσεων του χοίρου

Ο έλεγχος της μόλυνσης από *Salmonella* spp. των χοιροτροφικών μονάδων προϋποθέτει την συστηματική επιτήρησή τους, άρα την τακτική καταγραφή της πραγματικής επιδημιολογικής κατάστασης της κάθε μιας. Επειδή δε το παθογόνο μολύνει υποκλινικά πολλούς διαφορετικούς ιστούς του ζώου- ξενιστή, η απομόνωσή του πρέπει να επιχειρείται όχι μόνο από τα κόπρανα, αλλά και από άλλους ιστούς προτίμησής του, όπως ο λεμφικός ιστός και η χοληδόχος κύστη. Άρα, απαιτείται δειγματοληπτικός έλεγχος στο σφαγείο ικανοποιητικού αριθμού ζώων κάθε εκτροφής. Εξίσου απαραίτητος κρίνεται ο συχνός και συστηματικός έλεγχος του περιβάλλοντος της εκτροφής, των ζωοτροφών, αλλά και του σφαγείου για τον έλεγχο της επιμόλυνσης του σφάγιου (Berends et al., 1997; Warriner et al., 2002; Baptista et al., 2010; Duggan et al., 2010; Visscher et al., 2011). Έχει βρεθεί ότι υπάρχει υψηλή συσχέτιση μεταξύ του ποσοστού των υποκλινικά μολυσμένων ζώων και της επιμόλυνσης του δικού τους σφάγιου. Συγκεκριμένα, το 70% των φορέων του παθογόνου είναι υπεύθυνοι για την μόλυνση του δικού τους σφάγιου, ενώ το υπόλοιπο 15-30% των επιμολύνσεων οφείλεται σε επιμολυσμένο εξοπλισμό του σφαγείου, όπως το πριόνι διχοτόμησης και η μη υγιεινή χειρονακτική διαχείριση του σφάγιου (Berends et al., 1997; Swanenburg et al., 2001a). Οι τελευταίες επιμολύνσεις είναι κυρίως αποτέλεσμα της ανάπτυξης του παθογόνου στο περιβάλλον του σφαγείου, όταν δεν εφαρμόζονται επαρκή ή αποτελεσματικά μέτρα

απολύμανσης των χώρων και των αντικειμένων σε κάθε χρήση και μεταξύ των χρήσεων της ίδιας μέρας (Hald et al., 2002), αφού οι ίδιοι χώροι σφαγής χρησιμοποιούνται την ίδια μέρα από πολλές διαφορετικές εκτροφές και εκτρεφόμενα ζώα σε σύγκριση με τα σφαγεία πουλερικών, όπου δεν αναμειγνύονται απαραίτητα την ίδια μέρα πτηνά από διαφορετικές εκτροφές. Με βάση τα ανωτέρω, και λόγω της ενδοευρωπαϊκής διακίνησης προϊόντων ζωικής παραγωγής, η Ελλάδα υποχρεούται να ακολουθεί τις Ευρωπαϊκές Οδηγίες ελέγχου παθογόνων, όπως η *Salmonella*.

### Έλεγχος της Σαλμονέλλωσης του χοίρου στην Ελλάδα

Παρά τους στόχους που έχουν τεθεί από την ΕΕ, η Ελλάδα δεν έχει υιοθετήσει ακόμα εθνικό Πρόγραμμα Επιτήρησης των σαλμονελλώσεων του χοίρου. Ωστόσο, υπάρχει δημοσιευμένη πληροφόρηση που αφορά την συχνότητα μόλυνσης των ελληνικών μονάδων χοίρων τελικής πάχυνσης από οροτύπους του είδους *S. enterica*. Συγκεκριμένα, το 1996 ένα πρόγραμμα άρχισε με σκοπό τη διερεύνηση των διαφόρων παραμέτρων της επιδημιολογίας της σαλμονελλώσης των χοιροτροφικών μονάδων σε έξι ευρωπαϊκές χώρες, συμπεριλαμβανομένης της Ελλάδας. Η μελέτη ανέφερε την συχνότητα μόλυνσης (επιπολασμός) οροθετικών χοίρων τελικής πάχυνσης 59 εκτροφών τοκετού - τελικής πάχυνσης και τεσσάρων πολλαπλασιαστικών εκτροφών, την συχνότητα των μολυσμένων δειγμάτων κοπράνων και ζωοτροφών, τους απομονωθέντες οροτύπους και την αντιμικροβιακή αντοχή ενός επιμέρους δείγματος αυτών των εκτροφών. Στο τμήμα της μελέτης που αφορούσε την εκτροφή απομονώθηκαν τέσσερα στελέχη του οροτύπου *S. Tennessee*, καθώς και ένα ατυποποίητο στέλεχος από δείγματα ζωοτροφών δύο εκτροφών (4.8% των δειγμάτων), ενώ η συχνότητα της παρουσίας μόλυνσης των κοπράνων ήταν 1.2% (4/340 των ληφθέντων δειγμάτων). Τα απομονωθέντα στελέχη ανήκαν στους οροτύπους Typhimurium, Bredeney και London και παρουσίασαν ευαισθησία στους περισσότερους από τους 35 εξετασθέντες αντιμικροβιακούς παράγοντες, όπως σε φλουοροκινολόνες, τετρακυκλίνες και σουλφοναμίδες (Grafanakis et al., 2001). Όσον αφορά τη μελέτη σε επίπεδο σφαγείου ελήφθησαν δείγματα από το περιβάλλον δύο σφαγείων της Β. Ελλάδας, όπως δείγματα επιφανειών, χεριών και μαχαιριών των εκδοροσφαγέων, καθώς και δείγματα επιφανειών των σφαγίων. Τελικά, από τα 1654 δείγματα απομονώθηκαν 138 στελέχη από την ακάθαρτη και καθαρή ζώνη των οροτύπων Derby 31.9%, London (16.7), Typhimurium (13%), Bredeney (10.7%), Infantis (8.7%), Goldcoast (4.3%), Panama (2.9%), Livingstone (1.4%), Mbandaka (0.7%), λοιποί (7.3%) και ατυποποίητοι (2.2%) (Limpitakis



et al., 1999). Ωστόσο, τα δεδομένα που εξήχθησαν από το συγκεκριμένο Πρόγραμμα για την Ελλάδα και αφορούσαν την συχνότητα εμφάνισης της *Salmonella*, τη διασπορά των οροτύπων και φαγοτύπων στους χοίρους, στα τρόφιμα και τον άνθρωπο θεωρήθηκαν ελάχιστα και μη αντιπροσωπευτικά (Lo Fo Wong and Hald, 2000).

Μια άλλη μελέτη ακολούθησε το Μάρτιο του 2003 μέχρι τον Οκτώβριο του 2004, η οποία εστίαζε στη γενετική ποικιλότητα και την αντιμικροβιακή αντοχή σαλμονελλών που απομονώθηκαν από τα κόπρανα ασυμπτωματικών χοίρων 20 εκτροφών τελικής πάχυνσης της Κεντρικής Ελλάδας (Filioussis et al., 2008). Σε αυτή τη μελέτη 5 από τους 400 (1.25%) χοίρους τελικής πάχυνσης βρέθηκαν ασυμπτωματικοί φορείς του οροτύπου Mbandaka, ενώ κανένας άλλος ορότυπος δεν απομονώθηκε. Ως προς την ευαισθησία σε αντιμικροβιακούς παράγοντες και τα πέντε στελέχη εμφάνισαν ανθεκτικότητα στην τετρακυκλίνη, τέσσερα στην τριμεθοπρίμη/σουλφοναμίδη και τρία σε αμπικιλλίνη και αμοξικιλίνη/κλαβουλανικό οξύ, ενώ όλα παρουσίασαν ευαισθησία στις κεφαλοσπορίνες και τις κινολόνες.

Τα έτη 2006-2007 η Ελλάδα συμμετείχε στην τέταρτη επίσημη βασική έρευνα της ΕΕ με στόχο την εκτίμηση της συχνότητας εμφάνισης της μόλυνσης των χοίρων με *Salmonella* spp. κατά τη σφαγή. Όλα τα συμμετέχοντα Κράτη-Μέλη και η Νορβηγία έλαβαν δείγματα ειλεοκολικών λεμφαδένων από τους επιλεγέντες χοίρους στο σφαγείο. 73 στελέχη απομονώθηκαν από τους λεμφαδένες 345 ελληνικών χοίρων, τα οποία ανήκαν στους οροτύπους του υποείδους *S. enterica* subsp. *enterica*. Αυτοί ήταν οι: Typhimurium (12- 16.4%), Derby (9- 12.3%), Thompson (5, 6.8%), Bredeney, Enteritidis, Kottbus, Montevideo, Umbilo (3, 4.1% ο καθένας), 4,[5],12:i:-, Blockley, Muenster, Oranienburg (2, 2.7% ο καθένας), Agona, Anatum, Bovismorbificans, Brandenburg, Carno, Dublin, Hermannswerder, London, Menden, Mishmarhaemek, Newport, Paratyphi B var. Java, Szentes (1, 1.4% ο καθένας) και ατυποποίητοι (11-15%) (EFSA, 2008). Η έρευνα αποκάλυψε μεγάλες διαφορές μεταξύ των συμμετεχόντων χωρών με την Ελλάδα δυστυχώς να είναι μία εκ των πέντε Κρατών – Μελών (Ισπανία, Πορτογαλία, Λουξεμβούργο και Ηνωμένο Βασίλειο) που ανέφεραν συχνότητα εμφάνισης μολυσμένων λεμφαδένων > 20% των δειγμάτων.

Τα πιο πρόσφατα αποτελέσματα που αφορούν τη σαλμονέλλωση του χοίρου στην Ελλάδα αναφέρθηκαν από τους Mandilara et al., 2013 για την EFSA. Σε αυτή την μελέτη εξετάστηκαν 119 στελέχη του οροτύπου *S. enterica* 1,4,[5],12:i:- προερχόμενα από ανθρώπους, ζώα και τρόφιμα, τα οποία είχαν απομονωθεί κατά το χρονικό διάστημα 2006-2011. Τα αποτελέσματα έδειξαν ότι στην Ελλάδα κυκλοφορούν πολλαπλοί κλώνοι της πολυανθεκτικής μονοφασικής Typhimurium και ότι ο

συχνότερα απαντώμενος κλώνος σε ανθρώπους και ζώα ήταν ο φαγότυπος DT120, R-type ASSuTSpTm και με PFGE προφίλ STYMXB.0010, υποδεικνύοντας το χοίρο ως δεξαμενή αυτού του κλώνου στην Ελλάδα.

## Η δική μας διερεύνηση συγκρινόμενη με προηγούμενα ευρήματα

### Ορολογική και Μικροβιολογική Διερεύνηση

Αρχικά η μόλυνση διερευνήθηκε ορολογικά με δείγματα αίματος 314 σιών και 374 χοίρων τελικής πάχυνσης 39 εκτροφών από πέντε γεωγραφικές περιοχές της Ελλάδας (Θεσσαλία, Στερεά Ελλάδα, Β. Ελλάδα, Ήπειρος, Κρήτη), με τη χρήση εμπορικά διαθέσιμης έμμεσης mix-ELISA (Herd-Check Swine Salmonella Antibody Test Kit, Idexx Laboratories, Inc., Maine, USA). Τα αποτελέσματα ανακοινώθηκαν σε προηγούμενο συνέδριο (Ευαγγελοπούλου κ.ά. 2014) και συνοπτικά έδειξαν ότι η οροθετικότητα ήταν:

- Μεταξύ των χοιρομητέρων 81,53% (cut off OD $\geq$ 10%) και 20,38% (cut off OD $\geq$ 40%)
- Μεταξύ των χοίρων τελικής πάχυνσης 70.32% (cut off OD $\geq$ 10%) και 15,5% (cut off OD $\geq$ 40%)
- Μεταξύ των εκτροφών από 0-100% (cut off OD $\geq$ 10%) και από 0-63.33% (cut off OD $\geq$ 40%).

Με δεδομένα τα ευρήματα της οροδιερεύνησης ο σχεδιασμός της απομόνωσης του παθογόνου περιορίστηκε στη Θεσσαλία, όπου τα ποσοστά των οροθετικών εκτροφών ήταν μεταξύ 0-92,6% (cut off OD $\geq$ 10%) και μεταξύ 0-20% (cut off OD $\geq$ 40%).

Για την απομόνωση και ταυτοποίηση των οροτύπων εξετάστηκαν διάφορα δείγματα με βάση το ISO 6579:2002, Annex D για τρόφιμα και ζωοτροφές (ISO 2002). Συνολικά εξετάστηκαν 123 σφάγια από 15 εκτροφές τοκετού - τελικής πάχυνσης δυναμικότητας 20-500 χοιρομητέρων. Η οροθετικότητα των εξετασθέντων ζώων ήταν 59.35% (cut off OD $\geq$ 10%) και 20,33% (cut off OD $\geq$ 40%), χωρίς βακτηριολογική επιβεβαίωση. Η διερεύνηση αφορούσε, κατά το χρονικό διάστημα της μελέτης, περίπου 2500 ζώα τελικής πάχυνσης από τα οποία ελέγχθηκε μικροβιολογικά περίπου το 5% αυτών. Για τον μικροβιολογικό έλεγχο των εκτροφών διερευνήθηκαν 615 δείγματα ιστών και κοπράνων. Αξιοσημείωτο είναι ότι το ποσοστό των οροθετικών ζώων με βακτηριολογική επιβεβαίωση ήταν 30.23% (cut-off OD $\geq$  40%) - 65.11% (cut-off OD $\geq$  10%). Τέλος για τον έλεγχο του σφαγείου εξετάστηκαν 378 δείγματα επιφανειών (swab samples).

Εκατόν ένα ύποπτα στελέχη ταυτοποιήθηκαν βιοχημικά με το API 20E (Biomerieux, France) και το MicrogenTM GnA+B-ID (Microgen Bioproducts Ltd, UK), ελέγχθηκαν με πολυδύναμους αντι-Ο, αντι-Vi και αντι-H ορούς και στάλθηκαν στο Εθνικό Εργαστήριο Αναφοράς

111



Σαλμονελλών (Χαλκίδα) για οροταυτοποίηση.

Τελικά αναγνωρίστηκαν ως ορότυποι του γένους *Salmonella* 86 στελέχη (59 προερχόμενοι από ζώα και 27 από την ακάθαρτη ζώνη του σφαγείου), 4 χαρακτηρίστηκαν ως ατυποποίητοι και 14 αναγνωρίστηκαν βιοχημικά ως *S. enterica* subsp. *arizonae* ένα ως *S. enterica* subspecies *indica*. Μέρος των ευρημάτων έχει δημοσιευτεί (Evangelorouλου et al., 2014a, 2014b) ή είναι προς δημοσίευση. Συνοπτικά οι ορότυποι που αναγνωρίστηκαν ήταν οι *S. Typhimurium*, *S. enterica* subsp. *enterica* ser. 4,12:i:-, *S. enterica* subsp. *enterica*. 6,7:k:-, *S. enterica* subsp. *enterica* ser. 4,5, 12:i:-, *S. Bredeney*, *Agona*, *S. Derby*, *S. Infantis*, *S. Meleagridis*, *S. Cerro*, *S. enterica* subsp. *enterica* ser. 6,14,25: - : 1,2, *S. enterica* subsp. *diarizonae* 61:k:1,5, *S. enterica* subsp. *salamae* 38:b:1,2 και *S. enterica* subsp. *houtenae* 40:g.t:- (Πίνακας 1). Από τον πίνακα φαίνεται ότι πολλοί από τους αναγνωρισθέντες ορότυπους σε αυτή την μελέτη δεν περιλαμβάνονται σε αυτούς που είχαν δημοσιευτεί στο παρελθόν για τις ελληνικές εκτροφές χοίρου (Lo Fo Wong and Hald, 2000; Grafanakis et al., 2001; EFSA, 2008; Filioussis et al., 2008), γεγονός που αποτελεί ένδειξη της διασποράς των ορότυπων του γένους, η εμφάνιση των οποίων μπορεί να μεταβάλλεται σημαντικά στο χρόνο, λόγω της ανανέωσης του ζωικού κεφαλαίου των ελληνικών εκτροφών από διάφορες ευρωπαϊκές πηγές.

#### Αντιβιογράμματα

Το σύνολο των στελεχών αναγνωρισμένων με τα API 20E, MicrogenTM GnA+B-ID και την οροταυτοποίηση ως *Salmonella* spp. διερευνήθηκε με τη μέθοδο διάχυσης των δίσκων ως προς την ευαισθησία σε 24 αντιμικροβιακούς παράγοντες (Evangelorouλου et al., 2014a, 2014b): amoxicillin (30 µg), amoxicillin/clavulanic acid (20/10µg), ampicillin (10 µg), ampicillin/sulbactam (10/10 µg), aztreonam (30 µg), cefotaxime (30 µg), cefoxitin (30 µg), ceftazidime (30 µg), ceftiofur (30 µg), ceftriaxone (30 µg), cefuroxime (30 µg), chloramphenicol (30 µg), colistin (50 µg), doripenem (10 µg), enrofloxacin (5 µg), erythromycin (15µg), gentamycin (10 µg), kanamycin (30 µg), nalidixic acid (30 µg), penicillin G (10 µg), rifampin (30 µg), sulfamethoxazole/trimethoprim (23.75/1.25 µg), tetracycline (30 µg) and tigecycline (15 µg).

Τα ευρήματα έδειξαν υψηλά ποσοστά ανθεκτικότητας σε: penicillin G (10 µg) (93%), rifampin (30 µg) (75.24%), tetracycline (30 µg) (68.31%), sulfamethoxazole/trimethoprim (23.75/1.25 µg) (61.38%), ampicillin (10 µg) (54.45%), amoxicillin (30 µg) (53.46%) και μικρότερα σε chloramphenicol (30 µg) (22.77%), kanamycin (30 µg) (14.85%), και colistin (50 µg) (11.88%) (Πίνακας 2). Αυτά συγκρινόμενα με τα προηγούμενα ευρήματα στην Ελλάδα (Filioussis et al., 2008; Mandilara et al., 2013) δείχνουν συμφωνία ως προς την ανθεκτικότητα των σαλμονελλών

σε τετρακυκλίνες και σουλφοναμίδες, ενώ παράλληλα υπογραμμίζουν την εμφάνιση ανθεκτικότητας και σε άλλες κατηγορίες αντιμικροβιακών ουσιών.

#### Γενικά συμπεράσματα

Η μόλυνση από *Salmonella* spp. στις υπό διερεύνηση εκτροφές, αν και δεν μας αναφέρθηκαν κλινικά συμπτώματα, έδειξε ότι η συχνότητα εμφάνισης της μόλυνσης είναι σχετικά υψηλή, υποδεικνύοντας τον σημαντικό επιδημιολογικό ρόλο των χοιρομητρών στη διασπορά των *Salmonella* spp. τόσο στους χοίρους τελικής πάχυνσης, όσο και στο περιβάλλον. Εν τούτοις, αν και η ορολογική επιτήρηση των χοιρομονάδων επιτρέπει την ανίχνευση μονάδων υψηλού κινδύνου, δηλώνοντας έκθεση στο παθογόνο σε κάποιο στάδιο της παραγωγής, οι ορολογικές μέθοδοι δεν μπορούν να διακρίνουν τις τρέχουσες από τις παλαιότερες μολύνσεις. Συνεπώς, δεν δηλώνουν κατηγορηματικά την δυνατότητα απομόνωσης ή όχι του μικροοργανισμού. Αν λάβουμε δε υπ' όψη ότι τα kit που χρησιμοποιούνται δεν είναι προσαρμοσμένα στους ορότυπους που επικρατούν στην Ελλάδα, μπορούμε να συμπεράνουμε ότι αρκετά «θετικά» ζώα είναι δυνατό να διαφύγουν της διερεύνησης. Παρόλα αυτά, αναγνωρίζεται ότι οι ορολογικές μέθοδοι αποτελούν ένα προγνωστικό δείκτη κινδύνου, επιτρέποντας την εκτίμηση της αποτελεσματικότητας των μέτρων πρόληψης και ελέγχου στην πρωτογενή παραγωγή.

Η δειγματοληψία πολλαπλών σημείων αποκάλυψε ότι τα ζώα ήταν μολυσμένοι από μεγάλο αριθμό ορότυπων (14), επιβεβαιώνοντας τον χοίρο ως σημαντικό κίνδυνο για τη Δημόσια Υγεία. Μεταξύ αυτών ήταν αναγνωρισμένα σημαντικά ζωονοτικά στελέχη, όπως μονοφασικά στελέχη της *S. Typhimurium* (CDC, 2004; Pires et al., 2011), καθώς και άλλα που ανήκουν σε σπανιότερα υποείδη, αλλά με το ενδεχόμενο να εξελιχθούν σε παθογόνα του χοίρου, αποτελώντας τελικά κίνδυνο για τους καταναλωτές. Το γεγονός ότι τα μεγάλα ποσοστά της παρατηρούμενης ανθεκτικότητας αυτών των στελεχών σε κοινές, αλλά «Υψηλής Σημαντικότητας για την Ανθρώπινη Υγεία Αντιμικροβιακές Ουσίες» (Highly Important Antimicrobials for Human Health σύμφωνα με τον WHO (WHO 2011) συμβαδίζουν με άλλες έρευνες σε Ελλάδα και Ευρώπη (Filioussis et al., 2008; EFSA 2011; Mandilara et al., 2013; EFSA and ECDC 2014) αποτελεί ένδειξη της εκτεταμένης χρήσης τους στη χοιροτροφία, όχι μόνο για θεραπευτικούς σκοπούς, αλλά ακόμη και για προληπτικούς ή ως παράγοντες ανάπτυξης, καθιστώντας τους χοίρους δεξαμενές αυτών των στελεχών.

Επιπλέον, η παρουσία *Salmonella* spp. σε δείγματα προερχόμενα από τον χώρο και τον εξοπλισμό του σφαγείου (χέρια-μαχαίρια εκδοροσφαγέων, πριόνι διχοτόμησης) θα μπορούσε να αποτελέσει ένδειξη επιμόλυνσης ενός σφάγιου με ορότυπους του παθογόνου

που «ενδημούν στο σφαγείο» (Schraft et al., 1992). Ωστόσο, η παρούσα διερεύνηση δεν επιβεβαιώνει άλλες μελέτες (Limpitakis et al., 1999; Swanenburg et al., 2001b; Smid, 2012), καθώς η *Salmonella* απομονώθηκε μόνο από τα γάντια πολλαπλών χρήσεων του ίδιου εκδορέα κατά τη διάρκεια όλων των δειγματοληψιών. Πάντως, ο τρόπος συλλογής των δειγμάτων και τα συνολικά αποτελέσματα έδειξαν ότι η διαδικασία σφαγής δεν αποτελούσε σημαντική πηγή διασταυρούμενης επιμόλυνσης του σφαγείου, αλλά ότι ο κίνδυνος για τον

καταναλωτή προέρχεται από το ίδιο το ζώο που φέρει τον μικροοργανισμό σε κάποιο ιστό του.

Τελικά, τα αποτελέσματα αυτής της διερεύνησης δηλώνουν την είσοδο ζώων φορέων *Salmonella* spp. στην τροφική αλυσίδα του Έλληνα καταναλωτή, υποδεικνύοντας την ανάγκη συνεχούς επιτήρησης της συχνότητας εμφάνισης του παθογόνου στις ελληνικές χοιροτροφικές μονάδες, καθώς και προσπάθειας απομόνωσής του όχι μόνο από τα κόπρανα, αλλά και από ιστούς στους οποίους δείχνει τροπισμό.

Table 1. Ορότυποι *Salmonella* που απομονώθηκαν στην Ελλάδα από χοίρους και περιβαλλοντικά δείγματα αυτών

Προέλευση Στελεχών	Ορότυποι	Βιβλιογραφία
ΧΟΙΡΟΙ ΤΕΛΙΚΗΣ ΠΑΧΥΝΣΗΣ	Typhimurium, S.1, 4,12:i-; S.1, 6,7:k-; S.1, 4,5, 12:i-; Bredeney, Agona, Cerro, Derby, Infantis, Meleagridis, S.1, 6,14,25: - : 1,2, S. enterica subsp. diarizonae 61:k:1,5, S. enterica subsp. salamae 38:b:1,2, S. enterica subsp. houtenae 40:g,t- S. enterica subsp. arizonae S. enterica subspecies indica	Δική μας έρευνα
	Typhimurium, Bredeney, London	Grafanakis et al., 2001
	Mbandaka	Filioussis et al., 2008
	Typhimurium, Derby, Thompson, Bredeney, Enteritidis, Kottbus, Montevideo, Umbilo, S.1,4,[5],12:i-; Blockley, Muenster, Oranienburg, Agona, Anatum, Bovismorbificans, Brandenburg, Carno, Dublin, Hermannswerder, London, Menden, Mishmarhaemek, Newport, Paratyphi B var. Java, Szentes, AT α	EFSA, 2008
ΣΦΑΓΕΙΟ (χόρροι)	Typhimurium, S.1, 4,5,12:i-	<sup>1</sup> Δική μας έρευνα
	Derby, London, Typhimurium, Bredeney, Infantis, Goldcoast, Panama, Livingstone, Mbandaka	Limpitakis et al., 1999
ΖΩΟΤΡΟΦΗ	S. Tennessee	Grafanakis et al., 2001

<sup>1</sup> Ακάθαρτη ζώνη





**Table 2.** Συγκεντρωτικά αποτελέσματα ανθεκτικότητας σε αντιμικροβιακές ουσίες στελεχών *Salmonella* spp. που απομονώθηκαν από χοίρους και περιβαλλοντικά δείγματα αυτών

	<i>S. Typhimurium</i>	S.I. 4,12:i:-	S.I. 4,5,12:i:-	S.I. 6,7:k:-	<i>S. Bredeney</i>	<i>S. Agona</i>	<i>S. Infantis</i>	<i>S. Derby</i>	<i>S. Meleagridis</i>	<i>S. Cerro</i>	S.I. 6,14,25: - : 1,2	<i>S. enterica</i> subsp. <i>diarizonae</i> 61:k:1,5	<i>S. enterica</i> subsp. <i>salamae</i> 38:b:1,2	<i>S. enterica</i> subsp. <i>houtenae</i> 40:g,t:-	Rough	<i>S. enterica</i> subsp. <i>arizonae</i>	<i>S. enterica</i> subsp. <i>indica</i>	Total No (%) of resistant strains
AML	22	8	10	1	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	3	8	1	54-53.46%
AMC	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1(I)	5	0	5-4.9%
AMP	22	8	10	1	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	3	9	1	55-54.45%
SAM	1(I)	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	2-1.9%
AZT	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	1-1%
CTX	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
FOX	0	1(I)	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	5	0	5-4.9%
CAZ	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	1-1%
EFT	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
CRO	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
CXM	4(I)	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
CT	4	2	0	1	0	0	0	0	0	1	0	1	0	0	0	3	0	12-11.88%
C	8	1	1	1	0	0	0	0	0	0	1	0	1	1	3	5	1	23-22.77%
DOR	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
ENR	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	2	1(I)	2-1.9%
E	38	9	16	7	3	1	1	1	1	1	1	1	1	1	4	14	1	101-100%
CN	1	2	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	4-3.9%
K	4	1	5	1(I)	3	0	0	0	0	0	0	0	1(I)	1(I)	1	1	1(I)	15-14.85%
NA	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	3	1	4-3.9%
P	35	9	16	6	2	1	1	1	0	1	1	0	1	1	4	14	1	94-93%
RD	20, 6(I)	7, 2(I)	16	6, 1(I)	3	1	1	1	1	1, (I)	1	1, (I)	0	1	4	14	1(I)	76-75.24%
SXT	20	7	16	1	0	0	0	0	0	0	1	0	1	1	4	10	1	62-61.38%
TE	22	9	16	1	3	0	0	0	0	0	1	0	1	1	4	10	1	69-68.31%
TGC	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1(I)	0	0	1(I)	0	1	0	1-1%
Total N.	38	9	16	7	3	1	1	1	1	1	1	1	1	1	4	14	1	101

AML Amoxicillin, AMC Amoxicillin-clavulanic acid, AMP Ampicillin, SAM Ampicillin-sulbactam, AZT Aztreonam, CTX Cefotaxime, FOX Cefoxitin, CAZ Ceftazidime, EFT Ceftiofur, CRO Ceftriaxone, CXM Cefuroxime, C Chloramphenicol, CT Colistin, ENR Enrofloxacin, E Erythromycin, CN Gentamycin, K Kanamycin, NA Nalidixic acid, P Penicillin G, RD Rifampin, SXT Sulfamethoxazole/Trimethoprim, TE Tetracycline, TGC Tigecycline- (I) = Intermediate



## Pig and pork as potential sources of Greek consumers' salmonellosis

G. Evangelopoulou<sup>1</sup>, S. Kritas<sup>2</sup>, G. Christodouloupoulos<sup>3</sup>, A.R. Burriel<sup>4</sup>

<sup>1</sup> PhD Student, Laboratory of Microbiology and Parasitology, Faculty of Veterinary Medicine, School of Health Science, University of Thessaly, Trikalon 224, Karditsa 431 00, Greece, E-mail:matinavet@hotmail.com

<sup>2</sup> Associate Professor, Department of Microbiology and Infectious Diseases, Faculty of Veterinary Medicine, Aristotelian University, Thessaloniki 541 24, Greece

<sup>3</sup> Professor, Department of Clinical Veterinary Medicine, Faculty of Veterinary Medicine, School of Health Science, University of Thessaly, Trikalon 224, Karditsa 431 00, Greece

<sup>4</sup> Professor, Laboratory of Microbiology and Parasitology, Faculty of Veterinary Medicine, School of Health Science, University of Thessaly, Trikalon 224, Karditsa 431 00, Greece

### Abstract

*Salmonella* spp. are important zoonotic pathogens of economic significance for both humans and animals, that are mainly transmitted to hosts through the food chain. Human salmonellosis is mostly associated to the consumption of contaminated eggs, chicken products and pork meat. The significance of poultry and pork meat to consumer's infection has made *Salmonella* surveillance mandatory for the primary production units in the EU. However, in Greece although surveillance efforts have been intensified for poultry units, little has been done for *Salmonella* pig surveillance. From the literature and other research findings relating to Greece, it seems that herd infection could reach 76.9%, while that of herd seroprevalence 63.33% (cut off  $\geq 40\%$ ), without this to mean true current infection.

In a recent investigation in Central Greece the identified serovars differed from those that had been isolated in previous years from Greek pig herds. This may mean a possible change in the epidemiology of infection due to the intra-European movement of animals and products. However, the monophasic serovars of *S. Typhimurium*, newly emerging among man and animals were also recovered. Furthermore, the observed antimicrobial testing in the past showed sensitivity to quinolones, tetracyclines and sulfonamides, while resistance was observed for the last two classes of antimicrobials in more recent investigations.

**Keywords:** antimicrobial resistance, Greece, pig, serovar, *Salmonella*, slaughterhouse

### References

- (EC) Commission Regulation No 2160/2003 of the European Parliament and of the Council of 17 November 2003 on the control of *Salmonella* and other specified food-borne zoonotic agents. Official Journal of the European Union, L 325.
- Baptista, F.M., Dahl, J., Nielsen, L.R. 2010. Factors influencing *Salmonella* carcass prevalence in Danish pig abattoirs. *Prev Vet Med* 95: 231–238.
- Berends, B.R., Van Knapen, F., Sniijders, J. M., Mossel, D.A. (1997). Identification and quantification of risk factors regarding *Salmonella* spp. on pork carcasses. *Intern J Food Microbiol* 36(2–3): 199–206.
- CDC (Centers for Disease Control and Prevention). 2004. National *Salmonella* Surveillance System Annual Summary. *Salmonella* Annual Summary. 2004. (Available at: <http://www.cdc.gov/ncidod/dbmd/phlisdata/salmtab/2004/SalmonellaIntroduction2004.pdf>.) (Accessed at 17 Jan 2015).
- Dlabac, V. Trebichavsky, I., Rehakova, Z., Hofmanová, B., Splichal, I. and Cukrowska, B. 1997. Pathogenicity and protective effect of rough mutants of *Salmonella* species in germ-free piglets. *Infect Immun* 65 (12): 5238-5243.
- Duggan, S. J., Mannion, C., Prendergast, D. M., Leonard, N., Fanning, S., Gonzales-Barron, U., Egan, J., Butier, F., Duffy,

445



- G. 2010. Tracking the *Salmonella* Status of Pigs and Pork from Lairage through the Slaughter Process in the Republic of Ireland. *J Food Prot* 73(12): 2148-2160.
- EFSA (European Food Safety Authority). 2008. Report of the task force on zoonoses data collection on the analysis of the baseline survey on the prevalence of *Salmonella* in slaughter pigs, in the EU, 2006-2007. Part A. *EFSA Journal* 135: 1-111.
- EFSA (European Food Safety Authority). 2010a. EFSA assesses risk of *Salmonella* from pig meat. Press Release <http://www.efsa.europa.eu/en/press/news/biohaz100419.htm>
- EFSA (European Food Safety Authority). 2010b. The Community Summary Report on Trends and Sources of Zoonoses, Zoonotic Agents and Food-borne Outbreaks in the European Union in 2008. *EFSA Journal* 8(1):1496, 1-288.
- EFSA (European Food Safety Authority). 2011. The European Union Summary Report on antimicrobial resistance in zoonotic and indicator bacteria from humans, animals and food in the European Union in 2009. *EFSA Journal*, 9(7):2154.
- EFSA AND ECDC (European Food Safety Authority, European Centre for Disease Prevention and Control). 2014. SCIENTIFIC REPORT OF EFSA AND ECDC. The European Union Summary Report on Trends and Sources of Zoonoses, Zoonotic Agents and Food-borne Outbreaks in 2012.
- Evangelopoulou, G., Kritas, S., Govaris, A. & Burriel, A.R. 2014a. Pork meat as a potential source of *Salmonella enterica* subsp. *arizonae* infection in humans. *J Clin Microbiol* 52: 741–744.
- Evangelopoulou G., G. Filioussis, S. Kritas, G. Christodoulopoulos, L.A., Triantafyllou, Burriel A.R. 2014b. Short Communication. Colonisation of pig gallbladders with *Salmonella* species important to public health. *Vet Rec* doi: 10.1136/vr.102822.
- Ευαγγελιοπούλου Γ., Κρήτας Σ., Γκόβαρης Α., Φιλιούσης Γ., Μπουριέλ Α. 2014. Ορολογική διερεύνηση της *Salmonella* spp. σε εκτροφές χοίρων στην Ελλάδα (3ο Πανελληνίου Συνεδρίου Κτηνιατρικής παραγωγικών ζώων και Υγιεινής τροφίμων)
- Filioussis, G., Petridou, E., Johansson, A., Christodoulopoulos, G., Kritas, S.K. 2008. Antimicrobial susceptibility and genetic relatedness of *Salmonella enterica* subsp. *enterica* serovar Mbandaka strains, isolated from a swine finishing farm in Greece. *Afr J Microbiol Res.* 2 (11): 313-315.
- Galanis, E., Lo Fo Wong, D.M.A., Patric, M.E., Binsztein, N., Cieslik, A., Chalermchaikit, T., Aidara-Kane, A., Ellis, A., Angulo, F.J. and Wegener, H.C. 2006. Web-based surveillance and global *Salmonella* distribution, 2000–2002. *Emerg Infect Dis* 12:381–388.
- Gonzalez-Escobedo, G., Gunn, S. 2013. Gallbladder Epithelium as a Niche for Chronic *Salmonella* Carriage. *Infect Immun* 81: 2920-2930.
- Grafanakis E, Leontides L, Genigeorgis C. 2001. Seroprevalence and antibiotic sensitivity of serotypes of *Salmonella enterica* in Greek pig herds. *Vet Rec* 148:407-411.
- Hald, T., Wingstrand, A., Swanenburg, M., Von Altrock, A., Thorberg, B.M. 2003. The occurrence and epidemiology of *Salmonella* in European pig slaughterhouses. *Epidemiol Infect* 131(3): 1187-12033.
- International Organization for Standardization (ISO). 2002. Microbiology of food and animal feeding stuff—horizontal method for the detection of *Salmonella*. ISO 6579. Geneva, Switzerland: International Organization for Standardization.
- Liebler-Tenorio E.M., Pabst R. 2006. MALT structure and function in farm animals. *Vet Res* 37: 257–280.
- Limpitakis, N., Genigeorgis, C., Abraham, A., Leontides, L., Grafanakis, S., Iosifidou, E., 1999. Post-harvest epidemiology of *Salmonella enterica* in pork: Prevalence in the environment, carcasses and by-products in two slaughterhouses in Greece (1996-1998). Proceedings of the 3rd International Symposium on Epidemiology and Control of *Salmonella* in Pork, 4-7 August, 1999, Washington, USA, p. 141-150.
- Lo Fo Wong, D.M.A., Hald, T. 2000. *Salmonella* in Pork. Pre-harvest and Harvest Control Options Based on Epidemiologic, Diagnostic and Economic Research. Contract No FAIRI C195-0400. Final report 2000. Commission of the European Union. pp 21-24.
- Lo Fo Wong, D.M.A., Hald, T., van der Wolf P.J., Swanenburg, M. 2002. Epidemiology and control measures for *Salmonella* in pigs and pork. *Livestock Prod Sci* 76: 215–222.
- Mandilara, G., Lambiri, M., Polemis, M., Passiotou, M., Vatopoulos, A. 2013. Phenotypic and molecular characterisation of multiresistant monophasic *Salmonella* Typhimurium (1,4,[5],12:i:-) in Greece, 2006 to 2011. *Euro Surveill* 18(22):pii=20496.





- G. 2010. Tracking the *Salmonella* Status of Pigs and Pork from Lairage through the Slaughter Process in the Republic of Ireland. *J Food Prot* 73(12): 2148-2160.
- EFSA (European Food Safety Authority). 2008. Report of the task force on zoonoses data collection on the analysis of the baseline survey on the prevalence of *Salmonella* in slaughter pigs, in the EU, 2006-2007. Part A. *EFSA Journal* 135: 1-111.
- EFSA (European Food Safety Authority). 2010a. EFSA assesses risk of *Salmonella* from pig meat. Press Release <http://www.efsa.europa.eu/en/press/news/biohaz100419.htm>
- EFSA (European Food Safety Authority). 2010b. The Community Summary Report on Trends and Sources of Zoonoses, Zoonotic Agents and Food-borne Outbreaks in the European Union in 2008. *EFSA Journal* 8(1):1496, 1-288.
- EFSA (European Food Safety Authority). 2011. The European Union Summary Report on antimicrobial resistance in zoonotic and indicator bacteria from humans, animals and food in the European Union in 2009. *EFSA Journal*, 9(7):2154.
- EFSA AND ECDC (European Food Safety Authority, European Centre for Disease Prevention and Control). 2014. SCIENTIFIC REPORT OF EFSA AND ECDC. The European Union Summary Report on Trends and Sources of Zoonoses, Zoonotic Agents and Food-borne Outbreaks in 2012.
- Evangelopoulou, G., Kritas, S., Govaris, A. & Burriel, A.R. 2014a. Pork meat as a potential source of *Salmonella enterica* subsp. *arizonae* infection in humans. *J Clin Microbiol* 52: 741–744.
- Evangelopoulou G., G. Filioussis, S. Kritas, G. Christodoulopoulos, L.A., Triantafyllou, Burriel A.R. 2014b. Short Communication. Colonisation of pig gallbladders with *Salmonella* species important to public health. *Vet Rec* doi: 10.1136/vr.102822.
- Ευαγγελιοπούλου Γ., Κρήτας Σ., Γκόβαρης Α., Φιλιούσης Γ., Μπουριέλ Α. 2014. Ορολογική διερεύνηση της *Salmonella* spp. σε εκτροφές χοίρων στην Ελλάδα (3ο Πανελληνίου Συνεδρίου Κτηνιατρικής παραγωγικών ζώων και Υγιεινής τροφίμων)
- Filioussis, G., Petridou, E., Johansson, A., Christodoulopoulos, G., Kritas, S.K. 2008. Antimicrobial susceptibility and genetic relatedness of *Salmonella enterica* subsp. *enterica* serovar Mbandaka strains, isolated from a swine finishing farm in Greece. *Afr J Microbiol Res.* 2 (11): 313-315.
- Galanis, E., Lo Fo Wong, D.M.A., Patric, M.E., Binsztein, N., Cieslik, A., Chalermchaikit, T., Aidara-Kane, A., Ellis, A., Angulo, F.J. and Wegener, H.C. 2006. Web-based surveillance and global *Salmonella* distribution, 2000–2002. *Emerg Infect Dis* 12:381–388.
- Gonzalez-Escobedo, G., Gunn, S. 2013. Gallbladder Epithelium as a Niche for Chronic *Salmonella* Carriage. *Infect Immun* 81: 2920-2930.
- Grafanakis E, Leontides L, Genigeorgis C. 2001. Seroprevalence and antibiotic sensitivity of serotypes of *Salmonella enterica* in Greek pig herds. *Vet Rec* 148:407-411.
- Hald, T., Wingstrand, A., Swanenburg, M., Von Altrock, A., Thorberg, B.M. 2003. The occurrence and epidemiology of *Salmonella* in European pig slaughterhouses. *Epidemiol Infect* 131(3): 1187-12033.
- International Organization for Standardization (ISO). 2002. Microbiology of food and animal feeding stuff—horizontal method for the detection of *Salmonella*. ISO 6579. Geneva, Switzerland: International Organization for Standardization.
- Liebler-Tenorio E.M., Pabst R. 2006. MALT structure and function in farm animals. *Vet Res* 37: 257–280.
- Limpitakis, N., Genigeorgis, C., Abraham, A., Leontides, L., Grafanakis, S., Iosifidou, E., 1999. Post-harvest epidemiology of *Salmonella enterica* in pork: Prevalence in the environment, carcasses and by-products in two slaughterhouses in Greece (1996-1998). Proceedings of the 3rd International Symposium on Epidemiology and Control of *Salmonella* in Pork, 4-7 August, 1999, Washington, USA, p. 141-150.
- Lo Fo Wong, D.M.A., Hald, T. 2000. *Salmonella* in Pork. Pre-harvest and Harvest Control Options Based on Epidemiologic, Diagnostic and Economic Research. Contract No FAIRI C195-0400. Final report 2000. Commission of the European Union. pp 21-24.
- Lo Fo Wong, D.M.A., Hald, T., van der Wolf P.J., Swanenburg, M. 2002. Epidemiology and control measures for *Salmonella* in pigs and pork. *Livestock Prod Sci* 76: 215–222.
- Mandilara, G., Lambiri, M., Polemis, M., Passiotou, M., Vatopoulos, A. 2013. Phenotypic and molecular characterisation of multiresistant monophasic *Salmonella* Typhimurium (1,4,[5],12:i:-) in Greece, 2006 to 2011. *Euro Surveill* 18(22):pii=20496.

