



TESIS DOCTORAL

Salmonella spp. en jabalíes en el suroeste de España:
caracterización de los brotes producidos, estudio etiológico y
perfil de resistencia antimicrobiana de los aislados obtenidos

María de los Milagros Gil Molino

PROGRAMA DE DOCTORADO EN SALUD PÚBLICA Y ANIMAL (R005)

**La conformidad de los directores de la tesis consta en el
original en papel de esta Tesis Doctoral**

Joaquín Rey Pérez Alberto Quesada Molina Pedro Fernández Llario

2022



Asunto: Rtdo. Informe sobre las publicaciones que componen la tesis.

Destinatario: Sr. Coordinador de la Comisión Académica del Programa de Doctorado:

SALUD PÚBLICA Y ANIMAL (R005)

Como Directores de la Tesis doctoral titulada:

Salmonella spp. en jabalíes en el suroeste de España: caracterización de los brotes producidos, estudio etiológico y perfil de resistencia antimicrobiana de los aislados obtenidos

Cuya autora es D^a. María de los Milagros Gil Molino

INFORMAMOS

A la **Comisión Académica del Programa de Doctorado** que:

- La tesis está compuesta por un compendio de **3 artículos ya publicados** en revistas indexadas en el *Journal Citation Reports* y un **artículo en revisión** al momento de la impresión de esta tesis.
- Las **revistas** en las que se han publicado dichos artículos son las siguientes:
 - o **Transboundary and Emerging Diseases** (Editorial Wiley and Sons). 2 artículos publicados y uno en revisión.
 - Factor de impacto: 3.504 (2019)/5.005(2020). Q1 en la categoría *Veterinary Sciences*.
 - o **Antibiotics** (Basel). (Editorial MDPI). 1 artículo publicado.
 - Factor de impacto: 4.639 (2020). Q2 en la categoría *Infectious Diseases*.
- En todas las publicaciones de la presente tesis la doctoranda figura como **primera autora**, lo que certifica su participación preferente en todas ellas.

SOLICITAMOS

de la **Comisión Académica del Programa de Doctorado** que autorice la presentación de la Tesis a la Comisión de Doctorado.

Cáceres a

de

de

Fdo: Joaquín Rey Pérez

Alberto Quesada Molina

Pedro Fernández Llario

AGRADECIMIENTOS

La verdad que ha pasado tanto tiempo desde que comencé con la tesis, que ha habido momentos a lo largo de este periodo en los que pensaba que lo que estoy haciendo en este instante no iba a llegar. Sin embargo, gracias a muchas personas maravillosas que tengo la suerte de tener a mi lado, ha sido posible, apoyándome y confiando en mí cuando no veía el final. Por todo esto os doy las gracias:

En primer lugar, a mis directores: Joaquín, ¡siempre has confiado en mí y me has apoyado hasta el último momento!, y sabes que además de director, te considero un amigo con el que he podido contar para desahogarme en muchos momentos. Alberto, he aprendido muchísimo contigo, ¡me has adentrado en el mundo de las resistencias con mucho entusiasmo, y espero seguir en él mucho tiempo con todos esos proyectos que tenemos a medias! Gracias por cada vez que voy a tu despacho con una idea nueva y no tienes dudas en apoyarme y darme rienda suelta para que ¡investigue! Y Pedro, sin duda esto no lo hubiera empezado sin ti, esos comienzos los recuerdo con mucho cariño, ¡esas largas charlas de viaje a las monterías! gracias por prender la chispa de esta tesis.

A Javier Hermoso, por su infinita ayuda cada vez que lo he necesitado para algo, ya sea de la tesis, casos clínicos del Hospital y cómo no ¡para el bendito RAPI!, ¡mejor tutor imposible! A Miguel Hermoso que, aunque ya no le veamos en su despacho, siempre ha sido el padre de todos nosotros para guiarnos. Y por supuesto a Juanma, ¡ya sabes que tú eres mi desahogo en muchos momentos en los que estoy en crisis! ¡Esas injusticias de la vida de las que hablamos a última hora! Jaja. También tengo que nombrar a todas esas personas que te hacen el día a día mejor gracias a las charlas y risas dentro del departamento ¡Que de eso no nos falta! Ahí se encuentra mi influencer favorita, ¡mi Liyi! La madre de todas y la que pone cordura al asunto, ¡Natalia! la paz, ¡Laura!, y mi asesor político, ¡Chema! Jaja. Y cómo no mencionar a un super Doctor, ¡Remi!, ¡aquel que me ayudó con las primeras detecciones de mis salmonelis! Bueno, y me faltan aquí dos personas muy especiales: mi Dayani, que ya te he dicho que la culpa de que me haya retrasado tanto en la tesis ha sido tuya, ¡¡ya que si hubieras entrado antes en el departamento adelanto unos pocos de años!! Jaja, ¡¡con esa organización que te caracteriza!! ¡Y tu ayuda infinita, que la das antes de que se te pida! Eres una persona maravillosa, y por supuesto, ¡la mejor de todos los técnicos! Y mi Alfredi, ¡mi mejor maestro!

¡Una persona que se merece todo lo mejor y no es capaz de dar un no por respuesta! ¡Por eso acabas metido en todos los embolados que te pido! Gracias por ser "tu mini yo" jaja. Sin embargo, este equipo de trabajo no se acaba aquí, sino que todos los compañeros que forman parte de la empresa Ingulados han sido fundamentales, sobre todo Pilar y David, dos compañeros excelentes, ¡Tantas muestras no hubiera tenido sin los cientos de monterías a vuestras espaldas!

Como no darle las gracias a la mejor compañera del mundo de todas las faenas del Hospital (que son unas cuantitas) ¡Mi hermanita Argentina, Sofi! Porque ya sabes que, aunque entraras como compañera ¡has pasado a otro plano! Eres un ejemplo para mí en muchos sentidos, una valiente, una amiga con la que espero seguir muchos más años compartiendo miles de momentos, ¡Así como también verte pronto escribir los agradecimientos para tu tesis! ¡Que ya mismo nos ponemos manos a la obra! Y Laura, ¡ya sabes que ojalá pudiera retenerte con Sofi y conmigo para trabajar las tres juntas toda la vida! (algo se nos ocurrirá) ¡Eres excepcional! Y, a pesar de tu porte serio, ¡eres la más risueña! ¡El mundo está equivocado! jajaja. Daros las gracias por estos últimos momentos en los que habéis hecho posible que le dedicara un poquito más a la tesis y os hayáis encargado más del diagnóstico. Si no hubierais estado, ¡no me hubiera sido posible! Y como no, Ana, una vez que entraste al laboratorio, sabíamos que nadie te iba a ganar en eficaz, responsable, agradable (a veces un pelín de mala leche) y ¡¡la mayor colaboradora de TFGs por supuesto!! Jaja. No solo eres magnífica en tu trabajo, ¡sino como persona te superas! Por eso estás incluida en el grupo de wasap de las mejores del HCV jajaja. Aquí no se me podía olvidar mencionar a mi Varela, que estuvo conmigo durante los primeros comienzos de esta andadura, y aunque ya no estemos juntas ¡siempre seremos las eternas becarias!

En el Hospital se encuentran muchos profesores que me han animado mucho durante esta tesis y a los que les tengo un gran cariño, no solo por ello, sino por el trabajo codo con codo a diario, lo que me ha enriquecido enormemente. Entre ellos Rafa, Concha, Luis, Vicente, Esther, Marcos, Paco, y como no mencionar a Joaquín, ya que en parte gracias a él estoy aquí. Apostando por mí para trabajar en el Servicio de Diagnóstico, me ayudó a ver una rama de la veterinaria que nunca me había planteado y que a día de hoy me entusiasma. Y ¡aunque a veces es un cascarrabias!, le tengo un cariño infinito por esos buenos consejos en tantos momentos. Del Hospital no podría pasar sin mencionar a todos

los compañeros con los que a diario comparto muchos ratos en los que reímos y ¡¡alguna que otra critiquita también hacemos!! Noe (que espero verte puerta con puerta en breve), María Martín, Alejandro, Patri, Javi, Nacho, tito Mario, Jose, Gemma y Chiqui (¡¡que contigo limpiar la sala de necropsia y recoger esos cadáveres se hace más agradable! no te vayas por favor) jaja.

¡Qué decir de mi familia cacereña, mi familia piticlán!, Rober, que te voy a decir, pues que somos clavaditos! jaja que ¡con una mirada no nos hace falta más! Has sido un apoyo incondicional desde el momento que nos conocimos, has estado en los buenos momentos, pero sobre todo te agradeceré tu presencia en los malos, dando esos consejos que pareces un brujo ¡porque aciertas siempre! jaja. Eres de las personas, junto a Marisa, que más me habéis animado a no tirar la toalla en dejar esta larga tesis, en la que yo te decía ¿para que la quiero? Y tú me decías: "hazme caso..."jajaja. Y bueno, mi Marisina, tú eres mi alma gemela, eres mi ¡delfín hasta el fin!, te quiero infinito y ya lo sabes, gracias por estar siempre. Mi Virgi y Robertín, os adoro, no cambiéis nunca, aunque creo que no lo haréis, porque tenéis buenos referentes en casa. Marisol, tú formas parte también de esta familia. Eres toda una luchadora a la que admiro, viéndote sacar fuerzas en momentos muy duros, siendo todo un ejemplo. ¡Y gracias por esas tortillas de patatas en momentos de crisis! jaja.

Bueno en estas líneas quiero darle las gracias a lo más importante de mi vida, mi familia. Todo comienza por mis padres, grandes luchadores, reponiéndose de cada duro golpe que les ha dado la vida. Mi padre, un hombre de un corazón enorme, nos ha inculcado grandes valores a mis hermanos y a mí, como el respeto, el sacrificio y la valentía. Se que ver esta tesis acabada para él es muy importante, por eso el último empujón ha sido gracias a ti, papá. Mi madre, una mujer admirable en todos los aspectos, siempre positiva a pesar de las adversidades. Mis hermanos, no podría tener más suerte de tenerlos, estoy hecha de trocitos de vosotros, Mamen, Manoli y Aure (mi porri), ayudándome incondicionalmente en cualquier momento de mi vida. No quiero entrar en más detalles de vosotros ¡porque se que generaría muchos piques! Jajaja. Así que solo os digo que os quiero con locura. Mis cuñados, que realmente son como hermanos, Alberto ¡que desde mi comunión que nos conocimos ya ha pasado tiempo! jajaj, Antonio y Amelia ¡os quiero lo mismo! Y por último a mi niña, Andrea, ¡no cambies nunca y lucha siempre

por tus sueños! ¡Lo mismo le deseo a mi sobrinín que viene de camino! Como no hay nombre todavía, será mi pequeño porri.

Y por último, el mayor agradecimiento te lo debo a ti, Fran. Estoy convencida de que no hubiera llegado a este punto de terminarla, sino hubiera sido por ti. Creo que mi destino fue hacer veterinaria y no medicina por cruzarme contigo en el camino. Hace 19 años nos conocimos y desde entonces siempre me has ayudado incondicionalmente a todo, aunque la verdad, ¡hasta hace muy poco no se me asentó la cabeza y ya te vi como mi marido! jajaja. Eres la persona más maravillosa y generosa que conozco. Tu apoyo ha sobrepasado el estar ahí en los momentos de crisis de no querer seguir adelante con ella, sino que has sido para mí un director. Durante toda esta etapa, hemos pasado momentos de todo tipo, algunos de ellos ojalá no hubieran ocurrido, pero ahora tienes un ángel de la guarda que te acompaña, así que esta tesis también va dedicada a Javier. Pero bueno, ¡por fin toca cerrar capítulo de tesis, y así poder disfrutar más de mi Leni, la mejor compañera que he tenido en todo este viaje y de Bulicio, la nueva incorporación en la familia!

A mis padres

ÍNDICE

I. RESUMEN.....	1
II. ABREVIATURAS.....	3
III. INTRODUCCIÓN.....	7
1. LA EXPLOTACIÓN CINEGÉTICA COMO ALTERNATIVA AL MODELO DE GANADERÍA TRADICIONAL.....	7
1.1. El jabalí como sujeto de explotación cinegética.....	8
1.2. Modelos de gestión cinegética para la explotación del jabalí en España.....	11
1.3. Consecuencias de la interacción del jabalí con otras especies.....	13
2. GÉNERO SALMONELLA.....	19
2.1. Características generales y taxonomía del género <i>Salmonella</i>	19
2.2. Epidemiología de <i>Salmonella</i> en jabalíes de Europa.....	23
2.2.1. Mecanismos de transmisión y eliminación.....	25
2.2.2. Factores que influyen en la diseminación.....	26
2.3. Patogenicidad.....	30
2.3.1. Colonización inicial.....	30
2.3.2. Supervivencia de <i>Salmonella</i> en macrófagos y células dendríticas.....	31
2.6. Presentación clínica y lesional de la enfermedad.....	32
3. RESISTENCIAS A LOS ANTIMICROBIANOS EN SALMONELLA.....	36
3.1. Aspectos generales de resistencia a los antimicrobianos.....	36
3.2. Mecanismos de resistencia a los antimicrobianos.....	39
3.2.2. Aminoglucósidos.....	41
3.2.3. Tetraciclinas.....	41
3.2.4. Quinolonas y fluoroquinolona.....	42
3.2.5. Sulfonamidas.....	44
3.2.6. Cloranfenicol.....	45
3.2.6. Polimixinas.....	45
3.3. Transmisión de resistencias.....	46
3.3.1. Elementos genéticos móviles.....	48
3.4. Resistencias antimicrobianas en <i>Salmonella</i> y su trascendencia en salud pública.....	53

IV. JUSTIFICACIÓN	57
V. OBJETIVOS.....	59
VI. TRABAJOS PUBLICADOS.....	61
5.1. Estudio de la prevalencia de <i>Salmonella spp.</i> en tonsilas, ganglios linfáticos mandibulares y heces de jabalíes de España y de las relaciones genéticas entre aislados.....	61
5.2. Estudio de brotes de <i>Salmonella Choleraesuis</i> resistente a los antibióticos en jabatos de la zona centro-oeste de España.....	73
5.3. Estudio de la diseminación de resistencias antimicrobianas en <i>Salmonella enterica</i> serovar Choleraesuis entre ambientes domésticos y salvajes.....	85
5.4. Propagación de aislados de <i>Salmonella spp.</i> resistentes a los antimicrobianos en jabalíes y su relación con prácticas de manejo.....	103
VII. DISCUSIÓN	143
VIII. CONCLUSIONES	169
IX. BIBLIOGRAFÍA	171
X. ANEXOS.....	201
1. Copyright del artículo número 1.....	201
2. Copyright del artículo número 2.....	207
3. Copyright del artículo número 3.....	213
4. Estado de la revisión del artículo 4.....	215

I. RESUMEN

El género *Salmonella* integra varios serotipos de especial importancia sanitaria, bien por su carácter zoonótico, o bien por su carácter patógeno en los hospedadores en los que se encuentran adaptados. Uno de estos hospedadores son los suidos, entre los que se encuentra el jabalí (*Sus scrofa*), una especie cinegética que ha experimentado un gran crecimiento demográfico en los últimos años. A consecuencia de este aumento poblacional, acrecentado aún más por su cría en semilibertad con fines cinegéticos o por su producción cárnica, las interacciones entre jabalíes, humanos y animales domésticos se han incrementado notablemente, con el consiguiente riesgo de contagio de *Salmonella* spp. desde los jabalíes, incluyendo la transmisión de las resistencias antimicrobianas que con frecuencia portan.

En relación con esta situación, en la presente tesis doctoral nos hemos planteado identificar las salmonellas presentes en esta especie, determinar su forma de transmisión, caracterizar los procesos que producen, y en última instancia, determinar los perfiles de resistencia antimicrobiana de los aislamientos obtenidos. Por un lado, este trabajo se ha desarrollado a partir de animales abatidos en distintas acciones cinegéticas desarrolladas en fincas ubicadas en la zona Sur-Occidental de España. Los resultados mostraron que la prevalencia general de *Salmonella* spp. en jabalíes abatidos en monterías se sitúa en el 27%, siendo las tonsilas el órgano donde ésta se aisló con mayor frecuencia. Los aislados obtenidos pertenecieron mayoritariamente a las subespecies *enterica* y *diarizonae*, con porcentajes similares para ambas, mientras que los serotipos más comunes fueron: 38:z10:z53 en la subespecie *salamae*; y Enteritidis y Newport en la subespecie *enterica*. Por otro lado, durante el periodo de estudio, se estudiaron diferentes brotes de salmonelosis desarrollados por *S. Choleraesuis* en fincas de cría de jabalíes, observándose en todos ellos cuadros septicémicos, con una clínica y unas lesiones compatibles con este hecho, presentando en todos los casos una elevada morbilidad y mortalidad. Hemos constatado la presencia de relaciones clonales entre aislados obtenidos en fincas adyacentes, si bien circunstancialmente también hemos observado este hecho en fincas alejadas entre sí, lo que parece indicar la implicación de otros factores como el comercio de animales o la vehiculación a través de suministros, en la circulación de clones entre explotaciones. En cuanto a las resistencias antimicrobianas, un 75.2% de los aislados

obtenidos presentaron algún tipo de resistencia, mientras que un 15,7% se consideraron multirresistentes, siendo las resistencias a las sulfonamidas y a la estreptomicina las más frecuentes, en concordancia con los genes más numerosos detectados que fueron *sul1* y *strA*. La presencia de genes de resistencia asociados a elementos de movilidad se detectó en un 5.8% de los aislados procedentes de jabalíes, y en un 41.6% de los de cerdos, asociados mayoritariamente a los serotipos Typhimurium y Choleraesuis. Aunque un 38.8% de los aislados de jabalíes presentaron replicones plasmídicos, no hemos podido constatar el intercambio de genes de resistencia a través de estos elementos genéticos móviles con el cerdo, especie con la que comparte un mismo ecosistema. Por último, al estudiar el efecto de diferentes medidas de manejo sobre las resistencias antimicrobianas de los aislados de *Salmonella* spp. en jabalíes, se observó que la agrupación temporal de individuos provocada por la suplementación alimenticia en fincas con vallado perimetral se correlacionaba positivamente con el número de resistencias de los aislados.

En conclusión, podemos decir que el jabalí representa un importante reservorio de cepas patógenas de *Salmonella*, frecuentemente asociadas a genes de resistencia antimicrobiana, que pueden ser fácilmente transferidas al ganado doméstico y en última instancia al género humano, con importantes repercusiones clínicas y sanitarias, y que además pueden comprometer la eficacia de las distintas estrategias terapéuticas establecidas, siempre bajo un concepto "One Health" de la salud.

II. ABREVIATURAS

ADN: Ácido Desoxirribonucleico.

AEMPS: Agencia Española de Medicamentos y Productos Sanitarios.

Agar XLD. Agar xilosa lisina desoxicolato.

AMP: Ampicilina.

ARN: Ácido Ribonucleico.

ARNr: Ácido Ribonucleico Ribosómico.

BLEE: Betalactamasas de Espectro Extendido.

CATs: Cloranfenicol Acetil Transferasas.

CDC: Centers for Disease Control and prevention (Centros para la prevención y el control de enfermedades. EEUU).