116

**Pork Meat as a Potential Source of  
Salmonella enterica subsp. arizonae  
Infection in Humans**

Grammato Evangelopoulou, Spyridon Kritas, Alexander  
Govaris and Angeliki R. Burriel  
*J. Clin. Microbiol.* 2014, 52(3):741. DOI:  
10.1128/JCM.02933-13.  
Published Ahead of Print 11 December 2013.

---

Updated information and services can be found at:  
<http://jcm.asm.org/content/52/3/741>

*These include:*

**REFERENCES**

This article cites 30 articles, 8 of which can be accessed free at:  
<http://jcm.asm.org/content/52/3/741#ref-list-1>

**CONTENT ALERTS**

Receive: RSS Feeds, eTOCs, free email alerts (when new  
articles cite this article), [more»](#)

---

---

Information about commercial reprint orders: <http://journals.asm.org/site/misc/reprints.xhtml>  
To subscribe to to another ASM Journal go to: <http://journals.asm.org/site/subscriptions/>

---

[Journals.ASM.org](http://Journals.ASM.org)



## Pork Meat as a Potential Source of *Salmonella enterica* subsp. *arizonae* Infection in Humans

Grammato Evangelopoulou,<sup>a</sup> Spyridon Kritas,<sup>b</sup> Alexander Govaris,<sup>c</sup> Angeliki R. Burriel<sup>a</sup>

Laboratory of Microbiology and Parasitology, Faculty of Veterinary Medicine, School of Health Science, University of Thessaly, Karditsa, Greece<sup>a</sup>; Department of Microbiology and Infectious Diseases, School of Veterinary Medicine, Aristotle University, Salonika, Greece<sup>b</sup>; Laboratory of Hygiene of Foods of Animal Origin, Faculty of Veterinary Medicine, School of Health Science, University of Thessaly, Karditsa, Greece<sup>c</sup>

*Salmonella enterica* subsp. *arizonae* was isolated from 13 of 123 slaughtered pigs in central Greece. The samples cultured were feces, ileum tissue, mesenteric lymph nodes, and gallbladder swabs. A total of 74 isolates from 492 samples were identified as *Salmonella* spp. by use of standard laboratory culture media and two commercial micromethods and by use of a polyvalent slide agglutination test for the detection of O and H antigens. Among them were 19 (25.68%) suspected to be *S. enterica* subsp. *arizonae* according to analysis with standard laboratory culture media. Of those, 14 were identified as *S. enterica* subsp. *arizonae* by the API 20E (bioMérieux, France) and the Microgen GNA+B-ID (Microgen Bioproducts, Ltd., United Kingdom) identification systems. All the isolates were tested for resistance to 23 antimicrobials. Strains identified as *S. enterica* subsp. *arizonae* were resistant to 17 (70.8%) antibiotics. The highest proportions of resistance were observed for sulfamethoxazole-trimethoprim (71.4%), tetracycline (71.4%), ampicillin (64.3%), and amoxicillin (57.1%). Two isolates were resistant to aztreonam (7.1%) and tigecycline (7.1%), used only for the treatment of humans. Thus, pork meat may play a role in the transmission of antibiotic-resistant *S. enterica* subsp. *arizonae* to human consumers. This is the first report of *S. enterica* subsp. *arizonae* isolation from pigs.

Pork is a major source of food-borne salmonellosis in the European Union and around the world (1). Therefore, the European Food Safety Authority (EFSA) (2) considers many *Salmonella* serovars isolated from pigs, among which are Choleraesuis, Enteritidis and Typhimurium, important for public health (3, 4). Although *Salmonella enterica* subsp. *arizonae* is typically associated with reptiles, sporadic cases of human infection, related mainly to children, have also been reported (5–7). In such cases, the source of the microorganism is thought to be rattlesnake meat and some other animal products, especially poultry, as well as pet turtles (7, 8). Pork meat, however, is not among them, perhaps because this subspecies appears, due to the lack of scientific reports, to be a pathogen that is not important in pigs. *S. enterica* subsp. *arizonae* became important to public health during the 1980s, when several cases of human infections were associated with widespread use of rattlesnake meat, capsules, and powders (5, 9). These rattlesnake products were used by the Latino communities of the southwestern United States as forms of alternative medicinal therapies (10). Also, although adult human cases of infection by this microorganism are rare and perhaps underreported, the microbe should be considered a risk factor for infants and immunocompromised individuals having a history of contact with reptiles (6) and perhaps consumers of pork meat that was undercooked or unsafely handled during the cooking process (11).

*S. enterica* subsp. *arizonae* was first described in 1939 and named *Salmonella dar es salaam*, after the African city where it was first isolated from diseased chuckwallas, horned lizards, and Gila monsters (12). Since then, the placement and nomenclature of this species was continuously debated until it was placed, regardless of its many atypical similarities with the genus *Salmonella*, into the genus *Arizona*, which has only one species, *A. hinshawii* (4). In later years, the development of DNA homology studies placed it back in the genus *Salmonella* and in the group of subspe-

cies III (13–15). *Salmonella* subspecies III, later named *S. enterica* subsp. *arizonae*, has since been isolated from reptiles, fowl, turkeys, ducks, dogs, cats, monkeys, goats (10), and wild boars (16). To our knowledge, however, it has not been reportedly isolated from pigs.

We report here the isolation of *S. enterica* subsp. *arizonae* from the carcasses of finishing pigs in central Greece.

### MATERIALS AND METHODS

**Samples and sampling procedures.** A total of 492 samples were collected from 123 randomly selected pigs during slaughtering between September 2012 and March 2013. From each pig, samples were collected from various sites and samples from relative tissues were pooled. Thus, 123 samples each from pooled feces, pooled ileum, mesenteric lymph nodes, and gallbladder swabs were examined, in amounts and with the methods recommended by the 2002 ISO *Salmonella* rule 6579 applied to food and animal feeding stuffs (17). These samples were collected from 15 swine finishing farms, representing 10% of the swine finishing farms in central Greece.

**Laboratory examination of samples.** (i) Isolation and serotyping of *Salmonella* spp. Samples were cultured by standard culture methods following the 2002 ISO *Salmonella* rule 6579 (17). Briefly, after enrichment in buffered peptone water (BPW) (CM104; Oxoid), 0.1 ml of culture was inoculated onto modified semisolid Rappaport-Vassiliadis medium (MSRV) (BK191HA; Biokar) and incubated at 41.5 ± 1°C for 24 ± 3 h. A loopful of microorganisms taken from the edge of the MSRV colony was

Received 20 October 2013 Returned for modification 18 November 2013

Accepted 9 December 2013

Published ahead of print 11 December 2013

Editor: A. B. Onderdonk

Address correspondence to Grammato Evangelopoulou, [matinavet@hotmail.com](mailto:matinavet@hotmail.com).

Copyright © 2014, American Society for Microbiology. All Rights Reserved.

doi:10.1128/JCM.02933-13



**TABLE 1** Proportions of resistant and sensitive *S. enterica* subsp. *arizonae* isolates

Antimicrobial agent	No. (%) of isolates that were:	
	Resistant	Susceptible
Amoxicillin	8 (57.1)	6 (42.9)
Amoxicillin-clavulanic acid	5 (35.7)	9 (64.3)
Ampicillin	9 (64.3)	5 (35.7)
Ampicillin-sulbactam	0 (0)	14 (100)
Aztreonam	1 (7.1)	13 (92.9)
Cefotaxime	0 (0)	14 (100)
Cefoxitin	5 (35.7)	9 (64.3)
Ceftazidime	1 (7.1)	13 (92.9)
Ceftiofur	0 (0)	14 (100)
Ceftriaxone	0 (0)	14 (100)
Cefuroxime	0 (0)	14 (100)
Chloramphenicol	5 (35.7)	9 (64.3)
Colistin	3 (21.4)	11 (78.6)
Doripenem	0 (0)	14 (100)
Enrofloxacin	2 (14.3)	12 (85.7)
Gentamicin	0 (0)	14 (100)
Kanamycin	1 (7.1)	13 (92.9)
Nalidixic acid	3 (21.4)	11 (78.6)
Penicillin G	14 (100)	0 (0)
Rifampin	14 (100)	0 (0)
Sulfamethoxazole-trimethoprim	10 (71.4)	4 (28.6)
Tetracycline	10 (71.4)	4 (28.6)
Tigecycline	1 (7.1)	13 (92.9)

inoculated onto xylose-lysine-deoxycholate agar (XLD) (CM469; Oxoid), brilliant green agar (BG) (CM329; Oxoid), and *Salmonella-Shigella* agar (SS) (1.07667; Merck), all selective for *Salmonella* spp. Suspect colonies were examined by the API 20E (bioMérieux, France) and the Microgen GnA+B-ID (Microgen Bioproducts, Ltd., United Kingdom) systems, suitable for Gram-negative bacteria, supplemented by the oxidase, indole, and urease tests, triple sugar iron agar, lysine iron agar, and citrate utilization.

Isolates identified as *S. enterica* subsp. *arizonae* were tested for the presence of O and H antigens using a polyvalent slide agglutination test (Remel Europe, Ltd.; Dartford, England).

(ii) **Antimicrobial susceptibility testing.** The antimicrobial susceptibility of isolates identified as *S. enterica* subsp. *arizonae* was determined for 23 antimicrobials according to the disk diffusion method using Mueller-Hinton agar (LMLAB 39). *Escherichia coli* ATTC 25922 was used as the quality control strain. Interpretation of results followed the recommendations of the Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI) (18), the European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing (EUCAST) (breakpoint tables for interpretation of MICs and zone diameters, version 3.1, 2013 [<http://www.eucastr.org>]), and Galani et al., 2008 (19). Thus, for those antimicrobials for which breakpoints were not available, a strain was considered resistant when it showed an inhibitory zone below 12 mm (as do most of the organisms known as resistant) and as safely sensitive when having an inhibitory zone above 15 mm (as do most of the sensitive organisms on the lists). The antimicrobials used were selected according to their use for animal and human infections. They were amoxicillin (30 µg), amoxicillin-clavulanic acid (20/10 µg), ampicillin (10 µg), ampicillin-sulbactam (10/10 µg), aztreonam (30 µg), cefotaxime (30 µg), cefoxitin (30 µg), ceftazidime (30 µg), ceftiofur (30 µg), ceftriaxone (30 µg), cefuroxime (30 µg), chloramphenicol (30 µg), colistin (50 µg), doripenem (10 µg), enrofloxacin (5 µg), gentamicin (10 µg), kanamycin (30 µg), nalidixic acid (30 µg), penicillin G (10 µg), rifampin (30 µg), sulfamethoxazole-trimethoprim (23.75/1.25 µg), tetracycline (30 µg), and tigecycline (15 µg). Isolates exhibiting resistance to at least three antimicro-

**TABLE 2** Antibiotic resistance profiles of *S. enterica* subsp. *arizonae* isolates recovered from pig samples

Isolate no.	Sample source	Phenotypic antibiotic resistance of isolate to <sup>a</sup> :
1	Feces	AML, AMP, FOX, CT, P, RD, SXT, TE
2	Gallbladder	AML, AMP, C, P, RD, SXT, TE
3	Gallbladder	AML, AMC, AMP, FOX, C, P, RD, SXT, TE
4	Ileum	CT, P, RD
5	Gallbladder	C, P, RD, SXT, TE
6	Feces	P, RD
7	Feces	P, RD
8	Gallbladder	AML, AMP, C, ENR, K, NA, P, RD, SXT, TE
9	Feces	AMC, AMP, P, RD
10	Ileum	AML, AMP, C, P, RD, SXT, TE
11	Feces	AML, AMC, AMP, FOX, ENR, NA, P, RD, SXT, TE
12	Gallbladder	P, RD, SXT, TE, TGC
13	Gallbladder	AML, AMC, AMP, FOX, P, RD, SXT, TE
14	Lymph nodes	AML, AMC, AMP, ATM, FOX, CAZ, CT, NA, P, RD, SXT, TE

<sup>a</sup> AML, amoxicillin; AMC, amoxicillin-clavulanic acid; AMP, ampicillin; ATM, aztreonam; FOX, cefoxitin; CAZ, ceftazidime; C, chloramphenicol; CT, colistin; ENR, enrofloxacin; K, kanamycin; NA, nalidixic acid; P, penicillin G; RD, rifampin; SXT, sulfamethoxazole-trimethoprim; TE, tetracycline; TGC, tigecycline.

bial agents belonging to different antimicrobial classes were considered multidrug resistant (MDR) strains (20).

## RESULTS

**Isolation and serotyping of *Salmonella* spp.** The API 20E micro-method identified 14 out of 492 samples (2.8%), originating from 13 pigs, as positive to *S. enterica* subsp. *arizonae*. The same 14 isolates examined by the Microgen were identified as *S. enterica* subsp. *arizonae* (4 isolates), other *Salmonella* spp. (5), and different bacteria species (7). The strains identified as *S. enterica* subsp. *arizonae* by the API 20E were isolated from feces (6), ileum (3), mesenteric lymph nodes (2), and the gallbladder (7). All 14 isolates were found to be strongly positive by the slide agglutination test for the presence of *Salmonella* O and H antigens.

**Antimicrobial susceptibility testing.** Isolates examined showed varied resistance patterns (Tables 1 and 2). Twelve of 14 isolates were resistant to at least three antimicrobial categories, thus considered MDR, and all 14 were resistant to penicillin G and rifampin. From the remaining antimicrobials, the highest resistance rates were observed for sulfamethoxazole-trimethoprim (71.4%) and tetracycline (71.4%), followed by ampicillin (64.3%) and amoxicillin (57.1%). Low resistance rates were seen for aztreonam, ceftazidime, kanamycin, and tigecycline (7.1% each). All isolates were susceptible to ampicillin-sulbactam, cefotaxime, ceftiofur, ceftriaxone, cefuroxime, doripenem, and gentamicin.

## DISCUSSION

The isolation of *S. enterica* subsp. *arizonae* from pig carcasses has, to our knowledge, never been reported previously. In the present study, regardless of the biochemical microsystem used, some pigs were identified as carriers of this subspecies. Thus, pork meat could be a possible source of *S. enterica* subsp. *arizonae* transmission to consumers.

Due to the rare reporting of the isolation of this subspecies from food-producing animals, molecular confirmation is needed for explaining observed variations in the utilization of nutrients



incorporated in different commercial biochemical micromethods. An example is lactose incorporated in the Microgen system as a separate test. All isolates were found lactose negative with this system, although 50% of them were slow lactose fermenters, as previously reported (6), when cultured on *Salmonella-Shigella* (SS) and MacConkey agars. This could be one of the reasons the Microgen identified only four (28.6%) isolates as *S. enterica* subsp. *arizonae*. Another is the fewer years that this method has been used compared to the API 20E and/or the use of the Microgen mainly for the placing of Gram-negative bacteria isolated from humans. Thus, for increasing the accuracy of its database, it needs, perhaps, enrichment with information from animal isolates. Such problems and the usual practice of discarding lactose-fermenting bacteria as nonpathogenic (21) could play a role in the rarity of isolating *S. enterica* subsp. *arizonae*. The API 20E system, on the other hand, used for many decades in identifying microorganisms from humans and animals, identified 14 isolates as *S. enterica* subsp. *arizonae* with a very high probability (99.7%).

However, regardless of the proportions given by each phenotypic identification method used, *S. enterica* subsp. *arizonae* was isolated from slaughtered pigs, thus making them a probable source for human infection. The evident disagreements between the two micromethods used for first recognition of *S. enterica* subsp. *arizonae* point to the need to molecularly type them to clarify the source of disagreements. This requires an expense that is not available to all, especially under an economic crisis. Thus, for overcoming difficulties in the interpretation of the present results, lysine-iron agar, suggested many decades ago as a useful aid in identifying the *Arizona* group within the family of *Enterobacteriaceae* (22), was used. All 14 isolates were found positive to this test.

Regardless of difficulties encountered in the phenotypic placement of these Gram-negative isolates, the antimicrobial profiles of them are of clinical interest (Tables 1 and 2). Resistance to antimicrobials was high for those of low price, an observation indicative of a farmer's policy on the selection of antibiotics and the public health implications this may have. The economic crisis, forcing farmers to select cheaper antibiotics, could also further increase the resistance of microorganisms, such as *S. enterica* subsp. *arizonae*. Such increases could actually help this particular rare *Salmonella* subspecies increase its virulence, thus leading to its spreading among the pork industry and becoming a public health risk in the long run. The CLSI document M100-S21 (18) considers ampicillin a representative for the resistance patterns of amoxicillin. However, they are low-cost agents, thus routinely used in Greece for prophylactic and therapeutic purposes. For this reason, a higher disk content for amoxicillin (30 µg) was selected for comparing the results and to derive information for practical use. Also interesting was the observed resistance to chloramphenicol. Chloramphenicol has been banned since 1994 by the European Union for use in food-producing animals (see the chloramphenicol summary report by the European Agency for the Evaluation of Medicinal Products [[http://www.ema.europa.eu/docs/en\\_GB/document\\_library/Maximum\\_Residue\\_Limits\\_-\\_Report/2009/11/WC500012060.pdf](http://www.ema.europa.eu/docs/en_GB/document_library/Maximum_Residue_Limits_-_Report/2009/11/WC500012060.pdf)]). Thus, the isolates found resistant were, perhaps, derived from human sources, an additional indication of an emerging risk factor for public health. This is supported also by the finding of two isolates resistant to aztreonam and tigecycline, agents used only in humans. There are two possible sources for these isolates, either animal care takers, be-

cause unofficial use of these antibiotics is impossible due to costs, or the transfer of resistance genes within the carrier animal between different species of microorganisms, including other *Salmonella* serovars (23). The latter could be molecularly investigated by comparing the resistance genes and resistance-conferring structures of related microorganisms from the same animals or farms.

Another finding of interest is resistance observed to ceftazidime, which is an expanded-spectrum cephalosporin. This drug is considered by the WHO as a critically important antimicrobial for human medicine (24), and one of the therapeutics of choice for the treatment of *Salmonella* infection, together with aztreonam (25). The one isolate resistant to aztreonam is indicative of strains transferred from humans to animals during handling. However, *Salmonella* spp. resistance to aztreonam is not a rare observation for humans and animals (26–31). A major factor in the development of antibiotic resistance, a risk to public health, is the simultaneous use of therapeutic agents, such as ampicillin, trimethoprim-sulfamethoxazole, expanded-spectrum cephalosporins, and fluoroquinolones, in humans and food-producing animals. The development of resistant bacteria is threatening the efficient treatment of human infections (see the Joint FAO/World Organisation for Animal Health [OIE]/WHO Expert Workshop on Non-Human Antimicrobial Usage and Antimicrobial Resistance scientific assessment [<http://www.who.int/foodsafety/publications/micro/nov2003/en/>]). Pigs have been recognized as the primary reservoir of multiresistant bacteria (32), showing increased virulence, thus increasing the costs of disease to the pig industry (1, 33) and becoming sources of such bacteria for humans.

Most cases of human salmonellosis are foodborne, and pork is frequently a source of *Salmonella* (3). Undercooked meat is one source, but also important are improper in-home food handling and preparation and inadequate hand washing or washing of utensils during preparation of other materials consumed raw, such as salads. Cross-contamination of food materials via contaminated surfaces from raw meat has been implicated in foodborne outbreaks (11). Thus, *S. enterica* subsp. *arizonae* could be an emerging foodborne pathogen in the future, originating from the consumption of pork meat and becoming difficult to treat if it becomes multiresistant to antibiotics used in human medicine.

In summary, the present results demonstrate that *S. enterica* subsp. *arizonae*, a subspecies mainly associated with cold-blooded animals, is also infecting pigs, possibly making pork meat a source for human infection. *S. arizonae* could, under selective pressure, adapt to a new host, such as the pig, increasing its importance as a risk factor for humans. Improvements in the methods of molecular typing of this subspecies could provide new insight regarding the relatedness of rare serovars, such as those of *S. enterica* subsp. *arizonae*, to animal and human infections.

## REFERENCES

1. Boyen F, Haesebrouck F, Maes D, Van Immerseel F, Ducatelle R, Pasmans F. 2008. Non-typhoidal *Salmonella* infections in pigs: a closer look at epidemiology, pathogenesis and control. *Vet. Microbiol.* 130:1–19. <http://dx.doi.org/10.1016/j.vetmic.2007.12.017>.
2. European Food Safety Authority. 2006. Opinion of the Scientific Panel on Biological Hazards (BIOHAZ) on "Risk assessment and mitigation options of *Salmonella* in pig production". *EFSA J.* 341:1–131. <http://dx.doi.org/10.2903/j.elsa.2006.341>.
3. European Food Safety Authority. 2013. The European Union summary report on trends and sources of zoonoses, zoonotic agents and food-borne



- outbreaks in 2011. *EFSA J.* 11:3129. <http://dx.doi.org/10.2903/j.efsa.2013.3129>.
4. Galanis E, Lo Fo Wong DMA, Patrick ME, Binsztein N, Cieslik A, Chalermchaikit T, Aidara-Kane A, Ellis A, Angulo FJ, Wegener HC. 2006. Web-based surveillance and global *Salmonella* distribution, 2000–2002. *Emerg. Infect. Dis.* 12:381–388. <http://dx.doi.org/10.3201/eid1203.050854>.
  5. Weiss SH, Blaser MJ, Paleologo FP, Black RE, McWhorter AC, Asbury MA, Carter GP, Feldman RA, Brenner DJ. 1986. Occurrence and distribution of serotypes of the Arizona subgroup of *Salmonella* strains in the United States from 1967 to 1976. *J. Clin. Microbiol.* 23:1056–1064.
  6. Mahajan RK, Khan SA, Chandel DS, Kuma NR, Hans C, Chaudhry R. 2003. Fatal case of *Salmonella enterica* subsp. *arizonae* gastroenteritis in an infant with microcephaly. *J. Clin. Microbiol.* 41:5830–5832. <http://dx.doi.org/10.1128/JCM.41.12.5830-5832.2003>.
  7. Bertrand S, Rinhanen-Finne R, Weill FX, Rabsch W, Thornton L, Perovscikovs J, van Pelt W, Heck M. 2008. *Salmonella* infections associated with reptiles: the current situation in Europe. *Euro Surveill.* 13:pii: 18902. <http://www.eurosurveillance.org/ViewArticle.aspx?ArticleId=18902>.
  8. Kelly J, Hopkin R, Rimsza ME. 1995. Rattlesnake meat ingestion and *Salmonella arizonae* infection in children: case report and review of the literature. *Pediatr. Infect. Dis. J.* 14:320–322.
  9. Hall ML, Rowe B. 1992. *Salmonella arizonae* in United Kingdom from 1966–1990. *Epidemiol. Infect.* 108:59–65.
  10. Hoag JB, Sessler CN. 2005. A comprehensive review of disseminated *Salmonella* Arizona infection with an illustrative case. *South Med. J.* 98:1123–1129.
  11. Taulo S, Wetlesen A, Abrahamson R, Kululanga G, Mkakosya R, Grimason A. 2008. Microbiological hazard identification and exposure assessment of food prepared and served in rural households of Lungwena, Malawi. *Int. J. Food Microbiol.* 125:111–116. <http://dx.doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2008.02.025>.
  12. Caldwell ME, Ryerson DL. 1939. Salmonellosis in certain reptiles. *J. Infect. Dis.* 65:242–245.
  13. Crosa JH, Brenner DJ, Ewing WH, Falkow S. 1973. Molecular relationships among the salmonellae. *J. Bacteriol.* 115:307–315.
  14. Rohde R. 1979. Serological integration of all known Arizona-species into the Kauffmann-White-scheme (author's transl). *Zentralbl. Bacteriol. Orig. A.* 243:148–176. (In German.)
  15. Tindall JB, Grimont PAD, Garrity MG, Euzéby PJ. 2005. Nomenclature and taxonomy of the genus *Salmonella*. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 55(Pt 1):521–524. <http://dx.doi.org/10.1099/ijs.0.63580-0>.
  16. Zottola T, Montagnaro S, Magnapera C, Sasso S, De Martino A, Bragagnolo A, D'Amicib L, Condoleob R, Pisanelli G, Iovanea G, Pagninia U. 2013. Prevalence and antimicrobial susceptibility of *Salmonella* in European wild boar (*Sus scrofa*); Latium Region—Italy. *Comp. Immunol. Microbiol. Infect. Dis.* 36:161–168. <http://dx.doi.org/10.1016/j.cimid.2012.11.004>.
  17. International Organization for Standardization (ISO). 2002. Microbiology of food and animal feeding stuff—horizontal method for the detection of *Salmonella*. ISO 6579. International Organization for Standardization, Geneva, Switzerland.
  18. Clinical and Laboratory Standards Institute. 2011. Performance standards for antimicrobial susceptibility testing: twenty-first informational supplement. Approved standard. M 100-S21. Clinical and Laboratory Standards Institute, Wayne, PA.
  19. Galani I, Kontopidou F, Souli M, Reksatina PD, Koratzanis E, Deliolanis J, Giamarellou H. 2008. Colistin susceptibility testing by Etest and disk diffusion methods. *Int. J. Antimicrob. Agents* 31:434–439. <http://dx.doi.org/10.1016/j.ijantimicag.2008.01.011>.
  20. Schwarz S, Silley P, Simjee S, Woodford N, van Duijkeren E, Johnson AP, Gastra W. 2010. Assessing the antimicrobial susceptibility of bacteria obtained from animals. *Vet. Microbiol.* 141:1–4. <http://dx.doi.org/10.1016/j.vetmic.2009.12.013>.
  21. Edwards PR, Fife MA, Ramsey CH. 1959. Studies on the Arizona group of Enterobacteriaceae. *Bacteriol. Rev.* 23:155–174.
  22. Edwards PR, Fife MA. 1961. Lysine-iron agar in the detection of Arizona cultures. *Apple Microbiol.* 9:478–480.
  23. Courvalin P. 1996. The Garrod lecture. Evasion of antibiotic action by bacteria. *J. Antimicrob. Chemother.* 37:855–869.
  24. World Health Organization. 2011. Critically important antimicrobials for human medicine. 2nd revision 2011. WHO Document Production Services, Geneva, Switzerland.
  25. Farid Z, Girgis NI, Kamal M, Bishay E, Kilpatrick ME. 1990. Successful aztreonam treatment of acute typhoid fever after chloramphenicol failure. *Scand. J. Infect. Dis.* 22:505–506.
  26. Ben Redjeb S, Yaghlane BH, Boujnah A, Philippon A, Labia R. 1988. Synergy between clavulanic acid and newer-lactams of nine clinical isolates of *Klebsiella pneumoniae*, *Escherichia coli* and *Salmonella* Typhimurium resistant to third-generation cephalosporins. *J. Antimicrob. Chemother.* 21:263–266.
  27. Dias FS, Santos IF, Franco RM, Nascimento ER. 2010. Antimicrobial resistance in *Salmonella* spp. isolated from cattle gallbladder slaughtered in the south of the state of Rio de Janeiro. *R. bras. Ci. Vet.* 17 (n 3/4):104–107.
  28. Beyene G, Nair S, Asrat D, Mengistu Y, Engers H, Wain J. 2011. Multidrug resistant *Salmonella* Concord is a major cause of salmonellosis in children in Ethiopia. *J. Infect. Dev. Ctries.* 5:023–033. <http://dx.doi.org/10.3855/jidc.906>.
  29. Firoozeh F, Shahcheraghi F, Zahraei Salehi T, Karimi V, Aslani M. 2011. Antimicrobial resistance profile and presence of class I integrons among *Salmonella enterica* serovars isolated from human clinical specimens in Tehran, Iran. *Iran J. Microbiol.* 3:112–117.
  30. Nastasi A, Mammina C, Cannova L. 2000. Antimicrobial resistance in *Salmonella enteritidis*, southern Italy, 1990–1998. *Emerg. Infect. Dis.* 6:401–403. <http://dx.doi.org/10.3201/eid604.000415>.
  31. Fortuna JL, do Nascimento ER, Franco RM. 2012. Antimicrobial resistance of *Salmonella* spp. strains isolated from hamburgers. *Afr J. Microb. Res.* 6:7525–7533.
  32. Wedel SD, Bender JB, Leano FT, Boxrud DJ, Hedberg C, Smith KE. 2005. Antimicrobial drug susceptibility of human and animal *Salmonella* Typhimurium, Minnesota, 1997–2003. *Emerg. Infect. Dis.* 11:1899–1906. <http://dx.doi.org/10.3201/eid1112.050158>.
  33. EFSA. 2009. Joint opinion on antimicrobial resistance (AMR) focused on zoonotic infections. *The EFSA J.* 7:1372. <http://dx.doi.org/10.2903/j.efsa.2009.1372>.



# Short Communication

## Colonisation of pig gallbladders with *Salmonella* species important to public health

Grammato Evangelopoulou,  
Georgios Filioussis, Spyridon Kritas,  
Georgios Christodoulououlos,  
Eleftherios A. Triantafillou,  
Angeliki R. Burriel

*SALMONELLA* species have been isolated from human, cattle and goat gallbladders (Chandra and others 2006, Dias and others 2013, Gonzalez-Escobedo and Gunn 2013). *Salmonella* species genetically regulate mechanisms of resistance to the antibacterial and detergent-like properties of bile salts, thus they survive for a long time in this hostile environment (Begley and others 2005). They do it, either by down-regulating secretion and invasion genes in the type III secretion system of pathogenicity (Prouty and Gunn 2000) or by forming protective biofilms on gallstones (Crawford and others 2010). Their survival leads to lengthy intermittent shedding of pathogenic serovars or multidrug resistant strains (Gonzalez-Escobedo and Gunn 2013).

Therefore, the objective of this study was to investigate the presence of *Salmonella* species serovars in the gallbladder of slaughtered pigs and evaluate their antimicrobial resistance, thus their public health importance.

One hundred and twenty-three gallbladders collected from randomly selected healthy pigs at slaughter over a period of 6 months were cultured following ISO 6579 (ISO 2002)

(Annex D). Suspect colonies were subcultured on nutrient agar, confirmed as Gram negative, tested for oxidase production, utilisation of Triple Sugar Iron Agar (Merck, Germany) and assigned to species using the Microgen systems GnA and B-ID (Microgen Bioproducts Ltd, UK). Those identified as *Salmonella* species were confirmed with a polyvalent slide agglutination test (Remel Europe Ltd, Dartford, UK) detecting O and H antigens and further serotyped by the Greek National Reference Laboratory for *Salmonella* species (GNRLS).

*Salmonella* species isolates were tested against 24 antimicrobials using the disk diffusion method as described by Evangelopoulou and others (2014). The antimicrobials were selected according to their clinical use for treating animal and human infections and they are included in Table 1.

Nineteen *Salmonella* suspect isolates were collected from the International Organization for Standardization (ISO) recommended solid media, but only 15 were identified by the Microgen systems as *Salmonella* species (seven isolates), '*Salmonella enterica* subspecies *arizonae*' (six isolates), '*Salmonella enterica* subspecies *enterica*' and '*Salmonella enterica* subspecies *indica*' (one isolate each). The GNRLS serotyped only seven. They were serovar Typhimurium (one), the Typhimurium monophasic variant *S enterica* subspecies *enterica* ser. 4,12:i:- (two), the monophasic variants *S enterica* subspecies *enterica* ser. 6,7:k- and *S enterica* subspecies *enterica* ser. 6,14,25:-1,2 and one each, *S. Bredeney* and *S. enterica* subspecies *salamae* 38:b:1,2. All 15 isolates were resistant to tetracycline, 14 to sulfamethoxazole/trimethoprim, 12 to rifampin, 11 to ampicillin and amoxicillin, and 10 to chloramphenicol (Table 1).

Colonised gallbladder epithelial cells maintain pathogenic *Salmonella* serovars (Menendez and others 2009), found here to be highly resistant to commonly used antibiotics. Thus, animal gallbladders should be considered an important risk to consumers of pork, through carcass contamination. Interestingly, 8 of the 15 isolates identified with the Microgen systems as '*Salmonella enterica* subspecies *arizonae*' (six isolates), '*Salmonella enterica* subspecies *enterica*' and '*Salmonella enterica* subspecies *indica*' (one isolate each) were not serotyped by the GNRLS. *S. arizonae*, reported from sporadic human cases, is not serotyped easily (Mahajan and others 2003, Bertrand and others 2008), perhaps, due to the expression of mannose-resistant type III fimbriae, inhibiting the agglutination of 'O' antigens (Aleksić and others 1978), but they were positive in the polyvalent agglutination test.

Of the remaining seven serovars, six were serotyped as subspecies '*enterica*', two of which were monophasic *S. Typhimurium* and two of other monophasic variants. Monophasic *S. Typhimurium* has recently emerged worldwide (Switt and others 2009) and is considered a new pandemic threat, placed fourth among important serovars reported from man, second from live pigs and third from pig meat (EFSA (European Food Safety Authority) and ECDC (European Centre for Disease Prevention and Control) 2013). The present investigation is, to our knowledge, the first reporting the isolation of *Salmonella* species monophasic variants from the pig's gallbladder. Thus, the pig's gallbladder could be an important source of carcass contamination, either by direct accidental knife contamination or gut intermittent colonisation during transport and lairage, thus pork contamination.

*S enterica* subspecies *salamae* 38:b:1,2, is occasionally reported from human, wild boars, poultry and vegetables (Bellissima and others 2004, Bouchrif and others 2009, Quiroz-Santiago and others 2009, Zottola and others 2013) and this is the first reporting from the gallbladder of pigs. Its presence in the pig's gallbladder indicates the presence of genetic mechanisms helping it adapt in a hostile environment and eventually spreading to susceptible hosts. Interestingly, a recent retrospective study of more than 75,000 human isolates collected between 1985 and 2009 demonstrated that invasive extraintestinal disease in man was

Veterinary Record (2014)

doi: 10.1136/vr.102822

**Grammato Evangelopoulou**, DVM, PhD Candidate,  
**Angeliki R. Burriel**, DVM, MSc, MSc, PhD,  
Laboratory of Microbiology and Parasitology, Faculty of Veterinary Medicine, School of Health Sciences, University of Thessaly, Karditsa, Greece  
**Georgios Filioussis**, DVM, PhD, DipECVRHM,  
**Spyridon Kritas**, DVM, PhD, DipECPHM,  
Department of Microbiology and Infectious Diseases, Faculty of Veterinary Medicine, Aristotle University, Thessaloniki, Greece  
**Georgios Christodoulououlos**, DVM, PhD, CertSHIP, DipECVRHM,

DipECBHM, MRCVS,  
Department of Clinical Veterinary Medicine, Faculty of Veterinary Medicine, School of Health Sciences, University of Thessaly, Karditsa, Greece  
**Eleftherios A. Triantafillou**, DVM, MSc,  
Laboratory of Hygiene and Epidemiology, Faculty of Medicine, School of Health Sciences, University of Thessaly, Larisa, Greece  
E-mail for correspondence: [matinavet@hotmail.com](mailto:matinavet@hotmail.com)  
Provenance: not commissioned; externally peer reviewed  
Accepted November 13, 2014

February 14, 2015 | Veterinary Record



## Short Communication

TABLE 1: Antibiotic resistance profiles of *Salmonella* isolates recovered from pigs' gallbladder

Isolate no.	Isolate identification	Antibiotic resistance pattern of isolates
1.	<i>S</i> Typhimurium	P <sup>1</sup> , RD <sup>2</sup> , SXT <sup>3</sup> , TE <sup>4</sup> , E <sup>5</sup> , AML <sup>6</sup> , AMP <sup>7</sup> , CXM <sup>8</sup> (1) <sup>17</sup>
2.	<i>S enterica</i> subspecies <i>enterica</i> ser. 4,12:i:-	P <sup>1</sup> , RD <sup>2</sup> , SXT <sup>3</sup> , TE <sup>4</sup> , E <sup>5</sup> , AML <sup>6</sup> , AMP <sup>7</sup> , CT <sup>9</sup>
3.	<i>S enterica</i> subspecies <i>enterica</i> ser. 4,12:i:-	P <sup>1</sup> , RD <sup>2</sup> , SXT <sup>3</sup> , TE <sup>4</sup> , E <sup>5</sup> , AML <sup>6</sup> , AMP <sup>7</sup>
4.	<i>S enterica</i> subspecies <i>enterica</i> ser. 6,7:k:-	P <sup>1</sup> , SXT <sup>3</sup> , C <sup>10</sup> , TE <sup>4</sup> , E <sup>5</sup> , AML <sup>6</sup> , AMP <sup>7</sup> , RD <sup>2</sup> (0) <sup>9</sup> , K <sup>11</sup> (1) <sup>17</sup>
5.	<i>S enterica</i> subspecies <i>enterica</i> ser. 6,14,25:::1,2	P <sup>1</sup> , RD <sup>2</sup> , SXT <sup>3</sup> , C <sup>10</sup> , TE <sup>4</sup> , E <sup>5</sup> , AML <sup>6</sup> , AMP <sup>7</sup> , TGC <sup>12</sup> (1) <sup>17</sup>
6.	<i>S</i> Bredeney	P <sup>1</sup> , RD <sup>2</sup> , K <sup>12</sup> , TE <sup>4</sup> , E <sup>5</sup>
7.	<i>S enterica</i> subspecies <i>salamae</i> 38:b:1,2	P <sup>1</sup> , SXT <sup>3</sup> , C <sup>10</sup> , TE <sup>4</sup> , E <sup>5</sup> , K <sup>11</sup> (1) <sup>17</sup>
8.	<i>S enterica</i> subspecies <i>enterica</i>	P <sup>1</sup> , RD <sup>2</sup> , SXT <sup>3</sup> , C <sup>10</sup> , TE <sup>4</sup> , E <sup>5</sup> , AML <sup>6</sup> , AMP <sup>7</sup> , AMC <sup>13</sup> (1) <sup>17</sup> , FOX <sup>14</sup> (1) <sup>17</sup>
9.	<i>S</i> arizonae	P <sup>1</sup> , RD <sup>2</sup> , SXT <sup>3</sup> , C <sup>10</sup> , TE <sup>4</sup> , E <sup>5</sup> , AML <sup>6</sup> , AMP <sup>7</sup>
10.	<i>S</i> arizonae	P <sup>1</sup> , RD <sup>2</sup> , SXT <sup>3</sup> , C <sup>10</sup> , ENR <sup>15</sup> , TE <sup>4</sup> , E <sup>5</sup> , K <sup>11</sup> , NA <sup>16</sup> , AML <sup>6</sup> , AMP <sup>7</sup>
11.	<i>S</i> arizonae	P <sup>1</sup> , RD <sup>2</sup> , AMC <sup>13</sup> , SXT <sup>3</sup> , C <sup>10</sup> , TE <sup>4</sup> , E <sup>5</sup> , AML <sup>6</sup> , AMP <sup>7</sup> , FOX <sup>14</sup>
12.	<i>S</i> arizonae	P <sup>1</sup> , RD <sup>2</sup> , SXT <sup>3</sup> , C <sup>10</sup> , TE <sup>4</sup> , E <sup>5</sup> , AMC <sup>13</sup> , AML <sup>6</sup> , AMP <sup>7</sup> , FOX <sup>14</sup>
13.	<i>S</i> arizonae	P <sup>1</sup> , RD <sup>2</sup> , SXT <sup>3</sup> , C <sup>10</sup> , TE <sup>4</sup> , E <sup>5</sup>
14.	<i>S</i> arizonae	P <sup>1</sup> , RD <sup>2</sup> , SXT <sup>3</sup> , TE <sup>4</sup> , E <sup>5</sup> , TGC <sup>12</sup>
15.	<i>S enterica</i> subspecies <i>indica</i>	P <sup>1</sup> , SXT <sup>3</sup> , C <sup>10</sup> , NA <sup>16</sup> , TE <sup>4</sup> , E <sup>5</sup> , AML <sup>6</sup> , AMP <sup>7</sup> , RD <sup>2</sup> (0) <sup>9</sup> , K <sup>11</sup> (1) <sup>17</sup> , ENR <sup>15</sup> (1) <sup>17</sup>

<sup>1</sup>Penicillin G (10 µg), <sup>2</sup>rifampin (30 µg), <sup>3</sup>sulfamethoxazole/trimethoprim (23.75/1.25 µg), <sup>4</sup>tetracycline (30 µg), <sup>5</sup>erythromycin (15 µg), <sup>6</sup>amoxicillin (30 µg), <sup>7</sup>ampicillin (10 µg), <sup>8</sup>cefuroxime (30 µg), <sup>9</sup>colistin (50 µg), <sup>10</sup>chloramphenicol (30 µg), <sup>11</sup>kanamycin (30 µg), <sup>12</sup>tigecycline (15 µg), <sup>13</sup>amoxicillin-clavulanic acid (20/10 µg), <sup>14</sup>cefotaxime (30 µg), <sup>15</sup>enrofloxacin (5 µg), <sup>16</sup>nalidixic acid (30 µg), <sup>17</sup>intermediate resistance

significantly associated to subspecies other than *S enterica* subspecies *enterica*, among which was subspecies *salamae* (Abbott and others 2012). These newly emerging subspecies and related serovars and their increased resistance to commonly used antimicrobials observed here indicate the need for continuous epidemiological surveillance in animals aiming in their early control for consumer protection. Although the isolates were susceptible to aztreonam and doripenem used only for treating human cases, they were resistant to other commonly used antimicrobials against Gram-negative bacteria (Table 1). Multidrug resistance and the ability of *Salmonella* species to spread beyond the intestine and be established in the gallbladder have public health implications when chronic carrier hosts are present among food-producing animals (Spector and Kenyon 2012).

In conclusion, lack of information from the EU or other world areas concerning the presence of *Salmonella* species in the gallbladder of pigs makes comparison impossible. However, the present findings incriminate the gallbladder in carcass contamination during slaughtering and thus pork contamination with *Salmonella* species serovars is important to public health, such as the monophasic variants. Hence, this organ is a significant risk factor to public health and care should be taken to avoid carcass contamination during evisceration by avoiding accidental dissection of the intestines and the gallbladder.

No isolate was resistant to ampicillin/sulbactam (10/10 µg), aztreonam (30 µg), cefotaxime (30 µg), ceftazidime (30 µg), ceftiofur (30 µg), ceftiofur (30 µg), doripenem (10 µg) and gentamicin (10 µg).

## References

- ABBOTT, S. L., NI E C. Y. & JANDA, J. M. (2012) Increase in extraintestinal infections caused by *Salmonella enterica* subspecies II-IV. *Emerging Infectious Diseases* **18**, 637-639
- ALEKSIĆ, S., ROHDE, R., ALEKSIĆ, V. & MÜLLER, G. (1978) A new fimbrial antigen as a cause for a complete O-inagglutinability of various Arizona strains. *Zentralblatt Bakteriologie* **241**, 427-437
- BEGLEY, M., GAHAN, C. G. M. & HILL, C. (2005) The interaction between bacteria and bile. *FEMS Microbiology Reviews* **29**, 625-651
- BELLISSIMA, P., AMATO, R., AURNIA, G., CANNIZZO, R. & BONFANTE, S. (2004) Epidemiology of salmonellosis in Caltagirone area (Sicily). *Le Infezioni in Medicina* **12**, 60-64
- BERTRAND, S., RIMHANEN-FINNE, R., WEILL, E. X., RABSCH, W., THORNTON, L., PEREVOSCIKOVS, J., VAN PELT, W. & HECK, M. (2008) *Salmonella* infections associated with reptiles: the current situation in Europe. *Euro Surveillance* **13**, pii: 18902
- BOUCHRIË, B., PAGLIETTI, B., MURGIA, M., PIANA, A., COHEN, N., ENNAJI, M. M., RUBINO, S. & TIMINOUNI, M. (2009) Prevalence and antibiotic-resistance of *Salmonella* isolated from food in Morocco. *The Journal of Infection in Developing Countries* **3**(1), 35-40
- CHANDRA, M., SINGH, B. R., SHANKAR, H., AGARWAL, M., AGRAWAL, R. K., SHARMA, G. & BABU, N. (2006) Study on prevalence of *Salmonella* infection in goats. *Small Ruminant Research* **65**, 24-30
- CRAWFORD, R. W., ROSALES-REYES, R., RAMIREZ-AGUILAR, L., CHAPA-AZUELA, O., ALPUCHE-ARANDA, C. & GUNN, J. S. (2010) Gallstones play a significant role in *Salmonella* spp. gallbladder colonization and carriage. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA* **107**, 4353-4358
- DIAS, E. S., CARRIJO, K. E., SANTOS, I. E., FRANCO, R. M. & NASCIMENTO, E. R. (2013) Characterization of bacterial microbiota present in bile and gallbladder epithelium of cattle. *Veterinária Notícias* **18**, 20-28
- EFSA (EUROPEAN FOOD SAFETY AUTHORITY) AND ECDC (EUROPEAN CENTRE FOR DISEASE PREVENTION AND CONTROL) (2013) The European Union Summary Report on antimicrobial resistance in zoonotic and indicator bacteria from humans, animals and food in 2011. *EFSA Journal* **11**(5), 3196, 359 pp
- EVANGELOPOULOU, G., KRITAS, S., GOVARIS, A. & BURRIEL, A. R. (2014) Brk meat as a potential source of *Salmonella enterica* subsp. *arizonae* infection in humans. *Journal of Clinical Microbiology* **52**, 741-744
- GONZALEZ-ESCOBEDO, G. & GUNN, J. S. (2013) Gallbladder epithelium as a niche for chronic *Salmonella* carriage. *Infection and Immunity* **81**, 2920-2930
- INTERNATIONAL ORGANIZATION FOR STANDARDIZATION (ISO) (2002) *Microbiology of food and animal feeding stuff—horizontal method for the detection of Salmonella*. ISO 6579. Geneva, Switzerland: International Organization for Standardization
- MAHAJAN, R. K., KHAN, S. A., CHANDEL, D. S., KUMAR, N., HANS, C. & CHAUDHRY, R. (2005) Fatal case of *Salmonella enterica* subsp. *arizonae* gastroenteritis in an infant with microcephaly. *Journal of Clinical Microbiology* **41**, 5830-5832
- MENENDEZ, A., ARENA, E. T., GUTTMAN, J. A., THORSON, L., VALLANCE, B. A., VOGL, W. & FINLAY, B. B. (2009) *Salmonella* infection of gallbladder epithelial cells drives local inflammation and injury in a model of acute typhoid fever. *The Journal of Infectious Diseases* **200**, 1703-1715
- PROUTY, A. M. & GUNN, J. S. (2000) *Salmonella enterica* serovar Typhimurium invasion is repressed in the presence of bile. *Infection and Immunity* **68**, 6763-6769
- QUIROZ-SANTIAGO, C., RODAS-SUÁREZ, O. R., CARLOS, R. V., FERNÁNDEZ, E. J., QUIÑONES-RAMÍREZ, E. I. & VÁZQUEZ-SALINAS, C. (2009) Prevalence of *Salmonella* in vegetables from Mexico. *Journal of Food Protection* **72**, 1279-1282
- SPECTOR, M. P. & KENYON, W. J. (2012) Resistance and survival strategies of *Salmonella enterica* to environmental stresses. *Food Research International* **45**, 455-481
- SWITT, A. I., SOYER, Y., WARNICK, L. D. & WIEDMANN, M. (2009) Emergence, distribution, and molecular and phenotypic characteristics of *Salmonella enterica* serotype 4,5,12:i:-. *Foodborne Pathogens and Disease* **6**, 407-415
- ZOTTOLA, T., MONTAGNARO, S., MAGNAPERAA, C., SASSO, S., DE MARTINO, L., BRAGAGNOLO, A., D'AMICIB, L., CONDOLEO, R., PISANELLI, G., IOVANE, G. & PAGNINIA, U. (2013) Prevalence and antimicrobial susceptibility of *Salmonella* in European wild boar (*Sus scrofa*); Latium Region -Italy. *Comparative Immunology, Microbiology and Infectious Diseases* **36**, 161-168



CrossMark

## Colonisation of pig gallbladders with *Salmonella* species important to public health

Grammato Evangelopoulou, Georgios Filioussis, Spyridon Kritas, Georgios Christodoulououlos, Eleftherios A. Triantafillou and Angeliki R. Burriel

*Veterinary Record* 2015 176: 174 originally published online November 28, 2014  
doi: 10.1136/vr.102822

---

Updated information and services can be found at:  
<http://veterinaryrecord.bmj.com/content/176/7/174.2>

---

### References

*These include:*

This article cites 19 articles, 7 of which you can access for free at:  
<http://veterinaryrecord.bmj.com/content/176/7/174.2#BIBL>

### Email alerting service

Receive free email alerts when new articles cite this article. Sign up in the box at the top right corner of the online article.

---

### Notes

---

To request permissions go to:  
<http://group.bmj.com/group/rights-licensing/permissions>

To order reprints go to:  
<http://journals.bmj.com/cgi/reprintform>

To subscribe to BMJ go to:  
<http://group.bmj.com/subscribe/>



## Isolation and Antimicrobial Testing of *Aeromonas* spp., *Citrobacter* spp., *Cronobacter* spp., *Enterobacter* spp., *Escherichia* spp., *Klebsiella* spp., and *Trabulsiiella* spp. from the Gallbladder of Pigs

GRAMMATO EVANGELOPOULOU<sup>1\*</sup>, GEORGIOS FILIOUSSIS<sup>2</sup>, SPYRIDON KRITAS<sup>2</sup>,  
MARIA KANTERE<sup>1</sup> and ANGELIKI R. BURRIEL<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Laboratory of Microbiology and Parasitology, Faculty of Veterinary Medicine, School of Health Sciences,  
University of Thessaly, Karditsa, Greece

<sup>2</sup>Department of Microbiology and Infectious Diseases, Faculty of Veterinary Medicine,  
Aristotle University, Thessaloniki, Greece

Submitted 2 December 2014, revised 1 March 2015, accepted 17 March 2015

### Abstract

The presence of Gram-negative bacteria species, other than *Salmonella* spp., in the gallbladder of pigs was examined. Isolated Gram-negative bacteria were assigned to species using the Microgen™ GnA+B-ID Systems. Of the 64 isolated strains 43 were identified as *Escherichia coli*, seven as *Enterobacter* spp., three each as *Klebsiella* spp., *Citrobacter freundii*, *Aeromonas hydrophila* and *Cronobacter sakazakii* and one each as *Escherichia fergusonii* and *Trabulsiiella guamensis*. Their antibiograms showed very high resistance to ampicillin, amoxicillin, tetracycline, chloramphenicol and sulfamethoxazole/trimethoprim. It was concluded that the pigs' gallbladder is a reservoir of potentially pathogenic Gram-negative bacteria for pork consumers.

**Key words:** aztreonam, cholecystitis, doripenem, microflora of gallbladder, potentially pathogenic Gram-negative bacteria

Enteric bacteria have acquired the genetic ability to resist the defence mechanisms of the digestive system, some of which are gastric secretions, hydrochloric acid and bile, variations in pH, low oxygen levels, nutrient limitations and elevated osmolarity (Chowdhury *et al.*, 1996). By this ability, they are either pathogenic or potentially pathogenic for their host. If such bacteria colonize the gallbladder of pigs, they could become pork contaminants and a risk to consumers (Gunn, 2000). Bile is for some bacteria the regulating factor of their survival in the intestinal tract, thus a regulator of gut colonization. They survive the killing effect of bile, but also antibiotics and the host's immune response by forming protective biofilms (Begley *et al.*, 2005; Jensen *et al.*, 2010). Hence, the microflora of the gallbladder is evidence of an animal's intermittent gut colonization by potential pathogens.

Therefore, the objective was to assess Gram-negative bacteria of the pig's gallbladder, as risks to pork consumers.

Swab samples collected at slaughter from 145 randomly selected pigs' gallbladders, originating from

15 finishing farms located in Central Greece were bacteriologically examined.

Samples were enriched in Buffered Peptone Water (BPW Oxoid, England) for 18 ± 2 h at 37°C and subcultured on Columbia Blood Agar (CBA) and MacConkey agar (Oxoid, England). All morphologically different colonies were subcultured on CBA and after 24 h at 37°C, they were examined by Gram's stain. Gram-negative rods were tested for oxidase production (Bactident Oxidase Merck, Germany) and further examined as recommended by Quinn *et al.* (1994). In total, 79 Gram-negative isolates were selected for speciation using the Microgen™ GnA+B-ID (Microgen Bioproducts Ltd, UK) System.

Sixty four non *Salmonella* species were tested against 24 antimicrobial agents using the disk diffusion method, as described elsewhere (Evangelopoulou *et al.*, 2014a). The selection of the antimicrobials was based on their use for treating animal and human infections. They were amoxicillin (30 µg), amoxicillin/clavulanic acid (20/10 µg), ampicillin (10 µg), ampicillin/sulbactam (10/10 µg), aztreonam (30 µg), cefotaxime (30 µg),

\* Corresponding author: G. Evangelopoulou, Laboratory of Microbiology and Parasitology, Faculty of Veterinary Medicine, School of Health Sciences, University of Thessaly, Karditsa, Greece; e-mail: [matinavet@hotmail.com](mailto:matinavet@hotmail.com)

cefoxitin (30 µg), ceftazidime (30 µg), ceftiofur (30 µg), ceftriaxone (30 µg), cefuroxime (30 µg), chloramphenicol (30 µg), colistin (50 µg), doripenem (10 µg), enrofloxacin (5 µg), erythromycin (15 µg), gentamicin (10 µg), kanamycin (30 µg), nalidixic acid (30 µg), penicillin G (10 µg), rifampin (30 µg), sulfamethoxazole/trimethoprim (23.75/1.25 µg), tetracycline (30 µg) and tigecycline (15 µg). Isolates exhibiting resistance to at least three antimicrobial agents belonging to different antimicrobial classes were considered multidrug resistant (MDR) (Schwarz et al., 2010).

Of the 93 (64.1%) bacteria positive gallbladders, 79 Gram-negative bacteria were selected for speciation. Of them 15 were identified as *Salmonella* spp. and 64 were *Escherichia coli* (43), *Enterobacter* spp. (7), three each *Klebsiella* spp., *Citrobacter freundii*, *Aeromonas hydrophila* and *Cronobacter sakazakii* and one

each *E. fergusonii* and *T. guamensis* (Table I). The three *A. hydrophila* isolates exhibited beta-haemolysis after 48 hours of incubation.

High antimicrobial resistance was observed for ampicillin, amoxicillin, tetracycline, chloramphenicol and sulfamethoxazole/trimethoprim (Table I). Somewhat lower was resistance to cephalosporins, quinolones and aminoglycosides, as groups. All isolates, except one (*E. fergusonii*), were resistant to penicillin G and all were susceptible to aztreonam and doripenem used for human treatments. Sixty isolates were considered MDR (Table I).

Of the 79 Gram-negative 15 were *Salmonella* spp. published elsewhere (Evangelopoulou et al., 2014b). Of the remaining, *E. coli* forming the normal intestinal microbiota was the predominant aerobic microorganism identified by the Microgen System. *E. coli* is helpful

Table I  
Cumulative results of antimicrobial resistance of Gram-negative isolates recovered from pigs' gallbladder

	<i>Escherichia coli</i>	<i>Enterobacter aerogenes</i>	<i>Enterobacter gergoviae</i>	<i>Citrobacter freundii</i>	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	<i>Klebsiella oxytoca</i>	<i>Cronobacter sakazakii</i>	<i>E. fergusonii</i>	<i>Trabulsicella guamensis</i>	<i>Aeromonas hydrophila</i>	Total No of resistant strains
AML	37	3	3	2	1	1	1	0	1	3	52
AMC	12(I)	3	0	1, 1(I)	0	1	0	0	1	3	9
AMP	37	3	3	2	1	1	2	0	1	3	53
SAM	4, 8(I)	1(I)	0	1	0	1	1	0	0	1	8
AZT	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
CTX	2(I)	0	0	0	0	0	0	0	0	3	3
FOX	1(I)	0	1(I)	2(I)	0	1	1(I)	0	1	3	5
CAZ	1(I)	0	0	1	0	0	0	0	0	0	1
EFT	1(I)	0	0	1(I)	0	0	0	0	0	3	3
CRO	1	0	0	1	0	0	0	0	0	3	5
CXM	1, 13(I)	3(I)	1(I)	3(I)	0	1(I)	2(I)	0	0	3	4
CT	0	0	0	1	0	1	0	0	0	0	2
C	31	2	0	2	0	2	0	0	0	3	40
DOR	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
ENR	2, 2(I)	0	0	1(I)	0	0	0	0	0	1(I)	2
E	39	3	4	3	1	2	3	1	1	3	60
CN	2, 1(I)	0	0	1	0	0	0	0	0	0	3
K	4, 7(I)	0	1(I)	1	0	1	0	0	0	2	8
NA	5, 4(I)	0	0	1	0	1	0	0	0	3	10
P	43	3	4	3	1	2	3	0	1	3	63
RD	21,19(I)	2, 1(I)	4	3	1	2	2, 1(I)	0	1	3	39
SXT	39	2	0	2	0	2	1	0	1	3	50
TE	39	2	0	2	1	2	2	0	1	3	52
TGC	9(I)	2(I)	1(I)	0	1(I)	1(I)	0	0	0	3	3
<b>Total N.</b>	<b>43</b>	<b>3</b>	<b>4</b>	<b>3</b>	<b>1</b>	<b>2</b>	<b>3</b>	<b>1</b>	<b>1</b>	<b>3</b>	<b>64</b>

AML Amoxicillin, AMC Amoxicillin-clavulanic acid, AMP Ampicillin, SAM Ampicillin-sulbactam, AZT Aztreonam, CTX Cefotaxime, FOX Cefoxitin, CAZ Ceftazidime, EFT Ceftiofur, CRO Ceftriaxone, CXM Cefuroxime, C Chloramphenicol, CT Colistin, ENR Enrofloxacin, E Erythromycin, CN Gentamycin, K Kanamycin, NA Nalidixic acid, P Penicillin G, RD Rifampin, SXT Sulfamethoxazole/Trimethoprim, TE Tetracycline, TGC Tigecycline-(I)= Intermediate Resistance

in the development of a normal mucosal immune system, the suppression of harmful bacteria by overtaking their attachment sites and the production of essential nutrients (Canny and McCormick, 2008). However, pathogenic strains could invade the gallbladder and lead to its inflammation (Gunn, 2000). These strains and *Klebsiella pneumoniae*, *Enterobacter* spp. and *Enterococcus* spp. are associated with infectious cholecystitis (Wang *et al.*, 2003; Abeysuriya *et al.*, 2008; Carpender and Gilpin, 2014). Thus, enteric bacteria have developed sophisticated mechanisms not only for resisting the effects of bile salts, but also using favorably this unique environment for their survival, thus becoming under certain circumstances potential pathogens.

Among them could also be *T. guamensis* and *C. freundii*. The two could be confused, due to their phenotypic and antigenic behaviour, with *Salmonella* spp. or *E. coli* (McWhorter *et al.*, 1991; Delgado *et al.*, 2013), if a variety of methods for their differentiation are not used. Specifically, *T. guamensis* does not rapidly ferment lactose or sucrose and produces abundantly H<sub>2</sub>S, resembling phenotypically *Salmonella enterica* subspecies *diarizonae* and subspecies *hountanae* (McWhorter *et al.*, 1991). Although its clinical significance for animals is unknown, it could cause diarrhoea, as it does in man, resembling mild salmonellosis. Furthermore, carrier animals could be the source for these occasional human enteric problems.

*C. freundii*, a commensal microorganism of undocumented clinical importance to animals, is isolated from serious nosocomial infections in man (Nayar *et al.*, 2014). Its pathogenicity is attributed to multidrug resistance (Pepperell *et al.*, 2002), a property observed also in the present investigation (Table I). Evolutionary acquisition of resistance genes affects the course of an infectious disease, the evasion of the immune response and the events of host-pathogen interactions (Delgado *et al.*, 2013).

The same events could be important in human infections caused by multiresistant *Enterobacter* spp., as observed here, a bacterium easily acquiring resistance genes, mainly to beta-lactams, quinolones, tetracycline and chloramphenicol, thus emerging as a public health risk (Thiolas *et al.*, 2005; Boban *et al.*, 2011). The two species isolated here, *Enterobacter aerogenes* and *Enterobacter gergoviae*, are associated to infections of immunocompromised individuals (Boban *et al.*, 2011), as is also *Klebsiella* spp. showing phenotypic and DNA relatedness to *E. aerogenes* (Brisse *et al.*, 2006). *K. pneumoniae*, causing sporadic disease in individual pigs (AHVLA, 2012), is implicated in human pneumonia, urinary tract infections, neonatal septicemia and liver abscesses (Chang *et al.*, 2000; Bleich *et al.*, 2008).

*C. sakazakii*, previously a species of the genus *Enterobacter*, is reclassified as a new genus within the family

of Enterobacteriaceae (Iversen *et al.*, 2007). Although its pathogenic importance is unknown in animals and adult man, it has been recently implicated in fetal fatal meningitis, neurologic damage, brain abscess, septicemia, etc. (Healy *et al.*, 2010; Joseph and Forsythe, 2011). This association raises questions as to its role with immunocompromised pork consumers.

*A. hydrophila*, incriminated in a variety of human clinical conditions, such as gastroenteritis, septicemia, cellulitis, myonecrosis, peritonitis, hepatitis, pancreatic abscesses, respiratory, urogenital and eye infections of immunocompromised individuals, is also implicated in infections of poikilothermic animals (amphibians, reptiles and fish) (Janda and Abbott, 2010). However, it is more often isolated from food of plant and animal origin than animal disease (Queiroga *et al.*, 2012). *A. hydrophila* is producing haemolysins, enterotoxin (Ljungh *et al.*, 1981) and is multidrug resistant (Queiroga *et al.*, 2012), as it was observed here. Its isolation from pig gallbladders and its resistance to most of the antibiotics tested here, support its classification as an emerging pathogen for animals and man. Although the above microbes are opportunistic pathogens, their high resistance to commonly used antimicrobials makes them potential pathogens for man, and perhaps, unrecognized causes of reduced animal productivity.

Additionally, the multidrug resistance observed here indicates that pigs are a primary reservoir of multi-resistant bacteria. The use of antimicrobials in food producing helps faecal excretion of highly pathogenic Gram-negative enteric bacteria, such as *Salmonella*, eventually making pork carcasses the source of pork product contamination, thus consumer infections (Friendship *et al.*, 2009).

Observed high resistance above 60% to chloramphenicol, used in the treatment of human salmonellosis, but no longer used in animals in the EU (EVMP, 1994) could result from a variety of reasons. Although non-compliance of farmers is one reason, the number of farms participating (15 farms) is not supportive. Thus it could result from transfer of resistance genes between different bacteria species coding for similar classes of antimicrobials and/be residual caused by the persistence of resistance genes encoded in a microbial resistome (Sommer and Dantas, 2011). Persistent antimicrobial resistance is transferrable not only to pathogens, but also commensal bacteria or opportunistic pathogens, like the above, helping the development of a "superbug" (Thiolas *et al.*, 2005; Shailesh *et al.*, 2012; Frye and Jackson, 2013).

Such events in natural bacteria populations may have important implications in the evolution of bacteria and the means of evading the immune system, thus the outcome of infectious diseases (Delgado, *et al.*, 2013). Hence, pathogenic microorganisms can reside



transiently or permanently in the gallbladder of pigs, making it a reservoir of multidrug resistant Gram-negative bacteria contaminating pork products and infecting consumers.

### Literature

- Abey Suriya V., K.I. Deen, T. Wijesuriya and S.S. Salgado. 2008. Microbiology of gallbladder bile in uncomplicated symptomatic cholelithiasis. *Hepatobiliary Pancreat. Dis. Int.* 7: 633–637.
- Animal Health and Veterinary Laboratory Agencies (AHVLA). 2012. KLEBSIELLA SEPTICAEMIA. Information for farmers and vets in Great Britain Animal Health and Veterinary Laboratory. <http://www.defra.gov.uk/ahvla-en/files/pub-vet-klebsiella.pdf>, 2014.11.17
- Begley M., C.G.M. Gahan and C. Hill. 2005. The interaction between bacteria and bile. *FEMS Microbiol. Rev.* 29: 625–651.
- Bleich A., P. Kirsch, H. Sahly, J. Fahey, A. Smoczek, H.J. Hedrich and J.P. Sundberg. 2008. *Klebsiella oxytoca*: opportunistic infections in laboratory rodents. *Lab. Anim.* 42: 369–375.
- Boban N., A. Jeronic and V. Punda-Polic. 2011. Outbreak of nosocomial bacteremias, caused by *Enterobacter gergoviae* and *Enterobacter aerogenes*, in the neonatal intensive care unit, case-control study. *SIGNA VITAE.* 6: 27–32.
- Brisse S., Grimont F. and P.A.D. Grimont. 2006. The Genus *Klebsiella*, pp. 159–196. In: Dworkin M., S. Falkow, E. Rosenberg, K.H. Schleifer and E. Stackebrandt (eds). *Prokaryotes*, 3<sup>rd</sup> ed. Vol. 6. Springer, New York.
- Canny G.O. and B.A. McCormick. 2008. Bacteria in the Intestine, Helpful Residents or Enemies from Within? *Infect. Immun.* 76: 3360–3373.
- Carpender C.F. and N. Gilpin. 2014. Cholecystitis. Johns Hopkins Medicine. [http://www.hopkinsguides.com/hopkins/ub/view/Johns\\_Hopkins\\_ABX\\_Guide/540122/all/Cholecystitis](http://www.hopkinsguides.com/hopkins/ub/view/Johns_Hopkins_ABX_Guide/540122/all/Cholecystitis), 2014.11.17.
- Chang S.C., C.T. Fang, P.R. Hsueh, Y.C. Chen and K.T. Luh. 2000. *Klebsiella pneumoniae* isolates causing liver abscess in Taiwan. *Diagn. Microbiol. Infect. Dis.* 37: 279–284.
- Chowdhury R., G.K. Sahu and J. Das. 1996. Stress response in pathogenic bacteria. *J. Biosci.* 21: 149–160.
- Delgado G., V. Souza, R. Morales, R. Cerritos, A. Gonzalez-Gonzalez, J.L. Mendez, V. Vázquez and A. Cravioto. 2013. Genetic characterization of atypical *Citrobacter freundii*. *PLoS ONE* 8(9): e74120.
- Evangelopoulou G., S. Kritas, A. Govaris and A.R. Burriel. 2014a. Pork meat as a potential source of *Salmonella enterica* subsp. *arizonae* infection in humans. *J. Clin. Microbiol.* 52: 741–744.
- Evangelopoulou G., G. Filioussis, S. Kritas, G. Christodoulopoulos, L.A., Triantafyllou and A.R. Burriel. 2014b. Short Communication. Colonisation of pig gallbladders with *Salmonella* species important to public health. *Vet Rec.* 176 (7): 174.
- European Committee for Veterinary Medicinal Products. 1994. Chloramphenicol summary report. European Agency for the Evaluation of Medicinal Products (EMA). <http://www.emea.europa.eu/pdfs/vet/mrls/chloramphenicol.pdf>, 2014.11.17.
- Friendship R.M., A. Mouchili, S. McEwen and A. Rajic. 2009. Critical review of on-farm intervention strategies against *Salmonella*. <http://development.bpex.org.uk/downloads/298614/292327/Critical%20review%20of%20onfarm%20intervention%20strategies%20against%20Salmonella.pdf>, 2014.11.17.
- Frye F.G. and C.R. Jackson. 2013. Genetic mechanisms of antimicrobial resistance identified in *Salmonella enterica*, *Escherichia coli*, and *Enterococcus* spp. isolated from U.S. food animals. *Front. Microbiol.* 4: 135.
- Gunn J.S. 2000. Mechanisms of bacterial resistance and response to bile. *Microbes. Infect.* 2: 907–913.
- Healy B., S. Cooney, S. O'Brien, C. Iversen, P. Whyte, J. Nally, J.J. Callanan and S. Fanning. 2010. *Cronobacter (Enterobacter sakazakii)*: an opportunistic foodborne pathogen. *Foodborne Pathog Dis.* 7: 339–350.
- Iversen C., A. Lehner, N. Mullane, E. Bidlas, I. Cleenwerck, J. Marugg, S. Fanning, R. Stephan and H. Joosten. 2007. The taxonomy of *Enterobacter sakazakii*: proposal of a new genus *Cronobacter* gen. nov. and descriptions of *Cronobacter sakazakii* comb. nov., *Cronobacter sakazakii* subsp. *sakazakii*, comb. nov., *Cronobacter sakazakii* subsp. *malonicus* subsp. nov., *Cronobacter turicensis* sp. nov., *Cronobacter muytjensii* sp. nov., *Cronobacter dublinensis* sp. nov. and *Cronobacter* genomospecies . *BMC Evol. Biol.* 7: 64.
- Janda J.M. and S.L. Abbott. 2010. The genus *Aeromonas*: taxonomy, pathogenicity, and infection. *Clin. Microbiol. Rev.* 23: 35–73.
- Jensen P.O., M. Givskov, T. Bjarnsholt and C. Moser. 2010. The immune system vs. *Pseudomonas aeruginosa* biofilms. *FEMS Immunol. Med. Microbiol.* 59: 292–305.
- Joseph S. and S.J. Forsythe. 2011. Predominance of *Cronobacter sakazakii* sequence type 4 in neonatal infections. *Emerg. Infect. Dis.* 17: 1713–1715.
- Ljungh A., B. Wretling and R. Mollby. 1981. Separation and characterization of enterotoxin and two haemolysins from *Aeromonas hydrophila*. *Acta Pathogenica Microbiol. Scand. Sec. B.* 89: 387–397.
- McWhorter A.C., R.L. Haddock, F.A. Nocon, A.G. Steigerwalt, D.J. Brenner, S. Aleksic, J. Bockemuhl and J.J. 3rd Farmer. 1991. *Trabusiella guamensis*, a new genus and species of the family *Enterobacteriaceae* that resembles *Salmonella* subgroups 4 and 5. *J. Clin. Microbiol.* 29: 1480–1485.
- Nayar R., I. Shukla and A. Sultan. 2014. Epidemiology, Prevalence and identification of *Citrobacter* species in clinical specimens in a tertiary care hospital in India. *International Journal of Scientific and Research Publications*, Volume 4, Issue 4. <http://www.ijsrp.org/research-paper-0414/ijsrp-p2843.pdf>, 2014.11.17.
- Pepperell C., J.V. Kus, M.A. Gardam, A., Humar and L.L. Burrows. 2002. Low-virulence *Citrobacter* species encode resistance to multiple antimicrobials. *Antimicrob. Agents Chemother.* 46: 3555–3560.
- Queiroga M.C., A.S.P. Amaral and S.M. Branco. 2012. Short communication. Isolation of *Aeromonas hydrophila* in piglets. *Span. J. Agric. Res.* 10: 383–387.
- Quinn P.J., M.E. Carter, B. Markey and G.R. Carter. 1994. *Enterobacteriaceae*. In: *Clinical Veterinary Microbiology*, Mosby, St. Louis.
- Schwarz S., P. Silley, S. Simjee, N. Woodford, E. van Duijkeren, A.P. Johnson and W. Gaastra. 2010. Assessing the antimicrobial susceptibility of bacteria obtained from animals. *Vet. Microbiol.* 141: 1–4.
- Shailesh Y., G. Manoj and S. Virender. 2012. Superbug: Reality Or Fiction. *JARBS.* 4: 259–261.
- Sommer M.O.A. and G. Dantas. 2011. Antibiotics and the resistant microbiome. *Curr. Opin. Microbiol.* 14: 556–563.
- Thiolas A., C. Bollet, B. La Scola, D. Raoult and J.M. Pages. 2005. Successive emergence of *Enterobacter aerogenes* strains resistant to imipenem and colistin in a patient. *Antimicrob. Agents Chemother.* 49: 1354–1358.
- Wang A.J., T.E. Wang, C.C. Lin, S.C. Lin and S.C. Shih. 2003. Clinical predictors of severe gallbladder complications in acute acalculous cholecystitis. *World J. Gastroenterol.* 9: 2821–2823.

# The role of H<sub>2</sub>S in the recovery of *Salmonella* spp. from animals

G. Evangelopoulou (DVM, PhD Student)<sup>1</sup>, A.R. Burriel (DVM, MSc, MSc, PhD)<sup>1</sup>



<sup>1</sup>Laboratory of Microbiology and Parasitology, Faculty of Veterinary Medicine, University of Thessaly, Greece

## Introduction

- The ability of a microorganism to produce H<sub>2</sub>S is a detrimental taxonomic characteristic, with *Citrobacter*, *Proteus* and *Salmonella* being the major H<sub>2</sub>S-producing genera of the Enterobacteriaceae. H<sub>2</sub>S is a highly toxic compound to mammalian cells contributing, perhaps, to their ability to colonize tissues, playing a specific role in gastroenteritis and in the pathogenesis of ulcerative colitis. However, loss of H<sub>2</sub>S production may occur in environmental strains of *Salmonella* spp. due to mutations or it can be "masked" by acid production during sugar fermentation on typical diagnostic media.

## Materials and Methods

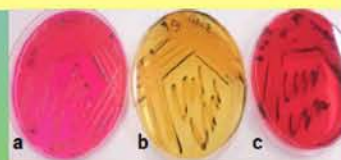
- Samples:** 615 samples, from a variety of pig carcass sites were examined using ISO 6579:2002, Annex D (ISO 2002).
- Culture media:** XLD agar (XLD Oxoid – England) and Salmonella Shigella agar (SS Merck - Germany) were used for isolating suspect colonies from MSRV (Biokar -France). Colonies suspected of being *Salmonella* spp. were subcultured on Columbia blood agar (CBA, Oxoid, England) for further examination with Gram stain, oxidase production test and utilization of Triple Sugar Iron Agar (TSI, Merck-Germany).
- Identification:** Suspect isolates were assigned to species using the API 20E (Biomérieux, France) and the Microgent™ GnA+B-ID (Microgen Bioproducts Ltd, UK) Systems.
- Serotyping:** Recognized *Salmonella* spp. isolates were tested with a polyvalent slide agglutination test (Remel Europe Ltd; Dartford, England) detecting O- and H- antigens and mailed for specific serotyping to the Greek National Reference Laboratory (GNRL).
- Lactose positive and H<sub>2</sub>S negative salmonellae (identified as above) and *E. coli* isolates** were cultured on SS and TSI media next to typical *Salmonella* isolates.

## Results

- Of the 59 serotyped *Salmonella* isolates five (5) were lactose positive and H<sub>2</sub>S negative when cultured on XLD, SS and TSI media.
- They were assigned to serovars: S.I.6,14,25:-:1,2 (1), *S. enterica* subsp. *houtenae* 40:g,t:- (1), *S. enterica* subsp. *salamae* (1) and S.I. 6,7:k:- (2).
- The above five (5) *Salmonella* spp. isolates and three (3) *E. coli* produced H<sub>2</sub>S when co-cultured with typical strong H<sub>2</sub>S - producing *Salmonella* isolates, after prolonged incubation (30h to 48h).



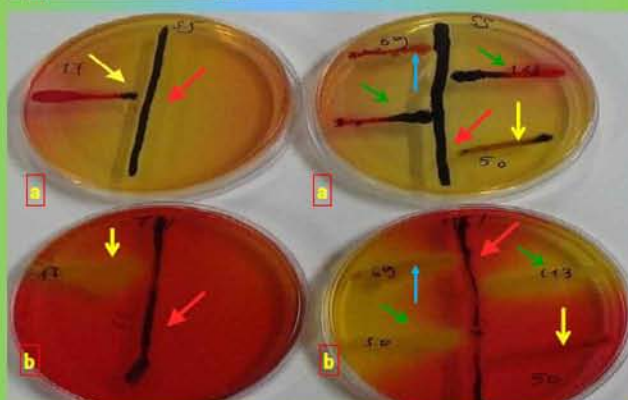
**Negative control (Strain 69):**  
*E. coli* H<sub>2</sub>S(-) isolate on TSI (a), SS (b) and XLD (c) media.



**Positive control (Strain 79):**  
Lactose negative -H<sub>2</sub>S(+) *Salmonella* isolate on XLD (a), SS (b) and TSI (c) media.



**Strain 17:**  
Lactose positive-H<sub>2</sub>S(-) *Salmonella* isolate on SS (a) and TSI (b) media.



Typical *Salmonella* isolate (strain 79) red arrows) on SS (a) and TSI (b) media co-cultured with: i) *Salmonella* H<sub>2</sub>S (-) (strains 17, 50) yellow arrows) and ii) *E. coli* (strains 30, 113) green arrows, negative control (blue arrows) after 36h incubation.

## Conclusions

- The observations indicate an increasing number of false negative results (present investigation ~ 8.5%), decreasing the recovery of *Salmonella* spp., if ISO recommendations are strictly followed.
- The presence of H<sub>2</sub>S-producing isolates in the gut may synergically reactivate the "masked" ability of H<sub>2</sub>S production of non- H<sub>2</sub>S producing *Salmonella* spp. and that of the abundant in the gut *E. coli*.
- This may result in an increased exposure of the colonic mucosa to H<sub>2</sub>S, causing, perhaps, local tissue damage, if cecal mucosa fails to detoxify it.

## References

- Barrett EL and Clark MA. 1987. Tetrathionate Reduction and Production of Hydrogen Sulfide from Thiosulfate. *Microbiological Reviews*, 51: 192-205.
- Bulmash, J.M., Fulton, M., Jiran, J. 1965. Lactose and sulfide reactions of an aberrant *Salmonella* strain. *J. Bacteriol.* 89:259.
- Levitt MD, Furne J, Springfield J, Suarez F, DeMaster E. 1999. Detoxification of hydrogen sulfide and methanethiol in the cecal mucosa. *J. Clin. Invest.* 104:1107-1114.
- Sakano C, Kuroda M, Sekizuka T, Ishioka T, Morita Y, Ryo A, Tsukagoshi H, Kawai Y, Inoue N, Takada H, Ogaswara Y, Nishina A, Shimoda MA, Kozawa K, Oishi K, Kimura H. 2013. Genetic analysis of non-hydrogen sulfide-producing *Salmonella enterica* serovar Typhimurium and *S. enterica* serovar Infantis isolates in Japan. *J. Clin. Microbiol.* 51:328-330.



**Presence of emerging *Salmonella* spp. serovars in pig farms: a risk to public health**

Journal:	<i>Journal of Agromedicine</i>
Manuscript ID:	WAGR-2015-0039
Manuscript Type:	Original Research
Keywords:	pig, salmonellosis, slaughterhouse, tissue

SCHOLARONE™  
Manuscripts

View Only



1  
2  
3 **1 Presence of emerging *Salmonella* spp. serovars in pig farms: a risk to public health**

4  
5  
6 2

7 **3 Abstract**

8  
9  
10 4 The protection of consumers from emerging *Salmonella* spp. serovars depends on  
11 surveillance and control of the pathogen in food producing animals. Among them, the pig holds  
12 the second place for emerging *Salmonella* spp. serovars pathogenic to consumers. Thus, a  
13 microbiological investigation of pig salmonellosis was undertaken in Greece using samples from  
14 multiple carcass sites and aiming at the identification of prevalent serovars. For this purpose 492  
15 tissue samples and 378 environmental swab samples were cultured following ISO 6579:2002.  
16  
17  
18  
19  
20  
21  
22  
23  
24  
25  
26  
27  
28  
29  
30  
31  
32  
33  
34  
35  
36  
37  
38  
39  
40  
41  
42  
43  
44  
45  
46  
47  
48  
49  
50  
51  
52  
53  
54  
55  
56  
57  
58  
59  
60

10 Twelve different serovars were identified from faeces and tissue samples and two from the  
11 environmental samples, representing a total of 79 isolates. Among the identified serovars were the  
12 emerging serovars of monophasic Typhimurium, *S. enterica* subsp. *enterica* ser. 4,5, 12:i:- (16  
13 isolates) and *S. enterica* subsp. *enterica* ser. 4,12:i:- (7 isolates), the monophasic *S. enterica* subsp.  
14 *enterica* ser. 6,7:k:- (6 isolates) and the rarer serovars of subspecies *enterica* subsp. *diarizonae*  
15 61:k:1,5, and *S. enterica* subsp. *houtenae* 40:g,t:- (one isolate each). Of the remaining serovars, 37  
16 were serovar Typhimurium and six various other serovars (*S. Bredeney* (2 isolates), *S. Agona*, *S.*  
17 *Derby*, *S. Infantis*, *S. Meleagridis*, *S. Cerro*), while four were untypeable. Although serovar  
18 Typhimurium was the most prevalent (37), the remaining could be considered of emerging public  
19 health importance, due to pork contamination. Thus, the pig appears in Greece as a source of  
20 human salmonellosis caused not only by commonly reported serovars, but also of rarer ones.