CHL: Cloranfenicol.

CG: Casetes Génicos.

CLSI: Clinical and Laboratory Standards Institute. Instituto de Estándares Clínicos y de Laboratorio.

Col: Colistina.

CTX: Cefotaxima.

DHFR: Dihidrofolato Reductasa.

DHPS: Dihidropteroato Sintasa.

DOX: Doxiciclina.

ECDC: European Centre for Disease Prevention and Control (Centro Europeo para la Prevención y Control de Enfermedades).

EFSA: European Food Safety Authority (Autoridad Europea de Seguridad Alimentaria).

ENR: Enrofloxacin.

GLM: Ganglio Linfático Mesentérico.

GLS: Ganglio Linfático Submandibular.

GMN: Gentamicina.

GRI: Genetic Resistance Index.

ha: Hectárea (10000 metros cuadrados).

Ig: Inmunoglobulina.

kb: Kilobases.

LPS: Lipopolisacárido.

mcr: Mobilized Colistin Resistance (Resistencia a la colistina movilizada)

MR: Multirresistencia.

MITERD: Ministerio para la Transición Ecológica y el Reto Demográfico.

NA: Noradrenalina.

NEO: Neomicina.

OECD: Organización para la Cooperación y el Desarrollo Económicos.

OMS: Organización Mundial de la Salud.

PABA: Para-aminobenzoic Acid (Ácido para-aminobenzoico)

PBP: Penicillin-Binding Protein (Proteína fijadora de penicilina).

PCR: Polimerase Chain Reaction (Reacción en cadena de la polimerasa).

PCV-2: Porcine Circovirus Type 2 (Circovirus Porcino Tipo 2).

PFGE: Pulsed Field Gel Electrophoresis (Electroforesis en gel de campo pulsado).

pMLST: plasmid "MultiLocus Sequence Typing" (Tipificación multilocus de secuencias plasmídicas)

PMQR: Plasmid-Mediated Quinolone Resistance. (Genes de resistencia a quinolonas mediados por plásmidos).

PRI: Phenotypic Resistance Index.

PRRS: Porcine Respiratory and Reproductive Syndrome (Síndrome Respiratorio y Reproductivo Porcino).

QRDR: Quinolone Resistance-Determining Regions (Regiones determinantes de resistencia a las quinolonas)

RAM: Resistencia Antimicrobiana.

SPI: *Salmonella* Pathogenicity Island (Isla de patogenicidad de *Salmonella*).

spp: Especies.

STR: Estreptomina.

SUL: Sufonamida.

SXT: Sulfametoxazol.

TET: Tetraciclina.

UFC: Unidades Formadoras de Colonias.

v. gr.: Verbi gratia (Verbigracia, Por ejemplo)

WGS: Whole Genome Sequencing (Secuenciación de genoma completo).

WHO: World Health Organization (Organización mundial de la salud).

XNL: Ceftiofur.

III. INTRODUCCIÓN

1. LA EXPLOTACIÓN CINEGÉTICA COMO ALTERNATIVA AL MODELO DE GANADERÍA TRADICIONAL

En las últimas décadas hemos asistido a un progresivo abandono de los modelos tradicionales de explotación agrícola y ganadera en el medio rural, sobre todo en aquellas zonas en las que estas prácticas eran escasamente productivas. Debido a ello, se han promovido distintas políticas en el ámbito europeo y nacional encaminadas a diversificar las actividades de estas zonas, favoreciendo el aprovechamiento de recursos económicos alternativos que hagan factibles el mantenimiento de las sociedades rurales que de ellas dependían. La actividad cinegética supone uno de estos valiosos recursos (Caro et al., 2014).

La caza ha experimentado una gran evolución a lo largo de los años, pasando de ser una actividad puramente de subsistencia a tener un carácter marcadamente deportivo y lúdico en la actualidad. Del mismo modo, la conciencia social respecto a la necesidad de preservar el medio ambiente ha ido creciendo en los últimos tiempos, lo que ha suscitado desencuentros entre aquellos que abogan por la eliminación de toda actividad humana en el ámbito natural y los que defienden una conservación más integradora que permita compatibilizar el cuidado del medio ambiente con el desarrollo de actividades económicas que mantengan a los residentes de las zonas rurales (R. Perea, 2014). En este panorama, el sector cinegético está cobrando una gran importancia como dinamizador económico de las zonas rurales, contribuyendo directamente a la generación de riqueza y a la fijación de la población al medio (Andueza et al., 2018).

Económicamente, el sector cinegético conlleva asociado un importante volumen de negocio. En 2018 se llevó a cabo un estudio en el que se estimó que todo el sector generaba un total de más de 6475 millones de euros y 187000 puestos de trabajo, cifras que suponen una gran inyección económica para las comarcas en las que se llevan a cabo las acciones cinegéticas y que suelen coincidir con aquellas que han experimentado una mayor crisis dentro de los modelos tradicionales de explotación ganadera (Andueza et al., 2018).

Además de su rendimiento económico, la caza genera otra serie de beneficios menos tangibles, pero de importancia capital, en los ecosistemas en los que se desarrolla

(Arroyo et al., 2013; Caro et al., 2014). En primer lugar, la actividad cinegética supone un sistema de control para algunas especies sobreabundantes, como puede ser el ungulado silvestre *Sus scrofa*, el jabalí. Las elevadas densidades de este animal en determinadas zonas provocan fenómenos de sobrepastoreo y desertización (Bañares A. et al., 2004), y además pueden suponer una amenaza para la nidificación de algunas aves (Antonio J Carpio et al., 2014). El control de estas especies también supone una disminución del riesgo que supone el ser reservorios a largo plazo de enfermedades infectocontagiosas tales como la tuberculosis, brucelosis o salmonelosis (Gortázar et al., 2007). Por otro lado, el mantenimiento de unas densidades óptimas de las especies cinegéticas en cada zona contribuye al equilibrio entre plantas leñosas y herbáceas y permite una correcta dinámica forestal (R. Perea, 2014).

En lo que respecta al jabalí, su importancia dentro del sector cinegético se ha visto incrementada en los últimos años, representando en la actualidad la primera especie de caza mayor por número de capturas (Garrido, 2012; MITERD, 2019). La necesidad de tener cotos con altas densidades de animales ha inducido a la aparición de nuevos modelos de gestión/explotación de fincas cinegéticas que adoptan, en mayor o menor medida, sistemas tradicionales de explotación ganadera. Hay que tener en cuenta que ciertas medidas de gestión pueden tener implicaciones de distinta índole, tanto para las especies cinegéticas como para otras con las que comparten un determinado ecosistema y los recursos que se generan, por lo que una buena gestión de los cotos y de las especies cinegéticas es esencial para la conservación de la biodiversidad (Arroyo et al., 2013).

1.1. El jabalí como sujeto de explotación cinegética

El jabalí (*Sus scrofa*) es un mamífero salvaje antecesor del cerdo doméstico, perteneciente a la Familia *Suidae* e integrada en el Orden *Artiodactyla* (Lipowski, 2003) (Fig. 1). Las 8 especies que componen el género *Sus* se localizan principalmente en Asia, aunque el jabalí eurasiático muestra un área de distribución histórica más amplia, que incluye Europa y el Norte de África (Rosell, 2001). Se trata de un animal de tamaño mediano, con un dimorfismo sexual poco marcado. Los machos son un 5-10% más grandes que las hembras y tienen el cráneo más largo. En los machos resulta evidente el tamaño que adquieren los caninos, cuyo desarrollo en longitud es prácticamente constante

a lo largo de toda su vida, con un ritmo de crecimiento cercano a los 3 milímetros anuales (P. Fernandez-Llario, Mateos-Quesada, Patricio, 2003).

En cuanto a su carácter trófico, el jabalí se puede considerar un omnívoro perfecto, capaz de alimentarse tanto de plantas como de materia de origen animal, predominando la dieta de tipo vegetal. De forma general, aunque la mayor parte de la dieta en verano e invierno está compuesta por raíces de especies herbáceas, e invertebrados en primavera, en otoño es especialmente frecuente el consumo de frutos de diversas especies, sobre todo los procedentes de la encina (*Quercus ilex*), el alcornoque (*Quercus suber*), el roble (*Quercus robur*) y el madroño (*Arbutus unedo*) (Fernández-Llario, 2006). La alimentación de procedencia animal es poco importante aunque habitual, siendo los caracoles y las lombrices de tierra los recursos más apreciados, no desdeñando en ocasiones los aportes de carroña como complemento proteico (Gortázar et al., 2006).



Fig. 1: *Jabalíes en libertad*

La estructura social de las poblaciones de jabalíes tiene como unidad básica el grupo matriarcal compuesto por una o varias hembras acompañadas de sus jabatos y liderado por la hembra de mayor edad. En estos grupos se establecen estrechos vínculos sociales entre sus integrantes produciéndose comportamientos de adopción de camadas por parte de una hembra integrante del grupo, en caso de la muerte de la madre (Janeau et al., 1988), o de agregaciones de jóvenes machos que abandonan sus grupos matriarcales por la presión ejercida por los machos adultos, manteniéndose aislados

durante la mayoría del año, aunque durante el periodo de celo pueden acercarse a los grupos de hembras y crías y desplazar de ellos a los jóvenes machos menores de un año (Fernández-Llario, 2006). El periodo de celo empieza en el mes de octubre y puede alargarse hasta enero, aunque está notablemente influido por la cantidad de recursos naturales disponibles en cada momento (P. Fernandez-Llario & Mateos-Quesada, 1998). Tiene lugar una vez al año y dura aproximadamente unos 21 días, produciéndose continuas luchas entre los machos con el fin de ser los predominantes en la cubrición (Étienne, 2004).

Los jabalíes concentran su actividad durante el periodo vespertino y la noche, mientras que sus movimientos durante el día se restringen casi exclusivamente a moverse desde el área de descanso a su área de alimentación (Boitani et al., 1994; Johann et al., 2020). No obstante, dependiendo de las condiciones ambientales o de otros factores, como la presión cinegética, los jabalíes pueden modular sus hábitos e incrementar sus periodos de actividad diurna (Colomer et al., 2021; Laguna et al., 2021). Este comportamiento hace que la observación directa de los animales sea complicada, aunque su actividad en la naturaleza produce muchos indicios que indican su presencia, como huellas y excrementos, rastros que identifican actividades de confort o de comunicación, bañas, árboles marcados y frotados, hozaduras y camas, así como la presencia de pelos en las vallas de separación de fincas (Rosell, 2001).

Durante las últimas décadas, el jabalí ha experimentado un aumento de su población y distribución en Europa, incluyendo la Península Ibérica (Fruzinski, 1995; Leranoz, 1996; Massei et al., 2015). Aunque en España no existen estimaciones oficiales sobre su censo, los datos de capturas de especies cinegéticas recogidos en las estadísticas anuales de caza proporcionadas por el Ministerio para la Transición Ecológica y el Reto Demográfico muestran un continuo crecimiento en el número de jabalíes abatidos en acciones cinegéticas. En los últimos 10 años, el número de capturas de esta especie casi se ha triplicado, pasando de los 136.356 en 2009 a 385.726 jabalíes abatidos en 2019 (MITERD, 2019). Si a este dato además se le suma que el número de licencias de caza ha tenido una tendencia inversa al número de capturas en ese mismo periodo, descendiendo desde 1.032.242 hasta 743.650 (MITERD, 2019), es lógico pensar que la población de jabalíes en España está experimentando un importante crecimiento. La caza es la principal causa de mortalidad del jabalí en toda Europa, incluso en aquellas

regiones donde esta especie aún tiene un importante número de depredadores naturales, como el lobo (Velickovic et al., 2016). En regiones como la península ibérica, donde la población de lobos no es especialmente abundante, su efecto regulador sobre la población de jabalíes no es significativo, más si tenemos en cuenta la elevada presencia de otras presas por las que este carnívoro muestra una mayor apetencia, como es el caso de los ciervos o los corzos (Figueiredo et al., 2020). La expansión demográfica del jabalí lleva aparejada una colonización de zonas en las que antes su presencia era escasa (Massei et al., 2015; Sarasa, 2013). Su elevada capacidad de adaptación a diferentes hábitats hace que grupos de esta especie se desplacen sin mayores problemas desde zonas costeras hasta zonas de alta montaña, en función de las condiciones de disponibilidad de alimento, agua y zonas tranquilas donde poder ocultarse (Colomer et al., 2021; Fernández-Llario, 2006; Johann et al., 2020). También se desplazan de acuerdo a su capacidad de aprovechar recursos antropogénicos, como basureros o contenedores en zonas urbanas y periurbanas, lo que lleva aparejado un incremento de las interacciones con personas o animales domésticos y un riesgo de transmisión de patógenos (Fernandez-Aguilar et al., 2018). Su elevada versatilidad ha hecho que incluso hayan comenzado a producirse adaptaciones fenotípicas a estos nuevos hábitats en los jabalíes de zonas periurbanas (Castillo-Contreras et al., 2021; Rosell, 2001). Además de por su citada adaptabilidad, el aumento poblacional se ha debido a su buena capacidad reproductora, fruto de tres factores fundamentales: la precocidad a la que alcanza la madurez sexual (aproximadamente en el macho a los 8 meses y en la hembra al año), su gestación relativamente corta (120-130 días) y su elevada media de crías por camada (3.3-5.3 fetos/camada) (Massei et al., 2015; Rosell, 2001).

1.2. Modelos de gestión cinegética para la explotación del jabalí en España.

En los últimos años se ha experimentado un aumento en la demanda de cotos de caza con elevadas densidades de jabalíes. Esta circunstancia ha favorecido la aparición de nuevos modelos de explotación para este animal. Para que las poblaciones cinegéticas cubran las expectativas de los cazadores y resulten además económicamente rentables para los propietarios y gestores de las fincas, es necesario gestionar el hábitat y las especies que en él se explotan, y para ello se recurre a varios mecanismos como pueden ser la siembra de cultivos y pastos como fuente de alimento, el aporte directo de agua y alimento, el control de depredadores, el establecimiento de tratamientos sanitarios frente

a enfermedades, o la suelta de individuos procedentes de otros lugares (Caro et al., 2014). Esto ha dado lugar a una evolución en los sistemas de explotación del jabalí en numerosas fincas situadas en la mitad suroccidental de la península Ibérica, creando modelos de explotación más eficientes para la cría de esta especie. El cambio ha consistido principalmente en una mayor intervención tendente a aumentar las densidades de la especie, intensificando su manejo y utilizando cerramientos cinegéticos para independizar cada unidad de gestión del entorno. Dependiendo del grado y el tipo de intervención, las modalidades de explotación pueden clasificarse en tres grupos: Fincas abiertas (Sistema extensivo), Fincas cerradas (Sistema mixto: intensivo-extensivo) y granjas o núcleos cinegéticos.

En las fincas abiertas, la población natural de jabalíes se regula en función de los recursos naturales que ofrece el hábitat donde se desarrollan. En este tipo de explotaciones, la población animal que es objeto de aprovechamiento cinegético se encuentra formando parte de la comunidad faunística de un ecosistema en el que se encuentra en equilibrio (Carranza, 1999). Esta forma de explotación es la que presenta menor intervención humana. Por otro lado, las fincas cerradas suelen estar organizadas en dos partes: una de menor superficie, dedicada a la cría intensiva de los animales recién nacidos; y otra parte más extensa a la que pasan los animales jóvenes, donde se desarrollan hasta alcanzar la madurez y convertirse en "trofeos de caza" (Carranza, 1999). En este sistema de explotación son muy comunes los llamados "cercones" (superficies que no suelen sobrepasar las 500 ha) (Fig. 2) donde los jabalíes se mantienen de forma artificial en densidades que suelen superar los 50 individuos/100 ha (Rosell, 2001). A su vez, las fincas cerradas pueden ser con manejo o sin manejo, dependiendo de si se actúa o no sobre los individuos de esa explotación. Las medidas de manejo más comúnmente aplicadas son la suplementación alimenticia y/o de agua, el manejo por lotes en diferentes cercas y/o la aplicación de tratamientos sanitarios (Desparasitaciones, vacunas...) (Gonçalves Blanco, 2017). Por último, las granjas cinegéticas se definen en la Ley 14/2010, de 9 de diciembre, de caza de Extremadura, como "*...aquellas explotaciones industriales, autorizadas como núcleos zoológicos por el órgano competente en la materia, dedicadas a la producción de especies cinegéticas mediante su confinamiento en instalaciones habilitadas al efecto con la finalidad de su comercialización vivas o muertas o autoabastecimiento*". En este caso los animales no se crían inmersos en un ecosistema

natural, sino que una determinada extensión de terreno se dedica exclusivamente a esta actividad, como ocurre en el caso de cualquier otra granja de animales domésticos.



Fig. 2: Jabalíes en un cercón

1.3. Consecuencias de la interacción del jabalí con otras especies.

El aumento en la densidad de las poblaciones de jabalí debido a su crecimiento natural o a su cría en explotaciones cinegéticas, conjuntamente con su expansión territorial, ha propiciado un incremento en la frecuencia de interacciones entre este animal y otras poblaciones animales, incluyendo al hombre, generando en este último caso situaciones de verdadera alarma social (J. L. Guerra, 2021; Meng et al., 2009). Ello se relaciona con la frecuente implicación de jabalíes en accidentes de tráfico, ataques a personas, animales domésticos y bienes urbanos o privados (Casas, 2008).

El aumento de las densidades de población de algunas especies cinegéticas puede provocar graves alteraciones del ecosistema. Está demostrado que, en épocas desfavorables, donde la vegetación herbácea escasea, los jabalíes, cérvidos y bóvidos recurren al ramoneo para completar su alimentación. En aquellas zonas donde la densidad de estos animales es alta, se llegan a producir cambios en la composición específica de las comunidades leñosas debido a las preferencias de estos animales por especies como los madroños, las encinas, los acebuches, etc. Este hecho hace que otras especies leñosas menos apetecibles, como pueden ser el romero, el cantueso o el tomillo, con compuestos aromáticos o alcaloides en su composición, reemplacen a las especies anteriores. Dado

que las plantas favorecidas (las no consumidas) reemplazan a otras con mayor valor ecológico, se produce un retroceso a etapas primitivas colonizadoras, rompiendo la dinámica natural que favorece el mantenimiento de áreas boscosas (Ramón Perea et al., 2014). Por otro lado, la intensificación de los cotos de caza suele acompañarse con frecuencia de la instalación de vallados perimetrales que dan lugar a una fragmentación del paisaje, impidiendo el movimiento libre de individuos y limitando las posibilidades de reproducción entre distintas poblaciones, con la consecuente pérdida de variabilidad genética (Caro et al., 2014).

Otra de las consecuencias de la intensificación de la gestión cinegética es que los individuos liberados pueden favorecer la introducción de nuevos parásitos y enfermedades al medio y modificar las características genéticas de las poblaciones receptoras, pudiendo ser perjudicial para la biodiversidad. Por lo tanto, si se llevan a cabo medidas de gestión inadecuadas se podría dar lugar a efectos ecológicos no deseados, mermando la calidad de las poblaciones de especies cinegéticas y no cinegéticas, así como la calidad de los hábitats naturales (Caro et al., 2014).