21 **Keywords:** pig; salmonellosis; slaughterhouse; tissue

22

1

URL: <http://mc.manuscriptcentral.com/wagr> Email: [heiberger.scott@mcrf.mfidclin.edu](mailto:heiberger.scott@mcrf.mfidclin.edu)

1  
2  
3  
4  
5  
6  
7  
8  
9  
10  
11  
12  
13  
14  
15  
16  
17  
18  
19  
20  
21  
22  
23  
24  
25  
26  
27  
28  
29  
30  
31  
32  
33  
34  
35  
36  
37  
38  
39  
40  
41  
42  
43  
44  
45  
46  
47  
48  
49  
50  
51  
52  
53  
54  
55  
56  
57  
58  
59  
60

## 23 Introduction

24 *Salmonella* spp. are the commonest cause of foodborne enteric disease in man and the  
25 second most frequently reported zoonotic agent in the EU.<sup>1</sup> Across EU 10-20% of human  
26 infections<sup>2</sup> are contributed to the consumption of pork products, although this contribution in some  
27 states is estimated above 56%.<sup>3</sup>

28 Thus, control of pig salmonellosis, affecting positively human infections, is the objective of  
29 the pig industry. Pigs usually get infected through the faecal-oral route, hence carrier animals (pigs  
30 or others) entering the premises. After infection of the host, the pathogen initially colonizes the  
31 intestine and eventually the gut-associated lymphoid tissue and other organs of the digestive tract.  
32 From these sites it is intermittently excreted into the gut and eventually the animal's  
33 environment.<sup>4,5</sup> In these events, important role play the lymph follicles of the ileum wall<sup>6,7</sup>. The  
34 Peyer's patches, mostly located in the ileum<sup>8</sup> serve as the main source of *Salmonella* serovars  
35 infecting other organs of the host, such as the lymph nodes and the gallbladder.<sup>9</sup> Colonization of  
36 the mesenteric lymph nodes and gallbladder epithelium may result to the survival of various  
37 highly infective serovars, although the infected pigs usually remain asymptomatic.<sup>10,11</sup>

38 Subclinically *Salmonella* infected pigs are only confirmed as carriers after multisite  
39 carcass sampling and microbiological examination. Hence, they are a potential source of infection  
40 for other animals and humans. Furthermore, they are incriminated in the development of an  
41 endemic 'house flora' of *Salmonella* within the slaughterhouse contaminating carcasses.<sup>12-15</sup> A  
42 strong correlation is found between the proportion of animals with *Salmonella* spp. in their faeces  
43 and contamination of carcasses. Reports estimate that 70% of carriers are responsible of their own  
44 carcass contamination, while a 15 to 30% of contamination results from contaminated equipment,  
45 such as the carcass splitter, or by the manual handling of carcasses.<sup>12,16</sup> Contaminated  
46 slaughterhouse equipment is reported as more important to carcass contamination than their  
47 handlers, due to bacterial growth during the day inside or on the surface of equipment.<sup>17</sup> If such

2

URL: <http://mc.manuscriptcentral.com/wagr> Email: [heiberger.scott@mcrf.mfldclin.edu](mailto:heiberger.scott@mcrf.mfldclin.edu)

1  
2  
3 48 bacteria are a public health risk, measures are taken for protecting consumers. Among these  
4  
5 49 measures is the minimization of positive animals entering the slaughterhouse.  
6

7 50 Therefore, the objectives of the present study were to identify the organs of slaughtered  
8  
9 51 pigs infected with *Salmonella* serovars, the serovars present in Greek swine farms and possibly  
10  
11 52 correlate these serovars with reported consumer serovars.  
12  
13

## 14 53

### 15 54 **Material and Methods**

#### 16 55 *Herd information and sample collection*

17  
18  
19  
20  
21  
22 56 A questionnaire designed to collect information on a number of factors considered  
23  
24 57 significant for the presence of *Salmonella* in pig farms<sup>18</sup> was answered by farm owners  
25  
26 58 participating in the study.  
27  
28

29  
30 59 Sampling of finishers from selected herds was possible with regular visits to two  
31  
32 60 slaughterhouses. Four hundred ninety two (492) tissue samples were collected from 123 randomly  
33  
34 61 selected pigs representing 15 farrow-to-finish herds, having 20 to 500 sows each. An estimated  
35  
36 62 5% of the fatteners (about 2500) slaughtered during the sampling period were microbiologically  
37  
38 63 examined. Tissue samples were collected after evisceration from the colon (intestinal content),  
39  
40 64 ileum (intestinal wall), mesenteric lymph nodes and muscle from the pigs' neck (site of carcass  
41  
42 65 drainage).  
43  
44

45  
46 66 Environmental samples were collected at the same time as above. In each sampling day  
47  
48 67 three sampling rounds were performed: one before slaughtering and two during carcass  
49  
50 68 processing. The samples collected were from the hands and knives of two skinners of the dirty  
51  
52 69 zone and three eviscerators of the clean zone and the carcass splitter. The knife blade was swabbed  
53  
54 70 from tip to base twice on both sides, as was also the blade from the splitter. Each swab sample of  
55  
56  
57  
58  
59  
60

3

URL: <http://mc.manuscriptcentral.com/wagr> Email: [heiberger.scott@mcrf.mfidclin.edu](mailto:heiberger.scott@mcrf.mfidclin.edu)



1  
2  
3  
4  
5  
6  
7  
8  
9  
10  
11  
12  
13  
14  
15  
16  
17  
18  
19  
20  
21  
22  
23  
24  
25  
26  
27  
28  
29  
30  
31  
32  
33  
34  
35  
36  
37  
38  
39  
40  
41  
42  
43  
44  
45  
46  
47  
48  
49  
50  
51  
52  
53  
54  
55  
56  
57  
58  
59  
60

71 the gloves was collected by swabbing the whole palmar surface of both hands. In total, 378  
72 environmental samples were collected.

73

74 *Isolation and serotyping of Salmonella spp.*

75 Isolations were attempted following the *Salmonella* ISO 6579:2002, Annex D for food and  
76 animal feeding stuffs.<sup>19</sup> The selection of choice laboratory media was *Salmonella*-*Shigella* agar  
77 (SS Merck- Germany). Thus, three selective media were included. Suspect colonies on these  
78 media were subcultured on Columbia blood agar (Oxoid, England). They were examined with  
79 Gram stain and if they were Gram negative rods, they were tested for oxidase production and the  
80 utilization of Triple Sugar Iron Agar (Merck- Germany). They were subsequently assigned to  
81 species using the API 20E (Biomérieux, France) and the Microgen™ GnA+B-ID (Microgen  
82 Bioproducts Ltd, UK) Systems suitable for Gram (-) bacteria. The isolates identified as  
83 *Salmonella* spp. were further tested, with a polyvalent slide agglutination test (Remel Europe Ltd;  
84 Dartford, England) detecting O- and H- antigens. If they were positive, they were sent to the  
85 Greek National Reference Laboratory (GNRL) for specific serotyping.

86

## 87 Results

88 *Prevalence of Salmonella and herd conditions*

89 Only 3 (20%) of the 15 herds examined were culture negative in all four sites of tissue  
90 samples. They were small herds having about 40 sows each and not reporting a recent entrance of  
91 replacement animals. Their owners did not report prophylactic use of antimicrobial agents, but  
92 they reported whitewashing between batches in addition to common cleaning and disinfection  
93 procedures. Herds above 100 sows, purchasing replacement animals and using antimicrobials for  
94 prophylactic purposes had slaughtered animals infected in one or more carcass sites. One of them

4

URL: <http://mc.manuscriptcentral.com/wagr> Email: [heilberger.scott@mcrf.mfidclin.edu](mailto:heilberger.scott@mcrf.mfidclin.edu)

1  
2  
3 95 used also acidifiers in weaners' feed, as a preventing measure for *Salmonella* infections. In total,  
4  
5 96 39 (31.7%) pigs of the 123 sampled were found *Salmonella* positive, but only nine (23%) had  
6  
7 97 more than one tissue sample positive. Specifically, 18 (46.15%) had a positive ileum, 17 (43.6%)  
8  
9 98 had infected mesenteric lymph nodes, 11 (28.2%) had positive faecal samples, and 6 (15.38%) had  
10  
11 99 positive neck muscle (Table 1). The last were all from pigs having at least one more positive  
12  
13 100 tissue. Twenty seven (7.4%) of the 378 environmental samples were found positive. Positive  
14  
15 101 samples derived from multiple samplings of the non-disposable gloves of one of the skimmers.  
16  
17  
18  
19  
20

#### 21 103 *Serovars identified*

22  
23 104 A total of 79 isolates (52 from tissue and 27 from the environment) were identified as  
24  
25 105 *Salmonella* spp. by the API, Microgen systems and the polyvalent slide agglutination test and they  
26  
27 106 were sent to the GNRL for further serotyping. Of the 39 positive pigs, one was infected with two  
28  
29 107 different serovars from two different sampling sites. Twelve different *Salmonella* spp. serovars  
30  
31 108 were identified. They were *S. Typhimurium* (20 isolates), the monophasic *S. enterica* subsp.  
32  
33 109 *enterica* ser. 4,12:i:- (7 isolates), *S. enterica* subsp. *enterica* ser. 4,5, 12:i:- (6 isolates), *S. enterica*  
34  
35 110 subsp. *enterica*. 6,7:k:- (6 isolates), serovars *S. Bredeney* (2 isolates) and one each *S. Agona*, *S.*  
36  
37 111 *Derby*, *S. Infantis*, *S. Meleagridis*, *S. Cerro*, *S. enterica* subsp. *diarizonae* 61:k:1,5, and *S. enterica*  
38  
39 112 subsp. *houtenae* 40:g,t:-. Four isolates were not serotyped and registered as 'rough strains'.  
40  
41  
42

43 113 The twenty seven serovars of the positive environmental samples were *S. Typhimurium*  
44  
45 114 (17 isolates) and the monophasic *S. enterica* subsp. *enterica* ser. 4,5,12:i:- (10 isolates). They were  
46  
47 115 isolated repeatedly from the same non-disposable gloves of one skinner, at all sampling dates.  
48  
49  
50

#### 51 117 **Discussion**

52  
53 118 The present investigation in Greece is evidence of *Salmonella* serovars spreading in the  
54  
55 119 EU, most possibly through life animal and feed stuff trading. Perhaps, free trade is an important  
56  
57  
58  
59  
60

1  
2  
3  
4  
5  
6  
7  
8  
9  
10  
11  
12  
13  
14  
15  
16  
17  
18  
19  
20  
21  
22  
23  
24  
25  
26  
27  
28  
29  
30  
31  
32  
33  
34  
35  
36  
37  
38  
39  
40  
41  
42  
43  
44  
45  
46  
47  
48  
49  
50  
51  
52  
53  
54  
55  
56  
57  
58  
59  
60

120 reason for the observed large range of identified serovars (12 different serovars) among pigs in  
121 Greek farms mostly receiving its replacement stock from EU breeders.<sup>20</sup> The identified serovars  
122 belong to three of the six recognized *Salmonella* subspecies. This variability has not been reported  
123 previously from Greek pig farms.<sup>21,22</sup> Evidently *Salmonella* serovar population in Greece is  
124 changing due to live pigs entering herds from a variety of community sources and spreading to  
125 pork consumers across EU. This is, perhaps, the reason that although the most prevalent serovar  
126 was Typhimurium (Table 1), recognized in EU as one of the serovars frequently associated with  
127 human and pig salmonellosis,<sup>23</sup> a similar number were emerging serovars not reported previously  
128 from Greek swine farms.<sup>21</sup>

129  
130 Among the emerging serovars were monophasic variants of *S. Typhimurium*, *S. enterica*  
131 ser. 4,5,12:i:- and *S. enterica* ser. 4,12:i:-, found here to be the second most prevalent serovars  
132 (Table 1). These variants have recently increased in prevalence among consumers, replacing  
133 gradually other important serovars associated to swine and pork.<sup>24-27,49</sup> Interestingly, these variants  
134 were not isolated from faeces in the present study due, perhaps, to their adaptation to the tissue of  
135 other digestive tract organs, such as the gallbladder<sup>9</sup> and lymph nodes. At such organs, they  
136 remain dormant until stressful factors cause their multiplication and subsequent gut and  
137 environmental contamination putting at risk other animals and eventually consumers. Such  
138 adaptation could be also responsible for the increased reporting of these variants from animals  
139 only recently, coinciding with carcass multisite sampling rather than just faeces and environmental  
140 sampling. The increased frequency of their isolation from human cases in different countries is,  
141 perhaps, a result of this adaptation.<sup>28-30</sup> Hence, consumers are infected through meat harboring the  
142 pathogen in lymphatic tissue, rather than been contaminated during e.g. slaughtering. This was  
143 evident from the positive neck muscle tissue deriving only from animals having at least one more  
144 positive site.



1  
2  
3  
4  
5  
6  
7  
8  
9  
10  
11  
12  
13  
14  
15  
16  
17  
18  
19  
20  
21  
22  
23  
24  
25  
26  
27  
28  
29  
30  
31  
32  
33  
34  
35  
36  
37  
38  
39  
40  
41  
42  
43  
44  
45  
46  
47  
48  
49  
50  
51  
52  
53  
54  
55  
56  
57  
58  
59  
60

145 Monophasic *S. Typhimurium* or “*S. Typhimurium*-like” variants are currently in the fourth  
146 place among important serovars reported from man, second from live pigs and the third from pig  
147 meat. They have also been isolated from a number of other animal species, such as poultry, cattle,  
148 turtles and food products, such as dried pork sausages.<sup>29,31-32</sup> They show very high molecular  
149 relatedness to the ‘classic’ *S. Typhimurium*, a reason for possible misclassifications without  
150 studies of molecular relatedness. Thus, molecular relatedness, in respect to pathogenicity genes,  
151 could not only help in avoiding misclassifications, but it could also change the epidemiological  
152 importance of newly emerging serovars from animals and consumers.<sup>30, 33-34</sup>

153 In addition, rarer serovars and subspecies, such as *S. enterica* 6,7:k:- and *S. enterica* subsp.  
154 *diarizonae* 61:k:1,5 were also identified in the present investigation. The source of subspecies  
155 *diarizonae* isolated from man is thought to be reptiles keeping them as pets,<sup>35</sup> but it was also  
156 isolated here. It has also been recently reported as able to colonize sheep’s, nasal mucosa.<sup>36</sup> Its  
157 isolation from pigs could indicate an emerging serovar for pork consumers, as could also be  
158 subspecies *S. enterica* subsp. *houtenae*, reported, like the previous one, from exotic reptiles,<sup>37</sup>  
159 raptors<sup>38</sup> and human infections considered reptile-associated.<sup>39</sup> Such hosts in the environment  
160 pass their strains to food producing animals and they to consumers. Thus, physicians treating  
161 *Salmonella* cases caused by such exotic serovars, including those of subspecies *arizonae* and  
162 *salamae* also found among Greek pigs,<sup>9,40</sup> should include pork in the possible sources of newly  
163 emerging exotic serovars or rarer subspecies.

164 The four isolates (5%) characterized during serotyping as ‘rough’, were considered isolates  
165 which had changed their surface antigens, thus were untypeable serologically. Such strains have  
166 developed surface mechanisms to evade host immune response and they are masking their ‘O’  
167 antigens.<sup>41</sup> Nevertheless, since all *Salmonella* serovars are considered potentially pathogenic for  
168 humans, regardless of the degree of host adaptation,<sup>42</sup> the current observed wide distribution of

7

URL: <http://mc.manuscriptcentral.com/wagr> Email: [heilberger.scott@mcrf.mfidclin.edu](mailto:heilberger.scott@mcrf.mfidclin.edu)

1  
2  
3  
4  
5  
6  
7  
8  
9  
10  
11  
12  
13  
14  
15  
16  
17  
18  
19  
20  
21  
22  
23  
24  
25  
26  
27  
28  
29  
30  
31  
32  
33  
34  
35  
36  
37  
38  
39  
40  
41  
42  
43  
44  
45  
46  
47  
48  
49  
50  
51  
52  
53  
54  
55  
56  
57  
58  
59  
60

169 serovars implicates pigs to consumer infections not only by commonly recognized serovars, but  
170 also by a variety of rare ones.

171

172        Infesting *Salmonella* spp. serovars, subclinically persisting in the tissue of pigs,<sup>4</sup> make  
173 swine a source of infection for other animals, carcasses and the slaughter house environment,  
174 eventually reaching pork consumers.<sup>12,43</sup> These epidemiological events are similar between  
175 prevalent or not serovars, but the last will take longer before their isolation frequency increases  
176 among consumers. Thus, such rare serovars infecting pigs should be considered "emerging" for  
177 Public Health and recorded as such, rather than reported as "exotic". In addition, rare isolation of  
178 such serovars from food producing animals and consumers could be associated to samples  
179 investigated. Faeces samples are those routinely used for confirming a positive clinical or  
180 subclinical case in humans and many animal species. However, as it is evident from Table 1, only  
181 11 (21.1%) of the 52 isolates derived from faeces. As previously reported<sup>44,45</sup> the best sites for  
182 confirming infection are the ileum and mesenteric lymph nodes. The same was observed here (18  
183 and 17 respectively), where only nine animals were positive to more than one site and multiple-  
184 site carcass sampling was needed for reliable results on serovar prevalence. Multiple site sampling  
185 could also reveal information on different serovars infecting the same host. This is rarely  
186 reported<sup>46</sup> and was observed with only one animal in the present investigation. Perhaps, this either  
187 rarely happens or the serotyping procedure is limited, due to costs, to only phenotypically different  
188 isolates. This observation and the low faeces' isolations of *Salmonella* are showing that only  
189 rarely faeces reflect tissue infection as to causative serovars. Thus, one could conclude that  
190 investigations of human salmonellosis using faeces as samples to define the causative serovar are  
191 failing to fully explain the cause of a clinical case.

192        Furthermore, colonization of lymphatic tissue increases the risk to meat consumers, if  
193 cooking or handling does not eliminate the pathogen. This increased risk from lymphatic tissue

8

URL: <http://mc.manuscriptcentral.com/wagr> Email: [heiberger.scott@mcrf.mfldclin.edu](mailto:heiberger.scott@mcrf.mfldclin.edu)

1  
2  
3  
4  
5  
6  
7  
8  
9  
10  
11  
12  
13  
14  
15  
16  
17  
18  
19  
20  
21  
22  
23  
24  
25  
26  
27  
28  
29  
30  
31  
32  
33  
34  
35  
36  
37  
38  
39  
40  
41  
42  
43  
44  
45  
46  
47  
48  
49  
50  
51  
52  
53  
54  
55  
56  
57  
58  
59  
60

194 colonization rather than carcass contamination during handling was evident in the present  
195 investigation through the examined meat and environmental samples. Only six (6) of the muscle  
196 neck samples (site of carcass drainage) were positive to *Salmonella* and of them only two had  
197 *Salmonella* in their faeces, but all derived from animals with another positive site.

198 As for the environmental samples considered evidence of possible slaughterhouse carcass  
199 contamination, the present investigation does not confirm other studies (Limpitakis et al 1997;  
200 Swanenburg 2001b)<sup>47,48</sup>. Specifically, *Salmonella* was repeatedly isolated from only the non –  
201 disposable gloves of one of the skimmers. Thus, hygiene measures were largely effective in the  
202 examined facilities, with the exemption of these gloves. This type of gloves should be changed  
203 between handlings and meticulously cleaned. The serovars identified were Typhimurium and *S.*  
204 *enterica* subsp *enterica* ser 4,5,12:i-, both potential consumer pathogens, if passed to carcasses.  
205 Although the worker was not handling carcasses, he was part of the “house flora”, which could  
206 contaminate carcasses, if HACCP procedures fail due to workers’ negligence.

207 From the above one concludes that the pig, thus pork meat, is a potential source of, not  
208 only serovars accepted as commonly pathogenic to consumers, but also of other rarer serovars and  
209 subspecies. These, colonizing the lymphatics of subclinically infected pigs, could eventually infect  
210 multiple consumers, if meat cooking and handling methods fail to protect them.

211 In addition, the present evidence showed that strict HACCP control effectively controls the  
212 building up of “house flora” having microbes pathogenic to consumers.

213

9

URL: <http://mc.manuscriptcentral.com/wagr> Email: [heiberger.scott@mcrf.mfidclin.edu](mailto:heiberger.scott@mcrf.mfidclin.edu)



1  
2  
3  
4  
5  
6  
7  
8  
9  
10  
11  
12  
13  
14  
15  
16  
17  
18  
19  
20  
21  
22  
23  
24  
25  
26  
27  
28  
29  
30  
31  
32  
33  
34  
35  
36  
37  
38  
39  
40  
41  
42  
43  
44  
45  
46  
47  
48  
49  
50  
51  
52  
53  
54  
55  
56  
57  
58  
59  
60

## 214 References

- 215 1. EFSA, European Food Safety Authority. The Community Summary Report on Trends and  
216 Sources of Zoonoses, Zoonotic Agents and Food-Borne Outbreaks in the European Union in 2008.  
217 *EFSA Journal* 2010; (1)1496: 23-25.
- 218 2. EFSA, European Food Safety Authority. EFSA assesses risk of *Salmonella* from pig meat.  
219 Press Release. <http://www.efsa.europa.eu/en/press/news/biohaz100419.htm> (accessed 4 February  
220 2015).
- 221 3. EFSA, European Food Safety Authority. EFSA Panel on Biological Hazards (BIOHAZ).  
222 Scientific Opinion on an estimation of the public health impact of setting a new target for the  
223 reduction of *Salmonella* in turkeys. *EFSA Journal* 2012; 10(4):2616: 1-89.
- 224 4. Wood RL, Pospischil A, Rose R. Distribution of persistent *Salmonella* Typhimurium infection  
225 in internal organs of swine. *Am J Vet Res.* 1989;50: 1015–1021.
- 226 5. Fedorka-Cray PJ, Gray JT, Wray C. *Salmonella* infections in pigs. In: Wray C, Wray, A,  
227 editors. *Salmonella* in Domestic animals, CAB International, ISBN 0–85199–261–7, Wallingford;  
228 2000, p. 191-207.
- 229 6. Carter PB and Collins FM. The route of enteric infection in normal mice. *J Exp Med.* 1974;  
230 139: 1189–1203.
- 231 7. Hohmann AW, Schmidt G, Rowley D. Intestinal colonization and virulence of *Salmonella* in  
232 mice. *Infect Immun.* 1978; 22: 763–770.
- 233 8. Liebler-Tenorio EM, Pabst R. MALT structure and function in farm animals. *Vet Res.* 2006;  
234 37: 257–280.
- 235 9. Evangelopoulou G, Filioussis G, Kritas S, Christodoulopoulos G, Triantafillou LA, Burriel AR.  
236 Colonisation of pig gallbladders with *Salmonella* species important to public health. *Vet Rec.*  
237 2014 (online first), doi: 10.1136/vr.102822.

10

URL: <http://mc.manuscriptcentral.com/wagr> Email: [heiberger.scott@mcrf.mfldclin.edu](mailto:heiberger.scott@mcrf.mfldclin.edu)

- 1  
2  
3 238 10. Dlabac V, Trebichavsky I, Rehakova Z, Hofmanová B, Splichal I, Cukrowska B.  
4  
5 239 Pathogenicity and protective effect of rough mutants of *Salmonella* species in germ-free piglets.  
6  
7 240 Infect Immun. 1997; 65(12): 5238-5243.  
8  
9 241 11. Gonzalez-Escobedo G, Gunn S. Gallbladder Epithelium as a Niche for Chronic *Salmonella*  
10  
11 Carriage. Infect Immun. 2013; 81: 2920-2930.  
12  
13 242  
14 243 12. Berends BR, Van Knapen F, Snijders JM, Mossel DA. Identification and quantification of risk  
15  
16 244 factors regarding *Salmonella* spp. on pork carcasses. Intern J Food Microbiol. 1997; 36(2-3):199-  
17  
18 245 206.  
19  
20 246 13. Warriner K, Aldsworth TG, Kaur S, Dodd CE. Cross-contamination of carcasses and  
21  
22 247 equipment during pork processing. J Appl Microbiol. 2002; 93(1): 169-177.  
23  
24 248 14. Baptista FM, Dahl J, Nielsen LR. Factors influencing *Salmonella* carcass prevalence in Danish  
25  
26 249 pig abattoirs. Prev Vet Med. 2010; 95: 231-238.  
27  
28 250 15. Visscher CF, Klein G, Verspohl J, Beyerbach M, Stratmann-Selke J, Kamphues J.  
29  
30 251 Serodiversity and serological as well as cultural distribution of *Salmonella* on farms and in  
31  
32 252 abattoirs in Lower Saxony, Germany. Intern J Food Microbiol. 2011; 146: 44-51.  
33  
34 253 16. Swanenburg M, Berends BR, Urlings HAP, Snijders JMA, van Knapen F. Epidemiological  
35  
36 254 investigations into the sources of *Salmonella* contamination of pork. Berl Muench Tieraerztl 2001;  
37  
38 255 114: 356-359.  
39  
40 256 17. Hald T, Wingstrand A, Swanenburg M, Von Altrock A, Thorberg BM. The occurrence and  
41  
42 257 epidemiology of *Salmonella* in European pig slaughterhouses. Epidemiol Infect. 2003;  
43  
44 258 131(3):1187-1203, 2003.  
45  
46 259 18. Smith RP, Clough HE, Cook AJ. Analysis of Meat Juice ELISA Results and Questionnaire  
47  
48 260 Data to Investigate Farm-Level Risk Factors for *Salmonella* Infection in UK Pigs. Zoonoses  
49  
50 261 Public Health 2010; 57 (Suppl. 1) 39-48.  
51  
52  
53  
54  
55  
56  
57  
58  
59  
60

1  
2  
3  
4  
5  
6  
7  
8  
9  
10  
11  
12  
13  
14  
15  
16  
17  
18  
19  
20  
21  
22  
23  
24  
25  
26  
27  
28  
29  
30  
31  
32  
33  
34  
35  
36  
37  
38  
39  
40  
41  
42  
43  
44  
45  
46  
47  
48  
49  
50  
51  
52  
53  
54  
55  
56  
57  
58  
59  
60

- 262 19. International Organization for Standardization (ISO). Microbiology of food and animal  
263 feeding stuff—horizontal method for the detection of *Salmonella*. ISO 6579. Geneva, Switzerland:  
264 International Organization for Standardization; 2002.
- 265 20. Lo Fo Wong DM, Dahl J, Stege H, van der Wolf PJ, Leontides L, von Altröck A, Thorberg  
266 BM. Herd-level risk factors for subclinical *Salmonella* infection in European finishing-pig herds.  
267 *Prev Vet Med*. 2004; 16, 253-66.
- 268 21. Grafanakis E, Leontides L, Genigeorgis C. Seroprevalence and antibiotic sensitivity of  
269 serotypes of *Salmonella enterica* in Greek pig herds. *Vet Rec*. 2001; 148,407-411.
- 270 22. Filioussis G, Petridou E, Johansson A, Christodoulopoulos G, Kritas SK. Antimicrobial  
271 susceptibility and genetic relatedness of *Salmonella enterica* subsp. *enterica* serovar Mbandaka  
272 strains, isolated from a swine finishing farm in Greece. *Afr J Microbiol Res*. 2008; 2 (11), 313-  
273 315.
- 274 23. Pires SM, de Knecht L, Hald T. SCIENTIFIC / TECHNICAL REPORT submitted to EFSA:  
275 Estimation of the relative contribution of different food and animal sources to human *Salmonella*  
276 infections in the European Union. National Food Institute. 2011. Technical University of  
277 Denmark.
- 278 24. CDC, Centers for Disease Control and Prevention. Investigation of outbreak of human  
279 infections caused by *Salmonella* serotype I 4,[5],12:i:\_. Centers for Disease Control and  
280 Prevention 2007. Atlanta, GA. (Available at: <http://www.cdc.gov/salmonella>  
281 /4512eyeminus.html)(Accessed at 17 Apr 2014).
- 282 25. EFSA, European Food Safety Authority. Scientific opinion on monitoring and assessment of  
283 the public health risk of "*Salmonella* Typhimurium-like" strains. *EFSA Journal*. 2010; 8(10), 1-48  
284 1826.

12

URL: <http://mc.manuscriptcentral.com/wagr> Email: [heiberger.scott@mcrf.mfidclin.edu](mailto:heiberger.scott@mcrf.mfidclin.edu)



- 1  
2  
3 285 26. EFSA, European Food Safety Authority. SCIENTIFIC REPORT OF EFSA AND ECDC. The  
4  
5 286 European Union Summary Report on Trends and Sources of Zoonoses, Zoonotic Agents and  
6  
7 287 Food-borne Outbreaks in 2011. EFSA Journal 2013; 11(4): 3129.  
8  
9  
10 288 27. Hopkins KL, Kirchner M, Guerra B, Granier SA, Lucarelli C, Porrero MC, et al. Multiresistant  
11  
12 289 *Salmonella enterica* serovar 4,[5],12:i:- in Europe: a new pandemic strain? Euro Surveill 2010;  
13  
14 290 15(22), 19580.  
15  
16 291 28. Moreno Switt AI, Soyer Y, Warnick LD, Wiedmann M. Emergence, Distribution, and  
17  
18 292 Molecular and Phenotypic Characteristics of *Salmonella enterica* Serotype 4,5,12:i:- Foodborne  
19  
20 293 Pathog Dis 2009; 6(4):407-415.  
21  
22  
23 294 29. Bone A, Noel H, Le Hello S, Pihier N, Danan C, Raguenaud ME, et al. Nationwide outbreak  
24  
25 295 of *Salmonella enterica* serotype 4,12:i:- infections in France, linked to dried pork sausage. Euro  
26  
27 296 Surveill 2010;15(24):pii=19592. Available at: [http://www.](http://www.eurosurveillance.org/ViewArticle.aspx?ArticleId=19592)  
28  
29 297 [eurosurveillance.org/ViewArticle.aspx?ArticleId=19592](http://www.eurosurveillance.org/ViewArticle.aspx?ArticleId=19592). (Accessed at 17 Apr 2014).  
30  
31  
32 298 30. Hauser E, Tietze E, Helmuth R, Junker E, Blank K, Prager R, et al. Pork Contaminated with  
33  
34 299 *Salmonella enterica* Serovar 4,[5],12:i:-, an Emerging Health Risk for Humans. App Environ  
35  
36 300 Microbiol 2010; 76(14): 4601–4610.  
37  
38  
39 301 31. EFSA Panel on Biological Hazards (BIOHAZ). Scientific Opinion on monitoring and  
40  
41 302 assessment of the public health risk of “*Salmonella* Typhimurium-like” strains. EFSA Journal  
42  
43 303 2010; 8(10):1826.  
44  
45 304 32. EFSA (European Food Safety Authority) and ECDC (European Centre for Disease Prevention  
46  
47 305 and Control). The European Union Summary Report on antimicrobial resistance in zoonotic and  
48  
49 306 indicator bacteria from humans, animals and food in 2011. EFSA Journal 2013; 11(5):3196, 359  
50  
51 307 pp. DOI:10.2903/j.efsa.2013.3196.  
52  
53  
54 308 33. Soyer Y, Moreno Switt A, Davis MA, Maurer J, McDonough PL, Schoonmaker-Bopp DJ,  
55  
56 309 Dumas NB, Root T, Warnick LD, Grohn YT, Wiedmann M. *Salmonella enterica* Serotype  
57  
58  
59  
60

1  
2  
3  
4  
5  
6  
7  
8  
9  
10  
11  
12  
13  
14  
15  
16  
17  
18  
19  
20  
21  
22  
23  
24  
25  
26  
27  
28  
29  
30  
31  
32  
33  
34  
35  
36  
37  
38  
39  
40  
41  
42  
43  
44  
45  
46  
47  
48  
49  
50  
51  
52  
53  
54  
55  
56  
57  
58  
59  
60

- 310 4,5,12:i:-, an Emerging *Salmonella* Serotype That Represents Multiple Distinct Clones. *J Clin*  
311 *Microbiol.* 2009; 47:3546–3556.
- 312 34. Bugarel M, Vignaud ML, Moury F, Fach P, Brisabois A. Molecular identification in  
313 monophasic and nonmotile variants of *Salmonella enterica* serovar Typhimurium. *Microbiology*  
314 *Open* 2012; 1(4): 481–489 doi: 10.1002/mbo3.39.
- 315 35. Schröter M, Roggentin P, Hofmann J, Speicher A, Laufs R, Mack D. Pet snakes as a reservoir  
316 for *Salmonella enterica* subsp. *diarizonae* (Serogroup IIIb): a prospective study. *Appl Environ*  
317 *Microbiol* 2004; 70: 613–615.
- 318 36. Lacasta D, Ferrer LM, Ramos JJ, Bueso JP, Borobia M, Ruiz de Arcaute M, et al. Chronic  
319 Proliferative Rhinitis associated with *Salmonella enterica* subspecies *diarizonae* serovar 61:k:1, 5,  
320 (7) in Sheep in Spain. *J Comp Path* 2012; 147, 406e409.
- 321 37. Bauwens L, Vercauteren F, Bertrand S, Collard JM, De Ceuster S. Isolation of *Salmonella*  
322 from environmental samples collected in the reptile department of Antwerp Zoo using different  
323 selective methods. *J Appl Microbiol.* 2006;101:284–289.
- 324 38. Millán J, Aduriz G, Moreno B, Juste RA, Barral M. *Salmonella* isolates from wild birds and  
325 mammals in the Basque Country (Spain). *Revue Scientifique et Technique* 2004; 23:905–11.
- 326 39. Tabarani CM, Bennett NJ, Kiska DL, Riddell SW, Botash AS, Domachowske JB. Empyema  
327 of preexisting subdural hemorrhage caused by a rare *Salmonella* species after exposure to bearded  
328 dragons in a foster home. *J Pediatrics.* 2010; 156(2):322–3.
- 329 40. Evangelopoulou G, Kritas S, Govaris A, Burriel AR. Pork Meat as a Potential Source of  
330 *Salmonella enterica* subsp. *arizonae* Infection of Man. *J Clin Microbiol.* 2014; 52, 741-744.
- 331 41. Chandra M, Singh BR, Shankar H, Agarwal M, Agrawal RK, Sharma G, et al. Study on  
332 prevalence of *Salmonella* infection in goats. *Small Rum Res.* 2006; 65:24-30.
- 333 42. Evangelopoulou G, Kritas S, Govaris A, Burriel AR. Animal salmonellosis: A brief review of  
334 “Host Adaptation and Host Specificity” of *Salmonella* spp. *Vet World.* 2013; 6(10): 703-708.

14

URL: <http://mc.manuscriptcentral.com/wagr> Email: [heiberger.scott@mcrf.mfidclin.edu](mailto:heiberger.scott@mcrf.mfidclin.edu)

- 1  
2  
3 335 43. Vieira-Pinto, M., P. Temudo, and C. Martins. Occurrence of *Salmonella* in the Ileum, Ileocolic  
4  
5 336 Lymph Nodes, Tonsils, Mandibular Lymph Nodes and Carcasses of Pigs Slaughtered for  
6  
7 337 Consumption. *J Vet Med Series B*. 2005; 52, 476-481.  
8  
9 338 44. Gray JT, Fedorka-Cray PJ, Stabel TJ, Ackermann MR. Influence of inoculation route on the  
10  
11 339 carrier state of *Salmonella* Choleraesuis in swine. *Vet Microbiol*. 1995; 47, 43-59.  
12  
13 340 45. Bahnon PB, Kim JY, Weigel RM, Miller GY, Troutt HF. Associations between on-farm and  
14  
15 341 slaughter plant detection of *Salmonella* in market-weight pigs. *J Food Prot*. 2005; 68, 246-250.  
16  
17 342 46. Garrido V, Sánchez S, San Román B, Zabalza-Baranguá A, Díaz-Tendero Y, de Frutos C,  
18  
19 343 Mainar-Jaime RC, Grilló MJ. Simultaneous infections by different *Salmonella* strains in  
20  
21 344 mesenteric lymph nodes of finishing pigs. *BMC Vet Res*. 2014; 10:59.  
22  
23 345 <http://www.biomedcentral.com/1746-6148/10/59>. (accessed 4 Apr 2015).  
24  
25 346 47. Limpitakis N, Genigeorgis C, Abraham A, Leontides L, Grafanakis S, Iosifidou E. Post-harvest  
26  
27 347 epidemiology of *Salmonella enterica* in pork: Prevalence in the environment, carcasses and by-  
28  
29 348 products in two slaughterhouses in Greece (1996-1998). In: *Proceedings of the 3rd International*  
30  
31 349 *Symposium on Epidemiology and Control of Salmonella in Pork*, Washington, USA, 1999. pp.  
32  
33 350 141-150.  
34  
35 351 48. Swanenburg M, Urlings HAP, Snijders JMA, Keuzenkamp DA, Van Knapen F. *Salmonella* in  
36  
37 352 slaughter pigs: prevalence serotypes and critical control points during slaughter in two  
38  
39 353 slaughterhouses. *Int J Food Microbiol*. 2001; 70, 243-254.  
40  
41 354 49. Mandilara, G., Lambiri, M., Polemis, M., Passiotou, M., Vatopoulos, A. Phenotypic and  
42  
43 355 molecular characterisation of multiresistant monophasic *Salmonella* Typhimurium (1.4,[5],12:i:-)  
44  
45 356 in Greece, 2006 to 2011. *Euro Surveill* 2013; 18(22):pii=20496.  
46  
47  
48  
49  
50  
51  
52  
53  
54  
55  
56  
57  
58  
59  
60



Table 1

*Salmonella* serovars found at four different bacteriological sampling sites of finishers

Serovar	Feaces No	Ileum No	Lymph nodes No	Pig meat No	Total isolates per serovar
<b>S. Typhimurium</b>	6	7	2	5	20
<i>S. enterica</i> subsp. <i>enterica</i> ser. 4,5,12:i:-	-	5	0	1	6
<i>S. enterica</i> subsp. <i>enterica</i> ser. 4,12:i:-	-	2	5	-	7
<b>S. Bredeney</b>	-	-	2	-	2
<b>S. Agona</b>	-	-	1	-	1
<b>S. Derby</b>	-	1	-	-	1
<i>S. enterica</i> subsp. <i>enterica</i> . 6,7:k:-	2	-	4	-	6
<b>S. Infantis</b>	1	-	-	-	1
<b>S. Meleagridis</b>	1	-	-	-	1
<b>S. Cerro</b>	-	1	-	-	1
<i>S. enterica</i> subsp. <i>diarizonae</i> 61:k:1,5	1	-	-	-	1
<i>S. enterica</i> subsp. <i>houtenae</i> 40:g,t:-	-	-	1	-	1
<b>Rough</b>	-	2	2	-	4
<b>TOTAL</b>	11	18	17	6	52

URL: <http://mc.manuscriptcentral.com/wagr> Email: [heiberger.scott@mcrf.mfldclin.edu](mailto:heiberger.scott@mcrf.mfldclin.edu)

# **ΚΕΦΑΛΑΙΟ 4**

## **ΓΕΝΙΚΗ ΣΥΖΗΤΗΣΗ**

#### 4.1 Ορολογική διερεύνηση *Salmonella* spp. σε χοιρομητέρες και παχυνόμενους χοίρους

Οι μολύνσεις των χοίρων με *Salmonella* spp. είναι συνήθως υποκλινικές (Baggesen et al. 1996), καθιστώντας τους «σιωπηρές» δεξαμενές παθογόνων οροτύπων για τους καταναλωτές, μέσω της επιμόλυνσης των χοιρινών προϊόντων. Οι χοίροι, ασυμπτωματικοί φορείς της *Salmonella*, ως υποκλινικά μολυσμένα ζώα μπορεί να εισαχθούν σε μια εκτροφή, χωρίς να υποκινήσουν υποψίες, και να μολύνουν τα υγιή ζώα. Το παθογόνο διατηρείται στην εκτροφή με τις μολυσμένες χοιρομητέρες, οι οποίες παραμένουν στη χοιρομονάδα για μεγάλο χρονικό διάστημα, επιμολύνοντας το περιβάλλον και τα χοιρίδια. Οι Αρχές της ΕΕ αναγνωρίζοντας τη σημασία των μολυσμένων ζωικών προϊόντων για τη δημόσια υγεία εξέδωσαν τον Ευρωπαϊκό Κανονισμό ΕΚ 2160/2003, καθιστώντας τα κράτη-μέλη υπεύθυνα για τη θέσπιση αποτελεσματικών εθνικών προγραμμάτων ελέγχου εντός συγκεκριμένου χρονικού πλαισίου (Voss 2007).

Η υλοποίηση των Ευρωπαϊκών Κανονισμών απαιτεί, από κάθε κράτος, την ανάληψη μελέτης εκτίμησης του επιπολασμού της *Salmonella* στην εκτροφή, δηλαδή την πρόβλεψη του κινδύνου εισαγωγής μολυσμένων τροφίμων στην τροφική αλυσίδα (Ball et al. 2011). Ο στόχος αυτών των προγραμμάτων είναι, τελικά, η μείωση της οροθετικότητας στη *Salmonella* σε αποδεκτά επίπεδα στη ζώνη της ΕΕ. Προς το σκοπό αυτό η ορολογική μέθοδος ELISA έχει βρεθεί να έχει ικανοποιητική ευαισθησία και ειδικότητα (Nielsen et al. 1995, Chow et al. 2004), άρα αποτελεί ένα χρήσιμο εργαλείο καθορισμού του ποσοστού συχνότητας μόλυνσης μιας εκτροφής με *Salmonella*. Όμως, η εφαρμογή της απαιτεί τον καθορισμό των συνθηκών καλύτερης αποτελεσματικότητας.

Συνεπώς, λαμβάνοντας υπόψη τις δυσκολίες αποτελεσματικής εφαρμογής της ELISA για τον καθορισμό του επιπέδου μόλυνσης μιας εκτροφής, η μελέτη ξεκίνησε με,

1. την ορολογική διερεύνηση της *Salmonella* spp. σε εκτροφές τοκετού-τελικής πάχυνσης, αγνώστου επιπέδου μόλυνσης από το παθογόνο, σε χοιρομητέρες και χοίρους τελικής πάχυνσης και ακολούθησε

2. η οροδιερεύνηση και απομόνωση του παθογόνου σε χοίρους τελικής πάχυνσης κατά τη σφαγή, με σκοπό την αναζήτηση συσχετισμού των αποτελεσμάτων της ELISA και των απομονώσεων στο ίδιο ζώο.



Η πρώτη διερεύνηση ανίχνευσε οροθετικές χοιρομητέρες σε εκτροφές με οροθετικούς χοίρους τελικής πάχυνσης, ενδεικτικό εύρημα της πιθανής κάθετης μετάδοσης της μόλυνσης (Davies et al. 2000a), αν και θα μπορούσε να είναι και αποτέλεσμα της γενικευμένης εγκατάστασης της μόλυνσης σε αυτές τις εκτροφές. Ότι και να ισχύει, η έκθεση στη *Salmonella* ήταν προφανής και αποτελούσε κίνδυνο εισαγωγής της μόλυνσης σε κάθε νέα αγέλη παχυνόμενων χοιριδίων. Ιδιαίτερα ανησυχητικό ήταν το εύρημα της σχετικά υψηλής οροθετικότητας (59,35% των ζώων με cut off OD $\geq$  10%), που βρέθηκε υψηλότερη από παλαιότερη ευρωπαϊκή έρευνα, όπου η οροθετικότητα των ζώων τελικής πάχυνσης σε τέσσερις χώρες, συμπεριλαμβανομένης και της Ελλάδας, ήταν μεταξύ 9% έως 24% για την ίδια τιμή cut off (Lo fo Wong & Hald 2000). Αυτό το εύρημα θα μπορούσε να υποδηλώνει ακόμη και μια αύξηση της χρόνιας μόλυνσης από το παθογόνο στις κλινικές εκτροφές την τελευταία δεκαετία. Επειδή δε, η στατιστική ανάλυση της οροθετικότητας χοιρομητέρων και χοίρων τελικής πάχυνσης της παρούσας μελέτης έδειξε τον σημαντικό επιδημιολογικό ρόλο των χοιρομητέρων στη μόλυνση με *Salmonella* spp., η αυξημένη οροθετικότητα προφανώς οφείλεται στον αυξημένο αριθμό των πραγματικά θετικών χοιρομητέρων. Είναι γνωστό ότι, οι χοιρομητέρες, φορείς του παθογόνου για μεγάλα χρονικά διαστήματα, αποτελούν σημαντικό κίνδυνο διασποράς του παθογόνου, καθιστώντας επιτακτική την υιοθέτηση αποτελεσματικών μέτρων ελέγχου, πρωτίστως σε επίπεδο χοιρομητέρων (Kranker et al. 2001, 2003, van der Wolf et al. 2001). Γι' αυτό το επίπεδο οροθετικότητας των χοιρομητέρων με *Salmonella* spp. συνίσταται ως δείκτης καθορισμού της οροθετικότητας των χοίρων τελικής πάχυνσης, άρα και της υγειονομικής κατάστασης της εκτροφής.

Όπως και σε άλλες μελέτες (Alban et al. 2002), επιλέγοντας διαφορετική τιμή cut off, επηρεαζόταν τόσο η ευαισθησία, όσο και η ειδικότητα της μεθόδου. Η τιμή του cut-off OD $\geq$ 10, προταθείσα από τον παρασκευαστή του kit της ELISA και επικυρωθείσα από τους Nielsen et. al (1995) σε προγράμματα επιτήρησης, μας έδωσε ιδιαίτερα υψηλά ποσοστά μόλυνσης για την ελληνική επικράτεια. Συγκεκριμένα, το 81,53% και το 70,32% αντίστοιχα των χοιρομητέρων και των χοίρων τελικής πάχυνσης βρέθηκαν οροθετικοί. Αυξάνοντας το cut-off από OD $\geq$ 10 σε OD $\geq$ 40, το ποσοστό μόλυνσης έπεσε στο 20,38% για τις χοιρομητέρες και στο 15,5% για τους χοίρους τελικής πάχυνσης (Πίνακας 3.1). Όταν η ανωτέρω διερεύνηση περιορίστηκε γεωγραφικά στην

περιοχή της Θεσσαλίας, η τιμή του cut-off OD%>10 έδειξε ποσοστό μόλυνσης 59,35% των εξετασθέντων ζώων τελικής πάχυνσης. Με την αύξηση του cut-off από OD%>10 σε OD%>40, το ποσοστό μόλυνσης μειώθηκε στο 20,33% (Πίνακας 3.5). Υψηλότερη OD άλλαξε την ευαισθησία της μεθόδου από το 65% στο 30%, τη δε ειδικότητα από 43,75% σε 85% (Πίνακας 3.14).

Λόγω της χαμηλής ειδικότητας της ELISA που παρατηρείται, σε πολλές ευρωπαϊκές χώρες, μεταξύ των οποίων και η Ελλάδα, δεν εφαρμόζεται η ορολογική διάγνωση των μολύνσεων με *Salmonella* spp. στις εκτροφές χοίρων. Η αδυναμία ορολογικού αξιόπιστου προσδιορισμού των επιπέδων μόλυνσης οδηγεί στη μη ύπαρξη επίσημου συστήματος ελέγχου και διαφοροποίησης στην τιμή πώλησης των χοιρινών, βάση του επιπέδου μόλυνσης στο γένος *Salmonella* spp. Άρα, δεν υπάρχει και άμεσο κίνητρο για τον παραγωγό να μειώσει τον επιπολασμό των *Salmonella* spp. σε επίπεδο εκτροφής. Εν τούτοις, η πλειονότητα των προβλημάτων ασφάλειας των τροφίμων προέρχεται από τον τομέα της πρωτογενούς παραγωγής, δηλαδή προ των σταδίων σφαγής και επεξεργασίας των χοιρινών (Blaha 2001). Επειδή, όμως, η ΕΕ καθιστά υποχρεωτικό τον έλεγχο των χοιρινών προϊόντων για όλα τα κράτη-μέλη, όσον αφορά την παρουσία οροτύπων *Salmonella* με σημασία στη Δημόσια υγεία (Ann. 2003, Ann. 2005, Voss 2007), επιβάλλεται εμμέσως η υλοποίηση εθνικών προγραμμάτων ελέγχου και επιτήρησης με όλους τους ενδεδειγμένους τρόπους. Αυτά τα προγράμματα βασίζονται, ανάλογα με το κράτος- μέλος, σε βακτηριολογικές ή ορολογικές εξετάσεις, αλλά και σε συνδυασμό των δύο, όπου είναι οικονομικά εφικτό.

#### **4.2 Σύγκριση ορολογικών και βακτηριολογικών μεθόδων κατά τη διερεύνηση *Salmonella* spp. σε χοίρους τελικής πάχυνσης**

Οι ορολογικές εξετάσεις σκοπεύουν στην ανίχνευση αντισωμάτων έναντι των σωματικών Ο-αντιγόνων της *Salmonella*. Όλοι οι διαθέσιμοι τύποι ELISA για τη *Salmonella*, γνωστοί ως ‘mix-ELISAs’ βασίζονται στα Λιπο-Πολύ-Σακχαριδικά (LPS) αντιγόνα, τα οποία είναι ειδικά για κάθε οροομάδα και περιλαμβάνουν συνδυασμούς Ο-αντιγόνων, ανιχνεύοντας θεωρητικά τους οροτύπους που απαντούν συνηθέστερα στη Δ. Ευρώπη και τις ΗΠΑ (Somyanontanagul et al. 2008). Άρα, επιβάλλεται η ανίχνευση της

αξιοπιστίας μιας ορολογικής μεθόδου σε συνδυασμό με τη μικροβιολογική εξέταση για συγκεκριμένη περιοχή. Παρόλο που η *Salmonella* έχει καθολική εξάπλωση, η συχνότητα εμφάνισης των οροτύπων αλλάζει στο χρόνο, αλλά και στις διάφορες γεωγραφικές περιοχές. Έτσι, διαφορετικές χώρες έχουν διαφορετικό φάσμα επικρατέστερων οροτύπων. Η ορολογική δοκιμασία που χρησιμοποιήθηκε στη συγκεκριμένη μελέτη ήταν σε θέση να ανιχνεύσει όλους τους οροτύπους των οροομάδων B, C1 και D. Ωστόσο, θετικά ορολογικά αποτελέσματα προέκυψαν ακόμη και για ζώα από τα οποία απομονώθηκαν ορότυποι που ανήκαν σε άλλες οροομάδες. Πιθανώς, αυτοί οι χοίροι να είχαν μολυνθεί με οροτύπους διαφορετικούς από αυτούς που απομονώθηκαν ταυτόχρονα ή σε κάποια άλλη στιγμή προγενέστερα. Από την άλλη, απομονώθηκαν ορότυποι *Salmonella* με O-αντιγόνα, τα οποία η mix-ELISA δεν μπόρεσε να ανιχνεύσει, όπως οι ορότυποι Meleagridis, Cerro, *S. enterica* subsp. *enterica* ser. 6,14,25: - : 1,2, *S. enterica* subsp. *diarizonae* 61:k:1,5, *S. enterica* subsp. *salamae* 38:b:1,2 και *S. enterica* subsp. *houtenae* 40:g,t:- (Πίνακας 3.10). Ωστόσο, σε ένα πρόγραμμα επιτήρησης, είναι σημαντικό να γνωρίζουμε τι ποσοστό των επικρατέστερων οροτύπων *Salmonella* καλύπτεται από τη μέθοδο στη χώρα όπου χρησιμοποιείται, αλλά και την επιδημιολογική σημασία των οροτύπων που χάνονται. Δυστυχώς, στην Ελλάδα λίγα δεδομένα είναι διαθέσιμα σχετικά με τον επιπολασμό και τη διασπορά των οροτύπων της *Salmonella* στο χοίρο, και ως εκ τούτου δεν ήταν δυνατό να εκτιμηθεί σε προγενέστερες μελέτες το ανιχνεύσιμο ποσοστό (Lo fo Wong & Hald 2000, Grafanakis et al. 2001).

Στην παρούσα μελέτη, οι χοίροι από τους οποίους απομονώθηκε ο ορότυπος Typhimurium και οι μονοφασικοί τύποι του, οι οποίοι θεωρούνται υψηλός κίνδυνος για τους καταναλωτές (EFSA 2013), έδειξαν τα μεγαλύτερα ποσοστά οροθετικότητας, πιθανότατα λόγω της ευαισθησίας του χρησιμοποιηθέντος kit ELISA σε αυτό τον ορότυπο (Nielsen et al. 1995), αλλά και της ικανότητας του συγκεκριμένου οροτύπου να διατηρεί χρόνιες λοιμώξεις (Monack et al. 2004). Αυτές οι αδυναμίες εγείρουν ερωτήματα μεταξύ των επιστημόνων και των κρατικών αρχών για το αν ένα πρόγραμμα επιτήρησης και ελέγχου θα πρέπει να περιλαμβάνει όλους τους οροτύπους *Salmonella* ή μόνο εκείνους που αποτελούν υψηλό κίνδυνο στη δημόσια υγεία και την υγεία των ζώων. Παρά το γεγονός ότι ένας περιορισμένος αριθμός οροτύπων είναι υπεύθυνος για τις περισσότερες περιπτώσεις σαλμονέλλωσης του ανθρώπου και των ζώων, άρα έχει



επιδημιολογική σημασία, όλοι οι ορότυποι *Salmonella* θα πρέπει να θεωρούνται ως δυνητικοί ζωνοσογόνοι παράγοντες (Wollin 2007, Volf et al. 2010). Συνεπώς, οι διάφοροι τύποι ELISA ως εργαλείο επιτήρησης των *Salmonella* spp. θα πρέπει να περιλαμβάνουν όσο το δυνατόν περισσότερους οροτύπους, καθώς είναι αδύνατο να προβλεφθεί ποια οροτύπου θα αυξηθεί ή θα μειωθεί η σημασία σε σχέση με τη δημόσια υγεία (Forshell & Wierup 2006). Στην πράξη, οι μικροβιολογικές έρευνες για καθορισμό των ενδημικών οροτύπων πρέπει να γίνονται σε τακτά χρονικά διαστήματα, ώστε η δοκιμή ELISA να προσαρμοστεί στην κατανομή των οροτύπων των *Salmonella* spp. ανά χώρα, ενσωματώνοντας τα Ο-αντιγόνα που σχετίζονται με μια συγκεκριμένη περιοχή.

Σύμφωνα με την EFSA (2008) οι ορολογικές δοκιμές ELISA αποτελούν αποτελεσματικό μέσο επιτήρησης των *Salmonella* spp. σε επίπεδο εκτροφής, έχουν αποδειχθεί ευέλικτες και οικονομικά προσιτές μέθοδοι του ελέγχου αντισωμάτων έναντι των *Salmonella* spp., ενώ έχει βρεθεί ότι από έναν οροθετικό χοίρο είναι δυο φορές πιθανότερο να προκύψει μολυσμένο σφάγιο (Mousing et al. 1997). Δεδομένου ότι η πρόθεση των προγραμμάτων επιτήρησης είναι να ανιχνευτούν οι μολυσμένες εκτροφές, είναι σημαντικό να γνωρίζουμε σε ποιο βαθμό οι ορολογικές μέθοδοι ελέγχου και η βακτηριολογική απομόνωση των *Salmonella* spp. συσχετίζονται.

Πολλοί συγγραφείς έχουν αναφέρει συσχέτιση μεταξύ των δύο διαγνωστικών τεχνικών και συμφωνούν ότι η ορολογική δοκιμή είναι μια καλή μέθοδος για τη διαλογή σε επίπεδο εκτροφής, αλλά όχι σε ατομικό επίπεδο ζώου (Sorensen et al. 2004, Nollet et al. 2005, Zottola et al. 2013). Δηλαδή, αν και εντοπίζει τις εκτροφές υψηλού κινδύνου, αδυνατεί να προσδιορίσει έναν πιθανό κίνδυνο για τους καταναλωτές από μεμονωμένους χοίρους που μπορεί να φέρουν το παθογόνο κατά τον χρόνο της σφαγής (Mousing et al. 1997, Wray 2001, Nollet et al. 2005). Επιπρόσθετα, στις χρόνιες μολυσμένες εκτροφές, το ποσοστό των ορολογικά θετικών ζώων μπορεί να μην συσχετίζεται καλά με τα μικροβιολογικά ευρήματα κατά τη στιγμή της δειγματοληψίας, ούτε μπορούν τα ορολογικά αποτελέσματα να διακρίνουν πρόσφατες και παλαιότερες μολύνσεις. Παρόλα αυτά, είναι ένα μέτρο ιστορικής έκθεσης στο παθογόνο, αφού δείχνουν έκθεση στη *Salmonella* σε κάποιο στάδιο της παραγωγής πολύ πριν από τη δειγματοληψία. Δηλαδή, οι ορολογικές δοκιμές δεν θα ανιχνεύσουν μολύνσεις που σημειώθηκαν λίγο πριν (1 έως

2 εβδομάδες) από τη δειγματοληψία, αφού δεν θα έχουν παραχθεί μετρήσιμα επίπεδα ειδικών αντισωμάτων. Πιο συγκεκριμένα, οι χοίροι μπορεί να φιλοξενούν κατά τη σφαγή *Salmonella* spp. στους ιστούς τους, π.χ. στους μεσεντέριους λεμφαδένες, χωρίς να γίνονται αντιληπτοί με τις ορολογικές μεθόδους (Nollet et. al. 2005). Για τον λόγο αυτό, ίσως, και στην παρούσα μελέτη οι απομονωθέντες ορότυποι που ήταν ορολογικά ανιχνεύσιμοι με το kit που χρησιμοποιήθηκε (*S. Typhimurium*, *S. enterica* subsp. *enterica* ser. 4,5,12:i:-, *S. enterica* subsp. *enterica* ser. 4,12:i:-, *S. Agona*, *S. Bredeney*, *S. Derby*, *S. Infantis* και *S. enterica* subsp. *enterica*. 6,7:k:-) (Πίνακας 3.10), να προέρχονταν από οροαρνητικά ζώα. Οι ορολογικές μέθοδοι εκφράζουν έμμεσα την έκθεση στο παθογόνο και, ως εκ τούτου, υποδεικνύουν διαφορετικά ορολογικά στάδια συμπεριλαμβανομένων των χοίρων που δεν φιλοξενούν πλέον το βακτήριο, καθώς και τους φορείς που το αποβάλλουν (Van der Wolf et al. 2001).

Από την άλλη πλευρά, οι βακτηριολογικές μέθοδοι, που θεωρούνται το χρυσό πρότυπο, δεν αφήνουν περιθώριο αμφιβολίας για την παρουσία του βακτηρίου, αρκεί να εκτελούνται από έμπειρους επιστήμονες. Η απομόνωση εκφράζει την πραγματική κατάσταση μόλυνσης του ζώου, συμπεριλαμβανομένων των πρόσφατων μολύνσεων, και μπορεί να ανιχνεύσει όλους τους οροτύπους. Το ερώτημα, όμως είναι σε ποιο στάδιο είναι αξιόπιστη και οικονομικά αιτιολογήσιμη η μικροβιολογική διερεύνηση. Ο ευκολότερος τρόπος είναι η βακτηριολογική εξέταση κοπράνων των χοίρων που εξέρχονται από την εκτροφή και γι' αυτό έχει αποτελέσει ένα μέτρο εκτίμησης της κατάστασης κάθε χοίρου. Όμως, στην παρούσα διερεύνηση απεδείχθη ότι τα κόπρανα ανίχνευσαν μόνο 11 από τους 123 χοίρους, ενώ ο λεμφικός ιστός (ειλεός και λεμφαδένες) ανίχνευσε 35 ζώα (18 και 17 ζώα αντίστοιχα) (Πίνακας 3.8).

Πέραν του χαμηλού ποσοστού θετικότητας των κοπράνων, η μικροβιολογική εξέταση μεμονωμένων χοίρων προ της σφαγής είναι πρακτικά δύσκολη, λόγω του χρόνου και της εργασίας που απαιτείται για τη λήψη και καλλιέργεια δειγμάτων και του απαγορευτικού κόστους της ανάλυσης. Το ίδιο ισχύει και για την πιθανή εφαρμογή της μικροβιολογικής εξέτασης των σφάγιων πριν τη διάθεσή τους για κατανάλωση. Έτσι, η απομόνωση της *Salmonella* σε υποκλινικά μολυσμένες εκτροφές, οι οποίες απαντώνται πολύ συχνότερα από τις εκτροφές με κλινικά συμπτώματα, είναι δύσκολη, αφού οι κλασικές μέθοδοι καλλιέργειας είναι χρονοβόρες, επίπονες και απαιτούν τη διεξαγωγή

πολλών σταδίων. Επομένως, μπορεί να μην είναι πρακτικά και οικονομικά εφικτό για τις περισσότερες χώρες να εφαρμόζουν αυτές τις μεθόδους συστηματικά σε μεγάλης κλίμακας προγράμματα ελέγχου του παθογόνου σε επίπεδο εκτροφής ή του καθορισμού της αξιοπιστίας ορολογικών μεθόδων χρησιμών σε τέτοια προγράμματα. Επιπρόσθετα, η διαλείπουσα αποβολή και ο χαμηλός αριθμός βακτηρίων στα δείγματα μειώνουν την ευαισθησία των μεθόδων καλλιέργειας (Baggesen et al. 1996) και κάποιοι θετικοί χοίροι μπορεί να «χαθούν». Γι' αυτό τα φαινομενικά «ψευδώς θετικά» ορολογικά αποτελέσματα, που παρατηρήθηκαν στην παρούσα διερεύνηση μπορεί κάλλιστα να αντιπροσωπεύουν πραγματικές μολύνσεις σε κάποιο στάδιο κατά τη διάρκεια της παραγωγής, οι οποίες δεν ανιχνεύτηκαν από τις βακτηριολογικές δοκιμές (Hurd et al. 1999).

Στα προβλήματα αυτά πρέπει να προστεθούν τα μη οροταυτοποιήσιμα στελέχη. Ίσως, γι' αυτούς τους λόγους δεν υπάρχει καλή συσχέτιση μικροβιολογικών και ορολογικών ευρημάτων, όπως παρατηρήθηκε και στην εδώ διερεύνηση. Στα εργαστήρια αναφοράς για τη *Salmonella*, η τελική ταυτοποίηση γίνεται συνήθως με τη χρήση του συστήματος προσδιορισμού του οροτύπου με το Σχήμα White-Kauffmann-Le Minor. Λόγω του μεγάλου αριθμού αντιορών που απαιτούνται με αυτή τη μέθοδο, ένα ποσοστό ύποπτων στελεχών μπορεί να μην ανιχνευτούν. Επίσης, ένα μικρό ποσοστό στελεχών που στερείται τα Ο-αντιγόνα (rough isolates) μπορεί να μην οροταυτοποιούνται ή να αποδίδονται σε λάθος ορότυπο (Lo Fo Wong & Hald 2000, Pol-Hofstad et al. 2012). Ως εκ τούτου, η απομόνωση και ταυτοποίηση των *Salmonella* spp. εξακολουθεί να αποτελεί μια πρόκληση, στην οποία προσπαθεί να ανταποκριθεί η αδιάκοπη παραγωγή νέων υποστρωμάτων και ταχέων διαγνωστικών δοκιμασιών, συμπεριλαμβανομένων των μοριακών (Ball et al. 2011). Στις δε περιπτώσεις όπου είναι σημαντικό να εξακριβωθεί αιτιολογικά η μόλυνση με την απομόνωση ενός συγκεκριμένου οροτύπου (όπως σε διερευνήσεις τροφολοιμώξεων ή σε διαδικασίες ιχνηλασιμότητας) οι μέθοδοι καλλιέργειας δεν μπορούν να αντικατασταθούν από τις ορολογικές δοκιμές, οι οποίες ανιχνεύουν αδιακρίτως τους οροτύπους.

Οι παραπάνω ασυμφωνίες αντανakλούν τις διαφορές στις ευαισθησίες των δύο μεθόδων διερεύνησης της σαλμονέλλωσης (Ball et al. 2011). Άρα, βασικό ερώτημα αποτελεί η περιγραφή της σχέσης μεταξύ των ορολογικών δοκιμασιών και της



βακτηριολογίας. Ένας παράγοντας που επηρεάζει την εκτίμηση αυτή είναι και η επιλεγμένη τιμή cut-off, βάση της οποίας αποδεχόμαστε ένα δείγμα ως θετικό. Στην παρούσα μελέτη το 30,23% (cut-off OD 40%) ή το 65,11% (cut-off OD 10%) των ζώων από τα οποία απομονώθηκε *Salmonella* ήταν οροθετικά. Το OR (95% CI) για ένα ζώο θετικό στη *Salmonella* για τιμές OD% μεγαλύτερες έναντι μικρότερες του cut-off ήταν υψηλότερο για την τιμή cut-off OD 40% σε σχέση με τις τιμές OD 20% και 10%. Δηλαδή η υψηλότερη επιλεγείσα τιμή cut-off (OD 40%) για τις ορολογικές δοκιμές είχε μεγαλύτερη ικανότητα διάκρισης των πραγματικά μολυσμένων χοίρων σε σχέση με τις μικρότερες τιμές cut-off (OR (95% CI) 2,456 (1,004 – 6,007), διότι αυξάνει την ειδικότητα της μεθόδου. Το αποτέλεσμα αυτό είναι παρόμοιο με προηγούμενες μελέτες που καταλήγουν τελικά, ότι υπάρχει μια αύξηση της πιθανότητας απομόνωσης *Salmonella* με την αύξηση της οροθετικότητας (Lo fo Wong & Hald 2000, Grafanakis et al. 2001). Έτσι, βρέθηκε μια συσχέτιση μεταξύ βακτηριολογίας και ορολογικών μεθόδων μόνο για cut off OD 40%. Εν τούτοις, με την αύξηση της τιμής cut-off, η πιθανότητα λήψης ψευδώς αρνητικών αποτελεσμάτων θα αυξηθεί, δεδομένου ότι ορότυποι εκτός του Typhimurium συχνά δίνουν μόνο μέτρια ορολογική ανταπόκριση (Baggesen & Christensen 1997). Ο κίνδυνος αποτυχίας ανίχνευσης αυτών των μολύνσεων ορολογικά αυξάνει σε υψηλότερες τιμές cut-off, κάνοντάς τες ακατάλληλες για τον πραγματικό έλεγχο του παθογόνου σε μια εκτροφή. Από την άλλη πλευρά, μια υψηλή τιμή cut-off δίνει λιγότερα θετικά δείγματα, άρα γίνεται και ευκολότερα αποδεκτή από τους παραγωγούς κατά την έναρξη ενός προγράμματος επιτήρησης της *Salmonella* σε μια χώρα. Σε δεύτερο χρόνο, όταν ο επιπολασμός της *Salmonella* σε εθνικό επίπεδο μειωθεί σε συγκεκριμένο επίπεδο, τότε μπορεί να μειωθεί και η τιμή του cut-off (Sorensen et al. 2004), ώστε να αυξηθεί η ευαισθησία της μεθόδου.

Ο καλύτερος τρόπος συστηματικής επιτήρησης είναι ο συνδυασμός των δύο τρόπων ανίχνευσης του παθογόνου. Συνεκτιμώντας τα πλεονεκτήματα και μειονεκτήματα των δύο μεθόδων μπορούμε να πούμε ότι, για την Ελλάδα η ορολογική δοκιμασία μπορεί να χρησιμοποιηθεί ως εργαλείο παρακολούθησης μιας μονάδας, υποδεικνύοντας έκθεση στη *Salmonella* σε κάποια φάση της παραγωγής. Οι βακτηριολογικές εξετάσεις ως ακριβότερες και επίπονες μπορούν να είναι το μέσο επιβεβαίωσης και εντόπισης μιας υπάρχουσας μόλυνσης. Θα πρέπει να λαμβάνεται

υπόψη, δεδομένης της δυναμικής φύσης της παραγωγής χοίρων, ότι η κατάσταση μιας εκτροφής όσον αφορά τη *Salmonella* δεν μπορεί να βασίζεται στα αποτελέσματα μόνο μιας δειγματοληψίας, δεδομένου ότι αυτή μπορεί να αλλάξει με την πάροδο του χρόνου, κυρίως σε επίπεδο σημαντικών οροτύπων (Carlson & Blaha 2001, Rajic et al. 2005). Ως εκ τούτου, ο τακτικός έλεγχος είναι απαραίτητος και παρέχει τη δυνατότητα άμεσης αντίδρασης των παραγωγών και των αρχών σε αιφνίδιες αυξήσεις του ποσοστού εμφάνισης της *Salmonella* σε μια συγκεκριμένη εκτροφή ή ακόμα και σε εθνικό επίπεδο ποσοτικά και ποιοτικά (Lo Fo Wong et al. 2004).

### **4.3 Επικρατέστεροι ορότυποι *Salmonella* spp. κατά τη σφαγή χοιρινών**

Ο έλεγχος των σαλμονελλώσεων του χοίρου, οι οποίες έχουν άμεσο αντίκτυπο στις αντίστοιχες μολύνσεις του ανθρώπου, πρέπει να αποτελεί στόχο της βιομηχανίας του χοίρου. Η ικανότητα αποικισμού των μεσεντέριων λεμφαδένων και του επιθηλίου της χοληδόχου κύστης των χοίρων από το παθογόνο, όπως παρατηρήθηκε στη διερεύνησή μας, μπορεί να οδηγήσει στην επιβίωση και διασπορά διαφόρων παθογόνων οροτύπων, κυρίως διότι τα μολυσμένα ζώα παραμένουν συνήθως ασυμπτωματικά, καθιστώντας τα πιθανές πηγές μόλυνσης ανθρώπων και ζώων (Dlabac et al. 1997, Gonzalez-Escobedo & Gunn 2013, Evangelopoulou et al. 2014a, 2014b, 2015b). Επιπλέον, τα ζώα αυτά ενοχοποιούνται για την ανάπτυξη ενδημικής χλωρίδας *Salmonella* εντός του σφαγείου, με τον κίνδυνο επιμόλυνσης των σφάγιων (Berends et al. 1997, Warriner et al. 2002, Baptista et al. 2010, Visscher et al. 2011). Έχει αναφερθεί μεγάλη συσχέτιση μεταξύ του ποσοστού των ζώων από τα κόπρανα των οποίων απομονώθηκε *Salmonella* spp. και επιμολυσμένων σφάγιων, κάτι όμως που δεν απεδείχθη στην παρούσα διερεύνηση. Ερευνητές εκτιμούν ότι το 70% των ζώων φορέων ευθύνεται για την επιμόλυνση του δικού τους σφάγιου, ενώ το 15 με 30% της επιμόλυνσης προκύπτει από μολυσμένο εξοπλισμό, όπως το πριόνι διχοτόμησης, ή από τους χειρισμούς των σφάγιων από το προσωπικό (Berends et al. 1997, Swanenburg et al. 2001). Στην εδώ διερεύνηση μόνο 6 από τα 43 θετικά ζώα είχαν θετικούς τραχηλικούς μυς και από αυτά μόνο 2 είχαν θετικά κόπρανα με βάση την οροταυτοποίηση. Ειδικά ο επιμολυσμένος εξοπλισμός του σφαγείου αναφέρεται ως περισσότερο κρίσιμος από τους χειρισμούς του προσωπικού ως

προς την επιμόλυνση των σφάγιων, εξαιτίας του βακτηριακού φορτίου, που συγκεντρώνεται κατά τη διάρκεια της ημέρας, στο εσωτερικό ή στην επιφάνεια του εξοπλισμού (Hald et al. 2003). Αν σε αυτά τα βακτήρια περιλαμβάνονται κι εκείνα που απειλούν τη δημόσια υγεία, όπως τα *Salmonella* spp., απαιτείται η λήψη μέτρων ανίχνευσης και ελαχιστοποίησης της εισόδου μολυσμένων ζώων στο σφαγείο, τα οποία επιβεβαιώνονται ως φορείς μόνο μετά τη μικροβιολογική εξέταση δειγμάτων πολλαπλών σημείων. Όμως, και αυτή η πιθανή πηγή μόλυνσης του σφάγιου δε φάνηκε να είναι ιδιαίτερης σημασίας στην παρούσα διερεύνηση, αφού η παρουσία του παθογόνου στο περιβάλλον του σφαγείου σχετίστηκε με την ακάθαρτη ζώνη.

Όπως προαναφέρθηκε, η μικροβιολογική διερεύνηση της σαλμονέλλωσης χοιρινών σφάγιων με δειγματοληψία πολλαπλών σημείων στόχευσε στην αξιολόγηση της ELISA, στην αναγνώριση των επικρατέστερων οροτύπων και στον εντοπισμό των προσβεβλημένων οργάνων των μολυσμένων χοίρων, ώστε τελικά να αξιολογηθεί η επικινδυνότητα του χοιρινού κρέατος για τον Έλληνα καταναλωτή.

Αν και η παρούσα διερεύνηση επικεντρώθηκε στην κεντρική Ελλάδα, θα μπορούσε να αποτελέσει μέρος των ενδείξεων των οροτύπων *Salmonella* που κυκλοφορούν στην ΕΕ, λόγω της ελεύθερης εισαγωγής ζώων και ζωοτροφών από άλλες ευρωπαϊκές χώρες. Αυτή η πιθανότητα μπορεί να αιτιολογεί τον μεγάλο αριθμό οροτύπων (14 ορότυποι) που ανιχνεύτηκαν στις εδώ εκτροφές. Οι απομονωθέντες ορότυποι ανήκουν σε τέσσερα από τα έξι αναγνωρισμένα υποείδη *Salmonella*. Είναι προφανές ότι ο πληθυσμός των οροτύπων *Salmonella* χαρακτηρίζεται από μια δυναμική συνεχούς ανανέωσης (Lo Fo Wong et al. 2004). Το ζωικό κεφάλαιο εισέρχεται στις ελληνικές εκτροφές χοίρων από διάφορες ευρωπαϊκές πηγές, με τελικό αποδέκτη αυτών των οροτύπων τον καταναλωτή. Αυτός είναι, ίσως, ο λόγος για τον οποίο, αν και ο πιο διαδεδομένος ορότυπος ήταν ο Typhimurium (Πίνακας 3.9), ο οποίος αναγνωρίζεται στην ΕΕ ως ένας εκ των οροτύπων που σχετίζονται συχνότερα με τις σαλμονελλώσεις του χοίρου και του ανθρώπου (Pires et al. 2011), διαφορετικός αριθμός οροτύπων είχε αναφερθεί σε προηγούμενες διερευνήσεις σε ελληνικές εκτροφές χοίρων (Grafanakis et al. 2001) (Πίνακας 4.1).

Μεταξύ των αναδυόμενων οροτύπων ήταν οι μονοφασικοί τύποι του οροτύπου Typhimurium, *S. enterica* ser. 4,12:i:- και *S. enterica* ser. 4,5,12:i:-, δεύτεροι και τρίτοι

σε ποσοστό εμφάνισης (Πίνακας 3.9α). Οι μονοφασικοί τύποι του οροτύπου *Typhimurium* έχουν αυξηθεί πρόσφατα παγκοσμίως σε συχνότητα εμφάνισης μεταξύ των καταναλωτών, αντικαθιστώντας σταδιακά άλλους σημαντικούς οροτύπους που συνδέονται με τον χοίρο και τα προϊόντα του (CDC 2007, EFSA 2010b, 2013, Hopkins et al. 2010). Είναι ενδιαφέρον ότι στην παρούσα μελέτη, αυτοί οι ορότυποι δεν απομονώθηκαν από κόπρανα, ίσως λόγω της προσαρμογής τους στους ιστούς άλλων οργάνων του πεπτικού συστήματος, όπως είναι η χολή (Evangelopoulou et al. 2014a) και οι λεμφαδένες. Σε αυτά τα όργανα παραμένουν σε λανθάνουσα κατάσταση μέχρις ότου στρεσογόνοι παράγοντες προκαλέσουν τον πολλαπλασιασμό τους και την επακόλουθη επιμόλυνση του εντέρου και του περιβάλλοντος, θέτοντας σε κίνδυνο τα άλλα ζώα και τελικά τον καταναλωτή. Η προσαρμογή αυτή θα μπορούσε να ευθύνεται για τις αυξημένες αναφορές απομόνωσης αυτών των οροτύπων από ανθρώπους και ζώα τα τελευταία χρόνια, από δειγματοληψίες πολλαπλών σημείων σφάγιων και όχι μόνο κοπράνων και περιβαλλοντικών δειγμάτων (Bone et al. 2010, Hauser et al. 2010, Moreno Switt et al. 2009). Επιπλέον, η παρόμοια αύξηση στον άνθρωπο από αυτούς τους οροτύπους σημαίνει ότι ο καταναλωτής μολύνεται μέσω του κρέατος που φιλοξενεί το παθογόνο στον λεμφικό ιστό του και όχι μέσω διασταυρούμενης επιμόλυνσης του σφάγιου π.χ. κατά τη διαδικασία της σφαγής. Στη διερεύνησή μας, αυτό κατέστη προφανές από τα θετικά δείγματα τεμαχίων τραχηλικού μυός προερχόμενα μόνο από ζώα που είχαν τουλάχιστον ένα ακόμη θετικό σημείο δειγματοληψίας, εκ των οποίων μόνο δύο είχαν θετικά κόπρανα.

Οι μονοφασικοί τύποι *S. Typhimurium* ή “*S. Typhimurium-like*” ορότυποι βρίσκονται στην τέταρτη θέση μεταξύ των σημαντικών οροτύπων που έχουν αναφερθεί από τον άνθρωπο, στη δεύτερη θέση από ζωντανούς χοίρους και στην τρίτη θέση από χοιρινό κρέας. Επίσης έχουν απομονωθεί και από άλλα ζωικά είδη, όπως πουλερικά, βοοειδή, χελώνες και χοιρινά λουκάνικα (Bone et al. 2010, EFSA 2010b, EFSA and ECDC 2013). Παρουσιάζουν πολύ υψηλή μοριακή συγγένεια με τον «κλασικό» ορότυπο *S. Typhimurium*, γεγονός που αποτελεί αιτία πιθανής πρότερης λανθασμένης ταξινόμησής τους, γι’ αυτό επιβάλλεται η βελτίωση των μεθόδων μοριακής διερεύνησής τους. Ο καθορισμός της μοριακής συγγένειας, σε σχέση με τα γονίδια παθογένειας, θα μπορούσε όχι μόνο να βοηθήσει στην αποφυγή εσφαλμένων ταξινομήσεων, αλλά και να



αλλάζει την επιδημιολογική σημασία των αναδυόμενων οροτύπων που απομονώνονται από ζώα και καταναλωτές (Soyer et al. 2009, Hauser et al. 2010, Bugarel et al. 2012).

Αξιοσημείωτο είναι ότι, στην παρούσα μελέτη ανιχνεύτηκαν σπάνιοι ορότυποι και υποείδη του γένους *Salmonella*, όπως τα *arizonae* (14 στελέχη) και *salamae* (Evangelopoulou et al 2014a, 2014b), αλλά και οι ορότυποι *S. enterica* 6,7:k:- και *S. enterica* subsp. *diarizonae* 61:k:1,5.

Όσον αφορά το υποείδος *arizonae* δεν έχει αναφερθεί ξανά απομόνωσή του από τον χοίρο, μιας και σχετίζεται κυρίως με τα ψυχρόαιμα ζώα. Η διαπίστωση χοίρων φορέων του υποείδους αυτού στην παρούσα μελέτη δηλώνει αφ' ενός τη δυσκολία απομόνωσής του, αφ' ετέρου δε την προσαρμογή του, λόγω της εκλεκτικής πίεσης επιλογής από τα ερπετά που θα μπορούσαν να κυκλοφορούν σε μια εκτροφή, σε ένα νέο ξενιστή, τον χοίρο, αυξάνοντας τη σημασία αυτού του υποείδους στη Δημόσια Υγεία. Παρομοίως, και για τον ορότυπο του υποείδους *salamae* πρώτη φορά αναφέρεται απομόνωσή του από τον χοίρο. Ειδικά, η παρουσία του στη χολή δηλώνει την παρουσία γενετικών μηχανισμών, οι οποίοι βοηθούν την προσαρμογή και εξάπλωση του παθογόνου στο «εχθρικό» περιβάλλον της χολής και τελικά την εξάπλωσή του σε ευπαθείς ξενιστές. Επιπλέον, το συγκεκριμένο υποείδος, όπως επίσης και το *arizonae*, συγκαταλέγονται μεταξύ εκείνων που μπορούν να προκαλέσουν σοβαρή παρεντερική νόσο στον άνθρωπο (Abbott et al. 2012), αυξάνοντας ακόμη περισσότερο την ανάγκη διερεύνησής τους στα παραγωγικά ζώα.

Το υποείδος *diarizonae* σχετίζεται με ερπετά και έχει απομονωθεί από ανθρώπους που τα διατηρούσαν ως κατοικίδια (Schröter et al. 2004). Επίσης, έχει αναφερθεί προσαρμογή του στο πρόβατο, όπου αποικεί τον ρινικό βλεννογόνο (Lacasta et al. 2012). Η απομόνωσή του από τον χοίρο θα μπορούσε να δηλώσει την εμφάνιση ενός αναδυόμενου οροτύπου για τους καταναλωτές, όπως και το απομονωθέν υποείδος *S. enterica* subsp. *houtenae*, που και αυτό συνδέεται με αρπακτικά (Millan et al. 2004), καθώς και με ανθρώπινες λομώξεις από εξωτικά ερπετά (Bauwens et al. 2006, Tabarani et al. 2010). Οι εξωτικοί ξενιστές βρίσκονται και στο περιβάλλον των ζώων, άρα μεταδίδουν τα παθογόνα που φέρουν στα παραγωγικά ζώα και τελικά στον καταναλωτή.

Όσο για τα τέσσερα ατυποποίητα στελέχη (6,67%) πιθανότερο είναι ότι είχαν αναπτύξει επιφανειακούς μηχανισμούς αποφυγής της ανοσοαπόκρισης του ξενιστή,

«συγκαλύπτοντας» τα O- αντιγόνα (Chandra et al. 2006), άρα και τη δυνατότητα οροταυτοποίησής τους. Δεδομένου ότι όλοι οι ορότυποι *Salmonella* θεωρούνται δυνητικά παθογόνοι για τον άνθρωπο, ανεξάρτητα από το βαθμό προσαρμογής ξενιστή (Evangeloroulou et al. 2013), η παρατηρούμενη ευρεία διανομή οροτύπων, συμπεριλαμβανομένων και των ατυποποίητων, εμπλέκει τον χοίρο σε μολύνσεις του καταναλωτή, όχι μόνο από ευρέως αναγνωρισμένους ορότυπους, αλλά επίσης και από πιο σπάνιους.