Además de las mencionadas consecuencias sociales y ecológicas, las altas densidades de jabalíes acarrearán una serie de inconvenientes de índole sanitaria originados fundamentalmente por el aumento de las interacciones con otras especies o por la debilidad inmunitaria derivada de la escasez de recursos y la elevada competencia por ellos (Halli et al., 2012; Ruiz-Fons et al., 2006). Además, en el caso de las explotaciones cinegéticas esta situación puede agravarse por la escasa higiene, la mezcla de animales de distintos orígenes y edades y el estrés que genera en ellos cualquier tipo de manejo. A los factores anteriores se les suele sumar además el hecho de que los ganaderos responsables de estas explotaciones carecen en muchos casos de la experiencia y conocimientos necesarios para la cría de esta especie, y tienden a desarrollar un tipo tradicional de explotación, especialmente inadecuado tanto desde el punto de vista zootécnico como sanitario. Estos sistemas someten a los animales a condiciones medioambientales y zootécnicas para las que no están adaptados ni fisiológica ni inmunitariamente, lo que da lugar a la aparición de enfermedades similares a las descritas en explotaciones de cerdo doméstico, pero con cuadros patológicos de especial virulencia o con características particulares, habiéndose descrito altas mortalidades en el jabalí por patógenos típicos de porcino doméstico como *Erysipelothrix rhusiopathiae* (Risco et al.,

2011) o *Pasteurella multocida* (D. Risco, P. Fernandez-Llario, J. M. Cuesta, et al., 2013), o cuadros patológicos de mayor gravedad en jabalíes coinfectados por *Mycobacterium bovis* y el circovirus porcino tipo 2 (D Risco et al., 2013).

Además de su papel como sujeto pasivo de enfermedades, el jabalí es una especie reconocida como reservorio de numerosos agentes patógenos susceptibles de transmitirse a otros animales salvajes, a los animales domésticos y también al ser humano. Así, existe una gran cantidad de estudios que confirman que los jabalíes son portadores de importantes agentes zoonóticos, entre los que destacan bacterias como *Salmonella* spp., *Brucella* spp, *Yersinia enterocolitica*, *Y. pseudotuberculosis*, *E.coli* O157:H7, *Listeria monocytogenes*, *Campylobacter* spp., y *Chlamydia* spp. entre otras (Cano-Manuel et al., 2014; Diaz-Sanchez et al., 2013; Kreizinger et al., 2014; N. Navarro-Gonzalez, Casas-Díaz, et al., 2013; Sanno et al., 2014; Wacheck et al., 2010); virus como el de la hepatitis E (Kaba et al., 2010); o parásitos como *Trichinella* spp. (Gamito-Santos et al., 2009) y *Toxoplasma gondii* (Calero-Bernal et al., 2013). Además, también se ha descrito que el jabalí actúa de reservorio de virus causantes de ciertas enfermedades muy importantes que afectan al cerdo doméstico, tales como la peste porcina africana, peste porcina clásica y enfermedad de Aujeszky (Gortázar et al., 2007; Meng et al., 2009). Existen igualmente estudios que demuestran la presencia de *Mycobacterium bovis* en jabalíes y en especies salvajes que cohabitan con él, como el ciervo o el gamo, suponiendo también por tanto un problema sanitario para la fauna salvaje (García-Jiménez et al., 2013). Por tanto, una inadecuada gestión en explotaciones de jabalí puede tener importantes consecuencias sanitarias para la población humana, los animales domésticos y el ecosistema en que se ubiquen dichas explotaciones (Meng et al., 2009; Wacheck et al., 2010).

Partiendo de animales infectados, la principal vía de transmisión al género humano la constituye el consumo de carne procedente de canales contaminadas durante su procesado (Van Campen & Rhyan, 2010). Dicha contaminación puede deberse a unas malas condiciones de evisceración o también ser provocada en la misma acción cinegética a consecuencia del disparo, si éste afectara al paquete intestinal (Diaz-Sanchez et al., 2013; Türck, 2008). Algunos estudios confirman que en el 61% de los jabalíes analizados se ha encontrado al menos un patógeno alimentario (Wacheck et al., 2010), entre los que figuran *Salmonella choleraesuis* y otras serovariedades de esta especie. Este hecho justifica la importancia de la inspección veterinaria *post mortem* de las canales y del

asesoramiento a los cazadores y a las personas que preparan y consumen dicha carne, como medidas esenciales para reducir el riesgo de contagio a los humanos y a los cerdos domésticos (Methner et al., 2010).

Además del consumo de carne de jabalíes abatidos en acciones cinegéticas, otras vías de contagio las constituyen el contacto directo con materiales contaminados por excreciones de estos animales, o el consumo de agua o alimentos contaminados por las excretas procedentes de esta especie (Wacheck et al., 2010). Las interacciones entre humanos y jabalíes se incrementan día a día debido a la colonización de zonas periurbanas por parte de estos animales en busca de fuentes fáciles de comida, como son los contenedores de basura o zonas ajardinadas (N. Navarro-Gonzalez, Casas-Díaz, et al., 2013).

En cuanto a la posible transmisión de enfermedades al ganado doméstico o a otras especies silvestres, cabe decir que puede verse favorecida por ciertas prácticas de manejo que promueven la agrupación de individuos de diferentes especies. Es lo que ocurre, por ejemplo, con la colocación de bebederos y comederos en zonas concretas de la finca (Fig. 3), ya que al ser puntos de encuentro para una gran variedad de animales (roedores, zorros, aves y ungulados) que comen y defecan en el mismo lugar de alimentación y sobre todo en casos de alta densidad (L. Castillo et al., 2011), se incrementa el riesgo de que se produzcan infecciones (Sanno et al., 2014).

Sin embargo, del mismo modo que el jabalí puede suponer un riesgo sanitario para las poblaciones humanas o animales con las que contactan, los jabalíes pueden verse afectados por patologías provenientes de las granjas domésticas de su entorno. Además, como se mencionaba al comienzo de este apartado, el tipo de manejo al que estén sometidos los animales determinará en gran medida el curso clínico de estas enfermedades. Este hecho se constata en estudios comparativos realizados entre animales de vida libre, animales con cierto grado de manejo, y animales con un manejo muy intensificado, destacando que a mayor intensificación en la explotación de los jabalíes, mayores seroprevalencias de ciertas enfermedades son encontradas (Joaquin Vicente et al., 2004), constatándose además que el incremento de granjas de jabalíes en Europa puede incrementar el riesgo de exposición de estos animales a algunas infecciones virales (Halli et al., 2012).



Fig. 3: Agrupación de jabalíes de diferentes edades en un comedero

Por último, un tema de gran actualidad, de suma importancia para la salud pública, y también con graves repercusiones ecológicas, son las resistencias antimicrobianas encontradas en animales salvajes. Diversos estudios confirman que los jabalíes podrían albergar genes de resistencia antimicrobiana similares a los encontrados en bacterias de origen humano, lo que podría indicar una posible circulación de estos genes entre las dos especies (Patricia Poeta et al., 2007; Patricia Poeta et al., 2009). En el caso concreto del jabalí, debido a su carácter omnívoro y como consecuencia de su gran potencial de dispersión y en relación con su extraordinaria rusticidad, los animales van acumulando a lo largo de su vida los distintos microorganismos que circulan en un determinado ecosistema, así como las resistencias antimicrobianas asociadas a ellos, convirtiéndose así en un extraordinario reservorio a largo plazo y un buen indicador de la salud de un determinado ecosistema (N. Navarro-Gonzalez et al., 2012). Una parte de dichas resistencias puede haberse seleccionado tras la utilización directa de antibióticos en estos animales, bien como medidas terapéuticas o profilácticas, siendo esta práctica cada vez más frecuente debido a la propia intensificación de la gestión cinegética. La otra parte de la generación de resistencias antimicrobianas en estos animales podría relacionarse con el contacto directo o indirecto con el ganado doméstico (N. Navarro-Gonzalez et al., 2012), o las poblaciones humanas o sus residuos debido al acercamiento de jabalíes a los núcleos

periurbanos (Klose et al., 2014). Una tercera vía, presente mayoritariamente en aquellas poblaciones que no han tenido un contacto previo con especies domésticas y que no han sido sometidas a ningún tipo de medida de manejo o terapéutica, podría corresponder a la transmisión directa de estas resistencias desde reservorios medioambientales telúricos (Larsson & Flach, 2021).

2. GÉNERO SALMONELLA

2.1. Características generales y taxonomía del género *Salmonella*

El género *Salmonella* se ubica dentro de la Familia *Enterobacteriaceae*. Sus miembros son bacilos cortos Gram-negativos, intracelulares facultativos y generalmente móviles por la presencia de flagelos peritricos (excepto *S. Gallinarum* y *S. Pullorum*) (Jajere, 2019). Bioquímicamente son anaerobios facultativos no fermentadores de la lactosa, excepto *S. enterica* subsp. *arizonae* y *S. enterica* subsp. *diarizonae*. La mayoría de los serotipos utilizan citrato como única fuente de carbono, a excepción de algunos serovares como *S. Choleraesuis*, *S. Typhi*, and *S. Paratyphi A* (Popoff & Le Minor, 2005). Las bacterias de este género no presentan cápsula y no son esporuladas. Además, contienen endotoxinas y son capaces de producir exotoxinas. Su hábitat natural es el tracto gastrointestinal de mamíferos, reptiles, aves e insectos, aunque también se encuentran presentes en el agua y en el medio ambiente a consecuencia de contaminación con excrementos, y en los alimentos derivados de los animales portadores (Markey et al., 2013).

Las salmonelas no son organismos que presenten elevadas necesidades metabólicas, ya que pueden crecer y multiplicarse en diversas condiciones ambientales fuera del hospedador (Jajere, 2019) (Fig. 4). La mayoría de los serotipos crecen en un amplio rango de temperaturas, desde 5 a 45°C, aunque su temperatura óptica de crecimiento está comprendida entre 35 y 37°C. Sin embargo, algunos serotipos pueden crecer a temperaturas inferiores (2-4°C) o superiores (54°C) (Pui et al., 2011). También son capaces de sobrevivir en un amplio rango de pH, entre 4 y 9, aunque crecen mejor a pH neutro. El valor óptico de actividad de agua para su multiplicación es de 0,995 aunque pueden crecer en alimentos con valores inferiores a 0,94 (Jajere, 2019). Sin embargo, el microorganismo puede ser inactivado fácilmente utilizando desinfectantes comunes como compuestos clorados, iodados y fenoles.



Fig. 4: Crecimiento de *Salmonella* spp. en agar XLD

Una de las claves del éxito de *Salmonella* es su ubicuidad, pudiendo vivir en ambientes muy diversos y persistir durante largos periodos de tiempo, desde meses hasta años si las condiciones son adecuadas, caracterizándose además por una gran capacidad de adaptación, lo que le permite infectar un amplio rango de hospedadores (Schwartz, 1999). Sin embargo, a pesar de que hay más de 2500 serotipos de *Salmonella*, hay serovariedades que se encuentran preferentemente adaptadas a una especie hospedadora en concreto. Este hecho da pie a clasificar, desde un punto de vista epidemiológico, a las serovariedades de este género en tres categorías diferentes (Kingsley & Bäumler, 2000):

- Serovariedades específicas de hospedador, como *S. Typhi* en el hombre o *S. Abortusovis* en ovejas.
- Serovariedades adaptadas a un hospedador, que en algunos casos se pueden aislar en otros hospedadores, como *S. Choleraesuis*, adaptada a los cerdos pero que también ha sido descrita en infecciones graves en el hombre.
- Serovariedades ubicuas que no están adaptadas a ningún hospedador específico, como *S. Typhimurium*, que causa enfermedad en varias especies de animales.

La nomenclatura de este género sigue siendo un tema sujeto a controversia debido a la existencia de varios sistemas de que inconsistentemente han dividido el género en especies, subespecies, subgéneros, grupos, subgrupos y serotipos. Actualmente el género *Salmonella* se subdivide en dos especies: *Salmonella bongori* (sin trascendencia clínica ni subespecies) y *Salmonella entérica* (Tabla 1). Esta última especie, a su vez, engloba seis subespecies que se distinguen bioquímicamente entre sí: I *enterica*; II *salamae*; IIIa *arizonae*; IIIb *diarizonae*; IV *houtenae* y VI *indica*. El símbolo romano V se reserva para los serotipos de *S. bongori* (Brenner et al., 2000; Le Minor & Popoff, 1987; Popoff & Le Minor, 2001). Se considera que más del 95% de las salmonelas aisladas en humanos enfermos y las obtenidas en animales homeotermos pertenecen a la subespecie *entérica*, mientras que las otras cinco subespecies y la especie *S. bongori* suelen afectar a animales poiquilotermos (Grimont & Weill, 2007).

Tabla 1: Número de serovares y principales hábitats de cada especie y subespecie del género *Salmonella* (Issenhuth-Jeanjean et al., 2014)

Especie / Subespecie	Serovares	Hábitat
<i>S. enterica</i> subsp. <i>enterica</i> (I)	1586	Animales homeotermos
<i>S. enterica</i> subsp. <i>salamae</i> (II)	522	Animales homeo/poiquilotermos y medio ambiente
<i>S. enterica</i> subsp. <i>arizonae</i> (IIIa)	102	Animales poiquilotermos y medio ambiente
<i>S. enterica</i> subsp. <i>diarizonae</i> (IIIb)	338	Animales poiquilotermos y medio ambiente
<i>S. enterica</i> subsp. <i>Houtenae</i> (IV)	76	Animales poiquilotermos y medio ambiente
<i>S. enterica</i> subsp. <i>indica</i> (VI)	13	Animales poiquilotermos y medio ambiente
<i>S. bongori</i> (V)	22	Animales poiquilotermos y medio ambiente
TOTAL	2659	

Las salmonelas poseen una amplia variedad de determinantes antigénicos en la pared celular y en los flagelos, gracias a los cuales se hace posible su clasificación e identificación en serogrupos, serotipos o serovariedades. Es por ello por lo que la serotipificación es una de las principales herramientas epidemiológicas en este género y referencia obligada para los estudios de salmonelosis. Para describir los serotipos de *Salmonella* se utiliza el esquema de Kauffmann-White y, actualmente, tanto la Organización Mundial de la Salud (OMS) como los laboratorios de referencia se basan en su clasificación. Recientemente se ha propuesto denominar a este sistema de clasificación esquema de fórmulas antigénicas de White-Kauffmann-Le Minor, ya que una gran parte de los serotipos descritos han sido identificados por Le Minor (Grimont & Weill, 2007). La fórmula antigénica se elabora teniendo en cuenta los diferentes antígenos presentes en la bacteria, como son antígenos de la pared (O), los flagelares (H) y los capsulares (K), estos últimos presentes únicamente en serovariedades muy invasivas, como *S. Typhi*, *S. Paratyphi* y *S. Dublin*. El antígeno O, o antígeno somático, es termoestable y corresponde a la capa más superficial de la membrana externa bacteriana, el lipopolisacárido (LPS), constituido por distintas combinaciones de oligosacáridos unidos al lípido A. Este antígeno es la base de la clasificación y, de hecho, algunas cepas con defectos en la síntesis de estos oligosacáridos se denominan cepas "rugosas" y no pueden serotipificarse. Los antígenos H están determinados por proteínas flagelares, o flagelinas, y son termolábiles. La mayoría de las cepas de *Salmonella* poseen dos genes que codifican para dos tipos distintos de flagelina, lo que da lugar a dos variantes del antígeno H: H1,

específica y característica del serotipo; y H2, no específica ya que puede ser común a varios serotipos). De esta manera, cada uno de los serotipos (serovares o serovariedades) es una combinación única de un antígeno somático, un antígeno flagelar de fase 1, y un antígeno flagelar de fase 2 (O:H1:H2) (Chattaway et al., 2021). Cada uno de estos antígenos puede presentar varios componentes en la misma bacteria, por lo que en este sistema de nomenclatura se separan los diferentes antígenos con dos puntos (:) y los componentes de cada antígeno mediante comas. La nomenclatura para cada antígeno es la siguiente: el antígeno O se denomina con números arábigos; el H1 con letras de la *a* a la *z*, a excepción de la *j*; y los antígenos H2 se identifican con números del 1 al 12 y letras de la *e* a la *z* (en caso de necesitarse más combinaciones para denominar los antígenos H2, se añaden subíndices a la letra *z*, desde el 1 al 83). Por ejemplo, el serovar 9,12:g,m:- de la especie *S. enterica* subsp. *enterica* presenta los componentes 9 y 12 del antígeno O, los componentes g y m del H1 y no presenta antígeno H2. No obstante, existen aislados denominados monofásicos que expresan solo una de las dos flagelinas, siendo naturales en algunas serovariedades y pudiendo aparecer en otras debido a la inactivación o falta de expresión del gen que codifica una u otra fase (Issenhuth-Jeanjean et al., 2014; Ryan et al., 2017).

En el caso de los serovares pertenecientes a la subespecie *enterica* se admiten excepciones debido al arraigo histórico de algunos de sus nombres, no siendo necesario incluir la fórmula antigénica en su denominación. Tal es el caso de los serotipos Typhimurium o Choleraesuis. Además, dado que la subespecie *enterica* es la única que presenta serotipos con nombres propios, se admite la omisión de la subespecie en la nomenclatura de estos serovares. Así, *S. enterica* subsp. *enterica* serovar Typhimurium podría abreviarse como *S. enterica* serovar Typhimurium, *Salmonella* ser. Typhimurium o más simplemente *S. Typhimurium* (Grimont & Weill, 2007).

2.2. Epidemiología de *Salmonella* en jabalíes de Europa

La importancia sanitaria de *Salmonella*, unida a la expansión demográfica que las poblaciones de jabalí han experimentado en el continente europeo en los últimos años, ponen de manifiesto la necesidad de conocer la prevalencia de esta bacteria en las diferentes regiones en las que el jabalí está presente. Los primeros estudios encaminados a conocer esta situación epidemiológica aparecen al principio de la década de los 2000 (Vengust et al., 2006; Wahlstrom et al., 2003), incrementando claramente su número a partir del año 2010. La metodología aplicada en cada uno de los estudios no es homogénea, aunque la mayoría de ellos emplean muestras fecales procedentes de animales muertos en acciones cinegéticas para el aislamiento de las bacterias. Como puede observarse en la tabla 2, los datos de prevalencia son muy dispares entre las diferentes regiones estudiadas, lo que podría reflejar una muy diferente situación sanitaria de estas poblaciones en los diferentes países, aunque la falta de estandarización de protocolos de muestreo también puede aportar parte de esa variabilidad. Junto con los datos de prevalencia, en estos estudios suele determinarse también el serotipo de los aislados de *Salmonella* obtenidos. Estas dos informaciones son fundamentales como punto de partida para conocer la situación epidemiológica de una zona y poder plantear acciones de control o prevención que disminuyan el riesgo sanitario para animales de granja o para las personas.

Tabla 2: Datos de prevalencia y principales serotipos aislados en estudios llevados a cabo en jabalíes salvajes en Europa en los últimos 10 años (2011-2021)

País	Estudio	Prevalencia	Serotipo principal
Alemania	<i>(Plaza-Rodriguez et al., 2020)</i>	Heces 2.4% (13/552)	Enteritidis
España	<i>(N. Navarro-Gonzalez, Casas-Díaz, et al., 2013)</i>	Heces 5% (2/40)	Anatum
	<i>(Mentaberre et al., 2013)</i>	Heces 47.2% (70/148)	Meleagridis
	<i>(Diaz-Sanchez et al., 2013)</i>	Heces 0.3% (1/333) Canal 1.2% (4/333) Animales 0.8% (5/637)	Typhimurium
	<i>(N. Navarro-Gonzalez et al., 2012)</i>	Heces 30.8% (66/214)	Meleagridis
Italia	<i>(Piras et al., 2021)</i>	Heces 36.6% (32/90) GLM 17.8% (16/90)	Abony
	<i>(Cilia et al., 2021)</i>	Heces 2.43% (7/278) Hígado 1.7% (5/278) Bazo 2.14% (6/287) Animales 4.18% (12/287)	50:r:1:1,5,7
	<i>(S. Bonardi et al., 2021)</i>	GLM 7.8% (5/64) Canal 6.2% (5/64) Animales 15.6% (10/64)	Enteritidis
	<i>(S. Bonardi et al., 2019)</i>	Heces 3.3% (6/189) GLM 15.9% (30/189) Animales 17.5% (33/189)	Typhimurium
	<i>(Stella et al., 2018)</i>	Heces 7% (4/57) GLM 3.5% (2/57) Canal 0% (0/57) Animales 9.6% (6/62)	Thompson
	<i>(Giorda et al., 2014)</i>	Hígado: 16/171 (9.3%)	Subsp.diarizonae
	<i>(Zottola et al., 2013)</i>	Heces 10.8% (54/499)	42:z:1,5
	<i>(Chiari et al., 2013)</i>	Heces 24.8% (326/1313)	Coeln
	<i>(Magnino et al., 2011)</i>	Heces 18.7 (441/2356)	Coeln
	Portugal	<i>(Dias et al., 2015)</i>	Heces 4.8% (1/21)
	<i>(M. Vieira-Pinto et al., 2011)</i>	Heces 22.1% (17/77)	Typhimurium
Suecia	<i>(Sannö et al., 2018)*</i>	Heces 7.8% (7/90) GLM 10% (9/90) GLS 12% (3/25) Tonsilas 14.7% (20/136) Animales 26.7% (24/90)	No estudiado
	<i>(Sanno et al., 2014)*</i>	Heces 1.1% (1/88) GLM 1.8% (1/56) Tonsilas 5.1% (9/157) Animales 3.4% (11/319)	4,5:-:1,5

(*) Detección de *Salmonella* mediante PCR. **GLM:** Ganglios linfáticos mesentéricos. **GLS:** Ganglios linfáticos submandibulares.

2.2.1. Mecanismos de transmisión y eliminación

La presencia endémica de *Salmonella* en un determinado colectivo animal, además de relacionarse con la existencia de animales enfermos, se encuentra íntimamente ligada a la presencia de portadores inaparentes en ese colectivo. Los animales portadores de *Salmonella* tienen una gran importancia epidemiológica, puesto que son animales aparentemente sanos pero potenciales diseminadores de la bacteria. La dispersión bacteriana puede producirse a dosis bajas, de forma continua o intermitente, o incluso llevarse a cabo a dosis elevadas tras la reactivación de la infección en situaciones de estrés o inmunosupresión. Este fenómeno se relaciona con la capacidad de *Salmonella* para sobrevivir y multiplicarse en macrófagos y evadir la respuesta inmunitaria del hospedador (Haesebrouck et al., 2004).

El contagio más frecuente en la salmonelosis es de tipo fecal-oral, vehiculado por el agua o alimentos (R.W. Griffith et al., 2006). Tras la entrada por vía oral, *Salmonella* es capaz de colonizar el tracto gastrointestinal y puede aparecer en las heces en un periodo de 30 minutos (H Scott Hurd, Gailey, et al., 2001). Durante la fase aguda de la enfermedad, los animales pueden llegar a eliminar hasta 10^6 UFC/g heces de *S. Choleraesuis* (Smith & Jones, 1967) o 10^7 UFC/g heces en el caso de *S. Typhimurium* (Gutzmann et al., 1976). Además, hay que tener en cuenta que *S. Choleraesuis* puede mantenerse viable en las heces hasta 13 meses (P.J. Fedorka-Cray et al., 1995), constituyendo un reservorio fundamental en la diseminación de la salmonelosis ya que a partir de él pueden irse infectando progresivamente todos los animales que permanezcan, visiten o se introduzcan en una zona contaminada (C. H. Chiu et al., 2004). Hay estudios que demuestran que, en condiciones naturales, los animales necesitan una dosis infectante mucho menor de este patógeno para llegar a enfermar. Así, se ha constatado que, si bien inoculaciones experimentales de 10^3 organismos no producen ningún efecto, animales no inoculados pero presentes en el mismo corral llegan a presentar la enfermedad con el tiempo. Este hecho parece indicar que la dosis y tal vez la virulencia, se magnifica tras sucesivos pases en distintos animales (J. Gray et al., 1996; Loynachan & Harris, 2005). Sin embargo, según otros autores, la eliminación fecal disminuye con el tiempo en intensidad, hasta convertirse en una eliminación intermitente (Beloil et al., 2003; Wood et al., 1989).

Además del contagio fecal-oral, se puede establecer un contagio alternativo a través de las vías respiratorias mediante la inhalación de aerosoles o partículas de polvo contaminadas con *Salmonella*, invadiendo las tonsilas y los pulmones (P.J. Fedorka-Cray et al., 1995). A partir de aquí, pueden diseminarse muy rápidamente a otras localizaciones. Así lo demuestran Fedorka-Cray et al. (1995) en un estudio con cerdos esofagoectomizados, donde observan que, en muy pocas horas tras la infección por vía aerógena, las salmonellas colonizan el tracto digestivo y los ganglios linfáticos mesentéricos. Debido a esta mayor diseminación de la bacteria en el organismo, los signos clínicos y las lesiones microscópicas son más graves que las producidas cuando la vía de entrada es la digestiva (Gray et al., 1995), circunstancia que agrava el proceso e incrementa la importancia epidemiológica de esta vía. De hecho, algunos experimentos han puesto de manifiesto que este tipo de contagio puede ser incluso más frecuente que el oral (Clemmer et al., 1960), sobre todo en explotaciones de cría intensiva y durante los meses estivales, debido a la mayor sequedad ambiental (A. Baskerville & Dow, 1973; A. Baskerville, Dow, C., Curran, W. L., Hanna, J., 1973). En este contexto, los aerosoles formados y el polvo en suspensión, al vehicular *Salmonella*, pueden tener una importancia crucial en la transmisión y diseminación de la enfermedad en los colectivos (P.J. Fedorka-Cray et al., 2000).

2.2.2. Factores que influyen en la diseminación

La alta densidad de animales, el estrés en el transporte y la concurrencia de alteraciones nutricionales o enfermedades infecciosas, son condicionantes que incrementan la diseminación por parte de los portadores y la susceptibilidad de los animales expuestos (Committee on Salmonella, 1969). En general se puede considerar que la mayoría de los brotes producidos se desarrollan como consecuencia de la reactivación del proceso en estos portadores subclínicos debido a la aparición de diversos factores estresantes que pueden facilitar la infección de los animales indemnes o bien reactivar a los reservorios asintomáticos convirtiéndolos en diseminadores activos de la infección (Wilcock, 1979).

2.2.2.1. Estrés

Como se ha comentado anteriormente, el estrés es un factor clave en el desarrollo de la infección, ya que al incrementar el nivel de glucocorticoides y catecolaminas se reduce el número de monocitos y linfocitos circulantes. (Biondi, 1997; P. H. Jones et al., 2001; Morrow-Tesch et al., 1994). Las catecolaminas reducen la producción de ácido gástrico e incrementan la motilidad intestinal. Este aumento del pH facilita la pervivencia de *Salmonella*, incrementando el número de bacterias viables que pasan al intestino para su replicación (R.W. Griffith et al., 2006). Además, algunas bacterias, entre ellas *Salmonella*, son capaces de detectar el aumento de las catecolaminas circulantes y responden mediante un incremento de su tasa de crecimiento (Freestone et al., 2008; M.P. Stevens, 2010). Así, se ha sugerido que la respuesta al estrés del sistema nervioso autónomo entérico libera norepinefrina desde las fibras simpaticomiméticas que inervan la pared intestinal, hormona que actúa directamente sobre *Salmonella* incrementando su viabilidad y tasa de crecimiento al favorecer la disponibilidad de Fe a partir de la transferrina y lactoferrina (Sandrini et al., 2010), y estimulando la expresión de determinados factores de virulencia relacionados con la síntesis de flagelos y el sistema de secreción tipo III (Pullinger et al., 2010). Todos estos factores contribuyen a la reactivación de *Salmonella* en los portadores subclínicos, incrementan su diseminación en las heces (Berends et al., 1996; H. S. Hurd et al., 2002; Isaacson et al., 1999), y facilitan su paso desde el intestino a los ganglios linfáticos (Callaway et al., 2006). Este factor es especialmente condicionante en una especie silvestre como es el jabalí, cuando es criada en cautividad o en condiciones de semi-libertad. Las medidas de manejo empleadas en su cría implican restricciones de movimiento, presencia de humanos o agrupamientos forzados, inductoras todas ellas de estrés en animales salvajes (Morgan & Tromborg, 2007).

2.2.2.2. Uso de antibióticos

Por otro lado, es de suma importancia destacar, que la presencia de una microbiota intestinal adecuada es fundamental para evitar la colonización por *Salmonella* (Van der Waaij, 1992; Wells, 1990). La utilización de antibióticos de amplio espectro altera esta microbiota y favorece el asentamiento de *Salmonella*, haciendo al cerdo entre 5 y 6 veces más susceptible al padecimiento de salmonelosis en la semana posterior a su utilización (Berends et al., 1996). Sin embargo, la influencia que tienen los antibióticos en la frecuencia y duración de la diseminación de *Salmonella* en cerdos es muy

controvertida. En humanos con salmonelosis entérica se ha constatado que la administración de antibióticos prolonga el estado portador y el tiempo en que esta bacteria es eliminada al medio ambiente (Aserkoff & Bennett, 1969; Dixon, 1965). En cerdos con enterocolitis se ha constatado que la administración de antibióticos no reduce la duración del proceso ni la cantidad de salmonelas eliminadas en las heces, aunque tampoco prolonga ni intensifica el estado portador (DeGeeter et al., 1976; Finlayson & Barnum, 1973). Por el contrario, en cuadros septicémicos causados por *S. Choleraesuis*, la terapia antimicrobiana temprana sí reduce la cantidad y duración de la eliminación de salmonellas por heces (Jacks et al., 1981). En el caso concreto del jabalí, su exposición a antibióticos puede ser provocada, al administrárseles en las explotaciones dedicadas a su cría (Gonçalves Blanco, 2017), o bien puede ser accidental, a través de fuentes antropogénicas como desechos de granjas o basuras urbanas (Allen et al., 2010). Hay estudios que cifran en hasta un 90% el porcentaje de antibióticos que no se metabolizan al ser administrados a los animales de granja, y son, por tanto, expulsados al medio ambiente, pudiendo constituir una fuente de consumo de antibióticos para una especie salvaje de carácter omnívoro como es el jabalí (Gothwal & Shashidhar, 2015).

2.2.2.3 Alimentación

En lo referente al tipo de alimentación o la forma de dosificar el agua de bebida, se ha observado que en las explotaciones porcinas la salmonelosis es más frecuente en animales alimentados con pienso en pellets que en aquellos alimentados con cualquier otra presentación (García-Feliz et al., 2009; Reid et al., 1996; Silvi et al., 1999). La ausencia del proceso de granulado en el alimento hace que éste sea menos refinado y por tanto más difícil de digerir, con lo que parte de los carbohidratos pueden pasar indigeridos al intestino grueso, donde fermentan produciendo ácidos grasos volátiles que inhiben el crecimiento bacteriano. El proceso también es más frecuente entre animales que ingieren alimento seco respecto al húmedo. Al humedecer el alimento se producen fermentaciones que originan ácido acético y láctico y favorecen la proliferación de levaduras que dificultan la proliferación de salmonella (Bahnson et al., 2006; Van Winsen, 2001). En relación a la bebida, se ha constatado que existe un mayor número de brotes en animales que beben en recipientes abiertos en relación a aquellos para los que el agua es dosificada mediante pezoneras (Bahnson et al., 2006).

En lo que respecta al jabalí, el principal problema relacionado con la alimentación no es tanto la influencia de la fibra alimentaria como el efecto de agregación que provoca la presencia de comederos en las fincas donde se suplementa a los jabalíes. La importancia de este efecto en diferentes enfermedades ya ha sido puesta de manifiesto en diferentes estudios (N. Navarro-Gonzalez, Fernandez-Llario, et al., 2013; Joaquín Vicente et al., 2007; J. Vicente et al., 2005; Joaquin Vicente et al., 2004). El efecto de la alimentación suplementaria mejora en general la condición corporal y los parámetros reproductivos de las poblaciones de animales salvajes, pero tiene un efecto negativo sobre la prevalencia de patógenos (M. H. Murray et al., 2016).

Los mencionados factores de riesgo; estrés, antibióticos y suplementos de alimentación, son muy importantes en el ganado doméstico, pero lo son aún más cuando el sujeto de la explotación ganadera son especies silvestres, como el jabalí. En estos animales, los niveles de estrés generados por estar sometidos a condiciones medioambientales o zootécnicas a las que no están adaptadas ni fisiológica ni inmunitariamente son muy elevados. Esto hace que puedan darse presentaciones clínicas de especial gravedad en estos animales, como un caso descrito donde el serovar Saintpaul que en principio en cerdos no causa ninguna sintomatología fue responsable de una grave enterocolitis que produjo la muerte de un gran número de jabalíes, probablemente en relación con la intensificación en el manejo de estos animales (Ecco et al., 2006). Por lo tanto, medidas comunes de manejo como son el agrupamiento de animales, el transporte entre explotaciones o cercados y la restricción de movilidad necesaria para determinados tratamientos pueden tener un impacto muy negativo para el desarrollo de la salmonelosis en estas especies.

2.3. Patogenicidad

La capacidad patogénica entre los miembros del género *Salmonella* es muy variable y está condicionada por una serie de factores, entre los que se encuentran el serotipo implicado, la dosis infectante, la vía de entrada y el grado de resistencia del hospedador. Se conocen alrededor de 200 factores de virulencia asociados a esta bacteria, la mayoría de ellos relacionados con la adhesión, invasión, citotoxicidad y resistencia a la muerte intracelular (Jajere, 2019).

De forma general, la patocronia de *Salmonella* puede dividirse en dos fases: una fase entérica, en la que tiene lugar la colonización inicial del intestino y del tejido linfoide asociado; y otra fase sistémica, que no necesariamente ocurre siempre, en la que *Salmonella* se disemina por el torrente circulatorio hacia otros órganos. También es posible que no exista una fase entérica propiamente dicha, cuando la vía de entrada es la vía aerógena, desarrollándose entonces directamente un cuadro sistémico.

2.3.1. Colonización inicial

Para que se inicie la fase entérica, *Salmonella* necesita colonizar los tramos distales del intestino delgado o del colon. En condiciones normales, la presencia de una microbiota intestinal bien adaptada y los ácidos grasos producidos por ella impiden la adhesión de esta bacteria a sus receptores específicos presentes en las células M de las placas de Peyer y, en menor medida, en las células epiteliales intestinales (Jepson & Clark, 2001). No obstante, determinadas circunstancias como la restricción de agua, los cambios bruscos de alimentación, la administración de antibióticos o diversas situaciones estresantes, pueden desequilibrar esta microbiota y propiciar la colonización mediada por las adhesinas fimbriales (Markey et al., 2013). Posteriormente, en función de la capacidad virulenta de la cepa responsable puede producirse la invasión del epitelio intestinal subyacente. Esta capacidad invasiva, conjuntamente a otros factores de virulencia, se encuentra codificada por un amplio grupo de genes denominados Islas de patogenicidad de *Salmonella* (SPI, por sus siglas en inglés). Aunque se han descrito multitud de estas islas de patogenicidad, tan sólo se conoce con exactitud la función de algunas de ellas, como SPI1 y SPI2, que determinan la capacidad de *Salmonella* de infiltrarse en el epitelio intestinal y de producir un cuadro sistémico, respectivamente. La penetración en el epitelio intestinal tiene lugar mediante un proceso denominado macropinocitosis inducido por la

propia bacteria. Este fenómeno consiste en la internalización de grandes partículas, en este caso, bacterias, por parte de las células epiteliales. Para ello, Salmonella utiliza un sistema de secreción tipo III, o inyector, para inocular una serie de proteínas efectoras en la célula diana e inducir este mecanismo de endocitosis (Hume et al., 2017). Una vez dentro de las vesículas endocíticas, las células bacterianas se replican y migran hacia la membrana basal de la célula infectada, por donde salen y entran en contacto con la lámina propia del intestino. Este proceso hace que la célula infectada comience a segregar citoquinas proinflamatorias que activan la migración de multitud de neutrófilos a través de la pared intestinal, hecho que se ve favorecido también por la propia presencia del lipopolisacárido bacteriano. La presencia masiva de estas células inmunes facilita la fagocitosis de las bacterias patógenas presentes, pero también induce la aparición de una diarrea inflamatoria debido a la intensa liberación de citoquinas. En determinadas circunstancias Salmonella consigue evitar la digestión de los fagocitos gracias a la liberación de sustancias antioxidantes, como la catalasa o la superóxido dismutasa, que inactivan las enzimas liberadas y que se encuentran codificadas en varias de sus SPI, y que permite a la bacteria diseminarse hasta los nódulos linfáticos zonales donde finalmente es fagocitada por los macrófagos (Markey et al., 2013).

2.3.2. Supervivencia de Salmonella en macrófagos y células dendríticas

La fase sistémica se inicia cuando Salmonella alcanza la lámina propia y es fagocitada por los macrófagos, donde consigue sobrevivir y replicarse, escapando así de la destrucción por parte del hospedador (Fig. 5). Este mecanismo, que es clave para el mantenimiento y progresión de la infección, está regulado por la SPI2 (Markey et al., 2013) y algunos estudios sugieren que la eficiencia de la infección tiene mucho que ver con la frecuencia y duración de la adhesión de Salmonella a los macrófagos (Achouri et al., 2015). Generalmente, la mayoría de los serotipos, a excepción de *S. Choleraesuis*, sólo suelen diseminarse hasta el tejido linfoide asociado al intestino y nódulos linfáticos mesentéricos próximos debido a la respuesta inmunitaria, tanto inespecífica como adaptativa, que se produce en los mismos (Rodrigo Prado Martins et al., 2012). En estos casos, el animal infectado pasa a un estado portador que se mantiene debido a la persistencia de Salmonella en las células dendríticas (R. P. Martins et al., 2013). Sin embargo, si el serotipo es muy invasivo o el animal se encuentra inmunodeprimido, las salmonelas

pasarán al torrente sanguíneo colonizando en primer lugar el hígado y el bazo, y generando posteriormente un cuadro de tipo septicémico (Barrow, 1999).