Ένας άλλος λόγος που αυτοί οι ορότυποι απομονώνονται σπάνια από τα ζώα θα μπορούσε να έχει σχέση με τον ιστό που φυσιολογικά αποικούν. Άρα, να αντικατοπτρίζει το σημείο δειγματοληψίας, που δεν είναι πάντα προσιτό προς διερεύνηση. Τα κόπρανα θεωρούνται, διαχρονικά, το καλύτερο δείγμα για την επιβεβαίωση μιας θετικής κλινικής ή υποκλινικής περίπτωσης. Ωστόσο, όπως είναι προφανές από τον Πίνακα 3.9α, μόνο 11 εκ των 59 στελεχών προήλθαν από κόπρανα. Αυτό σημαίνει ότι σε περιπτώσεις που είναι αδύνατη η διερεύνηση βαθύτερων ιστών, η κοπρανολογική εξέταση έχει ιδιαίτερα χαμηλή ευαισθησία. Όπως έχει ήδη αναφερθεί (Gray et al 1995, Bahnson et al 2005), τα καλύτερα σημεία δειγματοληψίας για την επιβεβαίωση της μόλυνσης ήταν ο ειλεός και οι μεσεντέριοι λεμφαδένες (18 και 17 στελέχη από ανάλογο αριθμό ζώων αντίστοιχα). Από το σύνολο δε των θετικών ζώων, μόνο 10 (23%) ήταν θετικά σε περισσότερους από έναν ιστούς. Αυτό σημαίνει ότι μόνο η σύγχρονη δειγματοληψία πολλαπλών σημείων μπορεί να δώσει αξιόπιστα αποτελέσματα, κάτι που είναι σχεδόν ανέφικτο για πλήρη έλεγχο σε επίπεδο σφάγιου ή για επιδημιολογικές μελέτες σε ζωντανά ζώα. Ένα πρωτόκολλο σε επίπεδο σφάγιου με πολλαπλές δειγματοληψίες θα μπορούσε επίσης ερευνητικά να δώσει πληροφορίες για την ύπαρξη διαφορετικών οροτύπων, που πιθανώς συνυπάρχουν στον ίδιο ξενιστή. Η τελευταία περίπτωση έχει πρόσφατα αναφερθεί (Garrido et al. 2014), είτε επειδή σπανίως συμβαίνει, είτε λόγω του ότι η οροταυτοποίηση περιορίζεται, λόγω του κόστους, μόνο στα στελέχη που διαφέρουν φαινοτυπικά και αυτό ακολουθήθηκε στην παρούσα μελέτη. Με αυτό τον τρόπο, σε τρεις περιπτώσεις της παρούσας διερεύνησης δύο (2) διαφορετικοί ορότυποι ταυτοποιήθηκαν από διαφορετικές περιοχές δειγματοληψίας του ίδιου ζώου: i) ο ορότυπος 4,12:i:- από τη χολή και ο ορότυπος 4,5,12:i:- από δείγματα ειλεού και τραχηλικού μυός, ii) ο ορότυπος 6,7:k:- από μεσεντέριους λεμφαδένες και ο ορότυπος Infantis από τα κόπρανα και iii) ο

ορότυπος 6,7:k:- από τη χολή και ο ορότυπος *S. Typhimurium* από τον ειλεό και τα κόπρανα. (Πίνακας 3.8).

Οι περισσότεροι ορότυποι απομονώθηκαν από τον λεμφικό ιστό (35 δείγματα), που οδηγεί στο συμπέρασμα ότι ο αποικισμός του λεμφικού ιστού αυξάνει τον κίνδυνο για τους καταναλωτές, αν το μαγείρεμα ή οι χειρισμοί δεν εξαλείφουν το παθογόνο. Γι' αυτό ενδιαφέρον θα είχε από την άποψη της Δημόσιας Υγείας η γενίκευση μικροβιολογικής εξέτασης λεμφογαγγλίων από σημεία του σφάγιου απομακρυσμένα του πεπτικού συστήματος.

Στην παρούσα έρευνα η εξέταση του κρέατος και των περιβαλλοντικών δειγμάτων κατέστησε εμφανή τον αυξημένο κίνδυνο που προκύπτει για τον καταναλωτή από τον αποικισμό του λεμφικού ιστού του ζώου και όχι από την επιμόλυνση των σφάγιων κατά τον χειρισμό τους. Μόνο έξι (6) ζώα είχαν δείγματα τραχηλικού μυός (περιοχή αποστράγγισης σφάγιου) θετικά στη *Salmonella*, εκ των οποίων μόνο δύο είχαν θετικά κόπρανα, αλλά και τα έξι ζώα είχαν ένα ακόμη δείγμα θετικό.

Όσον αφορά, όμως, τους οροτύπους που απομονώθηκαν από τα περιβαλλοντικά δείγματα του σφαγείου, στη δικιά μας έρευνα απομονώθηκαν μόνο δύο διαφορετικοί ορότυποι που σχετίζονταν με την ακάθαρτη ζώνη. Το αποτέλεσμα αυτό διαφέρει από προηγούμενη μελέτη στην Ελλάδα, όπου απομονώθηκε σχετικά μεγάλος αριθμός οροτύπων από το περιβάλλον των σφαγείων (Limpitakis et al 1999) (Πίνακας 4.1). Συνεπώς, η παρούσα μελέτη δεν επιβεβαιώνει την πιθανή διασταυρούμενη επιμόλυνση των σφάγιων από εξοπλισμό του σφαγείου ή από τα κόπρανα των μολυσμένων ζώων (Limpitakis et al 1999, Swanenburg 2001), καθώς η *Salmonella* απομονώθηκε μόνο από τα γάντια πολλαπλών χρήσεων του ιδίου εκδορέα κατά τη διάρκεια όλων των δειγματοληψιών. Θα μπορούσε να εξαχθεί το συμπέρασμα από τα ευρήματα αυτά ότι, τα μέτρα υγιεινής ήταν σε μεγάλο βαθμό αποτελεσματικά στις εξεταζόμενες εγκαταστάσεις σε σχέση με τις προηγούμενες μελέτες, αν και συνίσταται η αλλαγή και απολύμανση τέτοιων γαντιών μεταξύ των χειρισμών. Οι απομονωθέντες ορότυποι (*S. Typhimurium* και *S. enterica* subsp *enterica* ser 4,5,12:i-) είναι δυνητικά παθογόνοι για τον καταναλωτή, αν περάσουν στο σφάγιο. Παρόλο που ο εκδορέας δεν εργαζόταν στην καθαρή ζώνη, αποτελεί μέρος της «ενδημικής χλωρίδας» του σφαγείου και θα μπορούσε

να επιμολύνει τα σφάγια, εάν οι διαδικασίες HACCP αποτύχουν, εξαιτίας της αμέλειας των εργαζομένων.

Από τα παραπάνω συμπεραίνεται ότι, ο χοίρος και το κρέας του αποτελούν δυνητική πηγή οροτύπων ευρέως αποδεκτών ως παθογόνων για τον καταναλωτή, αλλά και σπανιότερων υποειδών και οροτύπων, οι οποίοι με τον αποικισμό του λεμφικού ιστού των υποκλινικά μολυσμένων χοίρων, θα μπορούσαν να μολύνουν πολλούς καταναλωτές, εάν οι μέθοδοι μαγειρέματος του κρέατος αποτύχουν να τους προστατεύσουν. Επιπλέον, τα αποτελέσματα έδειξαν ότι ο αυστηρός έλεγχος HACCP ελέγχει την ανάπτυξη της «ενδημικής χλωρίδας» μικροβίων παθογόνων για τους καταναλωτές.



**Πίνακας 4. 1. Ορότυποι *Salmonella* που απομονώθηκαν στην Ελλάδα από χοίρους και περιβαλλοντικά δείγματα αυτών**

Προέλευση Στελεχών	Ορότυποι	Βιβλιογραφία
<b>ΧΟΙΡΟΙ ΤΕΛΙΚΗΣ ΠΑΧΥΝΣΗΣ</b>	Typhimurium, S.1, 4,12:i:-, S.1, 6,7:k:-, S.1, 4,5, 12:i:-, Bredeney, Agona, Cerro, Derby, Infantis, Meleagridis, S.1, 6,14,25: - : 1,2, <i>S. enterica</i> subsp. <i>diarizonae</i> 61:k:1,5, <i>S. enterica</i> subsp. <i>salamae</i> 38:b:1,2, <i>S. enterica</i> subsp. <i>houtenae</i> 40:g,t:- <i>S. enterica</i> subsp. <i>arizonae</i> <i>S. enterica</i> subspecies <i>indica</i>	Δική μας έρευνα
	Typhimurium, Bredeney, London	Grafanakis et al., 2001
	Mbandaka	Filioussis et al., 2008
	Typhimurium, Derby, Thompson, Bredeney, Enteritidis, Kottbus, Montevideo, Umbilo, S.1,4,[5],12:i:-, Blockley, Muenster, Oranienburg, Agona, Anatum, Bovismorbificans, Brandenburg, Carno, Dublin, Hermannswerder, London, Menden, Mishmarhaemek, Newport, Paratyphi B var. Java, Szentes	EFSA, 2008
<b>ΣΦΑΓΕΙΟ (ζώοφοι)</b>	Typhimurium, S.1, 4,5,12:i:-	<sup>1</sup> Δική μας έρευνα
	Derby, London, Typhimurium, Bredeney, Infantis, Goldcoast, Panama, Livingstone, Mbandaka	Limpitakis et al., 1999
<b>ΖΩΟΤΡΟΦΗ</b>	S. Tennessee	Grafanakis et al., 2001

<sup>1</sup> Ακάθαρτη ζώνη

#### 4.4 Σύγκριση της δράσης αιθέριων ελαίων και ευρέως χρησιμοποιούμενων αντιβιοτικών έναντι *Salmonella* spp.

Τα αναδυόμενα πολυανθεκτικά στελέχη *Salmonella* που μπορούν να μεταδοθούν στον άνθρωπο, μέσω της τροφικής αλυσίδας, σχετίζονται με τη χορήγηση αντιβιοτικών στα παραγωγικά ζώα και προκαλούν ανησυχία σε παγκόσμιο επίπεδο για τις επιπτώσεις τους στη δημόσια υγεία (Choffnes et al. 2012). Η εμμονή της αντιβιοαντοχής προτρέπει την ανάγκη εξεύρεσης νέων τρόπων αντιμετώπισης των πολυανθεκτικών βακτηρίων, μεταξύ των οποίων είναι η εφαρμογή των φυτικών αιθέριων ελαίων. Η αντιμικροβιακή δράση των αιθέριων ελαίων ενάντια σε ένα ευρύ φάσμα μικροοργανισμών έχει ήδη αναγνωριστεί από την αρχαιότητα (Nychas 1995, Dorman & Deans 2000, Cattelan et al. 2013). Η χρήση τους, όμως, ως φυσικά αντιμικροβιακά στη βιομηχανία τροφίμων έχει τραβήξει το ενδιαφέρον τα τελευταία χρόνια, εξαιτίας της απαίτησης για την παραγωγή ασφαλών και υψηλής ποιότητας τροφίμων (Baydar et. 2004, Tajkarimia et al. 2010). Η δράση των αιθέριων ελαίων οφείλεται στις φαινολικές ενώσεις καρβακρόλη και θυμόλη, που στοχεύουν στη διαπερατότητα της κυτταρικής μεμβράνης των μικροοργανισμών (Preuss et al. 2005, McMeekin et al. 2010, Gavanjia et al. 2014). Χάρη σε αυτή την ιδιότητά τους, γίνεται προσπάθεια να χρησιμοποιηθούν στην ιατρική για την αντιμετώπιση προβλημάτων αντιβιοαντοχής (Yap et al. 2014), ενώ στην κτηνιατρική διερευνώνται ως δυνητικά «εναλλακτικά μέσα» αντικατάστασης των αντιμικροβιακών αυξητικών παραγόντων στο σιτηρέσιο πουλερικών και απογαλακτισμένων χοιριδίων. Έχει δε παρατηρηθεί θετική επίδραση στην απόδοση, τη μικροχλωρίδα του εντέρου και την ευζωία των ζώων (Bento et al. 2013).

Ως εκ τούτου, ο στόχος της παρούσας μελέτης ήταν να αξιολογήσει την αντιμικροβιακή δράση ευρέως χρησιμοποιούμενων αντιβιοτικών και τριών αιθέριων ελαίων από ρίγανη, δενδρολίβανο και θυμάρι, έναντι 59 πολυανθεκτικών στελεχών *Salmonella* spp., που απομονώθηκαν από σφάγια χοίρων.

Τα ευρήματα έδειξαν υψηλά ποσοστά ανθεκτικότητας κυρίως για τα «φτηνά» αντιβιοτικά, ενδεικτό της πολιτικής των κτηνοτρόφων ως προς την επιλογή των αντιβιοτικών και τις επιπτώσεις στη Δημόσια Υγεία, που μπορεί να έχει αυτό. Έτσι, παρατηρήθηκαν υψηλά ποσοστά ανθεκτικότητας στην tetracycline (30 μg) (68,31%),

amoxicillin (30 µg) (53,46%), ampicillin (10 µg) (54,45%), sulfamethoxazole/trimethoprim (23.75/1.25 µg) (61,38%), και την chloramphenicol (30 µg) (22,77%), που θεωρούνται «Υψηλής Σημαντικότητας για την Ανθρώπινη Υγεία Αντιμικροβιακές Ουσίες» από τον Παγκόσμιο Οργανισμό Υγείας [Highly Important Antimicrobials for Human Health (WHO 2011)] (Πίνακας 3.18). Τα αποτελέσματα αυτά συμβαδίζουν με άλλες έρευνες σε Ελλάδα και Ευρώπη, όπου υψηλά ποσοστά ανθεκτικότητας σε στελέχη *Salmonella* από χοίρους παρατηρήθηκαν για sulfonamides, tetracyclines και ampicillins (EFSA 2011b; EFSA and ECDC 2014b), επιβεβαιώνοντας την εκτεταμένη χρήση τους στη χοιροτροφία (Burgh 2005), όχι μόνο για θεραπευτικούς σκοπούς, αλλά για προληπτικούς λόγους, καθώς και ως αυξητικούς παράγοντες. Η τελευταία πρακτική μπορεί να οδηγήσει στη διατάραξη της φυσιολογικής μικροχλωρίδας του γαστρεντερικού συστήματος, επιτρέποντας έτσι τον εκλεκτικό αποικισμό πολυανθεκτικών *Salmonella* spp. και σε άλλα όργανα εκτός του εντέρου, όπως η χοληδόχος κύστη, την ανάπτυξη και απέκκρισή τους, δημιουργώντας χρόνιους φορείς και καθιστώντας τελικά τον χοίρο σημαντικό παράγοντα κινδύνου επιμόλυνσης του χοιρινού κρέατος (Friendship et al. 2009, Evangelopoulou et al. 2014a, 2014b).

Έχει επίσης αναφερθεί ότι η μονοφασική *S. Typhimurium* έχει μεγαλύτερη αντιμικροβιακή αντοχή από την τυπική *S. Typhimurium* και παρουσιάζει πολυανθεκτικό προφίλ (EFSA and ECDC 2014b), κάτι που επιβεβαιώνεται και εδώ (Πίνακας 3.18). Η αντοχή στη chloramphenicol ήταν ακόμη μία ανησυχητική παρατήρηση, επειδή έχει απαγορευτεί η χορήγησή της στα παραγωγικά ζώα στην ΕΕ από το 1994 (European Committee for Veterinary Medicinal Products, 1994). Η πιθανότερη αιτία γι' αυτό είναι η μεταφορά γονιδίων ανθεκτικότητας μεταξύ διαφορετικών ειδών βακτηρίων που κωδικοποιούν παρόμοιες κατηγορίες αντιμικροβιακών. Η κατάχρηση των αντιβιοτικών αλλάζει τα γονίδια ανθεκτικότητας και αυτές οι αλλαγές μπορούν να παραμείνουν για δεκαετίες (Sommer & Dantas 2011). Έτσι, τα γονίδια που παρέχουν αντίσταση στη chloramphenicol θα μπορούσε να παραμείνουν στη μικροβιακή χλωρίδα των ζώων για μεγάλο χρονικό διάστημα μετά την κατάργησή της (Johnsen et al. 2011) και, ίσως, αυτό είναι αυτό που παρατηρήθηκε εδώ. Ωστόσο, η ανθεκτικότητα στις κεφαλοσπορίνες τρίτης γενιάς και φθοριοκινολόνες, που είναι κρίσιμης σημασίας αντιμικροβιακές ομάδες για την ανθρώπινη ιατρική, δείχθηκε να είναι αμελητέα.

Ως συνέπεια της αντιβιοαντοχής των *Salmonella* spp. περιορίζεται το εύρος θεραπείας των σαλμονελλώσεων του ανθρώπου, με αποτέλεσμα ουσίες όπως η colistin μόνη της ή σε συνδυασμό με τη rifampin να χρησιμοποιούνται ως εναλλακτική λύση (Drapeau et al. 2010). Η παρατηρούμενη ανθεκτικότητα στα Κρίσημης Σημασίας Αντιμικροβιακά (Critically Important Antimicrobials), καθώς και στη rifampin, προκαλεί ανησυχία διότι δηλώνει την ανάδυση στελεχών τα οποία δε θα αντιμετωπίζονται κλινικά, άρα θα έχουν σοβαρές κλινικές επιπτώσεις. Επομένως, τα αποτελέσματα της παρούσας μελέτης απεικονίζουν τον χοίρο ως δεξαμενή ανθεκτικών μικροοργανισμών που μπορούν να μεταδοθούν στον άνθρωπο.

Τέτοια προβλήματα οδηγούν στη διερεύνηση της δυνατότητας αντικατάστασης των συνθετικών αντιμικροβιακών στη ζωική παραγωγή, κυρίως αποτελεσματικών σε παθογόνα, όπως τα *Salmonella* spp. (Bento et al. 2013, Cattelan et al. 2013). Τα αιθέρια έλαια «Θεωρούνται Ευρέως Αναγνωρισμένα ως Ασφαλή» (GRAS- Generally Regarded As Safe) για τον άνθρωπο και τα ζώα (Kabara 1991), ενώ έχουν φυσική αντιμικροβιακή δράση. Σε αυτή τη μελέτη, τα χρησιμοποιηθέντα αιθέρια έλαια έδειξαν ποικίλη αντιμικροβιακή δράση. Τόσο το ριγανέλαιο όσο και το θυμαρέλαιο είχαν ισχυρή ανασταλτική επίδραση, ακόμη και στην πολύ μικρή ποσότητα των 5 μl, χωρίς στατιστικά σημαντική διαφορά μεταξύ τους (Πίνακες 3.20, 3.21). Ειδικότερα, το θυμαρέλαιο στην ποσότητα των 30 μl παρήγαγε τη μεγαλύτερη ζώνη αναστολής (70mm) και είχε τον μεγαλύτερο μέσο όρο ζώνης αναστολής (47, 29 mm). Αντίθετα, το έλαιο δενδρολίβανου δεν είχε καμία ή παρουσίασε μικρότερη αντιμικροβιακή δράση σε σχέση με το ριγανέλαιο και το θυμαρέλαιο. Η διαφορά πιστεύεται ότι είναι αποτέλεσμα της διαφορετικής του σύνθεσης. Το κύριο συστατικό του είναι η καμφορά, που δεν του επιτρέπει να δράσει στον λιποπολυσακχαρίτη των Gram αρνητικών βακτηρίων σε σχέση με τα δύο άλλα αιθέρια έλαια, που είναι πλούσια σε καρβακρόλη και θυμόλη (Inouye et al. 2001).

Πέραν της διαφορετικής περιεκτικότητας σε κύρια συστατικά, η ανασχετική δράση των αιθέριων ελαίων ήταν συνάρτηση, όπως ήταν αναμενόμενο, της εφαρμοζόμενης ποσότητας. Γι' αυτό οι σημαντικές παρατηρούμενες διαφορές αφορούσαν μόνο την ποσότητα των 30 μl. Όσον αφορά το είδος του αιθέριου ελαίου σε σχέση με αυτές τις διαφορές, τόσο το ριγανέλαιο όσο και το θυμαρέλαιο εμφάνισαν



ισχυρή δραστηριότητα (>20mm) για τη συγκεκριμένη ποσότητα. Επίσης, ο ορότυπος φαίνεται να επηρεάζεται από το είδος του αιθέριου ελαίου, με τον μονοφασικό τύπο *S. enterica* subsp. *enterica* ser. 4,12:i:-, να εμφανίζει τη μεγαλύτερη ευαισθησία. Ωστόσο, δεν μπορούσε να εξεταστεί αν αυτή η διαφορά ήταν στατιστικώς σημαντική σε σύγκριση με τους άλλους οροτύπους, αφού ήταν μικρός ο αριθμός των στελεχών που διερευνήθηκε.

Η σύγκριση των αντιμικροβιακών ιδιοτήτων αυτών των αιθέριων ελαίων με τα ευρέως χρησιμοποιούμενα αντιβιοτικά (όπως η tetracycline, amoxicillin, ampicillin, sulfamethoxazole/trimethoprim), για το ίδιο στέλεχος, αποκάλυψε ότι τα αιθέρια έλαια έχουν καλύτερη αντιμικροβιακή δράση για την *in vitro* αντιμετώπιση της *Salmonella*, ανεξαρτήτως του επιπέδου ανθεκτικότητάς της στα αντιβιοτικά (Mayaud et al. 2008). Τα παρόντα ευρήματα δείχνουν την προοπτική μιας ευρύτερης υιοθέτησης των αιθέριων ελαίων ως ενδεχόμενη εναλλακτική λύση στα κοινά αντιμικροβιακά, κυρίως όταν χρησιμοποιούνται ως αυξητικοί παράγοντες. Ωστόσο, η θεραπευτική τους δράση στα ζώα, όταν η χορήγηση γίνεται *per os*, μένει να αποδειχθεί, ενώ περαιτέρω έρευνες απαιτούνται για τον προσδιορισμό της ελάχιστης χορηγούμενης δόσης, όσον αφορά την τοξικότητα και την πιθανή διατάραξη της μικροχλωρίδας του εντέρου, που θα μπορούσε να προκληθεί. Γενικά, απαιτείται η τυποποίηση της μεθοδολογίας εκτίμησης της θεραπευτικής δράσης των αιθέριων ελαίων, όπως έχει γίνει για τα αντιβιοτικά.

#### **4.5 Προβλήματα που προέκυψαν κατά τη διάρκεια της απομόνωσης και του βιοχημικού χαρακτηρισμού των Εντεροβακτηριοειδών**

Το ISO 6579:2002 (Annex D), μια διεθνώς αποδεκτή μέθοδος για την ανίχνευση των *Salmonella* spp., χρησιμοποιήθηκε για την απομόνωση αυτών από σφάγια χοίρων. Κατά την εφαρμογή του πρωτοκόλου διαπιστώθηκαν διάφορες αποκλίσεις, που απαιτούν συζήτηση με σκοπό τη βελτίωση της ειδικότητας της μεθόδου. Προς την επίτευξη αυτού του σκοπού είναι διαθέσιμη μια μεγάλη ποικιλία χρωμογόνων υποστρωμάτων, στα οποία τα *Salmonella* spp. παράγουν χαρακτηριστικές αποικίες (Perry et al. 1999, Manafi 2000, Schönbrücher et al. 2008). Όμως, με εξαίρεση το XLD, τα υπόλοιπα εξ' αυτών είναι ενδοεργαστηριακές επιλογές και όχι υποχρεωτικό μέρος του ISO. Επιπλέον, ο ορότυπος

μπορεί να επηρεάσει τη φαινοτυπική εμφάνιση των αποικιών ακόμη και σε αυτά τα υποστρώματα, γεγονός που μπορεί να οδηγήσει σε εσφαλμένα συμπεράσματα (Ruiz et al. 1996) ή σε μη διαχειρίσιμη αύξηση των απομονώσεων του ίδιου στελέχους. Έτσι, η τεχνική καλλιέργειας, τα επιλεγμένα υποστρώματα ως συνέχεια του ISO και η εμπειρία του μικροβιολόγου, ο οποίος θα αποφασίσει για την τύχη μιας ύποπτης αποικίας, είναι καθοριστικοί παράγοντες επιτυχίας (OIE 2010).

#### 4.5.1 Ευαισθησία υποστρωμάτων

Τέτοιου είδους προβλήματα προέκυψαν και κατά τη δική μας διερεύνηση της σαλμονέλλωσης του χοίρου, επιβεβαιώνοντας ότι καμία μέθοδος καλλιέργειας δεν είναι η καλύτερη δυνατή για την ανάκτηση όλων των οροτύπων εξ' αρχής (Davies et al. 2000b, Jensen et al. 2003, Osumi et al. 2003, Pangloli et al. 2003, Korsak et al. 2004, Champagne et al. 2005, Mejia et al. 2005, Rostagno et al. 2005), αφού υπάρχουν ορότυποι οι οποίοι εμφανίζουν το βιοχημικό προφίλ άλλων Εντεροβακτηριακών π.χ. της *E. coli*, που απαιτούν χρήση πρόσθετων υποστρωμάτων. Αυτό συνέβη στην περίπτωση των οροτύπων *S. enterica* subsp. *enterica* ser. 6,7:k:- και *S. Cerro* (Πίνακας 3.11). Όσο περισσότερο χρησιμοποιούνται τα διάφορα νεοπροτεινόμενα θρεπτικά υποστρώματα, τόσο περισσότερο διαφαίνεται ότι ορισμένα αποδίδουν καλύτερα (Love & Rostagno 2008). Αυτές οι διαφορές μπορεί να εξαρτώνται από το είδος του δείγματος (π.χ. τρόφιμα, ζωοτροφές, περιττώματα, περιβαλλοντικές πηγές) ή μπορεί να είναι αποτέλεσμα του οροτύπου (Love & Rostagno 2008).

Κατά συνέπεια, η πραγματική διαγνωστική ευαισθησία οποιασδήποτε συγκεκριμένης μεθόδου προσδιορίζεται με περισσότερη ακρίβεια όσο αυξάνει η χρήση της. Επί παραδείγματι, έχει αποδειχθεί η μεγαλύτερη ικανότητα ανάκτησης των *Salmonella* spp. από κόπρανα χοίρων με τη χρήση του MSR<sub>V</sub>, το οποίο αναστέλλει την ανάπτυξη συγγενών βακτηριακών γενών, ενώ αναδεικνύει τις κινητές σαλμονέλλες, μετά από καλλιέργεια σε εκλεκτικά μέσα, όπως τα XLD και BGA, αφού περιορίζει σημαντικά την εγγενή μικροχλωρίδα (Voogt et al. 2001, Pangloli et al. 2003, Eriksson & Aspan 2007). Αυτός ο περιορισμός καθιστά το MSR<sub>V</sub>, με 96% ευαισθησία σε φυσικά επιμολυσμένα δείγματα τροφίμων, πιο ευαίσθητο εκλεκτικό μέσο από το RVS (De Zutter

et al. 1991). Στην παρούσα μελέτη, 47 από τα 615 (7,64%) τρυβλία MSRV από δείγματα ιστών και 27 από τα 378 (7,1%) περιβαλλοντικά δείγματα, τα οποία στη συνέχεια επιβεβαιώθηκε ότι έφεραν *Salmonella*, εμφάνισαν εξάπλωση του παθογόνου στο ημίρρευστο MSRV, που του προσέδωσε λευκωπή χροιά χαρακτηριστικό του ερπυσμού της *Salmonella* στο MSRV (Εικ. 1). Τα 504 από τα 615 δείγματα σφάγιου που εξετάστηκαν (82,08%) παρήγαγαν ζώνες θολερότητας διαφόρων διαμέτρων, αλλά μόνο εννέα ταυτοποιήθηκαν ως ενοφθαλμισμένα με *Salmonella*. Τα υπόλοιπα 495 είχαν ευνοήσει την ανάπτυξη συγγενών βακτηριακών γενών. Έτσι, η ειδικότητα του MSRV για τα *Salmonella* spp. αποδείχθηκε μικρότερη από την αναμενόμενη (80,48% ψευδώς θετικά αποτελέσματα), καθιστώντας τις συμπληρωματικές δοκιμές υποχρεωτικές και ταυτόχρονα πιο επίπονες και δαπανηρές, ώστε τελικά να διαφοροποιηθούν τα *Salmonella* spp. από μικροοργανισμούς που ανήκαν σε άλλα γένη. Ισώς αυτό να οφειλόταν στην υπερανάπτυξη της ανταγωνιστικής χλωρίδας κατά το στάδιο του προεμπλουτισμού. Επομένως, είναι αναγκαία η βελτιστοποίηση αυτού του σταδίου, ανάλογα με το μικροβιακό φορτίο του δείγματος, το οποίο αποτελεί ένα κρίσιμο βήμα. Σε αυτό το στάδιο πρέπει να βρεθεί τρόπος που ενισχύει την ανάκτηση των «τραυματισμένων» ή αργά αναπτυσσόμενων salmonellae, αναστέλλοντας την υπερανάπτυξη των ανταγωνιστικών μικροοργανισμών.

Αξιοσημείωτο είναι ότι, έγινε ανάκτηση τριών επιπλέον στελεχών *Salmonella* από σφάγια απ' ευθείας από την καλλιέργεια του μη εκλεκτικού προεμπλουτισμού (BPW). Δηλαδή χωρίς τη χρήση του MSRV. Μάλιστα όταν η καλλιέργεια BPW αυτών των τριών στελεχών ενοφθαλμίστηκε σε MSRV, το υπόστρωμα δεν επέτρεψε την ανάπτυξη του παθογόνου. Επειδή η αναμενόμενη απομόνωση του παθογόνου είναι χαμηλή ποσοστιαία, τέτοια προβλήματα μειώνουν την ευαισθησία και ειδικότητα του υποστρώματος. Άρα, στο σύνολο των 59 οροταυτοποιηθέντων στελεχών από σφάγια, τα τρία αυτά στελέχη μείωσαν την ειδικότητα του υποστρώματος κατά 5,1%. Φαίνεται ότι στην ιδανική περίπτωση, για τη μέγιστη πιθανότητα ανίχνευσης, απαιτείται ο συνδυασμός μη εκλεκτικού και εκλεκτικού εμπλουτισμού με απ' ευθείας ενοφθαλμισμό σε στερεά εκλεκτικά υποστρώματα, κάτι που συνήθως δεν είναι εφικτό στην καθημερινή πρακτική κατά το χειρισμό μεγάλου αριθμού δειγμάτων. Επίσης, τέσσερα στελέχη *Salmonella* έδειξαν πολύ μικρή έως ενδιάμεση ανάπτυξη στο MSRV, εκδήλωση όχι

χαρακτηριστική των *Salmonella* spp. Αυτές οι καλλιέργειες θα μπορούσαν εύκολα να απορριφθούν ως αρνητικές για *Salmonella* και έτσι τα αντίστοιχα στελέχη θα είχαν χαθεί, αν δε γινόταν περαιτέρω διερεύνησή τους.

Η επιλογή του/των εκλεκτικών στερεών υποστρωμάτων επηρεάζει σημαντικά την ικανότητα ανάκτησης του παθογόνου. Η εδώ μελέτη επιβεβαίωσε την ικανότητα ενός σημαντικού αριθμού διαφορετικών οροτύπων *Salmonella* να αναπτύσσονται στα XLD, SS, BG και SCA, αλλά κατέδειξε ότι κάποια στελέχη δεν θα μπορούσαν να ανιχνευθούν ως τυπικές αποικίες σε καθένα από τα στερεά εκλεκτικά υποστρώματα που χρησιμοποιήθηκαν. Συγκεκριμένα, εκτός από την περίπτωση τριών σπάνιων οροτύπων *Salmonella*, τους *S. enterica* subsp. *enterica* ser. 6,14,25: - : 1,2, *S. enterica* subsp. *houtenae* 40:g,t:- και *S. enterica* subsp. *salamae* 38:b:1,2 οι οποίοι είχαν την εμφάνιση διαφανών αποικιών στο SCA (Εικόνα 2), αυτό φάνηκε να είναι πιο ειδικό από τα XLD, SS, BGA και TSI. Αρκετά «κλασικά» υποστρώματα, όπως το BGA, είναι σχετικά μη ειδικά, συνεπώς είναι δυσκολότερο να αξιολογηθούν, καθώς αποδίδουν πολλά ψευδώς θετικά αποτελέσματα (π.χ. *Citrobacter*, *Proteus*), εξαιτίας του υψηλού ποσοστού παρουσίας ανταγωνιστικής χλωρίδας και των ελάχιστων χαρακτηριστικών αποικιών *Salmonella* (Manafi 2000). Αυτό συνεπάγεται περιττό φόρτο εργασίας για την εξέταση των «ύποπτων» αποικιών, καθώς και αύξηση του εργαστηριακού κόστους. Η σύγκριση των τρυβλίων από XLD και BGA έχει δείξει ότι το XLD είναι ανώτερο του BGA, χάρη στη μεγαλύτερη εκλεκτικότητά του (Bauwens et al. 2006, Koyuncu & Haggblom 2009), κάτι που συμφωνεί και με τα αποτελέσματα της δικής μας έρευνας.

Αν και η χρήση των χρωμογόνων υποστρωμάτων καθιστά ευκολότερη την αναγνώριση των salmonellae, ακόμη και αυτά μπορεί να αποδειχθούν ανεπαρκή στην περίπτωση αναγνώρισης σπανιότερων οροτύπων *Salmonella*, οι οποίοι παρουσιάζουν κάποιες ιδιαιτερότητες, όπως συνέβη στην παρούσα μελέτη. Παρά το γεγονός ότι αυτοί οι ορότυποι είναι πολύ σπάνιοι ή δεν απαντώνται καθόλου σε λοιμώξεις του ανθρώπου ή των ζώων, θα πρέπει να διερευνώνται, ώστε οι επιδημιολογικές επιπτώσεις τους να μπορούν να αξιολογηθούν μέσα στον χρόνο. Έτσι, οι μέθοδοι καλλιέργειας μπορεί να ανακτούν συγκεκριμένους οροτύπους *Salmonella* επιλεκτικά, γεγονός που οδηγεί στη μεροληπτική αξιολόγηση της αποδόσεώς τους, η οποία γίνεται με βάση τον επικρατέστερο ορότυπο ενός δεδομένου δείγματος (Rostagno et al. 2005). Όπως



διαφαίνεται από τον Πίνακα 3.11, συνολικά εννέα (15,2%) εκ των 59 οροταυτοποιηθέντων στελεχών *Salmonella* από σφάγια χοίρων θα μπορούσαν να «χαθούν», αν δεν είχαν εφαρμοστεί όλες αυτές οι βιοχημικές δοκιμασίες.

Από την άλλη μεριά, μπορεί να γίνει εύκολα σύγκριση των *Salmonella* spp. με Gram-αρνητικά στελέχη ειδών, όπως τα *E. coli*, *Citrobacter freundii*, *Trabulsiella guamensis* και *Klebsiella ozanae*, λόγω της βιοχημικής συμπεριφοράς και της φαινοτυπικής εμφάνισης των τελευταίων στα μέσα που χρησιμοποιήθηκαν (Evangelopoulou et al. 2015b).

Οι ανωτέρω παρατηρήσεις υποδεικνύουν τη σημασία καταστολής των ανταγωνιστικών βακτηρίων στο αρχικό δείγμα, πράγμα που θα επιτρέψει την αύξηση του επιπέδου ανίχνευσης των *Salmonella* spp. ακόμη και από τα κοινά υποστρώματα. Παρόλο που η παράλληλη χρήση πολλών εκλεκτικών μέσων εξασφαλίζει αξιόπιστα αποτελέσματα, αυξάνει δυστυχώς το εργαστηριακό κόστος ανά δείγμα, καθώς και τον φόρτο εργασίας. Συνεπώς, τα συμβατικά εκλεκτικά υποστρώματα εξακολουθούν να είναι σημαντικά, λόγω αρκετών πλεονεκτημάτων τους σε σχέση με τα χρωμογόνα, όπως η σχέση κόστους-αποτελεσματικότητας, η ευκολία χρήσης και η εξοικείωση των χρηστών σε αυτά. Βέβαια, η χρήση δύο εκλεκτικών υποστρωμάτων με διαφορετικές εκλεκτικές και διαφοροποιητικές ιδιότητες, καθώς και η εμπειρία του εργαστηριακού προσωπικού μπορούν να συνεισφέρουν στην ανίχνευση άτυπων στελεχών *Salmonella*, όπως των λακτόζη θετικών, τα οποία στις περισσότερες περιπτώσεις «χάνονται» στα αρχικά στάδια μικροβιολογικής εξέτασης. Μολονότι η πρακτική αυτή δεν μπορεί να δικαιολογηθεί για σκοπούς επιτήρησης, λειτουργεί εάν ο στόχος είναι να μεγιστοποιηθεί η δυνατότητα ανίχνευσης των σημαντικών ζωονοσογόνων στελεχών (Carrique-Mas & Davies 2008). Αναμφίβολα, απαιτούνται περαιτέρω μελέτες αξιολόγησης της φαινοτυπικής εμφάνισης περισσότερων οροτύπων *Salmonella* σε στερεά υποστρώματα, ώστε να γίνει εκτίμηση και των προεμπλουτιστικών μεθόδων.

#### 4.5.2 *Salmonella* spp. λακτόζη θετικά

Ενδιαφέρον παρουσιάζουν τα λακτόζη θετικά στελέχη του γένους *Salmonella*, τα οποία στα υποστρώματα XLD, BG και SS μοιάζουν φαινοτυπικά (Πίνακας 3.10) με *Escherichia coli*. Η ζύμωση της λακτόζης χρησιμοποιείται ως βασική βιοχημική δοκιμή διαφοροποίησης της *Salmonella* από άλλα εντεροβακτηριακά. Ήδη από το 1887, ήταν γνωστό ότι η *E. coli* ζυμώνει τη λακτόζη, ενώ η *Salmonella* όχι. Ως εκ τούτου, τα περισσότερα εκλεκτικά υποστρώματα που χρησιμοποιούνται σήμερα για την απομόνωση της *Salmonella*, όπως τα XLD, SS και BG, περιέχουν λακτόζη. Ωστόσο, έχει αναφερθεί πριν πολλές δεκαετίες ότι ένα μικρό ποσοστό (περίπου 1%) των *Salmonella* spp. ζυμώνουν τη λακτόζη (Ewing 1986). Όμως, η πραγματική συχνότητα εμφάνισης των λακτόζη θετικών (lac +) στελεχών είναι άγνωστη, αφού διαφεύγουν στα περισσότερα εργαστήρια της αρχικής απομόνωσης (Falcao et al. 1975). Οι πρώτες αναφορές ύπαρξης lac + σαλμονελλών, συμπεριλαμβανομένων στελεχών του οροτύπου Typhimurium, έγιναν στις αρχές του εικοστού αιώνα (Rokey & Mecca 1972, Blackburn & Ellis 1973, Johnston & Jones 1976). Έκτοτε, είναι προφανές ότι πρέπει να αναγνωρίζεται η παρουσία τους στους πληθυσμούς των ζώων, διότι επηρεάζει τα ποσοστά μόλυνσης. Τα παραγωγικά ζώα ξενιστές αποτελούν δυνητικό τροφιμογενές πρόβλημα για την υγεία του καταναλωτή και τα πραγματικά επίπεδα μόλυνσής τους επηρεάζουν τις αποφάσεις ελέγχου του παθογόνου.

Κάποιες από τις αποικίες που εξετάστηκαν στη διερεύνησή μας, δεν ήταν προς επιλογή κατά τη διαδικασία διαγνωστικής ρουτίνας για τον έλεγχο εντεροπαθογόνων, επειδή αυτές οι αποικίες δεν διαφοροποιούνται στα αρχικά υποστρώματα από τις τυπικές lac+ *E. coli*. Βέβαια, αν είχαν καλλιεργηθεί σε TSI, θα μπορούσαν να θεωρηθούν ως «ύποπτες», μόνο λόγω της παραγωγής H<sub>2</sub>S. Γνωρίζοντας, όμως, ότι και κάποια στελέχη *E. coli* παράγουν H<sub>2</sub>S (Darland & Davies 1974), υπάρχει πάλι η πιθανότητα μη επιλογής τους. Όμως, αυτά τα βιοχημικώς «αποκλίνουντα» στελέχη επηρεάζουν τα ποσοστά μόλυνσης αν δεν απομονώνονται επιτυχώς ή δεν ταυτοποιούνται σωστά. Επειδή δε, όλα τα υποστρώματα που χρησιμοποιούνται στην ανίχνευση των *Salmonella* spp. περιέχουν λακτόζη, μόνη η παραγωγή H<sub>2</sub>S στο TSI πρέπει να λαμβάνεται ως ύποπτη ένδειξη.

Ψευδώς αρνητικά αποτελέσματα μπορεί επίσης να προκύψουν, όταν η δράση των lac + σαλμονελλών συγχέεται από την ανάπτυξη άλλων βακτηρίων, όπως τα *Klebsiella*

spp, που συνυπάρχουν σε κλινικά δείγματα και φέρουν το οπερόνιο της λακτόζης σε ένα πλασμίδιο ή στο χρωμόσωμα (MacDonald & Riley 1983, Patrick et al. 2000), εμφανιζόμενα φαινοτυπικώς ως lac + σαλμονέλλες. Η ακριβής γνώση των βιοχημικών ιδιοτήτων στελεχών του γένους *Salmonella* που ζυμώνουν τη λακτόζη επιτρέπει τη συμπλήρωση των χρησιμοποιούμενων, μέχρι σήμερα, διαγνωστικών σχημάτων με πρόσθετες δοκιμές, οι οποίες επιτρέπουν τη διαφοροποίησή τους από τα άλλα lac + μέλη της οικογένειας των Enterobacteriaceae.