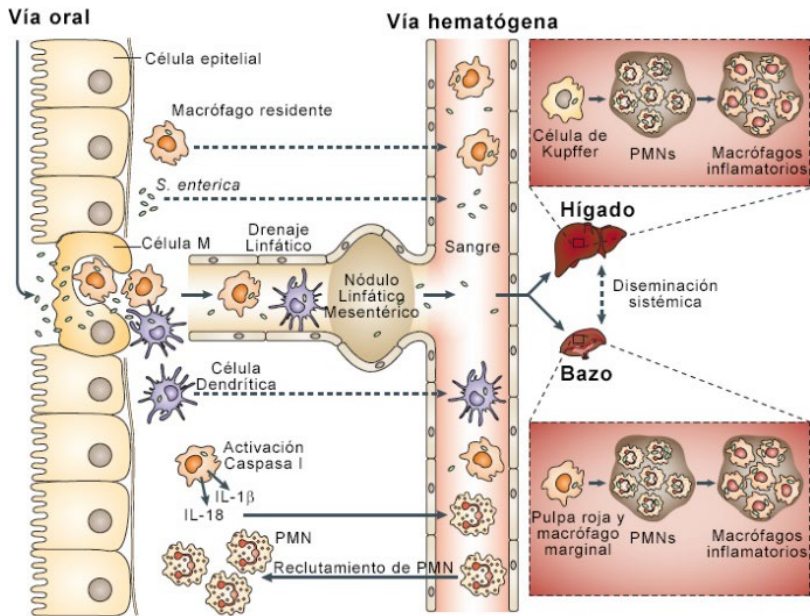


Fig. 5: Representación esquemática del proceso de diseminación sistémica de *Salmonella enterica*. Adaptado de (Mastroeni et al., 2009).

2.6. Presentación clínica y lesional de la enfermedad

La mayoría de los 2500 serotipos de *Salmonella* no causan enfermedad, aunque los que lo hacen provocan importantes procesos patológicos. Aunque *S. Typhimurium* y *S. Choleraesuis* son los principales serotipos que afectan al cerdo (Schwartz, 1991), además, otros serotipos adaptados al porcino y relacionados con procesos patológicos en esta especie son *S. Enteritidis*, *S. Typhisuis*, *S. Anatum*, *S. Dublin*, *S. Newport*, *S. Derby*, *S. Saintpaul* y *S. Heidelberg* (estas tres últimas encontradas como contaminantes en harinas de pescado y carne). *S. Typhisuis* provoca diarreas crónicas con lesiones caseificantes, *S. Heidelberg* está asociada a brotes de diarrea aguda, y *S. Dublin* y *S. Enteritidis* son responsables de signos nerviosos en animales lactantes como consecuencia de meningitis supurativa. A pesar de esta variedad, las tres formas más frecuentes de presentación clínica de la salmonelosis en cerdo son: la septicémica, una forma entérica aguda y un cuadro entérico crónico (Flores Castro, 2014).

S. Choleraesuis es el serotipo causante de la mayor parte de los cuadros septicémicos asociados a *Salmonella* en el cerdo (Ronald W. Griffith et al., 2019). Durante las décadas de los 50 y 60 fue el serovar predominante en cerdos de todo el mundo (Mark P Stevens & Gray, 2013) y aunque actualmente sigue manteniendo una alta prevalencia en América del Norte y Asia (Ronald W. Griffith et al., 2019; Luk-In et al., 2018) en Europa la prevalencia es escasa (EFSA & ECDC, 2021a). Esta disminución podría deberse a la mejora en las condiciones de manejo e instalaciones y a la presión selectiva vacunal que se ha venido ejerciendo en los cerdos (Carlson et al., 2012). Sin embargo, en los últimos años se ha visto un repunte de casos por este serotipo en diferentes países de Europa, tanto en cerdos procedentes de Serbia (Savic et al., 2021), Eslovenia (Papic et al., 2021) y Dinamarca (Pedersen et al., 2015), pero mayoritariamente los brotes detectados pertenecen a jabalíes procedentes de Alemania e Italia (Conedera G. et al., 2014; Donazzolo C., 2017; Longo, Losasso, et al., 2019; Longo, Petrin, et al., 2019; Methner et al., 2010; Methner et al., 2018; Uelze et al., 2021), mientras que en España solamente hay registrado un brote en una granja de jabalíes (Perez et al., 1999).

Desde un punto de vista clínico, en todos los trabajos revisados se constata en esta forma septicémica una primera fase en la que los animales suelen mostrarse reacios al movimiento, apiñados en las esquinas del corral o incluso muertos con cianosis en las extremidades y abdomen, acompañada de un cuadro de respiración superficial o diafragmática, disnea y tos húmeda. Estos signos aparecen entre las 24 y las 36 horas tras la instauración de la infección y se suelen resolver en un periodo de 14 días (J. T. Gray et al., 1996). La diarrea no es frecuente en esta forma, pero puede aparecer a los tres o cuatro días post-infección. Aunque con cierta variabilidad, en la mayoría de los brotes la tasa de mortalidad suele ser alta y la morbilidad no suele llegar al 10% (Carlson et al., 2012). En la especie humana, el serotipo *Choleraesuis* también tiene una presentación clínica de especial gravedad (Cherubin, 1980), pero su incidencia es muy baja, como lo demuestra la ausencia de casos en toda Europa en los últimos informes de la EFSA (EFSA & ECDC, 2019, 2021a).

A pesar de que *S. Choleraesuis* es el serotipo mejor adaptado al cerdo, la presentación más común de la infección por *Salmonella* en el ganado porcino es la entérica, relacionada principalmente con el serotipo *S. Typhimurium* (EFSA & ECDC,

2021a), usualmente caracterizada por un proceso enterocolítico que cursa con diarrea verde-amarillenta de duración variable. A diferencia de *S. Choleraesuis*, la mortalidad suele ser nula o muy baja, asociada principalmente a la hipokalemia y a la deshidratación producida, mientras que la morbilidad puede llegar a ser muy alta (R.W. Griffith et al., 2006). Otros signos clínicos que suelen acompañar a la diarrea son letargia, inapetencia y fiebre. Estos signos aparecen a las 48 horas post-infección aproximadamente, y suelen resolverse en un periodo de entre 7 y 10 días (P. J. Fedorka-Cray et al., 1994). Si pasado este periodo la infección persiste, puede cronificarse en el colectivo apareciendo animales delgados y débiles que desarrollan diarrea fétida persistente con picos febriles intermitentes. Estos animales empeoran y suelen morir en un corto plazo por debilitamiento extremo (Flores Castro, 2014).

Desde un punto de vista lesional, las alteraciones macroscópicas producidas por *S. Choleraesuis* incluyen cianosis distal en orejas, rabo y extremidades, colitis, congestión de la mucosa gástrica, aumento y congestión de los nódulos linfáticos, principalmente los mesentéricos y gastrohepáticos, esplenomegalia, hepatomegalia y congestión pulmonar. A menudo, en el parénquima hepático pueden observarse pequeños focos blanquecinos de necrosis (1-2mm de diámetro), y en la corteza renal petequias y equimosis (Carlson et al., 2012). En cuanto a las lesiones microscópicas, uno de los hallazgos más significativos suele ser la presencia de pequeños focos de necrosis coagulativa dispersos por todo el parénquima hepático, con infiltrado de neutrófilos e histiocitos, conocidos como "nódulos paratifoideos" (Lawson & Dow, 1966); o la presencia de trombos fibrinosos en vénulas de la mucosa gástrica, piel, capilares glomerulares y en menor medida en vasos pulmonares. En este proceso también es frecuente el desarrollo de neumonía intersticial difusa o bronconeumonía supurativa. En aquellos casos en los que se desarrolle una enterocolitis, el cuadro lesional es idéntico al descrito para el serotipo Typhimurium que se detalla a continuación (Carlson et al., 2012; Flores Castro, 2014).

Los individuos afectados por un cuadro de salmonelosis entérica aguda presentarán una enterotiflocolitis más o menos extensa, con afectación de los nódulos linfáticos mesentéricos, especialmente los ileocecales. En los casos menos graves, la afectación del intestino se reduce al enrojecimiento y engrosamiento de la mucosa, con aparición de fibrina en algunos casos, similar al cuadro que aparece en las llamadas "enteropatías proliferativas" producidas por otras bacterias (Carlson et al., 2012; R.W.

Griffith et al., 2006). En el resto de los casos, el intestino muestra un engrosamiento edematoso de la mucosa, congestivo y de apariencia granular, acompañado a veces por erosiones multifocales cubiertas con detritus fibrinonecróticos de color gris-amarillento, similares a depósitos terrosos. El contenido del ciego y del colon en estos animales presenta un característico aspecto oscuro y arenoso. En los animales que mueren tras un curso crónico se pueden observar úlceras muy definidas y profundas conocidas como “botones ulcerosos o pestosos”. Las lesiones microscópicas producidas por el serotipo Typhimurium consisten en necrosis de las criptas y del epitelio de la mucosa con presentación focal o difusa, acompañadas de un infiltrado leucocitario en la lámina propia y submucosa: neutrófilos en una primera fase y macrófagos y linfocitos transcurridas 48 horas. También aparecen trombos y fibrina en los capilares de la lámina propia, que suelen dar lugar a zonas ulceradas en la mucosa y en las placas de Peyer, fruto de la ausencia de riego sanguíneo. El tejido linfoide submucoso puede presentar zonas necróticas en fases agudas de la enfermedad, o hipertrofia o hiperplasia regenerativa en estados más avanzados. Por último, los nódulos linfáticos regionales suelen edematizarse y presentar un infiltrado neutrofilico en los 2-3 primeros días de infección, con posterior infiltrado de macrófagos (Carlson et al., 2012; Flores Castro, 2014).

Aunque Salmonella puede infectar cerdos de cualquier edad, la mayoría de los brotes se producen en animales destetados criados de forma intensiva. Por el contrario, en animales lactantes y en adultos, la enfermedad es mucho menos frecuente debido a la presencia de inmunoglobulinas específicas lactogénicas o a la propia inmunidad desarrollada por los adultos (Wilcock & Olander, 1978).

3. RESISTENCIAS A LOS ANTIMICROBIANOS EN SALMONELLA

3.1. Aspectos generales de resistencia a los antimicrobianos

Desde un punto de vista clínico, se denomina resistencia a la disminución o a la ausencia de susceptibilidad de un microorganismo respecto a un determinado antimicrobiano (Pastor-Sánchez, 2006). Este fenómeno supone una amenaza importante para la salud pública mundial, siendo responsable de un gran número de fallecimientos cada año debido a infecciones causadas por bacterias multirresistentes. Según datos del Centro Europeo para el Control y Prevención de Enfermedades, las infecciones causadas por bacterias resistentes provocan al año unas 33.000 muertes en Europa, que además generan sobrecostes para los sistemas de salud y pérdidas en la productividad que se estiman en al menos 1.100 millones de € anuales (WHO, 2021).

Durante décadas, el desarrollo de nuevos antimicrobianos ha ido contrarrestando la sucesiva aparición de resistencias bacterianas (Martinez, 2014). Sin embargo, en los últimos años este desarrollo se ha ralentizado de forma notable debido fundamentalmente a la dificultad de encontrar nuevas dianas terapéuticas y también al hecho de que las restricciones en el uso de estos fármacos hacen de ellos un mercado poco atractivo para muchas empresas farmacéuticas (Plackett, 2020). Esta situación ha provocado, por tanto, un incremento en la prevalencia de resistencias, lo que supone una grave amenaza para la salud pública al disminuir el abanico de opciones terapéuticas existentes en el tratamiento de infecciones y al comprometer distintos protocolos médicos que requieren el uso preventivo de antimicrobianos, tales como la quimioterapia, los trasplantes o las intubaciones (Martinez, 2014).

A diferencia de lo que pueda parecer, aunque la importancia sanitaria de las resistencias antimicrobianas es un problema relativamente cercano en el tiempo y estrechamente vinculado a la aparición de los antimicrobianos a mediados del siglo pasado, las bacterias han poseído desde tiempo inmemorial un complejo sistema metabólico que les ha permitido luchar contra sustancias tóxicas presentes en el medio natural, y poder así adaptarse a diferentes ambientes y hospedadores (Aminov, 2009). Desde un punto de vista ecológico, algunos autores también consideran que las sustancias con actividad antibiótica tienen una función señalizadora que permite la comunicación cruzada entre los microorganismos integrantes de un ecosistema (Shiner et al., 2005).

Existen numerosos registros que han constatado la presencia de microorganismos resistentes, o incluso multirresistentes, en medios naturales absolutamente prístinos en cuanto a antimicrobianos, como manantiales selváticos o sedimentos helados en zonas remotas de Alaska (Allen et al., 2009; Lima-Bittencourt et al., 2007). Otros trabajos demuestran que algunos de los genes que codifican mecanismos de resistencia se originaron hace algunos miles de millones años (Garau et al., 2005; Song et al., 2005). Aunque todos estos hechos constatan que la existencia de mecanismos de resistencia a antimicrobianos es un fenómeno previo a la utilización de estos compuestos en la lucha contra las enfermedades infecciosas, parece evidente que la utilización masiva y en muchos casos incorrecta de los antimicrobianos ha acelerado este proceso, provocando en la actualidad un incremento en la frecuencia de aparición de microorganismos resistentes en entornos naturales, en los que los animales salvajes se convierten en potenciales vectores o reservorios para su diseminación (D. Carroll et al., 2015).

La enorme presión selectiva que ha significado la introducción de los antimicrobianos como arma terapéutica constituye uno de los escasos ejemplos de adaptación evolutiva que puede ser observado y estudiado "en tiempo real". Desde un punto de vista bioquímico, los mecanismos de resistencia de las bacterias se basan, *grosso modo*, en dos procedimientos bien distintos: modificación de la diana del antibiótico; o reducción de la concentración intracelular del antimicrobiano disponible.

En el primer caso, el cambio en la diana puede tener lugar mediante cuatro mecanismos (Martinez, 2014):

- Mutación: v. gr., la mutación producida en las topoisomerasas (GyrA y ParC) que causa resistencia a las quinolonas.
- Reemplazo: v. gr., la sustitución de proteínas de unión a β -lactámicos por moléculas quiméricas que genera resistencia a estos compuestos.
- Modificación enzimática: v. gr., la reorganización de la pared bacteriana que provoca resistencia a la vancomicina.
- Protección: v. gr., la proteína QnrA que protege a las topoisomerasas bacterianas de la acción de las quinolonas.

En el segundo caso, en la reducción de la concentración de antimicrobianos se emplean diferentes mecanismos:

- Cambios en la permeabilidad de la membrana externa: mediante la modificación estructural de las porinas se dificulta la permeabilidad de las moléculas.
- Bombas de expulsión o eflujo: una vez que el antibiótico penetra en el citoplasma sufre un bombeo activo hacia el exterior que impide que alcance concentraciones suficientes para poder actuar con efectividad sobre los lugares de acción.
- Inactivación enzimática: las bacterias son capaces de elaborar enzimas que alteren la estructura del antibiótico, haciendo que éste pierda su funcionalidad. (v. gr. β -lactamasas y transferasas que inactivan respectivamente a los betalactámicos y a los aminoglucósidos).

Existe consenso en la actualidad de que la susceptibilidad individual a un determinado antimicrobiano viene condicionada por la presencia individual o colectiva de alguno o de varios de los factores anteriormente enumerados, conjuntamente con otros factores, no bien conocidos, presentes en la bacteria, por lo que el fenómeno de resistencia engloba a la totalidad de la fisiología bacteriana (Martinez, 2014). Además, es común que una misma bacteria pueda desarrollar o adquirir múltiples mecanismos de resistencia frente a uno o varios antimicrobianos, de la misma manera que un mismo antibiótico pueda ser inhibido por distintos mecanismos.

3.2. Mecanismos de resistencia a los antimicrobianos

Como ya se ha mencionado, el desarrollo de nuevos antimicrobianos ha ido paralelo a la aparición de microorganismos resistentes a esos compuestos. Dependiendo de su mecanismo de acción, las bacterias han ido desarrollando resistencias para cada una de estas nuevas familias (Fig. 6).

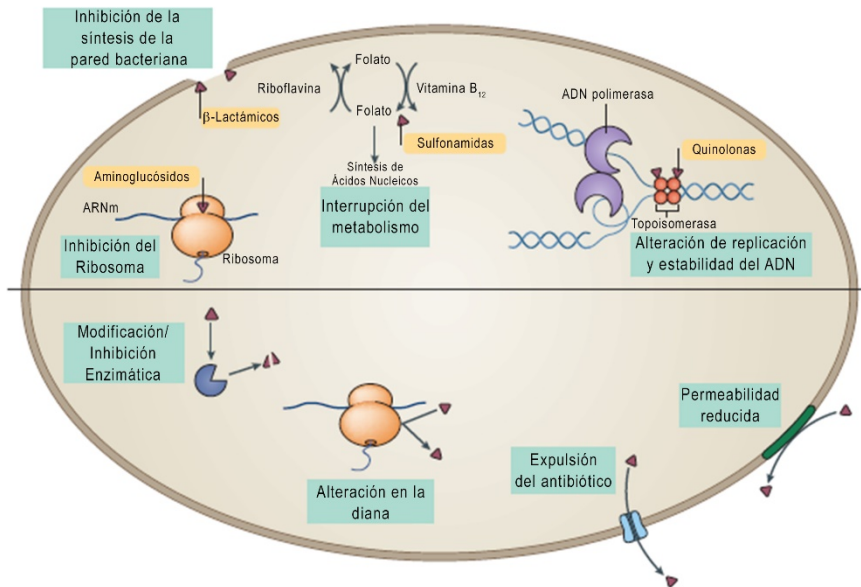


Fig. 6: Principales mecanismos de resistencia frente a los antimicrobianos. En la parte superior se muestran ejemplos de mecanismos que modifican la diana de los antimicrobianos, mientras que en la parte inferior se presentan de forma general los mecanismos que modifican la concentración de los antimicrobianos Adaptado de (Crofts et al., 2017).

3.2.1. Betalactámicos

Los betalactámicos representan la familia de antimicrobianos más numerosa y son los más empleados en la práctica clínica. Estos compuestos actúan como inhibidores irreversibles de distintas enzimas, esencialmente de transpeptidasas, conocidas como proteínas fijadoras de penicilina (PBP), encargadas del entrecruzamiento y estabilización de los peptidoglucanos existentes en la pared bacteriana. De esta forma, la unión del anillo β -lactámico del antibiótico y las transpeptidasas da lugar a la desestabilización de la pared celular y, en última instancia, a la lisis bacteriana (Marín & Gudiol, 2003). Los β -lactámicos se clasifican en cinco grandes grupos dependiendo de su estructura química: penicilinas,

cefalosporinas, carbapenemas, monobactámicos e inhibidores de las β -lactamasas (Suárez & Gudiol, 2009).