#### 4.5.3 Ο ρόλος του H<sub>2</sub>S στην απομόνωση *Salmonella* spp. από τα ζώα

Η ικανότητα των μικροοργανισμών να παράγουν H<sub>2</sub>S αποτελεί σημαντικό κριτήριο ταξινόμησης της οικογένειας των Enterobacteriaceae, με τα *Citrobacter* spp., *Proteus* spp. και *Salmonella* spp. να θεωρούνται τα κύρια γένη που παράγουν H<sub>2</sub>S. Το H<sub>2</sub>S είναι ένα πολύ τοξικό στοιχείο για τα κύτταρα των θηλαστικών και ίσως, βοηθάει τα βακτήρια που το παράγουν να αποικούν ή να καταστρέφουν ιστούς, παίζοντας έτσι σημαντικό ρόλο στην ανάπτυξη της γαστρεντερίτιδας και της ελκωτικής κολίτιδας (Barret & Clark 1987, Levitt et al. 1999). Η τοξικότητα του H<sub>2</sub>S για τα κύτταρα των θηλαστικών είναι συγκρίσιμη με αυτή της κυανιδίνης, όταν η LD50 προσδιορίζεται χρησιμοποιώντας τρωκτικά. Περίπου το 97,7% των οροτύπων *Salmonella* spp., εκτός από τους Choleraesuis και Typhi, παράγουν H<sub>2</sub>S (Ewing 1986). Απώλεια της ικανότητας παραγωγής H<sub>2</sub>S παρατηρείται σε περιβαλλοντικά στελέχη *Salmonella* spp. τα οποία προκύπτουν, πιθανώς, από μεταλλάξεις (Lannigan & Hussain 1993, Sasahara et al. 1997). Μια άλλη πιθανότητα αρνητικού ευρήματος είναι η εξουδετέρωση του παραγόμενου H<sub>2</sub>S από οξέα που παράγονται κατά τη διάρκεια της ζύμωσης των σακχάρων στα ευρέως χρησιμοποιούμενα υποστρώματα. Κάποιοι δε ερευνητές (Clarke 1953, Barret & Clark 1987, Rambach 1990) υποστηρίζουν ότι τέτοια στελέχη αποκτούν την ικανότητα παραγωγής ενζύμων ελέγχου του ρυθμού παραγωγής H<sub>2</sub>S. Το τελευταίο ενισχύεται και από ευρήματα που δείχνουν ότι σε κάποιες περιπτώσεις η ικανότητα παραγωγής H<sub>2</sub>S εξαρτάται από πλασμίδιο (Orskov I & Orskov F 1973, Burkardt et al. 1978, Magalhies & Veras 1977, Lautrop et al. 1979), του οποίου η φύση διαφέρει από στέλεχος σε στέλεχος.

Με γνώση των ανωτέρω, στην παρούσα μελέτη έγινε μια προσπάθεια διερεύνησης της επίδρασης άλλων βακτηρίων στην έκφραση της παραγωγής  $H_2S$ . Δηλαδή έγινε διερεύνηση της πιθανότητας η συνύπαρξη με άλλα εντεροβακτήρια να επηρεάζει τη φαινοτυπική εικόνα των σαλμονελλών στα εκλεκτικά υποστρώματα. Δοκιμάστηκαν πέντε (5) στελέχη σαλμονελλών λακτόζη θετικών σε συνύπαρξη με τρία (3) *E. coli*, που ήταν  $H_2S$  αρνητικά όταν καλλιεργήθηκαν μεμονωμένα στα XLD και SS. Τα  $H_2S$  αρνητικά στελέχη *Salmonella* και *E. coli* βρέθηκε ότι παρήγαγαν  $H_2S$  όταν συγκαλλιεργήθηκαν με τυπικά στελέχη *Salmonella*, που χαρακτηρίζονταν από έντονη παραγωγή  $H_2S$  (Πίνακας 3.10). Αυτό το εύρημα δείχνει τις πιθανές αστοχίες στην αναγνώριση παθογόνων οροτύπων *Salmonella* spp. με βάση το κριτήριο παραγωγής  $H_2S$ , αλλά και την αύξηση της παθογένειας του ίδιου ή άλλων εντεροβακτηριδίων λόγω συνέργειας.



# ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ

Σε πολλές χώρες της ΕΕ έχουν εφαρμοστεί εθνικά συστήματα ελέγχου των σαλμονελλώσεων των ζώων, προκειμένου να προστατευθεί ο καταναλωτής. Η επιτήρηση των *Salmonella* spp. σε όλα τα διαφορετικά στάδια της τροφικής αλυσίδας (στην εκτροφή, στο σφαγείο, κατά την επεξεργασία και πώληση) συνιστά σημαντικό στοιχείο διερεύνησης της επιδημιολογίας των τροφιμογενών σαλμονελλώσεων, απαραίτητο για την ανάπτυξη και εφαρμογή αποτελεσματικών στρατηγικών ελέγχου του παθογόνου, και είναι στενά συνδεδεμένη με την εφαρμογή αξιόπιστων μεθόδων εργαστηριακής απομόνωσης, αναγνώρισης και ταυτοποίησης.

Η παρούσα μελέτη έδειξε ότι:

1. Οι υποκλινικά μολυσμένοι χοίροι επιβεβαιώνονται ως φορείς μόνο μετά τη μικροβιολογική εξέταση δειγμάτων πολλαπλών σημείων του σφάγιου. Αυτή η μεθοδολογία διερεύνησης δεν εφαρμόζεται συστηματικά, ενώ δεν έχει ουδέποτε εφαρμοστεί στην Ελλάδα. Αποτέλεσμα της εφαρμογής της είναι να απομονωθεί στην παρούσα διερεύνηση ένας μεγάλος αριθμός οροτύπων, σημαντικών για τη Δημόσια Υγεία, επιβεβαιώνοντας τον χοίρο ως σημαντική πηγή μόλυνσης του ανθρώπου. Μεταξύ αυτών αναγνωρίστηκαν σημαντικά ζωνοτικά στελέχη, όπως μονοφασικά στελέχη της *S. Typhimurium*, καθώς και άλλα που ανήκουν σε σπανιότερα υποείδη του γένους *Salmonella*, τα οποία πιθανόν να εξελιχθούν σε παθογόνα του χοίρου, αποτελώντας τελικά κίνδυνο για τους καταναλωτές. Οι ορότυποι *Salmonella* spp., που εμμένουν στους ιστούς αυτών των χοίρων τους καθιστούν πηγή μόλυνσης άλλων ζώων, των σφάγιων και του περιβάλλοντος του σφαγείου, με κατάληξη τον καταναλωτή. Αυτά τα επιδημιολογικά γεγονότα είναι τα ίδια τόσο για τους ευρύτερα διαδεδομένους όσο και για τους λιγότερο απαντώμενους οροτύπους. Επιπλέον, ο τρόπος συλλογής των δειγμάτων και τα συνολικά αποτελέσματα έδειξαν ότι η διαδικασία σφαγής δεν αποτελούσε σημαντική πηγή διασταυρούμενης μόλυνσης του σφάγιου, δηλαδή ότι ο κίνδυνος για τον καταναλωτή προέρχεται από το ίδιο το ζώο που φέρει τον μικροοργανισμό σε κάποιο ιστό του.

2. Το υποείδος *Salmonella enterica* subsp. *arizonae*, το οποίο σχετίζεται κυρίως με τα ψυχρόαιμα ζώα, αναφέρεται για πρώτη φορά ότι απομονώνεται από χοίρους. Το εύρημα δηλώνει τη δυναμική της προσαρμοστικότητας του συγκεκριμένου υποείδους, το οποίο κάτω από εκλεκτική πίεση επιλογής μπορεί να προσαρμοστεί σε έναν νέο ξενιστή,

όπως είναι ο χοίρος, με σημαντικές μακροπρόθεσμες επιπτώσεις. Μια τέτοια προσαρμογή καθιστά τον χοίρο και το κρέας του πιθανή πηγή μόλυνσης του ανθρώπου, δίνοντας νέες προοπτικές διερεύνησης της συγγένειας σπάνιων υποειδών και οροτύπων, όπως του υποείδους *S. arizonae*, με τις λοιμώξεις ανθρώπων και ζώων.

3. Η δειγματοληψία πολλαπλών σημείων ανέδειξε τη χοληδόχο κύστη ως σημείο εντοπισμού οροτύπων *Salmonella* spp. σημαντικών για τη Δημόσια Υγεία, όπως είναι οι μονοφασικοί τύποι του οροτύπου Typhimurium. Η παρουσία *Salmonella* spp. στη χοληδόχο κύστη του χοίρου, αν και δεν έχει αναφερθεί προηγουμένως, την καθιστά σημαντικό παράγοντα κινδύνου για τη Δημόσια Υγεία. Συνεπώς, εφίσταται η προσοχή αποφυγής επιμόλυνσης των σφάγιων κατά τη διαδικασία του εκσπλαγχιισμού όχι μόνο λόγω της ακούσιας διάτρησης των εντέρων, αλλά και της χοληδόχου κύστης.

4. Η άσκοπη χρήση αντιβιοτικών στην εκτροφή χοίρων στην Ελλάδα φαίνεται ότι είναι ένας σημαντικός παράγοντας της εμφάνισης μεγάλων ποσοστών ανθεκτικότητας των απομονωθέντων στελεχών σε κοινές, αλλά «Υψηλής Σημαντικότητας για την Ανθρώπινη Υγεία Αντιμικροβιακές Ουσίες». Η αντιβιοαντοχή που παρατηρήθηκε καταδεικνύει σαφώς τη δυναμική εξέλιξη της απάντησης των μικροοργανισμών στο εχθρικό περιβάλλον των αντιβιοτικών. Τα παραγωγικά ζώα, αποτελούν σημαντική δεξαμενή αντιβιοανθεκτικών στελεχών, που επηρεάζουν την παραγωγή, αλλά και αποτελούν πηγές μόλυνσης του ανθρώπου. Συνεπώς, οι Έλληνες παραγωγοί οφείλουν να αλλάξουν τη διαχειριστική τακτική των ζώων τους, ώστε να μειωθούν οι ενδεχόμενοι κίνδυνοι. Μεταξύ των πιθανών προσεγγίσεων είναι και η χρήση αιθέριων ελαίων για την αντιμετώπιση ή πρόληψη της μόλυνσης από *Salmonella* spp. Η σύγκριση της αντιμικροβιακής δράσης αιθέριων ελαίων και ευρέως χρησιμοποιούμενων αντιμικροβιακών ουσιών αποκάλυψε ότι τα πρώτα έχουν καλύτερη δράση στον έλεγχο των παθογόνων στελεχών *in vitro*, άρα θα μπορούσαν να χρησιμοποιηθούν στην πρόληψη της μόλυνσης, αν βελτιστοποιηθούν οι τρόποι χορήγησής τους.

5. Η παρουσία άτυπων στελεχών *Salmonella*, όπως των λακτόζη θετικών ή άλλων Εντεροβακτηριακών που μοιάζουν με τα *Salmonella* spp. στην καλλιέργεια, συντελούν στη μείωση της ειδικότητας και ευαισθησίας του χρησιμοποιούμενου ISO 6579:2002, αν εφαρμοστεί, χωρίς παρεκκλίσεις. Αποτέλεσμα είναι η μείωση των ποσοστών μόλυνσης

και η μη απομόνωση σπάνιων οροτύπων που μολύνουν τους χοίρους και θα πρέπει να θεωρούνται «νέο-αναδυόμενοι» όσον αφορά τη Δημόσια Υγεία.

6. Στην παρούσα μελέτη χρησιμοποιήθηκε μεγάλος αριθμός εκλεκτικών διαφοροποιητικών μέσων για να βελτιωθεί η ειδικότητα και η ευαισθησία των μέσων διαφοροποίησης των *Salmonella* spp., διότι διαπιστώθηκε η ανάγκη διαφοροποίησης του παθογόνου από άλλα γένη της οικογένειας των Enterobacteriaceae, όπως τα *Citrobacter* spp., με τα οποία παρουσιάζουν κοινά βιοχημικά και αρκετά αντιγονικά στοιχεία. Όμως, η επιλογή αυτή είναι χρονο- και κοστοβόρα για τα διαγνωστικά εργαστήρια. Άρα, επιβάλλεται η βελτιστοποίηση των εναρμονισμένων πρότυπων μεθόδων καλλιέργειας. Με το ISO 6579:2002 (Annex D) οι ερευνητικές μελέτες διερεύνησης του παθογόνου και οι κανονισμοί της ΕΕ έχουν ένα σημείο εκκίνησης για την εναρμόνιση των αποτελεσμάτων σε όλες τις χώρες της ΕΕ, όμως χρειάζεται περισσότερη δουλειά για την επικύρωση των αποτελεσμάτων διερεύνησης των σαλμονελλώσεων στα επιμέρους εργαστήρια της ΕΕ.

7. Οι υπάρχουσες βακτηριολογικές μέθοδοι για το σημαντικό παθογόνο *Salmonella* πρέπει να συνδυάζονται με νέες μοριακές τεχνικές που μπορούν να παράγουν αποτελέσματα πιο γρήγορα ή πιο αποτελεσματικά. Η υιοθέτηση αυτών των νέων μεθοδολογιών από τα συνήθη προγράμματα ελέγχου στα εργαστήρια παρακολούθησης των ζωνόσων πρέπει να βασίζεται σε έναν συμβιβασμό μεταξύ αυξημένης ευαισθησίας και ταχύτητας, ευκολίας χρήσης και οικονομικής ευχέρειας, καθώς και στην ένταξη ακόμη και ορισμένων «εξωτικών» οροτύπων *Salmonella* στην ομάδα-στόχο των μικροοργανισμών.

8. Παρόλο που και οι βακτηριολογικές μέθοδοι είναι πολύτιμες για τη διασφάλιση των τροφίμων, ως μέτρο παρουσίας της *Salmonella* σε επίπεδο εκτροφής, οι ορολογικές μέθοδοι μπορούν να θεωρηθούν ευαίσθητες και πρακτικές για στοχευμένη δειγματοληψία, παρέμβαση και εφαρμογή ορθών διαδικασιών κατά τη σφαγή. Στην παρούσα διερεύνηση η δοκιμή της ELISA έδειξε ότι η ευαισθησία της για τιμές cut-off 10, 20 και 40% ήταν 65,11%, 46,51% και 30,23% αντίστοιχα, ενώ η ειδικότητά της ήταν 43,75%, 66,25% και 85%. Συνεπώς, η ορολογική επιτήρηση της μόλυνσης με *Salmonella* των ελληνικών εκτροφών χοίρου θα μπορούσε να χρησιμοποιηθεί για την ανίχνευση εκτροφών υψηλού κινδύνου, βοηθώντας τους παραγωγούς να επιλέξουν τα



καταλληλότερα μέτρα ελέγχου για τη μείωση του κινδύνου και την εφαρμογή των Ευρωπαϊκών Κανονισμών. Μια ELISA προσαρμοσμένη στους οροτύπους που επικρατούν στην Ελλάδα, οι οποίοι θα καθοριστούν μετά από επιδημιολογικές διερευνήσεις, θα μπορούσε να είναι ένα χρήσιμο εργαλείο στην τιμή cut off OD 40% που επιτρέπει την εκτίμηση της αποτελεσματικότητας των μέτρων πρόληψης και ελέγχου στην πρωτογενή παραγωγή. Ειδικότερα, η ELISA θα μπορούσε να χρησιμοποιηθεί, κατ' αρχήν, στη μείωση της συχνότητας των οροθετικών χοιρομητέρων σε επίπεδο εκτροφής, ενώ ο ορολογικός έλεγχος και σε επίπεδο σφαγείου θα μπορούσε να συσχετίσει την προέλευση των οροθετικών χοίρων με τις αντίστοιχες χοιρομητέρες.

9. Τα αποτελέσματα της παρούσας διερεύνησης, μέσω των απομονώσεων του παθογόνου, αποτελούν απόδειξη μόλυνσης των εκτροφών με πολλούς οροτύπους, αποδεδειγμένα σημαντικούς στη μόλυνση των καταναλωτών, αλλά και σπανιότερους που είναι εν δυνάμει σημαντικοί. Καθίσταται, επομένως, επιτακτική η εφαρμογή μέτρων ελέγχου της σαλμονέλλωσης του χοίρου στην Ελλάδα. Αυτό μπορεί να επιτευχθεί με τη συνεχή επιτήρηση της συχνότητας εμφάνισης οροθετικότητας του παθογόνου στις ελληνικές χοιροτροφικές μονάδες, αλλά και με την προσπάθεια απομόνωσης του παθογόνου όχι μόνο από τα κόπρανα, αλλά και από ιστούς στους οποίους δείχνει τροπισμό.

10. Συνίσταται η άμεση σύσταση εθνικού προγράμματος διερεύνησης των πραγματικών ποσοστών μόλυνσης των σφάγιων μετά από δειγματοληψία πολλαπλών σημείων και η σύγκριση των αποτελεσμάτων με εμπορικές ELISA, ώστε να βρεθεί ο καταλληλότερος τρόπος επιτήρησης των σαλμονελλώσεων στις ελληνικές χοιροτροφικές μονάδες.

# **ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΚΕΣ ΠΗΓΕΣ**

1. Abbott SL, Ni FCY, Janda JM. 2012. Increase in extraintestinal infections caused by *Salmonella enterica* subspecies II–IV. *Emerging Infectious Diseases* 18, 637–639.
2. Agbaje M, Begum RH, Oyekunle MA, Ojo E, Adenubi OT. 2011. Evolution of *Salmonella* nomenclature: a critical note. *Folia Microbiol* 56, 497–503.
3. Alanis AJ. 2005. Resistance to antibiotics: Are we in the post-antibiotic era? *Archives of Medical Research* 36, 697-705.
4. Alban L, Stege H, Dahl J. 2002. The new classification system for slaughter-pig herds in the Danish *Salmonella* surveillance-and-control programme. *Preventive Veterinary Medicine* 53, 133-146.
5. Anon. 2003. Commission Regulation (EC) No 2160/2003 of the European Parliament and of the Council of 17 November 2003 on the control of Salmonella and other specified food-borne zoonotic agents. *Official Journal of the European Union*, L 325.
6. Anon. 2004. Annual Report on Zoonoses in Denmark 2003. Danish Zoonosis Centre, Copenhagen, Denmark, 31 pp.
7. Anon. 2005. Commission Regulation (EC) No 2073/2005 of November 2005 on microbiological criteria for foodstuffs. *Official Journal of the European Union* 338, –26.
8. Arrus KM, Holley RA, Ominski KH, Tenuta M, Blank G. 2006. Influence of temperature on *Salmonella* survival in hog manure slurry and seasonal temperature profiles in farm manure storage reservoirs. *Livestock Science* 102(3), 226–236.
9. Baggesen DL, Wegener HC, 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.

10. Baggesen DL and Christensen J. 1997. Distribution of *Salmonella enterica* serovars and phage types in Danish pigherds. In: Proceedings of the Second International Symposium on Epidemiology and Control of *Salmonella* in Pork, Copenhagen, Denmark, 20–22 August 1997, pp. 107–109.
11. Bahnson PB, Kim JY, Weigel RM, Miller GY, Troutt HF. 2005. Associations between on-farm and slaughter plant detection of *Salmonella* in market-weight pigs. *Journal of Food Protection* 68, 246-250.
12. Ball M, Magowan E, Taylor M, Bagdonaite G, Madden R. 2011. A review of current knowledge on *Salmonella* control on-farm and within the processing plant relevant to the Northern Ireland pig industry. Agri-Food and Bioscience Institute (AFBI): 45 pp.
13. Baptista FM, Dahl J, Nielsen LR. 2010. Factors influencing *Salmonella* carcass prevalence in Danish pig abattoirs. *Preventive Veterinary Medicine* 95, 231–238.
14. Barrett EL and Clark MA. 1987. Tetrathionate Reduction and Production of Hydrogen Sulfide from Thiosulfate. *Microbiological Reviews* 51, 192-205.
15. Baumer AJ, Tsolis RM, Heffron F. 2000. Virulence mechanisms of *Salmonella* and their genetic basis. In: Wray C and Wray A. (Eds.), *Salmonella* in domestic animals. CABI Publishing, New York, pp. 57-72.
16. Baumler AJ, Tsolis RM, Ficht TA, Adams LG. 1998. Evolution of host adaptation in *Salmonella enterica*. *Infection and Immunity* 66, 4579–4587.
17. Bauwens L, Vercammen F, Bertrand S, Collard JM, De Ceuster S. 2006. Isolation of *Salmonella* from environmental samples collected in the reptile department of Antwerp Zoo using different selective methods. *Journal of Applied Microbiology* 101, 284–289.
18. Baydar H, Sagdic O, Ozkan G, Karadogan T. 2004. Antibacterial activity and composition of essential oils from *Origanum*, *Thymbra* and *Satureja* species with commercial importance in Turkey. *Food Control* 15, 169–172.



19. Bento MHL, Ouwehand AC, Tiihonen K, Lahtinen S, Nurminen P, Saarinen MT, Schulze H, Mygind T, Fischer J. 2013. Essential oils and their use in animal feeds for monogastric animals – Effects on feed quality, gut microbiota, growth performance and food safety: a review. *Veterinari Medicina* 58(9), 449–458.
20. Berends BR, Van Knapen F, Snijders JM, Mossel DA. 1997. Identification and quantification of risk factors regarding *Salmonella* spp. on pork carcasses. *International Journal of Food Microbiology* 36(2–3), 199–206.
21. Bitar R. and Tarpley J. 1985. Intestinal perforation and typhoid fever: a historical and state-of-the-art review. *Review of Infectious Diseases* 7(2), 257-271.
22. Blackburn BO and Ellis EM. 1973. Lactose-fermenting *Salmonella* from dried milk and milk-drying plants. *Applied Microbiology* 26, 672–674.
23. Blaha T. 2001. “Pre-Harvest Food Safety as Integral Part of Quality Assurance Systems in the Pork Chain from Stable to Table.” Proceedings of the 4th International Symposium on the Epidemiology and Control of *Salmonella* and other Food Borne Pathogens in Pork. Leipzig, Germany, 2001, pp. 7-13
24. Bone A, Noel H, Le Hello, S, Pihier N, Danan C, Raguenaud ME, Salah S, Bellali H, Vaillant V, Weill FX, Jourdan-da Silva N. 2010. Nationwide outbreak of *Salmonella enterica* serotype 4,12:i:- infections in France, linked to dried pork sausage. *Euro Surveill* 2010;15(24):pii=19592.
25. Borman EK, Stuart CA, Wheeler K. 1944. Taxonomy of the family Enterobacteriaceae. *Journal of Bacteriology* 48, 351-67.
26. Boughton C, Egan J, Kelly G, Markey B, Leonard N. 2007. Rapid infection of pigs following exposure to environments contaminated with different levels of *Salmonella* Typhimurium. *Foodborne Pathogens and Disease* 4(1), 33–40.
27. Boyen F, Haesebrouck F, Maes D, Van Immerseel F, Ducatelle R, Pasmans F. 2008. Non-typhoidal *Salmonella* infections in pigs: A closer look at epidemiology, pathogenesis and control. *Veterinary Microbiology* 130, 1–19.

28. Brown JH. 1935. Theobald Smith 1859-1934. *Journal of Bacteriology* 30, 1-3.
29. Bugarel M, Vignaud ML, Moury F, Fach P, Brisabois A. 2012. Molecular identification in monophasic and nonmotile variants of *Salmonella enterica* serovar Typhimurium. *Microbiology Open* 1, 481–489.
30. Burch D. 2005. Problems of antibiotic resistance in pigs in the UK. *In Practice* 27, 37–43.
31. Burkardt HJ, Mattes R, Schmid K, Schmitt R. 1978. Properties of two conjugative plasmids mediating tetracycline resistance, raffinose catabolism, and hydrogen sulfide production by *Escherichia coli*. *Molecular and General Genetics MGG* 166, 75-84.
32. Butaye P, Michael GB, Schwarz S, Barrett TJ, Brisabois A, White DJ. 2006. The clonal spread of multidrug-resistant non-typhi *Salmonella* serotypes. *Microbes and Infection* 8, 1891–1897.
33. Canton R and Morosini MI. 2011. Emergence and spread of antibiotic resistance following exposure to antibiotics. *FEMS Microbiology Reviews* 35(5), 977-91.
34. Carlson AR and Blaha T. 2001. In-herd prevalence of *Salmonella* in 25 selected Minnesota swine farms. *Journal of Swine Health and Production* 9, 7–10.
35. Carrique-Mas JJ, Davies RH. 2008. Sampling and bacteriological detection of *Salmonella* in poultry and poultry premises: a review. *Revue scientifique et technique (International Office of Epizootics)* 27 (3), 665-677.
36. Carter PB and Collins FM. 1974. The route of enteric infection in normal mice. *Journal of Experimental Medicine* 139, 1189–1203.
37. Casal J, De Manuel A, Mateu E, Martin M. 2007. Biosecurity measures on swine farms in Spain: perceptions by farmers and their relationship to current on-farm measures. *Preventive Veterinary Medicine* 82, 138–150.

38. Cattelan MG, de Castilhos MBM, Sales PJP, Hoffmann FL. 2013. Antibacterial activity of oregano essential oil against foodborne pathogens. *Nutrition & Food Science* 43, 169–174.
39. CDC, Centers for Disease Control and Prevention. 2007. Investigation of outbreak of human infections caused by *Salmonella* serotype I 4,[5],12:i:\_. Centers for Disease Control and Prevention 2007, Atlanta, GA. (Available at: <http://www.cdc.gov/salmonella/4512eyeminus.html>.) (Accessed at 17 Apr 2015).
40. Champagne MJ, Ravel A, Daignault D. 2005, A comparison of sample weight and culture methods for the detection of *Salmonella* in pig feces. *Journal of Food Protection* 68, 1073–1076.
41. Chandra M, Singh BR, Shankar H, Agarwal M, Agrawal RK, Sharma G, Babu N. 2006. Study on prevalence of *Salmonella* infection in goats. *Small Ruminant Research* 65, 24-30.
42. Choffnes ER, Relman DA, Olsen L, Hutton R, Mack A. 2012. Improving Food Safety Through a One Health Approach Workshop Summary Institute of Medicine (US). Washington (DC): National Academies Press (US).
43. Chow EY, Wu JT, Jauho ES, Heegaard PM, Nilsson E, Harris IT, Manninen K. 2004. Evaluation of a covalent mix-enzyme linked immunosorbent assay for screening of *Salmonella* antibodies in pig serum. *Canadian Journal of Veterinary Research* 68(2), 134-9.
44. Clark TJ. 2015. Bacterial endotoxins [http://www.tjclarkdirect.com/bacterial\\_diseases/bacterial\\_endotoxins.htm](http://www.tjclarkdirect.com/bacterial_diseases/bacterial_endotoxins.htm). (Accessed 1 May 2015).
45. Clarke PH. 1953. Hydrogen Sulphide Production by Bacteria. *Journal of general Microbiology* 8, 397-407.

46. Clarke RC and Gyles CL. 1993. *Salmonella*. In: Gyles, CL and Thoen CO. (Eds.), Pathogenesis of Bacterial Infections in Animals, 2nd edn. Iowa State University Press, Ames, Iowa, pp. 133–153.
47. Clinical and Laboratory Standards Institute. 2011. Performance standards for antimicrobial susceptibility testing: twenty-first informational supplement. Approved standard. M 100-S21. Clinical and Laboratory Standards Institute, Wayne, PA.
48. Cowan and Steel's Manual for the Identification of Medical Bacteria. 3rd edition Edited by Barrow GI and Feltham RKA. 1993. Cambridge University Press. pp. 331.
49. Crosa JH, Brenner DJ, Ewing WH, Falkow S. 1973. Molecular relationships among the Salmonellae. *Journal of Bacteriology* 115, 307–315.
50. Daniels EM, Schneerson R, Egan WM, Szu SC, Robbins JB. 1989. Characterization of the *Salmonella* Paratyphi C Vi polysaccharide. *Infection and Immunity* 57, 3159-3164.
51. Darland G and Davis BR. 1974. Biochemical and serological characterization of hydrogen sulfide-positive variants of *Escherichia coli*. *Applied Microbiology* 27, 54-58.
52. Davies PR, Funk JA, Morrow WEM. 1999. Fecal shedding of *Salmonella* by a cohort of finishing pigs in North Carolina. *Journal of Swine Health and Production* 7, 231–234.
53. Davies PR, Funk J, Morrow WEM. 2000a. Fecal shedding of *Salmonella* by gilts before and after introduction to a swine breeding farm. *Journal of Swine Health and Production* 8(1), 25-28.
54. Davies PR, Turkson PK, Funk JA, Nichols MA, Ladely SR, Fedorka-Cray PJ. 2000b. Comparison of methods for isolating *Salmonella* bacteria from faeces of naturally infected pigs. *Journal of Applied Microbiology* 89, 169–177.



55. De Zutter L, De Smedt JM, Abrams R, Beckers H, Catteau M, de Borchgrave J, Debevere J, Hoekstra J, Jonkers F, Lenges J, Notermans S, Van Damme L, Vandermeersch R, Verbraeken R, Waes G. 1991. Collaborative study on the use of motility enrichment on modified semisolid Rappaport-Vassiliadis medium for the detection of *Salmonella* from foods. *International Journal of Food Microbiology* 13, 11–20.
56. Dlabac V, Trebichavsky I, Rehakova Z, Hofmanová B, Splíchal I, Cukrowska B. 1997. Pathogenicity and protective effect of rough mutants of *Salmonella* species in germ-free piglets. *Infection and Immunity* 65(12), 5238-5243.
57. Drapeau CM, Grilli E, Petrosillo N. 2010. Rifampicin combined regimens for gram-negative infections: data from the literature. *Int J Antimicrob Agents*. 35(1):39-44.
58. Dorman HJD and Deans SG. 2000. Antimicrobial agents from plants: antibacterial activity of plant volatile oils. *Journal of Applied Microbiology* 88, 308–316.
59. Edwards PR, Fife MA, Ramsey CH. 1959. Studies on the Arizona group of *Enterobacteriaceae*. *Bacteriology Reviews* 23, 155-174.
60. EFSA. 2008. Report of the task force on zoonoses data collection on the analysis of the baseline survey on the prevalence of *Salmonella* in slaughter pigs, Part A. *EFSA Journal*, 135: 1-111.
61. EFSA. 2009. Joint opinion on antimicrobial resistance (AMR) focused on zoonotic infections. *EFSA Journal* 7(11):1372.
62. EFSA. 2010a. The community summary report on trends and sources of zoonoses and zoonotic agents and food-borne outbreaks in the European Union in 2008. *EFSA Journal* 1496, 1–288.

63. EFSA. 2010b. Scientific opinion on monitoring and assessment of the public health risk of “*Salmonella* Typhimurium-like” strains. EFSA Journal 8(10), 1–48 1826.
64. EFSA. 2011a. Analysis of the baseline survey on the prevalence of *Salmonella* in holdings with breeding pigs, in the EU, 2008. Part B: factors associated with *Salmonella* pen positivity. EFSA Journal 9(7):2329.
65. EFSA. 2011b. The European Union Summary Report on antimicrobial resistance in zoonotic and indicator bacteria from humans, animals and food in the European Union in 2009. EFSA Journal 9(7):2154.
66. EFSA. 2012a. Scientific report of EFSA and ECDC. The European union summary report on trends and sources of zoonoses, zoonotic agents and food-borne Outbreaks in 2010. EFSA Journal 10(3): 2597.
67. EFSA. 2012b. EFSA panel on biological hazards (BIOHAZ). Scientific opinion on an estimation of the public health impact of setting a new target for the reduction of *Salmonella* in turkeys. EFSA Journal 10(4): 2616, 89.
68. EFSA. 2013. SCIENTIFIC REPORT OF EFSA AND ECDC. The European Union Summary Report on Trends and Sources of Zoonoses, Zoonotic Agents and Food-borne Outbreaks in 2011. EFSA Journal 11(4), 3129.
69. EFSA (European Food Safety Authority) and ECDC (European Centre for Disease Prevention and Control). 2013. The European Union Summary Report on antimicrobial resistance in zoonotic and indicator bacteria from humans, animals and food in 2011. EFSA Journal 11(5):3196, 359.
70. EFSA and ECDC. 2014a. The European Union Summary Report on Trends and Sources of Zoonoses, Zoonotic Agents and Food-borne Outbreaks in 2012. EFSA Journal 12(2): 3547, 312.
71. EFSA AND ECDC. 2014b. SCIENTIFIC REPORT OF EFSA AND ECDC: The European Union Summary Report on antimicrobial resistance in zoonotic and

- indicator bacteria from humans, animals and food in 2012. *EFSA Journal* 2014;12(3):3590.
72. Eisenstein TK. 1998. Intracellular pathogens: the role of antibody-mediated protection in *Salmonella* infection [letter; comment]. *Trends in Microbiology* 6, 135–136.
73. Emborg HD, Baggesen DL, Aarestrup FM. 2008. Ten years of antimicrobial susceptibility testing of *Salmonella* from Danish pig farms. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy* 62, 360–363.
74. Eriksson E, Aspan A. 2007. Comparison of culture, ELISA and PCR techniques for salmonella detection in faecal samples for cattle, pig and poultry. *BMC Veterinary Research* 3:21. doi:10.1186/1746-6148-3-21.
75. European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing (EUCAST). Breakpoint tables for interpretation of MICs and zone diameters, version 3.1, 2013 [<http://www.eucast.org>].
76. Euzéby JP. 1999. Revised *Salmonella* nomenclature: designation of *Salmonella enterica* (ex Kauffmann and Edwards 1952) Le Minor and Popoff 1987 sp. nov., nom. rev. as the neotype species of the genus *Salmonella* Lignieres 1900 (approved lists 1980), rejection of the name *Salmonella choleraesuis* (Smith 1894) Weldin 1927 (approved lists 1980), and conservation of the name *Salmonella typhi* (Schroeter 1886) Warren and Scott 1930 (approved lists 1980). Request for an opinion. *International Journal of Systematic and Evolutionary Bacteriology* 49(2), 927–930.
77. Euzéby JP. 2010. List of Prokaryotic names with standing in nomenclature-Genus *Samonella*, [www.bacterio.cict.fr/s/salmonella.html](http://www.bacterio.cict.fr/s/salmonella.html), Accessed 7 July 2010
78. European Committee for Veterinary Medicinal Products. 1994. Chloramphenicol summary report. European Agency for the Evaluation of Medicinal Products (EMA). <http://www.emea.europa.eu/pdfs/vet/mrls/chloramphenicol.pdg>

79. Evangelopoulou G, Kritas S, Govaris A, Burriel AR. 2013. Animal salmonellosis: A brief review of “Host Adaptation and Host Specificity” of *Salmonella* spp. *Veterinary World* 6(10), 703-708.
80. Evangelopoulou G, Filioussis G, Kritas S, Christodoulopoulos G, Triantafyllou LA, Burriel AR. 2014a. Colonisation of pig gallbladders with *Salmonella* species important to public health. *Veterinary Record* (online first), doi: 10.1136/vr.102822.
81. Evangelopoulou G, Kritas S, Govaris A, Burriel AR. 2014b. Pork Meat as a Potential Source of *Salmonella enterica* subsp. *arizonae* Infection of Man. *Journal of Clinical Microbiology* 52, 741-744.
82. Evangelopoulou G, Kritas S, Christodoulopoulos G, Burriel AR. 2015a. The commercial impact of pig *Salmonella* spp. infections in border-free markets during an economic recession. *Veterinary World* 8(3), 257-272.
83. Evangelopoulou G, Filioussis G, Kritas S, Christodoulopoulos G, Kantere M, Burriel AR. 2015b. Isolation and Antimicrobial Testing of *Aeromonas* spp., *Citrobacter* spp., *Cronobacter* spp., *Enterobacter* spp., *Escherichia* spp., *Klebsiella* spp., and *Trabulsiella* spp. from the Gallbladder of Pigs. *Polish Journal of Microbiology* 64(2), 185-188.
84. Ewing WH. 1986. Differentiation of Enterobacteriaceae by biochemical reactions, In: Edwards and Ewing’s identification of the Enterobacteriaceae, 4th ed. Elsevier Science Publishing Co., Inc., New York, N.Y. p. 47–72.
85. Ewing HW. 1972. The nomenclature of *Salmonella*, its usage and definitions of the three species. *Canadian Journal of Bacteriology* 84, 1303-1312.
86. Falcao DP, Trabulsi LR, Hickman F, Farner JS. 1975. Unusual Enterobacteriaceae: lactose positive *Salmonella typhimurium* which is endemic in Sao-Paulo, Brazil. *Journal of Clinical Microbiology* 2, 349-353.



87. Falkow S and Mekalanos J. 1990. The enteric bacilli and vibrios. In: Davis B, Dulbecco R, Eisen H, Ginsberg H. (Eds.), *Microbiology*, 4th edn. Lippincott JB, Philadelphia, pp. 576–579.
88. FCC, Food Control Consultants Ltd Consortium. 2010. Analysis of the costs and benefits of setting a target for the reduction of *Salmonella* in slaughter pigs for European Commission Health and Consumers Directorate-General SANCO/2008/E2/036 Final Report. p 1-198.
89. FCC, Food Control Consultants Ltd Consortium. 2011. Analysis of the costs and benefits of setting a target for the reduction of *Salmonella* in breeding pigs for European Commission Health and Consumers Directorate-General SANCO/2008/E2/056 Final Report. p 1-91.
90. FDA. 2013. Guidance for Industry #213. Available at: <http://www.fda.gov/downloads/AnimalVeterinary/GuidanceComplianceEnforcement/GuidanceforIndustry/UCM299624.pdf>
91. Fedorka-Cray PJ, Whipp SC, Isaacson RE, Nord N, Lager K. 1994. Transmission of *Salmonella* Typhimurium to swine. *Veterinary Microbiology* 41, 333-344.
92. Fedorka-Cray PJ, Kelley LC, Stabel TJ, Gray JT, Laufer JA. 1995. Alternate routes of invasion may affect pathogenesis of *Salmonella* Typhimurium in swine. *Infection and Immunity* 63, 2658-2664.
93. Fedorka-Cray PJ, Gray JT, Wray C. 2000. *Salmonella* Infections in Pigs. In: Wray C and Wray A. (Eds.), *Salmonella* in Domestic Animals. CABI Publishing, New York, pp. 191-207.
94. Filioussis G, Petridou E, Johansson A, Christodoulopoulos G, Kritas SK. 2008. Antimicrobial susceptibility and genetic relatedness of *Salmonella enterica* subsp. *enterica* serovar Mbandaka strains, isolated from a swine finishing farm in Greece. *African Journal of Microbiology Research* 2 (11), 313-315.

95. Forshell LP and Wierup M. 2006. *Salmonella* contamination: a significant challenge to the global marketing of animal food products. Source: Revue Scientifique et Technique Office International des Epizooties. Volume 25 Issue 2: Pages 541-554, Published Aug 2006.
96. Frances CL, Ryan TA, Jones BD, Smith SJ Falkow S. 1993. Ruffles induced by *Salmonella* and other stimuli direct macropinocytosis of bacteria. Nature 364, 639–642.
97. Friendship RM, Mouchili A, McEwen S, Rajic A. 2009. Critical review of on-farm intervention strategies against *Salmonella*. BPEX/ZNCP.
98. Galan JE. 2001. *Salmonella* interactions with host cells: type III secretion at work. Annual Review of Cell and Developmental Biology 17, 53–86.
99. Galani I, Kontopidou F, Souli M, Rekatsina PD, Koratzanis E, Deliolanis J, Giamarellou H. 2008. Colistin susceptibility testing by Etest and disk diffusion methods. International Journal of Antimicrobial Agents 31, 434–439.
100. Garrido V, Sánchez S, San Román B, Zabalza-Baranguá A, Díaz-Tendero Y, de Frutos C, Mainar-Jaime RC, Grilló MJ. 2014. Simultaneous infections by different *Salmonella* strains in mesenteric lymph nodes of finishing pigs. BMC Vet. Res. 10:59.
101. Gavanjia S, Mohammadi E, Larki B, Bakhtari A. 2014. Antimicrobial and cytotoxic evaluation of some herbal essential oils in comparison with common antibiotics in bioassay condition. Integrative Medicine Research 3, 142–152.
102. Gebreyes WA, Thakur S, Morrow WE. 2006. Comparison of prevalence, antimicrobial resistance, and occurrence of multidrug-resistant *Salmonella* in antimicrobial-free and conventional pig production. Journal of Food Protection 69(4), 743–748.