Las bacterias han desarrollado diversos mecanismos de resistencia frente a este grupo de antimicrobianos consistentes en la modificación estructural o en la disminución de la afinidad de las PBP, en el aumento del ritmo de expulsión o disminución de la entrada de estos compuestos a la célula y, por último, en el desarrollo de enzimas específicos para su degradación (β -lactamasas). Estas enzimas, que inactivan el fármaco por hidrólisis, constituyen el mecanismo de resistencia principal contra los betalactámicos, especialmente en bacterias Gram-negativas (Bush, 2009).

Existen varios sistemas de clasificación de las β -lactamasas, siendo la de Bush, Jacob y Medeiros (1995) y actualizada por Bush y Jacoby en 2010, la que tiene mayor aceptación. En ella se agrupan en función de sus características bioquímicas, estructurales y funcionales (Bush & Jacoby, 2010; Bush et al., 1995). Desde el punto de vista clínico, es importante conocer la identidad de la bacteria que produce la β -lactamasa, localización del gen productor de la enzima (cromosoma o plásmido), el carácter inducible o constitutivo de su expresión, y el fenotipo de resistencia que presenta (Vadillo Machota et al., 2002).

Muchas enterobacterias, excepto algunos géneros como *Salmonella*, poseen una β -lactamasa cromosómica, si bien se ha constatado la presencia de una cefalosporinasa cromosómica en un aislado de *S. Typhimurium* (Sykes & Matthew, 1976). Por el contrario, es frecuente encontrar en *Salmonella* β -lactamasas plasmídicas, siendo las más frecuentes las de tipo TEM, SHV, OXA, CTX-M o PSE (Bush & Jacoby, 2010).

En la década de los 70 y 80 se incrementó el empleo de cefalosporinas de tercera generación, favoreciendo la selección y emergencia de cepas productoras de β -lactamasas de espectro extendido (BLEE) (Paterson & Bonomo, 2005). Se trata de enzimas de transmisión plasmídica y con un mayor espectro de acción: hidrolizan las penicilinas, todas las cefalosporinas (menos las cefamicinas) y los monobactámicos, pero no los carbapenémicos y son inhibidas por el ácido clavulánico, tazobactam y sulbactam (Patterson, 2003).

3.2.2. Aminoglucósidos

Los aminoglucósidos presentan una alta afinidad por el ARN ribosómico (ARNr) bacteriano, uniéndose irreversiblemente a la subunidad 30S del ribosoma y alterando la síntesis proteica de los microorganismos. Las resistencias desarrolladas en las bacterias contra esta familia de compuestos se basan fundamentalmente en su modificación enzimática por lo que impiden su acción. Existen más de 50 tipos de enzimas modificantes de aminoglucósidos y entre las más frecuentemente detectadas en enterobacterias se encuentran acetiltransferasas, codificadas por genes *aac*; adeniltransferasas, codificadas por los genes *aad* o *ant*; y fosfotransferasas, codificadas por los genes *aph* o *str* (J. G. Frye & Jackson, 2013). Cada una de estas enzimas reconoce un cierto tipo de aminoglucósido, lo que se traduce en un fenotipo de resistencia concreto (Vakulenko & Mobashery, 2003). Tal es el caso de lo que ocurre con las que confieren resistencia a la estreptomycin, que son codificada por los genes *strA-strB* y *aadA* (Sunde & Norström, 2005). Los genes *strA-strB* se encuentran ampliamente diseminados en bacterias Gram-negativas, y están presentes en plantas, animales y humanos (Sundin & Bender, 1996). Los genes *aadA* se localizan en casetes génicos ubicados en integrones portadores de multiresistencia (Recchia & Hall, 1995), siendo los más prevalentes los integrones de clase 1 y 2 cuyo elevado potencial de movilización ha favorecido su amplia difusión en numerosos reservorios (Sunde & Norström, 2005). La resistencia frente a los aminoglucósidos también puede conferirse por alteración del sitio de unión, mutación en alguno de los componentes ribosómicos, metilación postranscripcional del ARNr, o por un aumento en la tasa de expulsión (Magnet & Blanchard, 2005).

3.2.3. Tetraciclinas

Las tetraciclinas son una de las clases de antimicrobianos más frecuentemente utilizados en medicina humana y veterinaria al presentar un amplio espectro de acción, ser de fácil administración y tener una buena eficacia. Son fármacos de primera línea en animales destinados al consumo humano al presentar actividad contra una variedad de bacterias Gram-positivas y Gram-negativas (incluidas bacterias intracelulares obligadas), y muchos parásitos protozoarios (P. S. McManus et al., 2002). Este uso masivo ha contribuido a la amplia dispersión de mecanismos de resistencia en el género *Enterobacteriaceae* (J. R. E. d. Castillo, 2013).

Los principales mecanismos de resistencia frente a las tetraciclinas se relacionan con la presencia de bombas de eflujo, protección ribosomal, inactivación enzimática y mutaciones en el ARN ribosomal 16S, siendo el primero el más prevalente. Aunque se conocen al menos 28 genes codificantes de esta resistencia, denominados de forma genérica como genes *tet* (Nguyen et al., 2014), en *Salmonella* los más frecuentes son *tet(A)*, *tet(B)*, *tet(C)*, *tet(D)*, *tet(G)* y *tet(H)* (J. G. Frye & Jackson, 2013; Hall, 2010). De todos ellos, *tet(A)* parece ser el más frecuente en cepas resistentes a la tetraciclina, tanto en *Salmonella* spp. como en *E. coli* (Bryan et al., 2004; Gargano et al., 2021), pudiéndose transferir fácilmente entre bacterias a través de diferentes elementos genéticos móviles como integrones, transposones y plásmidos (Gargano et al., 2021; Koo & Woo, 2011; Tawyabur et al., 2020). Los genes *tet* detectados en *Salmonella* codifican proteínas asociadas a la membrana que expulsan la tetraciclina desde el interior de la célula, lo que reduce su concentración y protege a los ribosomas (Roberts & Schwarz, 2009). Estos genes para bombas de eflujo de tetraciclinas tienen mayor potencial de dispersión y son predominantes en bacterias de aguas residuales o lodos (Yu et al., 2015). Además, las bacterias pueden portar más de un determinante de resistencia a la tetraciclina, a menudo asociados a diferentes elementos genéticos móviles (J. R. E. d. Castillo, 2013).

3.2.4. Quinolonas y fluoroquinolona

Las quinolonas y fluoroquinolonas son antimicrobianos, pero no antibióticos, ya que proceden de síntesis química. En 1962, el ácido nalidíxico se convirtió en la primera quinolona aprobada para uso médico (Mascaretti, 2003), desarrollándose desde ese momento varias generaciones de quinolonas modificadas, como las fluoroquinolonas. Estos antimicrobianos interfieren en la síntesis del ADN conduciendo a la muerte bacteriana tras la fragmentación cromosómica (Laponogov et al., 2009). Su mecanismo de acción consiste en inhibir directamente la replicación bacteriana al interactuar con dos enzimas necesarias para realizar el superenrollamiento del ADN: ADN girasa o topoisomerasa II (compuesta por dos pares de subunidades A y B, codificadas por los genes *gyrA* y *gyrB*); y topoisomerasa IV (compuesta por dos pares de subunidades A y B, codificadas por los genes *parC* y *parE*). Concretamente, la ADN girasa es el blanco primario en bacterias Gram-negativas, mientras que la topoisomerasa IV lo es en Gram-positivas. Las quinolonas de primera generación se dirigen a la ADN girasa mientras que las

fluoroquinolonas parecen tener como blanco ambas enzimas (Álvarez-Hernández et al., 2015; Blondeau, 2004; Mascaretti, 2003).

Quinolonas y fluorioquinolonas han sido ampliamente utilizadas en el tratamiento de infecciones animales y humanas, por lo que muchos microorganismos han desarrollado resistencia frente a ellos. Así, la circulación de clones de *Salmonella* resistentes a quinolonas entre animales domésticos, animales salvajes y humanos ya ha sido descrita en España (Palomo et al., 2013). La existencia de este tipo de cepas es motivo de especial preocupación ya que las fluoroquinolonas, y más concretamente el ciprofloxacino, son fármacos muy utilizados para tratar las infecciones graves por *Salmonella* y otras enterobacterias (CDC, 2019), por lo que se clasifican como "antimicrobianos de importancia crítica" por la Organización Mundial de la Salud (WHO, 2014).

Las resistencias desarrolladas contra las quinolonas en *Salmonella* se basan en tres mecanismos principalmente:

- Alteración de la diana mediante mutaciones cromosómicas en los genes que codifican las subunidades de la enzima ADN girasa (*gyrA* y *gyrB*) o de la topoisomerasa IV (*parC* y *parE*). Estas mutaciones se ubican en las regiones determinantes de resistencia a las quinolonas (QRDR), siendo el polimorfismo de *gyrA* el mecanismo que con mayor frecuencia se encuentra involucrado en la resistencia a quinolonas entre las bacterias Gram-negativas (Gruger et al., 2004). El nivel de resistencia es variable puesto que depende de la diana afectada y del número de mutaciones acumuladas, por ejemplo, una simple mutación en *gyrA* es suficiente para originar un alto nivel de resistencia a ácido nalidíxico y baja sensibilidad a fluoroquinolonas, pero para obtener un alto nivel de resistencia a estas últimas es necesario un segundo cambio en *gyrA* y/o *parC* (Crump et al., 2011; Guijarro, 2011). Sin embargo, altos niveles de resistencia a fluoroquinolonas resultan todavía infrecuentes (X. Wang et al., 2019), posiblemente debido a que suponen un elevado coste para la bacteria (O'Regan et al., 2010).

- Disminución en la acumulación del antibiótico en el interior de la célula. Este mecanismo normalmente ocurre por la sobreexpresión de bombas de eflujo (AcrAB), o por disminución de la permeabilidad en la membrana externa. (Fabrega et al., 2009).

- Genes de resistencia a quinolonas mediados por plásmidos (PMQR). Estos mecanismos de resistencia codificados en diversos plásmidos engloban proteínas que

impiden la unión entre el ADN girasa y la quinolona (proteínas QNR; (Martínez-Martínez et al., 1998), enzimas que modifican el antimicrobiano (como AaC(6')-Ib-cr; una variante de una aminoglucósido acetiltransferasa que acetila las fluoroquinolonas; (Robicsek et al., 2006), o mediante las bombas de eflujo QepA (Lunn et al., 2010) y OqxAB (Wong & Chen, 2013).

3.2.5. Sulfonamidas

Aunque al inicio se prescribían por separado sulfonamidas y trimetoprim, la combinación de ambas ha sido una forma popular de tratamiento durante décadas, y aunque han surgido mecanismos de resistencia entre los aislados de *Salmonella*, en el serotipo *S. Typhimurium* su acción conjunta no parece ser común (X. Wang et al., 2019). Tanto las sulfonamidas como el trimetoprim actúan sobre la ruta de biosíntesis del ácido fólico, lo que interfiere en última instancia en la síntesis de los ácidos nucleicos. Las sulfonamidas, debido a su similitud con el ácido aminobenzoico, inhiben competitivamente a la enzima dihidropteroato sintasa (DHPS), enzima bacteriana que posibilita la unión del ácido paraaminobenzoico (PABA) y la pteridina para formar ácido dihidropteroico, el precursor inmediato del ácido fólico. De manera similar, el trimetoprim es un análogo estructural del ácido fólico y actúa inhibiendo otra enzima, la dihidrofolato reductasa (DHFR) (Mascaretti, 2003).

Las resistencias a sulfamidas han sido atribuidas a la presencia de genes que codifican formas mutantes de la enzima DHPS que no pueden ser inhibidas por el antimicrobiano. Los tres principales genes *sul*, denominados *sul1*, *sul2* y *sul3*, se hallan habitualmente en integrones, trasposones y/o plásmidos, sobre todo el gen *sul1*, que ha sido encontrado en un amplio rango de serotipos de *Salmonella* y a menudo asociado a integrones de clase 1 que contienen otros genes de resistencia (Patrícia Antunes et al., 2005; Argüello et al., 2018; Chen et al., 2004). De forma similar, la resistencia al trimetoprim se produce por la expresión de genes transferibles que codifican diferentes formas de la enzima DHFR, denominados *dhfr* o *dfr*. Hay múltiples variantes de estos genes presentes en *Salmonella* y se pueden encontrar asociados con *sul1* y *sul3*. Además, en algunos casos se encuentran localizados en casetes génicos, plásmidos portadores de otras resistencias y en las islas genómicas de *Salmonella* (Patrícia Antunes et al., 2007; Argüello et al., 2018; Sin et al., 2020).

3.2.6. Cloranfenicol

A pesar de ser un antibiótico de amplio espectro de acción, su elevada toxicidad, tanto en humanos como animales, ha obligado a restringir su utilización en ambos grupos, tanto en la UE como en otros países (J. G. Frye & Jackson, 2013). Su actividad bacteriostática se relaciona con la inhibición de la síntesis proteica en la subunidad ribosomal 50S, y su resistencia con la inactivación por acetilación mediada por diferentes tipos de cloranfenicol acetiltransferasas (CATs) que generan derivados acetilados incapaces de unirse al ribosoma. La resistencia también puede relacionarse con exportadores específicos codificados por genes, como *cmIA* o *floR* (compatible a la vez para el florfenicol), que expulsan el antibiótico de la célula (Schwarz et al., 2004). Mientras que *cmIA* apenas ha sido descrito en algunas serovariedades de *Salmonella*, el gen *floR* se encuentra frecuentemente asociado al integrón de clase I a su vez ubicado en la Isla Genómica I de *Salmonella* (SGI-1) y en plásmidos (Jonathan G Frye et al., 2011), participando en fenómenos de multirresistencia detectados en múltiples serotipos como Typhimurium, Newport y Agona (Alcaine et al., 2007), lo que facilitaría su dispersión en ausencia de presión selectiva (Thakur et al., 2007).

3.2.6. Polimixinas

La colistina (polimixina E) ha sido ampliamente usada en veterinaria durante décadas, tanto en España como en otros países, para tratamientos, prevención de infecciones gastrointestinales y en ganado como promotor del crecimiento (EMA/AMEG, 2016). En la actualidad se ha limitado mucho su utilización en animales y humanos al ser catalogado como antibiótico de importancia crítica en entornos clínicos humanos por la Organización Mundial de la Salud (WHO). Las polimixinas actúan directamente sobre el lipopolisacárido (LPS) de las bacterias Gram-negativas, desestabilizándolo e incrementando la permeabilidad de la pared bacteriana, por lo que se pierde el contenido citoplasmático y se produce la muerte celular (Velkov et al., 2010).

La resistencia a colistina está principalmente asociada a modificaciones del LPS, con la consiguiente reducción o ausencia de afinidad por la colistina. Este mecanismo, aunque común en bacterias Gram-negativas, puede diferir entre especies (Falagas et al., 2010; Olaitan et al., 2014). La modificación se produce esencialmente por la adición de dos moléculas: 4-amino-4-deoxi-L-arabinosa (L-Ara4N) y/o fosfoetanolamina (PEA), que

reducen la carga negativa del LPS y así su afinidad por la colistina (Olaitan et al., 2014; Rhouma et al., 2016). Para que se produzca esa modificación en la membrana externa es necesario que se activen dos sistemas de doble componente (PhoPQ y/o PmrA/B), que responden a estímulos ambientales pero que también se activan constitutivamente por determinadas mutaciones, conduciendo a la sobreexpresión de los genes que codifican las enzimas responsables de la síntesis y/o transferencia al LPS de L-Ara4N y PEA (Rhouma et al., 2016). Aunque hasta hace pocos años se consideraba que no existía transferencia horizontal de la resistencia a las polimixinas, un estudio llevado a cabo a finales del 2015 demostró que en una cepa de *E.coli* resistente a colistina estaba mediada por un gen de naturaleza plasmídica, *mcr-1* (Liu et al., 2016), identificándose poco después hasta 10 isoformas no alélicas (*mcr1-10*) en diferentes enterobacterias y hospedadores en todo el mundo, incluyendo España, y siendo considerado el ganado como el principal reservorio en la selección y diseminación de los genes *mcr* de mayor impacto clínico (L. M. Carroll et al., 2019; Guenther et al., 2017; Hassan & Kassem, 2020; Lima et al., 2019; Poirel et al., 2017; Quesada et al., 2016; C. Wang et al., 2020; R. Wang et al., 2018). Este descubrimiento se ha convertido en una preocupación de ámbito mundial debido al amplio potencial de dispersión de los plásmidos que llevan estos, y a menudo otros, determinantes de resistencia (Lima et al., 2019; Rhouma et al., 2016).

3.3. Transmisión de resistencias

Existen géneros bacterianos con determinadas características que les hacen resistentes *per se* frente a la acción de algunos tipos de antimicrobianos, bien porque carezcan de receptores específicos, porque tengan una baja permeabilidad, o porque posean mecanismos de expulsión para estos fármacos. A este tipo de resistencia se le llama resistencia intrínseca y es muy específica de género y especie. Por otro lado, la mayoría de las bacterias pueden generar o incorporar nuevos mecanismos de resistencia debido a mutaciones (Martinez & Baquero, 2000) o por transferencia horizontal (Boto & Martinez, 2011), desarrollando lo que se conoce como resistencia adquirida (Fig. 7).

La adquisición de resistencia frente a los antimicrobianos por mutación es un proceso generalmente lento, que ocurre a través de cambios en la secuencia del cromosoma bacteriano dando lugar a modificaciones que reducen la sensibilidad y aumentan el éxito reproductivo cuando el antimicrobiano está presente, condiciones en

las que las cepas resistentes proliferan y que, tras varias generaciones, se dispersan en lo que se conoce como transmisión vertical de resistencia o evolución vertical (Tenover, 2006). Con frecuencia, las mutaciones no confieren una resistencia muy elevada al antimicrobiano, sino que disminuyen la sensibilidad lo suficiente como para posibilitar que la bacteria sobreviva más tiempo y le permita adquirir nuevas mutaciones o información genética adicional (M. C. McManus, 1997).

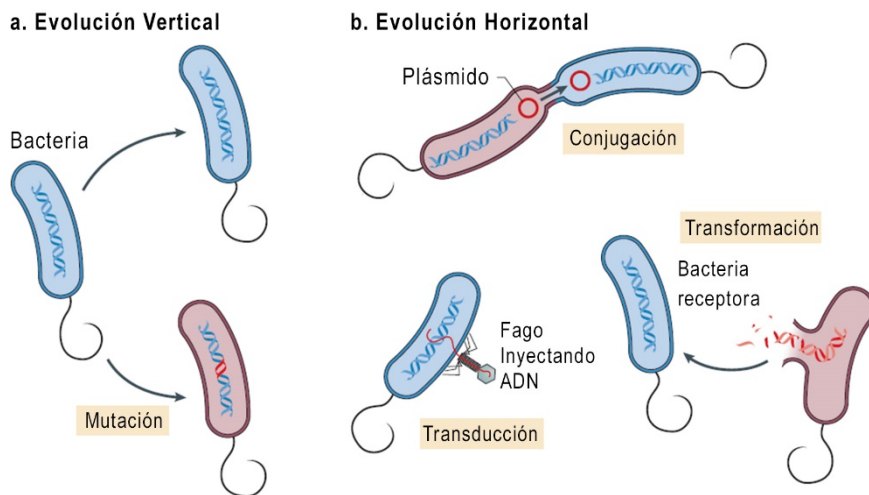


Fig. 7: Principales mecanismos de transmisión de resistencias antimicrobianas. Adaptado de (Sommer et al., 2017).

Existe otra vía, mediada por el intercambio de material genético, por la que una bacteria puede incorporar un nuevo mecanismo de resistencia procedente de otro microorganismo. Este hecho tiene una gran relevancia clínica ya que posibilita la adquisición de nuevas resistencias en muy poco tiempo. A este proceso se le llama transmisión horizontal de resistencia o evolución horizontal y puede ocurrir entre cepas de la misma especie o de distintas especies e incluso géneros (Tenover, 2006). Los mecanismos a través de los cuales se producen estos intercambios de material genético son la conjugación, la transducción y la transformación (M. C. McManus, 1997). En el primero de ellos, las bacterias intercambian material genético entre sí a través de estructuras especializadas que permiten el paso de ADN, el pilus sexual o factor F en las bacterias Gram-negativas y diversas adhesinas en el caso de las bacterias Gram-positivas (Ochman et al., 2000). En la transducción, la transferencia de material genético se hace a través de virus bacterianos, también denominados bacteriófagos o fagos. Cada

bacteriófago posee un rango acotado de huéspedes bacterianos, por lo que este fenómeno está normalmente restringido entre especies concretas (Ochman et al., 2000). Cuando estos virus infectan la bacteria hospedadora, emplean su maquinaria replicativa para multiplicarse. Durante este proceso, secuencias del cromosoma bacteriano pueden incorporarse al virus y transferirse a otras bacterias que sean posteriormente infectadas. Este tipo concreto de transducción se llama transducción generalizada, ya que cualquier parte del cromosoma bacteriano es susceptible de ser incorporada al virus. En cambio, en el caso de virus que se encuentran como profagos en el cromosoma bacteriano, solamente los fragmentos de ADN adyacentes al profago se replican con éste y pueden ser transferidos a otras bacterias, denominándose a este tipo transducción especializada (Gyles & Boerlin, 2014) y siendo el fago λ de *E. coli* la referencia (Cavalli et al., 1953). Por último, la transformación consiste en la captación por una bacteria receptora competente de material genético libre del medio extracelular, que se une al cromosoma bacteriano mediante recombinación genética (Ochman et al., 2000). Este mecanismo posibilita la transferencia de ADN entre especies muy poco relacionadas filogenéticamente y se encuentra regulado por señales extrínsecas como las feromonas bacterianas (Cavalli et al., 1953; Johnsborg et al., 2007).

3.3.1. Elementos genéticos móviles

Para que tengan lugar los mecanismos de transmisión horizontal descritos anteriormente es necesario que exista material genético móvil, siendo sus elementos mejor caracterizados los transposones, integrones y plásmidos (Baumberg et al., 1995).

3.3.1.1. Transposones

Estos elementos pueden consistir únicamente en una secuencia que codifica una enzima denominada transposasa que permite el movimiento e inserción del transposón por el genoma, lo que hace que se les conozca también como genes "saltarines" (Mahillon & Chandler, 1998; Pennisi, 2007). Esta versión mínima de un transposón, denominada secuencia de inserción, es frecuente entre algunas cepas bacterianas y su actividad es mutagénica, ya que puede inactivar genes por interrupción o provocar la delección o sobreexpresión de genes adyacentes. Puede darse el caso de que dos secuencias de inserción similares flanqueen una región de ADN, constituyendo un transposón compuesto con capacidad para movilizar los genes que quedan en su interior (Gyles & Boerlin, 2014).

Estos elementos carecen por sí mismos de la capacidad de transferirse a otras bacterias, aunque sí es posible su transferencia mediada por plásmidos o por transformación (Gyles & Boerlin, 2014; Mahillon & Chandler, 1998). Otro tipo de transposones, mucho más complejos, son los denominados transposones conjugativos, que pueden transferirse por sí mismos ya que disponen de la maquinaria necesaria para realizar esta función. A diferencia de los plásmidos no pueden autorreplicarse eficientemente, aunque suelen presentar un intermediario de estructura circular previo a su integración en el cromosoma (Bennett, 2008).

3.3.1.2. *Integrones y cassettes génicos*

Los integrones son secuencias que codifican integrasas, enzimas que facilitan la recombinación específica de sitio del elemento en lugares concretos del genoma. Al igual que los transposones, los integrones no son autónomos para transferirse de unas bacterias a otras y son secuencias generalmente de reducido tamaño que se asocian frecuentemente a casetes génicos conteniendo funciones de resistencia a los antimicrobianos (Gyles & Boerlin, 2014). Frecuentemente asociados a transposones, plásmidos e islas genómicas que aseguran su transmisión horizontal (Pennisi, 2007), presentan una estructura básica que consta de tres elementos indispensables para la captura y expresión de los casetes génicos: el gen de la integrasa (*int*), una región de integración para el casete de resistencia (*attI*), y un promotor encargados de la expresión de los casetes génicos, una región variable que se encuentra flanqueada por segmentos conservados en sus extremos (5' y 3'-CS; (Rowe-Magnus & Mazel, 2002). En *Salmonella* se han descrito dos tipos de integrones, clasificándose en función de la integrasa que codifican, siendo el más frecuente el de tipo o clase 1 (*int1*), generalmente asociado a la aparición de cepas multirresistente (Argüello et al., 2018; Guijarro, 2011; Krauland et al., 2009). Se caracterizan por presentar las secuencias *int1* y *attI* en la región 5'-CS y, en la mayoría de los casos, una 3'-CS compuesta por los genes *qacEΔ1* y *sul1*, que confieren resistencia a compuestos de amonio cuaternario y sulfamidas respectivamente, y un marco de lectura abierto de función desconocida (*orf5*) (Fig. 8) (Bennett, 2008; Carattoli, 2001). Los integrones de clase 1 están frecuentemente asociados con el transposón Tn271, que puede localizarse en plásmidos conjugativos (Fluit & Schmitz, 2004). Así, es frecuente encontrar dos copias de este integrón dentro de un transposón conjugativo de 43 kb denominado Isla Genómica 1 de *Salmonella* (SGI1), que confiere resistencia a

múltiples antimicrobianos en función de la estructura de la SGI1, cantidad de integrones de clase 1 y número de casetes génicos que éstos alberguen (Vo et al., 2006).

Los casetes génicos se consideran elementos móviles que codifican diferentes funciones (metabolismo, virulencia, resistencia a los antimicrobianos o metales, etc). Pueden encontrarse libres en el citoplasma como moléculas de ADN circulares no replicativas o integrados en la estructura del integrón. Su integración y escisión depende de la integrasa y de las regiones de recombinación específicas situadas en la estructura del integrón (*attI*) y en los casetes génicos (*attC*). Los casetes génicos siempre están orientados en un mismo sentido, aunque carezcan de una secuencia promotora, regulándose su transcripción por el promotor *P_c* localizado en la región 5'-CS del integrón. Los casetes génicos se pueden insertar uno tras otro en el sitio de inserción del integrón, *attI*. La posición de los casetes en el integrón indica su orden de adición, siendo el más cercano a 5'CS el último que se incorporó, porque cada uno es insertado en el mismo punto y cada inserción se genera entre *attI* del integrón y *attC* flanqueando el gen de resistencia (Fig.8) (Bennett, 2008). Además, se ha demostrado que los que se encuentran más cercanos al promotor *P_c* son expresados más eficientemente (Di Conza & Gutkind, 2010).

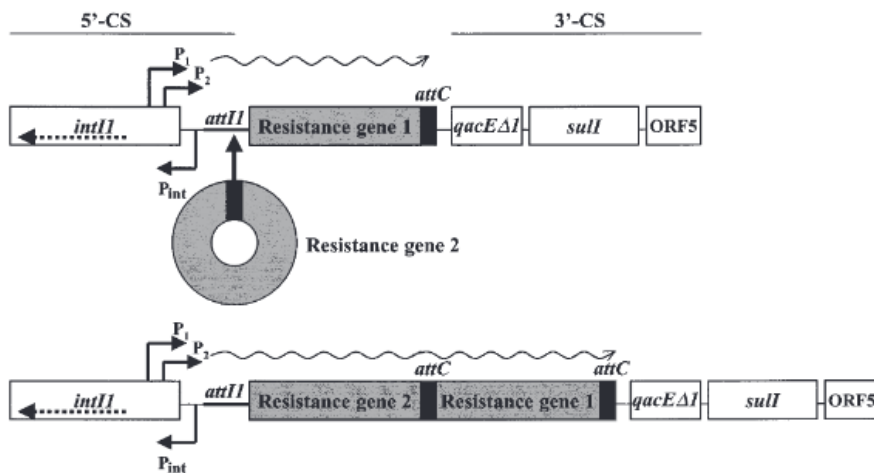


Fig. 8: Representación esquemática de integrones de clase 1 y un modelo de adquisición de casetes génicos (Carattoli, 2001)

3.3.1.3. Plásmidos

Los plásmidos son moléculas de ADN extracromosómico, generalmente circulares, de tamaño muy variable, frecuentemente entre 2 y 100 kb, aunque también existen megaplásmidos (>100 kb), que pueden autorreplicarse y que se transfieren a las células hijas cuando la bacteria se divide (Wozniak & Waldor, 2010). Mayoritariamente estos elementos no forman parte del genoma de la especie bacteriana que los contiene y portan genes no esenciales para la bacteria, como los relacionados con la resistencia a antimicrobianos, factores de virulencia y diversas adaptaciones al medio (Gyles & Boerlin, 2014). Algunos contienen genes que les habilitan para ser transferidos por conjugación a otras bacterias (Plásmidos conjugativos o autotransmisibles), mientras que los no autónomos dependen de otros plásmidos para poderse transferir (Smillie et al., 2010). Los plásmidos conjugativos tienen cuatro grupos de genes, cada uno de ellos encargado de una función determinada: 1) Replicación del ADN, 2) partición y control del número de copias, 3) conjugación y 4) genes auxiliares entre los que se incluyen los que codifican resistencias a antimicrobianos y metales pesados, y degradación de moléculas orgánicas complejas (Roy & Partridge, 2017).

Los genes que regulan la replicación del ADN dividen a los plásmidos en distintos grupos de incompatibilidad (Inc), determinando el espectro de hospedadores de cada grupo. Por ejemplo, los plásmidos IncF se limitan a las enterobacterias, mientras que los IncP-1 pueden encontrarse en enterobacterias, pseudomonas y otras bacterias Gram-negativas. Esta circunstancia se relaciona con el hecho de que dos plásmidos del mismo grupo no son estables dentro de la misma célula hospedadora, ya que la maquinaria replicativa no puede distinguir entre ellos y al cabo de sucesivas generaciones sólo uno de ellos prevalecería (Roy & Partridge, 2017). Aunque muchos plásmidos codifican una proteína iniciadora de la replicación, el resto de la maquinaria (DnaA, DnaB, DnaC, ADN polimerasa III y ADN girasa) suele ser aportada por la bacteria hospedadora (Pinkney et al., 1988). En lo referente a la bipartición y al control del número de copias a realizar, muchos plásmidos cuentan con mecanismos propios de anclaje a la membrana, como ParA y ParB, así como un lugar similar a un centrómero en el caso de los IncP-1, mientras que otros plásmidos emplean los sistemas de la bacteria (aunque con proteínas auxiliares distintas). Además, los plásmidos pueden contener "sistemas de dependencia" que favorecen su mantenimiento a lo largo de sucesivas generaciones, consistentes en dos

componentes: una "toxina" estable y un "antídoto" lábil (Hayes, 2003). De esta manera, en las células hijas carentes de plásmido, el antídoto es degradado y la toxina elimina a la bacteria, manteniendo así el plásmido en la población. Para llevar a cabo la conjugación, los plásmidos poseen un sitio especial de origen de replicación, *oriT*, y genes para la síntesis de los pili y las modificaciones necesarias en la membrana que faciliten el intercambio entre bacterias. Durante la transferencia, la replicación sucede mediante la síntesis de una única hebra de ADN que será la que se movilice y en la célula receptora se fabricará la hebra complementaria (Roy & Partridge, 2017). La clasificación de los plásmidos en grupos Inc puede llevarse a cabo por un sistema de tipificado por PCR basado en la detección específica de las secuencias relacionadas con cada módulo de replicación (Carattoli et al., 2005). Sin embargo, para algunas familias de replicones (IncI1, IncF, IncHI1, IncHI2, IncN) se recomienda realizar un análisis detallado de secuencias plasmídicas conservadas denominado pMLST (plasmid "MultiLocus Sequence Typing"; <http://pubmlst.org/plasmid/>; (García-Fernández et al., 2008). Los genes de resistencia y demás genes auxiliares característicos de diversos tipos de plásmidos suelen ubicarse a su vez dentro de transposones o integrones, lo que les faculta de una gran capacidad de dispersión al facilitarles movilidad entre plásmidos y el propio cromosoma, incluso en el caso de que el plásmido original que los contenga no pueda replicarse debido a alguna limitación relacionada con su rango de hospedador (Roy & Partridge, 2017). La existencia de estos genes en los plásmidos hace que su transferencia horizontal sea el principal mecanismo de adquisición de resistencias en microorganismos patógenos, aportando resistencias para los principales grupos de antimicrobianos: β -lactámicos, aminoglucósidos, tetraciclinas, cloranfenicol, sulfamidas, trimetoprim, macrólidos y quinolonas.

Además de plásmidos, transposones e integrones, existen otros dos tipos de material genético móvil que tienen importancia en la transmisión de mecanismos de resistencia: los profagos y las islas genómicas, conocidas en *Salmonella* como SGI, por sus siglas en inglés (Baumberg et al., 1995). Ambos elementos se encuentran integrados en el cromosoma bacteriano, donde su movilidad está determinada por las secuencias que los flanqueen. Los bacteriófagos suelen codificar en su mayoría toxinas, como son los casos de la toxina diftérica (Sekizuka et al., 2012) o la toxina de *Vibrio cholerae* (Waldor & Mekalanos, 1996), mientras que las SGI contienen grupos de genes que desempeñan

un papel importante en la evolución del genoma de las bacterias y por ende en la adaptabilidad microbiana (Bertelli & Brinkman, 2018). Históricamente, las islas genómicas han sido clasificadas en diferentes subtipos dependiendo de las funciones que codifiquen: islas simbióticas, metabólicas, de adaptación, o islas de resistencia a los antimicrobianos (Juhas et al., 2009). La isla genómica prevalente en *Salmonella*, la SGI1, está implicada en la transferencia horizontal de resistencias frente a los antimicrobianos. Este elemento, que puede considerarse un transposón conjugativo de gran complejidad, presenta características diferenciales sobre los plásmidos ya que al encontrarse integrada en el cromosoma del hospedador no necesita una replicación autónoma y eficiente que asegure su mantenimiento, lo que disminuye su coste energético, aunque penaliza el nivel de expresión de las funciones codificadas (Juhas et al., 2009). La SGI1 fue descrita inicialmente en la *Salmonella enterica* serovar Typhimurium (Boyd et al., 2001), y se caracteriza por conferir un característico fenotipo de resistencia múltiple frente a los antimicrobianos denominado pentarresistencia ó ACSSuT (por resistencia frente a ampicilina, cloranfenicol, estreptomycin, sulfonamidas y tetraciclinas; (Quinn et al., 2006).

3.4. Resistencias antimicrobianas en *Salmonella* y su trascendencia en salud pública

La ya de por sí elevada importancia que tiene *Salmonella* como agente causal de gastroenteritis y procesos septicémicos a nivel mundial, se ve incrementada por la cada vez más frecuente aparición de aislados resistentes a los antimicrobianos. Este fenómeno supone un riesgo notable para la salud pública, como refleja el llamamiento que en 2017 realizó la organización mundial de la salud para el desarrollo de nuevos antimicrobianos contra infecciones causadas por *Salmonella* (WHO, 2017). Las infecciones causadas por clones resistentes de esta bacteria son mucho más proclives a cursar con septicemia, lo que incrementa la necesidad de hospitalización en humanos y también la mortalidad (Parisi et al., 2018). En el caso concreto de la Unión Europea, desde 2013 existe un marco legal que regula la vigilancia y control de las resistencias antimicrobianas en bacterias zoonóticas y comensales, siendo obligatoria la monitorización de resistencias en *Salmonella* en todos los casos de salmonelosis humana, canales de pollos, pavos, cerdos y terneros, y durante diferentes momentos del ciclo productivo en broilers, pavos de engorde y gallinas ponedoras (EU-2013/652; EU-2020/1729). Según los datos del último informe elaborado por la EFSA y el ECDC, en Europa existen altos porcentajes de resistencia

(>25%) a las sulfonamidas, ampicilina y tetraciclinas en los aislados de *Salmonella* de procedencia humana, siendo *S. Typhimurium* y *S. Kentucky* los serotipos con mayores resistencias, en ambos casos superiores al 70% (EFSA & ECDC, 2021b). Porcentajes similares se obtuvieron en aislados de origen animal, siendo los cerdos y sus canales los que presentaron mayores cifras. En cuanto a las resistencias contra antimicrobianos calificados como de importancia crítica, un 13.5% de los aislados procedentes de casos humanos en Europa son resistentes al ciprofloxacino. Este porcentaje se eleva hasta el 82.1% en el caso de los aislados del serotipo Kentucky. Los aislados procedentes de animales o sus canales mostraron niveles de resistencia muy dispares entre especies, con una media del 51.4% en pollos o del 32.4% en pavos y del 9% en cerdos. Los índices son inferiores en el caso de las resistencias a cefalosporinas de 3ª generación, situándose alrededor del 1.5%, y aún menores cuando se analiza la resistencia combinada a ciprofloxacino y cefotaxima, que se sitúa en el 0.5% de los aislados tanto humanos como de origen animal. Los datos de multirresistencia (resistencia a 3 ó más antimicrobianos) señalan que un 25.4% de los aislados de *Salmonella* procedentes de humanos presentan esta característica. En concreto, los serotipos *S. Typhimurium* monofásica 1,4,[5],12:i:- y *S. Kentucky* llegan a tener porcentajes de multirresistencia superiores al 70%. Los datos en canales varían desde el 43.3% de los cerdos al 15.1% de los pavos y en animales vivos desde el 38.8% de los pavos al 6.5% de las gallinas ponedoras. En los casos particulares de las resistencias contra colistina y carbapenemas, no se detectó ningún aislado resistente en animales contra este último y tan solo un aislado de origen humano. La resistencia contra colistina supone un hallazgo poco frecuente entre los aislados de *Salmonella* obtenidos en humanos o animales, aunque concretamente en los pertenecientes al serotipo Enteritidis se detectaron porcentajes superiores al 15% en humanos y en animales valores que van desde el 25% en gallinas ponedoras hasta 5% en pavos (EFSA & ECDC, 2021b). Estos datos, que ponen de manifiesto la importante presencia de resistencias antimicrobianas entre los aislados del género *Salmonella* en nuestro entorno, se repiten, en mayor o menor medida, en todas las regiones más desarrolladas del planeta donde la administración de antimicrobianos de forma indiscriminada ha sido una constante en los últimos años (Parisi et al., 2018). Las consecuencias sanitarias derivadas de las infecciones causadas por microorganismos resistentes han hecho que, hoy en día y en prácticamente todas estas regiones, se hayan implementado programas de vigilancia y control con el objetivo de disminuir el ritmo de

aparición de nuevas resistencias y para intentar controlar la propagación de las ya existentes (AEMPS, 2019; EU-2020/1729).