103. Giannella RA, Broitman SA, Zamcheck N. 1972. Gastric acid barrier to ingested microorganisms in man: studies in vivo and in vitro. *Gut* 13, 251–56.
104. Gnardelis X. 2006. Data analysis with the SPSS 14.0 for windows. Athens: Papazisi Publications. [In Greek]
105. Gonzalez-Escobedo G and Gunn S. 2013. Gallbladder Epithelium as a Niche for Chronic *Salmonella* Carriage. *Infection and Immunity* 81, 2920-2930.
106. Goosney DL, Knoechel DG, Finlay BB. 1999. Enteropathogenic *E. coli*, *Salmonella*, and *Shigella*: Masters of host cell cytoskeletal exploitation. *Emerging Infectious Diseases* 5, 216–223.
107. Gorbach SL. 2001. Antimicrobial use in animal feed--time to stop. *The New England Journal of Medicine* 345, 1202-1203.
108. Gorton SJ, Kliebensten J, Beran G, Baum D. 2000. Economic analysis of *Salmonella* impacts on swine herds. Staff General Research Papers, Iowa State University, Department of Economics ASL-R1702.
109. Grafanakis E, Leontides L, Genigeorgis C. 2001. Seroprevalence and antibiotic sensitivity of serotypes of *Salmonella enterica* in Greek pig herds. *Veterinary Record* 148, 407-411.
110. Gray JT, Fedorka-Cray PJ, Stabel TJ. 1995. Ackermann MR. Influence of inoculation route on the carrier state of *Salmonella Choleraesuis* in swine. *Veterinary Microbiology* 47, 43–59.
111. Gray JT, Stabel TJ, Fedorka-Cray PJ. 1996. Effect of dose on the immune response and persistence of *Salmonella Choleraesuis* infection in swine. *American Journal of Veterinary Research* 57, 313-319.
112. Groisman EA and Ochman H. 1996. Pathogenicity islands: bacterial evolution in quantum leaps. *Cell* 87, 791–94

113. Grimont PAD, Weill FX. 2007. Antigenic formulae of the *Salmonella* serovars, 9th Edition, World Health Organization Collaborating Centre for Reference and Research on *Salmonella*. Institute Pasteur, Paris, France
114. Gustafson RH and Bowen. RE. 1997. Antibiotic use in animal agriculture. *Journal of Applied Microbiology* 83, 531-541.
115. Hald T, Wingstrand A, Swanenburg M, Von Altrock A, Thorberg BM. 2003. The occurrence and epidemiology of *Salmonella* in European pig slaughterhouses. *Epidemiology and Infection* 131(3), 1187-1203.
116. Harris IT, Fedorka-Cray PJ, Gray JT, Thomas LA, Ferris K. 1997. Prevalence of *Salmonella* organisms in swine feed. *Journal of the American Veterinary Medical Association* 210, 382-385.
117. Hauser E, Tietze E, Helmuth R, Junker E, Blank K, Prager R, Rabsch W, Appel B, Fruth, A, Malorny B. 2010. Pork Contaminated with *Salmonella enterica* Serovar 4,[5],12:i:, an Emerging Health Risk for Humans. *Applied and Environmental Microbiology* 76, 4601–4610.
118. Hedemann MS, Mikkelsen LL, Naughton PJ, Jensen BB. 2005. Effect of feed particle size and feed processing on morphological characteristics in the small and large intestine of pigs and on adhesion of *Salmonella enterica* serovar Typhimurium DT12 in the ileum in vitro. *Journal of Animal Science*. 83, 1554-1562.
119. Helms M, Ethelberg S, Molbak K. 2005. International *Salmonella* Typhimurium DT104 Infections, 1992-2001. *Emerging Infectious Diseases* 11, 859-867.
120. Hentges DJ. and Maier BR. 1970. Inhibition of *Shigella flexneri* by the normal intestinal flora. III. Interactions with *Bacteroides fragilis* strains in vitro. *Infection and Immunity* 2, 364-370.



121. Hohmann AW, Schmidt G, Rowley D. 1978. Intestinal colonization and virulence of *Salmonella* in mice. *Infection and Immunity* 22, 763–770.
122. Holt JG, Krieg NR, Sneath PHA, Staley JT, Williams ST. 1994. *Bergey's Manual of Determinative Bacteriology* 9th Edition, Williams and Wilkins, ISBN 0-68300-6032, Baltimore, Maryland, USA.
123. Hopkins KL, Kirchner M, Guerra B, Granier SA, Lucarelli C, Porrero MC, Jakubczak A, Threlfall EJ, Mevius DJ. 2010. Multiresistant *Salmonella enterica* serovar 4,[5],12:i:- in Europe: a new pandemic strain? *Euro Surveillance* 15, 19580.
124. Hotes S, Kemper N, Traulsen I, Rave G, Krieter J. 2010. Risk factors for *Salmonella* infection in fattening pigs—An evaluation of blood and meat juice samples. *Zoonoses and Public Health*, 57(Suppl. 1), 30–38.
125. Howitt DL and Cramer D. 2003. *A guide to computing statistics with SPSS Release 11 for Windows*, Prentice Hall, ISBN: 0 131 39983 7.
126. Hurd HS, Schlosser WD, Ebel ED. 1999. The effect of intermittent shedding on prevalence estimation in populations. In: *Proceedings of the Third International Symposium on Epidemiology and Control of Salmonella in Pork*, Washington, USA, 5–7 August 1999, pp. 57–62.
127. Hutchison ML, Walters LD, Moore A Avery SM. 2005. Decline of zoonotic agents in liquid livestock wastes stored in batches on-farm. *Journal of Applied Microbiology* 99(1), 58 – 65.
128. ICMSF. 1996. *Salmonellae*. Ch 14 In: *Microorganisms in food 5: Microbiological specifications of food pathogens*. Blackie Academic and Professional, London, p. 217–264.
129. Inouye S, Takizawa T, Yamaguchi H. 2001. Antibacterial activity of essential oils and their major constituents against respiratory tract pathogens by gaseous contact. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy* 47(5), 565-73.

130. International Organization for Standardization (ISO). Microbiology of food and animal feeding stuff—horizontal method for the detection of *Salmonella*. ISO 6579:2002/Amd 1:2007 Annex D: Detection of *Salmonella* spp. in animal faeces and in environmental samples from the primary production stage.
131. Issenhuth- Jeanjean S, Roggentin P, Mikoleit M, Guibourdenche M, de Pinna E, Nair S, Fields PI, Weill FX. 2014. Supplement 2008–2010 (no. 48) to the White–Kauffmann–Le Minor scheme. *Research in Microbiology* 165, 526-530.
132. Jensen AN, Sorensen G, Baggesen DL, Bodker R, Hoorfar J. 2003. Addition of Novobiocin in pre-enrichment step can improve *Salmonella* culture protocol of modified semisolid Rappaport-Vassiliadis. *Journal of Microbiological Methods* 55, 249–255.
133. Johnsen PJ, Townsend JP, Bohn T, Simonsen GS, Sundsfjord A, Nielsen KM. 2011. Retrospective evidence for a biological cost of vancomycin resistance determinants in the absence of glycopeptide selective pressures. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy* 66, 608–610.
134. Johnston KG and Jones RT. 1976. Salmonellosis in calves due to lactose fermenting *Salmonella typhimurium*. *Veterinary Record* 98, 276–278.
135. Joint FAO/OIE/WHO Expert Workshop on Non-Human Antimicrobial Usage and Antimicrobial Resistance: scientific assessment. Geneva: World Health Organization, 2003. Available at: <http://www.who.int/foodsafety/publications/micro/nov2003/en/>. Accessed 16 Apr 2015.
136. Judicial Commission of the International Committee on Systematic Prokaryotes (2005). The type species of the genus *Salmonella* Lingnieres 1900 is *Salmonella enterica* (ex Kauffmann and Edwards 1952) Le Minor and Popoff 1987, with type strain LT2T and conservation of the epithet *enterica* in *Salmonella enterica* over all earlier epithets that may be applied to this species.

- Opinion 80. International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology 55, 519-520.
137. Kabara JJ. 1991. Phenols and chelators. In: Russell NJ and Gould GW. (Eds.), Food Preservatives. Blackie, London, pp. 200-214.
138. Kauffmann F. 1966. The Bacteriology of Enterobacteriaceae. The Williams and Wilkins Co., Baltimore. pp 400.
139. Kauffmann F. 2009. Two biochemical sub-divisions of the genus salmonella. Acta Pathologica Microbiologica Scandinavica 49, 393-396.
140. Kingsley RA and BaÈuml er AJ. 2000. Host adaptation and the emergence of infectious disease: the *Salmonella* paradigm. Molecular Microbiology 36(5), 1006-1014.
141. Knodler LA and Steele-Mortimer O. 2003. Taking possession: Biogenesis of the *Salmonella*-containing vacuole. Traffic 4, 587–599.
142. Korsak N, Degeye JN, Etienne G, China B, Daube G. 2004. Comparison of four different methods for *Salmonella* detection in fecal samples of porcine origin. Journal of Food Protection 67, 2158–2164.
143. Koyuncu S and Haggblom P. 2009. A comparative study of cultural methods for the detection of *Salmonella* in feed and feed ingredients. BMC Veterinary Research 5, 6 doi:10.1186/1746-6148-5-6.
144. Kranker S, Dahl J, Wingstrand A. 2001. Bacteriological and serological examination and risk factor analysis of *Salmonella* occurrence in sow herds, including risk factors for high *Salmonella* seroprevalence in receiver finishing herds. Berliner und MÜNchener Tierärztliche Wochenschrift 114, 350–352.
145. Kranker S, Alban L, Boes J, Dahl J. 2003. Longitudinal study of *Salmonella enterica* serotype Typhimurium infection in three Danish farrow-to-finish swine herds. Journal of Clinical Microbiology 41, 2282–2288.

146. Lacasta D, Ferrer LM, Ramos JJ, Bueso JP, Borobia M, Ruiz de Arcaute M, Figueras L, Gonzalez-Sainz JM, De las Heras M. 2012. Chronic Proliferative Rhinitis associated with *Salmonella enterica* subspecies *diarizonae* serovar 61:k:1, 5, (7) in Sheep in Spain. *Journal of Comparative Pathology* 147, 406-409.
147. Lannigan R and Hussain Z 1993. Wound Isolate of *Salmonella typhimurium* That Became Chlorate Resistant after Exposure to Dakin's Solution: Concomitant Loss of Hydrogen Sulfide Production, Gas Production, and Nitrate Reduction. *Journal of Clinical Microbiology* 31(9), 2497.
148. Lautrop H, Orskov I, Gaarskev K. 1979. Hydrogensulphide producing variants of *Escherichia coli*. *Acta Pathologica Microbiologica Scandinavica. Section B Microbiology and Immunology* 79, 641-650.
149. Leontides LS, Grafanakis E, Genigeorgis C. 2003. Factors associated with the serological prevalence of *Salmonella enterica* in Greek finishing swine herds. *Epidemiology and Infection* 131, 599-606.
150. Levitt MD, Furne J, Springfield J, Suarez F, DeMaster E. 1999. Detoxification of hydrogen sulfide and methanethiol in the cecal mucosa. *Journal of Clinical Investigation* 104, 1107-1114.
151. Liebler-Tenorio EM and Pabst R. 2006. MALT structure and function in farm animals. *Veterinary Research* 37, 257-280.
152. Limpitakis N, Genigeorgis C, Abraham A, Leontides L, Grafanakis S, Iosifidou E. 1999. Post-harvest epidemiology of *Salmonella enterica* in pork: Prevalence in the environment, carcasses and by-products in two slaughterhouses in Greece (1996-1998). *Proceedings of the 3rd International Symposium on Epidemiology and Control of Salmonella in Pork, 4-7 August, 1999, Washington, USA*, p. 141-150.
153. List of Prokaryotic names with Standing in Nomenclature (LPSN). 2015. Available at: <http://www.bacterio.net/-allnamesz.html>



154. Lo Fo Wong DMA and Hald T. 2000. *Salmonella* in pork (SALINPORK): Preharvest and Harvest Control Options based on Epidemiological, Diagnostic and Economic Research. Final Report, Contract No: FAIR1 CT95-0400. p 1-251.
155. Lo Fo Wong DMA, Dahl J, Stege H, van der Wolf PJ, Leontides L, von Altrock A, Thorberg BM. 2004. Herd-level risk factors for subclinical *Salmonella* infection in European finishing-pig herds. *Preventive Veterinary Medicine* 62, 253–266.
156. Lodish H, Berk A, Zipursky SL, Matsudaira P, Baltimore D, Darnell J. 2000. Functional Rearrangements in Chromosomal DNA. In: Freeman WH (ed.), *Molecular Cell Biology*, 4th edition. New York. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK21732/> (Accessed 4 May 2015).
157. Love BC and Rostagno MH. 2008. Comparison of Five Culture Methods for *Salmonella* Isolation from Swine Fecal Samples of Known Infection Status. *Journal of Veterinary Diagnostic Investigation* 20, 620-624.
158. Loynachan AT, Nugent JM, Erdman MM, Harris DL. 2004. Acute infection of swine by various *Salmonella* serovars. *Journal of Food Protection* 67(7), 1484–1488.
159. MacDonald C and Riley M. 1983. Cloning chromosomal lac genes of *Klebsiella pneumoniae*. *Gene* 24, 341–345.
160. Macnab RM. 1987. Flagella. In: Neidhardt FC, Ingraham JL, Low KB, Magasanik B, Schaechter M, Umberger HE. (Eds.), *Escherichia coli* and *Salmonella typhimurium*: Cellular and Molecular Biology, Vol. I. American Society for Microbiology, Washington DC, pp. 70–83.
161. Macnab RM. 1996. Flagella and motility. In: Neidhardt FC. (Ed.) *Escherichia coli* and *Salmonella typhimurium*: Cellular and Molecular Biology 2, 123–145.

162. Macnab RM. 2003. How bacteria assemble flagella. *Annual Review of Microbiology* 57, 77-110.
163. Magalhães M and Veras A. 1977. Properties of pPE1572 (Hys-Raf), a plasmid governing hydrogen sulphide production and raffinose fermentation in *Escherichia coli*. *Journal of General Microbiology* 99, 445-447.
164. Manafi M. 2000. New developments in chromogenic and fluorogenic culture media. *International Journal of Food Microbiology* 60, 205-18.
165. Mandilara G, Lambiri M, Polemis M, Passiotou M, Vatopoulos A. 2013. Phenotypic and molecular characterisation of multiresistant monophasic *Salmonella* Typhimurium (1,4,[5],12:i:-) in Greece, 2006 to 2011. *Euro Surveill* 18(22):pii=20496.
166. Marques de Sa JP. 2007. *Applied Statistics*. Springer, 2nd Ed pp 187-188.
167. Mayaud L, Carricajo A, Zhiri A, Aubert G. 2008. Comparison of bacteriostatic and bactericidal activity of 13 essential oils against strains with varying sensitivity to antibiotics. *Letters in Applied Microbiology* 47, 167-173.
168. McMeekin TA, Hill C, Wagner M, Dahl A, Toss T. 2010. Ecophysiology of food-borne pathogens: essential knowledge to improve food safety. *International Journal of Food Microbiology* 139, 64-78.
169. McNamara PE, Liu X, Miller GY. 2003. The Costs of Human Salmonellosis Attributable to Pork: A Stochastic Farm-to-Fork Analysis. Paper prepared for presentation at the American Agricultural Economics Association Annual Meeting, Montreal, Canada, July 27-30, 2003.
170. Mejia W, Zapata D, Mateu E, Martin M. 2005. Lack of specificity of a combination of Rappaport-Vassiliadis broth and XLT4 agar for the isolation of salmonellae from pig faeces. *Veterinary Record* 156, 150–151.
171. Mellon M, Benbrook C, Benbrook KL. 2001. Hogging It. Estimates of Antimicrobial Abuse in Livestock. Union of Concerned Scientists. UCS

- Publications, Cambridge, MA 02238-9105. Available at: [http://www.ucsusa.org/assets/documents/food\\_and\\_agriculture/hog\\_front.pdf](http://www.ucsusa.org/assets/documents/food_and_agriculture/hog_front.pdf). (Accessed 16 Apr 2015).
172. Millán J, Aduriz G, Moreno B, Juste RA, Barral M. 2004. *Salmonella* isolates from wild birds and mammals in the Basque Country (Spain). *Revue scientifique et technique (International Office of Epizootics)* 23, 905-911.
173. Miller SI and Pegues DA. 2000. *Salmonella* species, including *Salmonella* Typhi. In: Mandell GL, Bennett JE, Dolin R. (Eds.), *Principles and Practice of Infectious Diseases* 2, 2344–63. Philadelphia: Churchill Livingstone. 2 vols. 5th ed.
174. Monack DM, Mueller A, Falkow S. 2004. Persistent bacterial infections: the interface of the pathogen and the host immune system *Nature Reviews Microbiology* 2, 747-765.
175. Moreno Switt AI, Soyer Y, Warnick LD, Wiedmann M. 2009. Emergence, Distribution, and Molecular and Phenotypic Characteristics of *Salmonella enterica* Serotype 4,5,12:i:–. *Foodborne Pathogens and Disease* 6, 407-415.
176. Mousing J, Thode Jensen P, Halgaard C, Bager F, Feld N, Nielsen B, Nielsen JP, Bech-Nielsen S. 1997. Nation-wide *Salmonella enterica* surveillance and control in Danish slaughter swine herds. *Preventive Veterinary Medicine* 29, 247–261.
177. Nielsen B, Baggesen DL, Bager F, Haugegaard J, Lind P. 1995. The serological response to *Salmonella* serovars Typhimurium and Infantis in experimentally infected pigs. The time course followed with an indirect anti-LPS ELISA and bacteriological examinations. *Veterinary Microbiology* 47, 205-218.
178. Nielsen B, Alban L, Stege H, Sorensen LL, Møgelmoose V, Bagger J, Dahl J, Baggesen DL. 2001. A new *Salmonella* surveillance and control programme in

- Danish pig herds and slaughterhouses. Berliner und Münchener tierärztliche Wochenschrift 114, 323–326.
179. Nnalue NA. 1991. Relevance of inoculation route to virulence of three *Salmonella* spp. strains in mice. Microbial Pathogenesis 11, 11-8.
180. Nollet N, Maes D, Duchateau L, Hautekietd V, Houf K, Van Hoof J, De Zutter L, De Kruif A, Geers R. 2005. Discrepancies between the isolation of *Salmonella* from mesenteric lymph nodes and the results of serological screening in slaughter pigs. Veterinary Research 36(4), 545-55.
181. Nychas GJE. 1995. Natural antimicrobials from plants. In: Gould, G.W. (Ed.), New Methods of Food Preservation. Blackie Academic and Professional, London, pp. 58– 89.
182. OIE Terrestrial Manual 2010. NB: Version adopted by the World Assembly of Delegates of the OIE in May 2010 C H A P T E R 2 . 9 . 9 . SALMONELLOSIS
183. Orskov I and Orskov F. 1973. Plasmid-determined H<sub>2</sub>S character in *Escherichia coli* and its relation to plasmid-carried raffinose fermentation and tetracycline resistance characters. Examination of 32 H<sub>2</sub>S-positive strains isolated during the years 1950-1971. Journal of General Microbiology 77, 487-499.
184. Osterkorn K, Czerney CP, Wittkowski G, Huber M. 2001. Stichprobenplanung für die Etablierung eines serologischen Salmonellen-Monitoringsprogramms bei Mastschweinen mittels Fleischsaft-ELISA. Berliner und Münchener tierärztliche Wochenschrift 114, 30-34.
185. Osumi T, Asai T, Namimatsu T, Sato S, Yamamoto K. 2003. Enrichment for isolating *Salmonella* Choleraesuis and other *Salmonella* spp. from pigs. The Journal of Veterinary Medical Science 65, 949–951.



186. Pangloli P, Dje Y, Oliver SP, Mathew A, Golden DA, Taylor WJ, Draughon FA. 2003. Evaluation of methods for recovery of *Salmonella* from dairy cattle, poultry, and swine farms. *Journal of Food Protection* 66, 1987–1995.
187. Parija SC. 2012. *Salmonella* in: Textbook of Microbiology and Immunology. Elsevier (ed) 2<sup>nd</sup> Ed. p.269-290.
188. Patrick L. McDonough, Sang J. Shin and Donald H. Lein. 2000. Diagnostic and Public Health Dilemma of Lactose-Fermenting *Salmonella enterica* Serotype Typhimurium in Cattle in the Northeastern United States. *Journal of Clinical Microbiology* 38(3), 1221-1226.
189. Perry JD, Ford M, Taylor J, Jones AL, Freeman R, Gould FK. 1999. ABC medium, a new chromogenic agar for selective isolation of *Salmonella* spp *Journal of Clinical Microbiology* 37, 766 –768.
190. Pires SM, de Knecht L, Hald T. 2011. SCIENTIFIC / TECHNICAL REPORT submitted to EFSA: Estimation of the relative contribution of different food and animal sources to human *Salmonella* infections in the European Union. National Food Institute. Technical University of Denmark.
191. Pol-Hofstad IE, Jacobs-Reitsma WF, Maas H, de Pinna E, Mevius D, Mooijman KA. 2012. TECHNICAL REPORT. Third external quality assurance of *Salmonella* typing. European Food and Waterborne Diseases and Zoonoses Network.
192. Popoff MY, Bockemuhl J, Gheesling LL. 2004. Supplement 2002 (no. 46) to the Kauffmann–White scheme. *Research in Microbiology* 155, 568–570.
193. Preuss H, Echard B, Dadgai A, Talpur N, Manohar V, Enig M, Bagchi D, Ingram C. 2005. “Effects of essential oils and monolaurin on *Staphylococcus aureus*: in vitro and in vivo studies”, *Toxicology Mechanisms and Methods* 15, 279-85.

194. Que JU and Hentges DJ. 1985. Effect of streptomycin administration on colonization resistance to *Salmonella* Typhimurium in mice. *Infection and Immunity* 48, 169–174.
195. Quinn PJ., Carter ME., Markey B, Carter GR. 1994. *Clinical Veterinary Microbiology*, Published by Mosby, pp 1-648.
196. Raetz CR and Whitfield C. 2002. Lipopolysaccharide endotoxins. *Annual Review of Biochemistry* 71, 635-700.
197. Rajic A, Keenlside J, Mcfall ME, Deckert AE, Muckle AC, O'connor BP, Manninen K, Dewey CE, Mcewen SA. 2005. Longitudinal study of *Salmonella* species in 90 Alberta swine finishing farms. *Veterinary Microbiology* 5, 47-56.
198. Rambach A. 1990. New plate medium for facilitated differentiation of *Salmonella* spp. from *Proteus* spp. and other enteric bacteria. *Applied and Environmental Microbiology* 56, 301–303.
199. Revathi G, Shannon KP, Stapleton PD, Jain BK, French GL. 1998. An outbreak of extended-spectrum, beta-lactamase-producing *Salmonella* senftenberg in a burns ward. *Journal of Hospital Infection* 40, 295-302.
200. Roberts JA, Cumberland P, Sockett PN, Wheeler J, Rodrigues LC, Sethi D, Roderick PJ. 2010. The study of infectious intestinal disease in England: Socioeconomic impact. *Epidemiology and Infection* 130, 1-11.
201. Rohde R. 1979. Serological integration of all known Arizona-species into the Kauffmann-White-scheme (author's transl). *Zentralbl Bacteriol Orig A* 243, 148-76.
202. Rokey NW and Mecca MD. 1972. Lactose fermenting salmonellae—a dilemma for diagnostic laboratories? *Proceedings, annual meeting of the United States Animal Health Association* 75, 509–514.
203. Rostagno MH, Gailey JK, Hurd HS, Mckean JD, Leite RC. 2005. Culture methods differ on the isolation of *Salmonella enterica* serotypes from naturally

- contaminated swine fecal samples. *Journal of Veterinary Diagnostic Investigation* 17, 80–83.
204. Rota MC, Herrera A, Martinez RM, Sotomayor JA, Jordan MJ. 2008. Antimicrobial activity and chemical composition of *Thymus vulgaris*, *Thymus zygis* and *Thymus hyemalis* essential oils. *Food Control* 19, 681–687.
205. Rowe TA, Leonard FC, Kelly G, Lynch PB, Egan J, Quirke AM, Quinn PJ. 2003. *Salmonella* serotypes present on a sample of Irish pig farms. *Veterinary Record* 153, 453–456.
206. Ruiz J, Nunez ML, Diaz J, Lorente I, Perez J, Gomez J. 1996. Comparison of five plating media for isolation of *Salmonella* species from human stools. *Journal of Clinical Microbiology* 34, 686–688.
207. Rychlik I and Barrow PA. 2005. *Salmonella* stress management and its relevance to behavior during intestinal colonisation and infection. *FEMS Microbiology Reviews* 29, 1021–1040.
208. Rycroft AN. 2000. Structure, Function and Synthesis Of Surface Polysaccharides in *Salmonella*. In: Wray C and Wray A. (Eds.), *Salmonella in domestic animals*. CABI Publishing, New York, pp. 19–33.
209. Salmon DE. 2015. Available at: [www.whonamedit.com/doctor/cfm/408.html](http://www.whonamedit.com/doctor/cfm/408.html), Accessed 6 April 2015.
210. SANCO Workshop on Salmonella Control in Pigs 26 February 2009, November 2010 [http://ec.europa.eu/food/food/biosafety/salmonella/other\\_act\\_en.htm](http://ec.europa.eu/food/food/biosafety/salmonella/other_act_en.htm),
211. Sasahara KC, Heinzinger NK, Barrett EL. 1997. Hydrogen Sulfide Production and Fermentative Gas Production by *Salmonella typhimurium* Require F0F1 ATP Synthase Activity. *Journal of Bacteriology* 179, 6736–6740.
212. Scharff RL. 2012. Economic burden from health losses due to foodborne illnesses in the United States. *Journal Food Protection* 75, 123–131.

213. Schwarz S, Silley P, Simjee S, Woodford N, van Duijkeren E, Johnson AP, Gaastra W. 2010. Assessing the antimicrobial susceptibility of bacteria obtained from animals. *Veterinary Microbiology* 141, 1–4.
214. Schönenbrücher V, Mallinson ET, Bülte M. 2008. A comparison of standard cultural methods for the detection of foodborne *Salmonella* species including three new chromogenic plating media. *International Journal Food Microbiology* 123, 61– 66.
215. Schröter M, Roggentin P, Hofmann J, Speicher A, Laufs R, Mack D. 2004. Pet snakes as a reservoir for *Salmonella enterica* subsp. *diarizonae* (Serogroup IIIb): a prospective study. *Applied and Environmental Microbiology* 70, 613–615.
216. Sefton AM. 2002. Mechanisms of antimicrobial resistance. *Drugs* 62, 557-566.
217. Shelobolina ES, Sullivan SA, O'Neill KR, Nevin KP, Lovley DR. 2004. Isolation, characterization, and U(VI)-reducing potential of a facultatively anaerobic, acid-resistant bacterium from low-pH, nitrate- and U(VI)-contaminated subsurface sediment and description of *Salmonella subterranean* sp. nov. *Applied and Environmental Microbiology* 70, 2959-2965.
218. Silverman M, Zieg J, Simon M. 1979. Flagellar-phase variation: isolation of the rhl gene. *Journal of Bacteriology* 137, 517-523.
219. Skandamis P, Koutsoumanis K, Fasseas K, Nychas GJE. 2001. Inhibition of oregano essential oil and EDTA on *Escherichia coli* O157:H7. *Italian Journal of Food Science* 13, (1), 65-75.
220. Skerman VBD, Mc Gowan V, Sneath PHA. 1980. Approved list of bacterial names. *International Journal of Systematic and Evolountiary Bacteriology* 30, 225-420.
221. Socket PN. 1991. The economic implications of human salmonella infection. *Journal of Applied Bacteriology* 71, 289-295.



222. Sommer MOA and Dantas G. 2011. Antibiotics and the resistant microbiome. *Current Opinion in Microbiology* 14, 556–563.
223. Somyanontanagul N, Nathues H, Tegeler R, Blaha T. 2008. Comparison between detecting *Salmonella* spp. by bacteriological method and Real-Time PCR assay in samples from pig herds. In: Oral Proceedings of the 20th International Pig Veterinary Society Congress, Durban, South Africa, 2008, 176.
224. Sorensen LL, Alban L, Nielsen B, Dahl J. 2004. The correlation between *Salmonella* serology and isolation of *Salmonella* in Danish pigs at slaughter. *Veterinary Microbiology* 101, 131–141.
225. Soyer Y, Moreno Switt A, Davis MA, Maurer J, McDonough PL, Schoonmaker-Bopp DJ, Dumas NB, Root T, Warnick LD, Grohn YT, Wiedmann M. 2009. *Salmonella enterica* Serotype 4,5,12:i:-, an Emerging *Salmonella* Serotype That Represents Multiple Distinct Clones. *Journal of Clinical Microbiology* 47, 3546–3556.
226. Swanenburg M, Urlings HAP, Snijders JMA, Keuzenkamp DA, Van Knapen F. 2001. *Salmonella* in slaughter pigs: prevalence serotypes and critical control points during slaughter in two slaughterhouses. *International Journal of Food Microbiology* 70, 243-254.
227. Tabarani CM, Bennett NJ, Kiska DL, Riddell SW, Botash AS, Domachowske JB. 2010. Empyema of preexisting subdural hemorrhage caused by a rare *Salmonella* species after exposure to bearded dragons in a foster home. *Journal of Pediatrics* 156, 322–323.
228. Tajkarimia MM, Ibrahima SA, Cliverb DO. 2010. Antimicrobial herb and spice compounds in food. *Food Control* 21(9), 1199–1218.
229. Takeuchi A. 1967. Electron microscope studies of experimental *Salmonella* infection. I. Penetration into the intestinal epithelium by *Salmonella* Typhimurium. *The American Journal of Pathology* 50, 109–136.

230. Tenover FC. 2006. Mechanisms of antimicrobial resistance in bacteria. *The American Journal of Medicine* 19:S3–10; discussion S62–70.
231. The *Salmonella* Subcommittee of the Nomenclature Committee of the International Society for Microbiology. 1934. The genus *Salmonella* Lingnieres 1900. *The Journal of Hygiene* 34, 333-350.
232. Tindal JB, Grimont DAP, Garrity MG, Euzeby PJ. 2005. Nomenclature and taxonomy of the genus *Salmonella*. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* 55, 521-524.
233. Uzzau S, Leori GS, Petruzzi V, Watson PR, Schianchi G, Bacciu D, Mazzarello V, Wallis TS, Rubino S. 2001. *Salmonella* enterica Serovar-Host Specificity Does Not Correlate with the Magnitude of Intestinal Invasion in Sheep. *Infection and Immunity* 69(5), 3092–3099.
234. Van der Heijden HM. 2001. First international ring trial of ELISAs for *Salmonella*-antibody detection in swine *Berliner und Münchener Tierärztliche Wochenschrift* 114, 389–392.
235. Van der Wolf PJ, Wolbers WB, Elbers AR, van der Heijden HM, Koppen JM, Hunneman WA, van Schie FW, Tielen MJ. 2001. Herd level husbandry factors associated with the serological *Salmonella* prevalence in finishing pig herds in The Netherlands. *Veterinary Microbiology* 78, 205–219.
236. Van Duijkeren E, Wannet WJ, Houwers DJ, van Pelt W. 2002. Serotype and phage type distribution of *Salmonella* strains isolated from humans, cattle, pigs, and chickens in the Netherlands from 1984 to 2001. *Journal of Clinical Microbiology* 40, 3980–5.
237. Veterinary Laboratories Agency. 2010. Quantitative microbiological risk assessment on *Samonella* in slaughter pigs and breeder pigs: Final Report. p1-413.

238. Visscher CF, Klein G, Verspohl J, Beyerbach M, Stratmann-Selke J, Kamphues J. 2011. Serodiversity and serological as well as cultural distribution of *Salmonella* on farms and in abattoirs in Lower Saxony, Germany. *International Journal of Food Microbiology* 146, 44–51.
239. Volf J, Havlickova H, Hradecka H, Ondrackova P, Matiasovic J, Faldyna M, Rychlik I. 2010. Epidemiology and interaction of *Salmonella enterica* serovar Derby, Infantis and Typhimurium with porcine alveolar macrophages. *Veterinary Microbiology* 146, 105–110.
240. Voogt N, Raes M, Wannet WJ, Henken AM, Giessen AW van de. 2001. Comparison of selective enrichment media for the detection of *Salmonella* in poultry faeces. *Letters in Applied Microbiology* 32(2), 89-92.
241. Voss M. 2007. Control of *Salmonella* and other zoonotic agents in the European Community- current status of legislation -. *Lohmann Information* 42(1), 18-28.
242. Wallis TS. 2005. Host-specificity of *Salmonella* infections in animal species. In: Mastroeni P and Maskell D. (Eds.), '*Salmonella*' Infections: Clinical, Immunological and Molecular Aspects, Cambridge University Press, pp. 57-80.
243. Warriner K, Aldsworth TG, Kaur S, Dodd CE. 2002. Cross-contamination of carcasses and equipment during pork processing. *Journal of Applied Microbiology* 93(1), 169-177.
244. Wedel SD, Bender JB, Leano FT, Boxrud DJ, Hedberg C, Smith KE. 2005. Antimicrobial drug susceptibility of human and animal *Salmonella* Typhimurium, Minnesota, 1997– 2003. *Emerging Infectious Diseases* 11, 1899–1906.
245. White PB. 1926. Further Studies of the *Salmonella* Group. Great Britain Medical Research Council 103 (Her Majesty's Stationery Office), 3–160.
246. WHO. 2011. 3<sup>rd</sup> Revision. WHO list of Critically Important Antimicrobials (CIA).

247. Wollin R. 2007. A study on invasiveness of different *Salmonella* serovars based on analysis of the enter-net database. Euro Surveillanc 12 (39):pili= 3275.
248. Wray C. 2001. Review of research into *Salmonella* infection in pigs. A report commissioned by the Meat and Livestock Commission, UK.
249. Yap PS, Yiap BC, Ping HC, Lim SH. 2014. Essential oils, a new horizon in combating bacterial antibiotic resistance. The Open Microbiology Journal 8, 6-14.
250. Zottola T, Montagnaroa S, Magnaperaa C, Sasso S, De Martinoa L, Bragnolob A, D'Amicib L, Condoleob R, Pisanelli G, Iovanea G, Pagninia U. 2013. Prevalence and antimicrobial susceptibility of *Salmonella* in European wild boar (*Sus scrofa*); Latium Region—Italy. Comparative Immunology Microbiology and Infectious Diseases 36, 161–168.



# **ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ**

## **ΔΗΜΟΣΙΕΥΣΕΙΣ -ΑΝΑΚΟΙΝΩΣΕΙΣ ΤΗΣ ΔΙΔΑΚΤΟΡΙΚΗΣ ΔΙΑΤΡΙΒΗΣ**

## ΔΗΜΟΣΙΕΥΣΕΙΣ ΤΗΣ ΔΙΔΑΚΤΟΡΙΚΗΣ ΔΙΑΤΡΙΒΗΣ

1. Evangelopoulou GD, Burriel AR, Spyrou V. 2010. **A concise history of *Salmonella* spp. nomenclature.** Journal of the Hellenic Veterinary Society 61(4), 323-329.
2. Ευαγγελοπούλου Γ.Δ, Γκόβαρης Α., Κρήτας Σ., Μπουριέλ Α. 2012. **Η έννοια της «προσαρμογής-εξειδίκευσης ξενιστή» στα είδη του γένους *Salmonella* και ο ρόλος της στις χοιροτροφικές μονάδες.**  
(Πανελλήνιο Συνέδριο Κρέατος MEAT DAYS 2012- Το Κρέας και τα Προϊόντα του «Από το στάβλο στο Πιάτο». Αθήνα 29,30 Σεπτεμβρίου- 1 Οκτωβρίου 2012). σελ 105-113.
3. Ευαγγελοπούλου Γ.Δ, Γκόβαρης Α., Κρήτας Σ., Μπουριέλ Α. 2012. **Εκτροφή χοίρων απαλλαγμένων από *Salmonella* spp.**  
(Πανελλήνιο Συνέδριο Κρέατος MEAT DAYS 2012- Το Κρέας και τα Προϊόντα του «Από το στάβλο στο Πιάτο». Αθήνα 29,30 Σεπτεμβρίου- 1 Οκτωβρίου 2012). σελ 135- 147.
4. Ευαγγελοπούλου Γ.Δ, Γκόβαρης Α., Κρήτας Σ., Μπουριέλ Α. 2012. **Το σημερινό σύστημα ταξινόμησης του γένους *Salmonella* και οι επιπτώσεις του στον έλεγχο των λοιμώξεων.**  
(Πανελλήνιο Συνέδριο Κρέατος MEAT DAYS 2012- Το Κρέας και τα Προϊόντα του «Από το στάβλο στο Πιάτο». Αθήνα 29, 30 Σεπτεμβρίου- 1 Οκτωβρίου 2012). σελ. 502-510.
5. Evangelopoulou G, Kritas S, Govaris A, Burriel AR. 2013. **Animal salmonellosis: A brief review of “Host Adaptation and Host Specificity” of *Salmonella* spp.** Veterinary World 6(10), 703-708.
6. Evangelopoulou G, Kritas S, Govaris A, Burriel AR. 2014. **Pork Meat as a Potential Source of *Salmonella enterica* subsp. *arizonae* Infection of Man.** Journal of Clinical Microbiology 52, 741-744.

7. Evangelopoulou G, Kritas S, Govaris A, Burriel AR. 2014. **A Brief Account of the Rules Applied to the Naming and Epidemiologically Grouping *Salmonella* Strains when Isolated from Animals.** Journal of Medical Sciences 14 (3), 101-107. DOI: 10.3923/jms.2014.101.107.
8. Evangelopoulou G, Filioussis G, Kritas S, Christodoulopoulos G, Triantafyllou LA, Burriel AR. 2014. Short Communication. **Colonisation of pig gallbladders with *Salmonella* species important to public health.** Veterinary Record doi: 10.1136/vr.102822.
9. Ευαγγελοπούλου Γ., Κρήτας Σ., Χριστοδουλόπουλος Γ., Μπουριέλ Α. 2015. **Ο χοίρος και το κρέας του ως πιθανές πηγές σαλμονέλλωσης του Έλληνα καταναλωτή.**  
(Πανελλήνιο Συνέδριο- Το Κρέας και τα Προϊόντα του «Από τον Στάβλο στο πιάτο» 2015. Θεσσαλονίκη 27,28 Φεβρουαρίου- 1 Μαρτίου 2015). σελ 109-117.
10. Evangelopoulou G, Kritas S, Christodoulopoulos G, Burriel AR (2015), **The commercial impact of pig *Salmonella* spp. infections in border-free markets during an economic recession,** Veterinary World 8(3), 257-272.
11. Evangelopoulou G, Filioussis G, Kritas S, Christodoulopoulos G, Kantere M Burriel AR. 2015. **Isolation and Antimicrobial Testing of *Aeromonas* spp., *Citrobacter* spp., *Cronobacter* spp., *Enterobacter* spp., *Escherichia* spp., *Klebsiella* spp., and *Trabulsiella* spp. from the Gallbladder of Pigs.** Polish Journal of Microbiology 64(2), 185-188.
12. Evangelopoulou G, Kritas S, Christodoulopoulos G, Sbiraki AP, Burriel AR. **Presence of emerging *Salmonella* spp. serovars in pig farms: a risk to public health.** Journal of Agromedicine (*under review*).

## ΠΕΡΙΛΗΨΕΙΣ ΣΕ ΠΡΑΚΤΙΚΑ ΣΥΝΕΔΡΙΩΝ

1. Ευαγγελοπούλου ΓΔ, Μπουριέλ Α, Σπύρου Β. 2011. **Μια συνοπτική ανασκόπηση της ιστορίας της ονοματολογίας του γένους *Salmonella***  
(2<sup>ο</sup> Πανελλήνιο Συνέδριο Κτηνιατρικής παραγωγικών ζώων-Υγιεινής και ασφάλειας των τροφίμων ζωικής προέλευσης- Προστασίας καταναλωτή. Θεσσαλονίκη 18-20 Μαρτίου 2011). σελ 147-148.
2. Ευαγγελοπούλου ΓΔ, Μπουριέλ Α, Γκόβαρης Α. 2012. **Οι επιπτώσεις της οικονομικής κρίσης στους παράγοντες που καθορίζουν την εξέλιξη των σαλμονελλώσεων του χοίρου**  
(12<sup>ο</sup> Πανελλήνιο Κτηνιατρικό Συνέδριο. Αθήνα 5-8 Απριλίου 2012) 6t3166
3. Evangelopoulou G, Kritas S, Govaris A and Burriel AR. **Isolation and biochemical identification of *Salmonella enterica* subsp. *arizonae* from finishing pigs in Central Greece**  
(International Scientific Conference 90 years Faculty of Veterinary Medicine in Bulgaria. Stara Zagora, Bulgaria 30-31 May 2013) pp 72-73.
4. Evangelopoulou G, Filioussis G, Kritas S, Govaris A, Burriel AR. 2014. **Biochemical identification and antimicrobial profile of Gram negative bacterial species isolated from the gallbladder of finishing pigs in Central Greece** (International VETistanbul Group Congress 2014. Istanbul, Turkey 28-30 April 2014) pp 5.
5. Ευαγγελοπούλου Γ., Κρήτας Σ., Γκόβαρης Α., Φιλίουσης Γ., Μπουριέλ Α. 2014. **Ορολογική διερεύνηση της *Salmonella* spp. σε εκτροφές χοίρων στην Ελλάδα**  
(3ο Πανελληνίο Συνέδριο Κτηνιατρικής παραγωγικών ζώων και Υγιεινής τροφίμων. Ιωάννινα 2-4 Μαΐου 2014). σελ 67-68.
6. Evangelopoulou G, Kolygas M, Burriel AR. 2015. **Inhibition of *Salmonella* spp. by oregano, rosemary and thyme Essential oils vs Antimicrobials**  
(1<sup>st</sup> International Caparica Conference in Antibiotic Resistance, Costa de Caparica Conference, Portugal 26-28 January 2015). pp 114.



7. Ευαγγελοπούλου Γ., Κρήτας Σ., Χριστοδουλόπουλος Γ., Μπουριέλ Α. 2015. **Σύγκριση της δράσης αιθέριων ελαίων και ευρέως χρησιμοποιούμενων αντιβιοτικών έναντι *Salmonella* spp.** (13<sup>ο</sup> Πανελλήνιο Κτηνιατρικό Συνέδριο- Η Κτηνιατρική Επιστήμη στην ολότητά της. Αθήνα 8-10 Μαΐου 2015). σελ 146.
  
8. Evangelopoulou G, Burriel AR. 2015. **The role of H<sub>2</sub>S in the recovery of *Salmonella* spp. from animals.** Global Veterinary Summit. August 31-September 2, 2015 Florida, USA (*poster presentation accepted*)