IV. JUSTIFICACIÓN

La realización de los estudios enmarcados dentro de la presente tesis doctoral responde a la necesidad de abordar los múltiples aspectos de la problemática existente alrededor de la presencia de *Salmonella* spp., en una de las especies de mamíferos salvajes de interés cinegético y con mayor expansión demográfica del continente europeo: el jabalí.

A pesar de que no existen censos sistemáticos de esta especie en los países europeos, el aumento de las poblaciones de jabalíes es un hecho generalizado que puede constatarse por la multitud de consecuencias que trae aparejadas. Considerando solo datos de España, el aumento en el número de jabalíes se refleja en la cada vez más frecuente presencia de estos animales en zonas urbanas (Castillo-Contreras et al., 2021; J. L. Guerra, 2021), en el aumento de los accidentes de tráfico provocados por ellos (Gutierrez, 2020), o en el aumento del número de capturas en acciones cinegéticas, a pesar incluso del considerable descenso del número de licencias de caza en España en los últimos años (MITERD, 2019). Además de su crecimiento demográfico natural, la creciente demanda de carne de jabalí y la búsqueda de individuos considerados como “buenos trofeos de caza”, están haciendo que proliferen las fincas cinegéticas en las que se aplican diferentes sistemas de manejo que persiguen mejorar la calidad de la especie (Antonio J. Carpio et al., 2020).

La aplicación de prácticas de manejo propias de animales domésticos a especies salvajes suele tener consecuencias negativas derivadas del estrés provocado por las agrupaciones forzosas, la presencia de seres humanos o las altas densidades de individuos (Morgan & Tromborg, 2007). Estos elevados niveles de estrés inciden negativamente en el sistema inmunitario del animal, predisponiendo al padecimiento de enfermedades o a presentaciones clínicas de especial gravedad (Martinez-Miro et al., 2016). Algunas prácticas, como la colocación de bebederos y comederos, facilitan el contacto estrecho con individuos de otras especies, lo que puede favorecer el intercambio de microorganismos entre ellos (Gonçalves Blanco, 2017).

Teniendo en cuenta que los jabalíes son portadores de serotipos de *Salmonella* de especial virulencia para los seres humanos (Hilbert et al., 2012), y que esta enterobacteria está considerada por la EFSA como la principal causante de infecciones alimentarias en Europa (EFSA & ECDC, 2021 a), la situación planteada anteriormente, con

un importante aumento de las posibilidades de contacto entre jabalíes y personas, o entre jabalíes y animales domésticos, supone un riesgo considerable para la salud humana y la sanidad animal. Además, también debe considerarse dentro de esta problemática el riesgo añadido que suponen las resistencias antimicrobianas, especialmente en bacterias de carácter zoonótico como es *Salmonella* spp (EFSA & ECDC, 2021b). Según datos de la OMS, se estima que las resistencias antimicrobianas provocan unas pérdidas económicas en Europa de 1.100 millones de euros anuales y que son causantes de alrededor de 33.000 muertes cada año (WHO, 2021). Es por ello por lo que el conocimiento de las dinámicas de transmisión de estas resistencias entre aislados de *Salmonella* spp. procedentes de jabalíes y ambientes antropogénicos, es de vital importancia para contener su avance y minimizar sus consecuencias.

En base a la situación anteriormente descrita, hemos planteado y desarrollado nuestra tesis con la esperanza de poder contribuir a un mayor conocimiento de esta especie y que sirva de base para la elaboración de estrategias efectivas para el control de *Salmonella* spp. y las consecuencias negativas de su dispersión asociadas a la expansión demográfica que está teniendo lugar en las poblaciones del jabalí.

V. OBJETIVOS

En la realización de esta Tesis nos hemos planteado los siguientes objetivos primarios que a su vez se materializan y articulan en una serie de objetivos secundarios:

1. Investigar la presencia de *Salmonella* en jabalíes abatidos en monterías en la zona suroccidental de España en el periodo 2010-2015.

1.1. Determinar la prevalencia de *Salmonella* spp. y la idoneidad de cada tipo de muestra en su aislamiento.

1.2. Describir las especies, subespecies y serovares de *Salmonella* identificados.

2. Describir los brotes de salmonelosis producidos en jabalíes en el periodo 2010-2015.

2.1. Caracterizar los brotes de salmonelosis producidos en jabalíes desde un punto de vista etiológico, epidemiológico, clínico y lesional.

2.2. Constatar la existencia de relaciones clonales entre los aislados obtenidos de jabalíes y de las poblaciones de cerdos domésticos alledañas.

3. Determinar el perfil de resistencia antimicrobiana de los aislamientos de *Salmonella* obtenidos y las consecuencias epidemiológicas derivadas.

3.1. Investigar fenotípicamente y genotípicamente las resistencias antimicrobianas presentes en los aislamientos de *Salmonella*.

3.2. Comparar las resistencias halladas en los aislados de *S. Choleraesuis* con las detectadas en los cerdos domésticos de la misma zona.

3.3. Analizar la presencia de plásmidos y su potencial como elementos de movilidad genética portadores de resistencias antimicrobianas.

3.4. Determinar la relación existente entre los factores de manejo y el desarrollo de la resistencia frente a los antimicrobianos.

VI. TRABAJOS PUBLICADOS

5.1. Estudio de la prevalencia de *Salmonella spp.* en tonsilas, ganglios linfáticos mandibulares y heces de jabalíes de España y de las relaciones genéticas entre aislados.

Publicado en: *Transboundary and emerging diseases*. 2019;66(3):1218-26. *Prevalence of Salmonella spp. in tonsils, mandibular lymph nodes and faeces of wild boar from Spain and genetic relationship between isolates.*

Es bien conocida la importancia del jabalí como especie cinegética en España. Sus hábitos alimenticios y comportamiento intrusivo, junto con una distribución cada vez mayor de las poblaciones, aumentan las interacciones de estos animales con el ganado y los seres humanos. Teniendo en cuenta que los jabalíes podrían tener un papel potencial en la transmisión de ciertos patógenos como las salmonelas, los objetivos de este estudio fueron determinar la prevalencia de *Salmonella spp.* en jabalíes cazados en el centro-oeste de España, la presencia de este patógeno en tonsilas, ganglios linfáticos mandibulares y heces (como marcadores de riesgo de transmisión), y analizar las posibles relaciones clonales entre las cepas aisladas, con el fin de investigar las vías de circulación de las bacterias entre los animales, fincas e incluso los tejidos analizados.

Para ello, se analizaron un total de 1467 muestras pertenecientes a 1041 jabalíes, los cuales procedían de un total de 36 fincas localizadas en el centro-oeste de España. Por un lado, se analizaron 148 animales, procesándose de cada animal tonsilas, ganglios submandibulares y heces. Sin embargo, de 893 jabalíes no se procesaron todas las muestras de el mismo animal, tomándose 690 heces, 267 ganglios linfáticos submandibulares y 66 tonsilas. Los aislamientos de *Salmonella spp.* se realizaron a través de cultivos microbiológicos, los cuales fueron confirmados mediante PCR y serotipificados en el Centro de Referencia Nacional de Algete. Finalmente, el análisis filogenético de las cepas se realizó mediante PFGE.

Los resultados mostraron que de los 148 animales en los que se analizaron las tres muestras, el número de animales positivos para *Salmonella spp.* fue del 27%, siendo las tonsilas el órgano que proporciona mayor sensibilidad para la detección (20.9%), seguido de ganglios (8.1%) y heces (1.35%). Hay que destacar que de estos animales

ninguno mostró simultáneamente *Salmonella* spp. en los tres tipos de muestras, sin embargo, en 5 animales si se aislaron a la vez en tonsilas y ganglios, compartiendo el mismo serotipo en 4 de ellos. Por otro lado, al analizar el resto de jabalíes, se observó que el porcentaje de detección en los animales fue menor (7.7%), esto fue debido a que las heces fue la muestra tomada con mayor frecuencia y en la que menos se detectó *Salmonella* spp. (2.9%), seguida de los ganglios (5.1%) y las tonsilas (18.7%). Hay que añadir que en el 58.3% de las fincas había animales portadores de *Salmonella* spp.

Un total de 86 cepas de *Salmonella* spp. fueron aisladas en este trabajo, pertenecientes a 34 serotipos diferentes de 4 subespecies de *S. entérica*. La subsp. *enterica* se identificó en el 40.7% de los aislados y de los 16 serotipos diferentes los predominantes fueron Enteritidis 9,12:g,m:- y Newport 6,8:e,h. La subsp. *diarizonae* presentó un porcentaje muy similar al anterior (39.5%), con 11 serotipos, siendo 38:z10:z53 el predominante. En cuanto a la subsp. *salamae* apareció en un 18.6% con 6 serotipos, predominando 4,12:b:- y por último la subsp. *houtenae* solamente se aisló una vez en este trabajo (1.2%).

El análisis filogenético de los aislados mostró una gran diversidad clonal, detectándose 48 perfiles diferentes agrupados en dos clústers (A y B). El clúster A, compuesto únicamente por dos aislados de una misma finca e idéntico serotipo, representa probablemente un único clon. Por el contrario, el clúster B agrupa a la mayoría de las cepas, estando subdividido en los subgrupos clústerB1 y B2. Este último resultó ser predominante, con 75 aislados clasificados en 39 pulsotipos. Trece de estos grupos incluían entre dos y cuatro aislados estrechamente ligados, que coincidían perfectamente en serotipo, finca y perfil PFGEs (Sa9, Sa13, Sa15, Sa16, Sa20, Sa21, Sa24, Sa32, Sa37, Sa40, Sa44, Sa45 y Sa46). Sin embargo, el subgrupo B2 también presentó evidencias de propagación clonal dado que siete pulsotipos (Sa22, Sa23, Sa25, Sa35, Sa39, Sa41 y Sa47), incluían aislados que presentaban el mismo serotipo pero que provenían de fincas diferentes e incluso alejadas entre sí. Además de aparecer clones dispersos, también se observó una elevada similaridad genética (> 80%) si los aislados pertenecen al mismo serotipo (Sa13-Sa14, Sa26-S27, Sa33-Sa34, Sa42-Sa43).



ORIGINAL ARTICLE

WILEY *Transboundary and Emerging Diseases*

Prevalence of *Salmonella* spp. in tonsils, mandibular lymph nodes and faeces of wild boar from Spain and genetic relationship between isolates

María Gil Molino¹ | Alfredo García Sánchez² | David Risco Pérez³ |
 Pilar Gonçalves Blanco³ | Alberto Quesada Molina^{4,5} | Joaquín Rey Pérez¹ |
 Francisco Eduardo Martín Cano⁶ | Rosario Cerrato Horrillo³ |
 Javier Hermoso-de-Mendoza Salcedo¹ | Pedro Fernández Llario³

¹Unidad de Patología Infecciosa, Facultad de Veterinaria, Universidad de Extremadura, Cáceres, Spain

²Área de Producción Animal, CICYTEX-La Orden, Badajoz, Spain

³Innovación en Gestión y Conservación de Ungulados S.L., Cáceres, Spain

⁴Departamento de Bioquímica, Biología Molecular y Genética, Facultad de Veterinaria, Universidad de Extremadura, Cáceres, Spain

⁵INBIO G+C, Universidad de Extremadura, Cáceres, Spain

⁶Área de Reproducción, Facultad de Veterinaria, Universidad de Extremadura, Cáceres, Spain

Correspondence

María Gil Molino, Unidad de Patología Infecciosa, Facultad de Veterinaria, Universidad de Extremadura, Cáceres, Spain.
 Email: mariamilm@unex.es

Funding information

Junta de Extremadura, Grant/Award Number: TA13003; European Social Fund; Ministerio de Economía y Competitividad of Spain, Grant/Award Number: PTQ14-06663

Summary

The importance of wild boars as game species in Spain is well known. Their feeding habits and intrusive behaviour, together with a progressively wider spreading of populations, increases the interactions of these animals with livestock and humans. Considering that wild boars could have a potential role in the transmission of certain pathogens as salmonellae, the aims of this study were to determine the prevalence of *Salmonella* spp. in wild boars hunted in central-western Spain, the occurrence of this pathogen in tonsils, mandibular lymph nodes and faeces (as markers for transmission risk), and to define the phylogenetic relationships among isolated strains, in order to investigate the circulation pathways of bacteria among tissues, animals and estates. Samples from 1,041 hunted wild boars were analysed for the presence of *Salmonella* spp. by bacteriological culture. Isolates were confirmed by PCR and serotyped in the Spanish national reference laboratory. The genetic relationships between strains were determined by PFGE. The results showed a 7.7% of positive animals (81 wild boars), being tonsils the organ most frequently colonised by *Salmonella* spp. (18.7%), followed by lymph nodes (5.1%) and faecal samples (2.9%). Serovars Enteritidis and Newport were the most frequent amongst the 34 different serovars obtained. The pulsed-field gel electrophoresis (PGFE) analysis showed a great genetic diversity, with serovars that exhibited different pulsotypes when isolated from different estates and multiple serovars in the same estate. In conclusion, this study reveals the importance of wild boars as carriers and possible transmitters of virulent and/or antimicrobial-resistant clones of *Salmonella* spp. to livestock and humans.

KEYWORDS

Epidemiology, phylogeny, salmonellae, sampling, *Sus scrofa*

1 | INTRODUCTION

Salmonellosis was the second cause of zoonotic disease in Europe in 2016, with 94,530 cases confirmed (EFSA, 2017). Infections in humans are mostly caused by food contaminated with *Salmonella* spp., being *S. Enteritidis*, *S. Typhimurium* and monophasic *S. Typhimurium* (1,4,[5],12:i:-) the three most commonly reported *Salmonella* serovars, comprising 48.5%, 13.4% and 8.4% of the isolates respectively (EFSA, 2017). Although animals are the major reservoir for *Salmonella*, environmental contamination as a result of human activities, such as livestock farming and waste disposal, can be an important source of infection for humans and animals, posing a major risk for wildlife infection (Gaffuri & Holmes, 2012). These infections may result in enteric and fatal systemic disease in young and immunocompromised animals (Gil Molino et al., 2019), but adults generally carry these serotypes asymptotically in the tonsils, the intestines and the gut-associated lymphoid tissue (GALT), being these tissues the target organs for the detection of salmonellae (Boyen et al., 2006; Fedorka-Cray, Gray, & Wray, 2000; Wood, Pospischil, & Rose, 1989). The importance of wildlife as *Salmonella* spp. carriers has been reported in several studies on a variety of wild animals (e.g. ungulates, mustelids, wild birds, rodents) (Botti et al., 2013; Euden, 1990; Millan, Aduriz, Moreno, Juste, & Barral, 2004). Wild boar is considered a relevant carrier and reservoir for several zoonotic pathogens, including *Salmonella* spp. (Sanno, Aspan, Hestvik, & Jacobson, 2014; Wacheck, Fredriksson-Ahomaa, König, Stolle, & Stephan, 2010). Human health risks from *Salmonella* spp. infected wild boar arise indirectly from contamination of agricultural areas and vegetable products, through direct animal contact, during the hunting process and carcass manipulation (inadequate evisceration conditions and/or gut shots), or directly from ingestion of contaminated meat (Türk, 2008; Vieira-Pinto et al., 2011).

Salmonella spp. is considered a multi-host pathogen with a long environmental persistence (Murray, 2000). Environmental contamination by salmonellae may differ significantly from one area to another, and wild animals may reflect the level of salmonellae contamination in their habitat (Gaffuri & Holmes, 2012; Millan et al., 2004). Consequently, the distribution of the infection and serotypes involved can be diverse within the same species in different locations (Gaffuri & Holmes, 2012), thus, wild animals are relevant to the epidemiology of salmonellosis because of their role as healthy carriers in a broad range of *Salmonella* serotypes (Zottola et al., 2013).

In contrast to the abundance of literature on the prevalence of *Salmonella* spp. in humans and in domestic pigs, data on the epidemiological distribution of *Salmonella* spp. in wild boars are very limited (Vieira-Pinto et al., 2011; Wacheck et al., 2010), in particular in Spain. Moreover, it has been recently described the presence of large groups of these animals in peri-urban and urban zones, feeding on the garbage (Gonzalez, 2017; Navarro-Gonzalez et al., 2013), with evident risks for human health. In addition, the sampling methodology differs between studies, remaining unclear

which organs presents the highest rates of contamination by *Salmonella* spp., especially in asymptomatic animals. Therefore, considering the importance of wild boars as a major game species in Spain, as well as their potential role in transmission of *Salmonella* spp. to humans and domestic and wild animal populations, the aims of this study were to determine the prevalence of *Salmonella* spp. in wild boars hunted in central-western Spain, the occurrence of this pathogen in tonsils, mandibular lymph nodes and faeces (as markers for transmission risk) and determine the phylogenetic relationships among isolated strains, in order to investigate the circulation pathways of bacteria among tissues, animals and estates.

2 | MATERIALS AND METHODS

2.1 | Sample collection

During five hunting seasons (periods from October to February), since 2010 until 2015, 148 hunted wild boars were sampled from 15 different estates in the central-western area of Spain. Samples of faeces (using colon swabs), submandibular lymph nodes and tonsils were systematically collected and analysed in the Infectious Diseases Unit of the Veterinary Clinic Hospital of the University of Extremadura in order to determine the presence of *Salmonella* spp. in those organs. In addition, samples from 893 wild boars submitted in the same period by a hunting management enterprise ('Ingulados' S.L.) to the Infectious Diseases Unit were included in the study. The latter consisted of 690 faecal samples (colon swabs), 267 lymph nodes and 66 tonsils collected in 21 additional estates. The 36 estates sampled are located in eight different geographic regions of the Iberian Peninsula, as shown in Figure 1.

2.2 | Isolation and identification of *Salmonella* spp

For submandibular lymph nodes and tonsils, the surface was decontaminated by searing. The isolation method was based on a pre-enrichment stage where colon swabs, or 1 g of tonsils/lymph nodes were incubated into sterile sampling bags with 10 ml of buffered peptone water (1/10 dilution in BPW according to ISO 6579:2002) at 37°C for 24 hr; thereafter, 0.1 ml was inoculated in enrichment broth (Rappaport-Vassiliadis) and kept at 42°C for 24 hr. Then, 10 µl of broth was inoculated onto two plates of selective media, Xylose Lysine Dioxycarbonate agar (XLD) and Xylose-Lysine-Tergitol 4 (XLT4). The plates were incubated for 48 hr at 37°C. Identification of suspicious colonies was performed in an automated bacterial identification device, Phoenix 100 (Becton Dickinson), and confirmed by detection of the *invA* gen by PCR (Hoorfar, Ahrens, & Rådström, 2000). Isolates resulting positive were sent to the Spain *Salmonella* National Reference Laboratory (Algete, Madrid, Spain) for Kauffman-White serotyping. Confidence intervals (CI) were calculated for each proportion following the Wald method (Brown, Cai, & DasGupta, 2001).

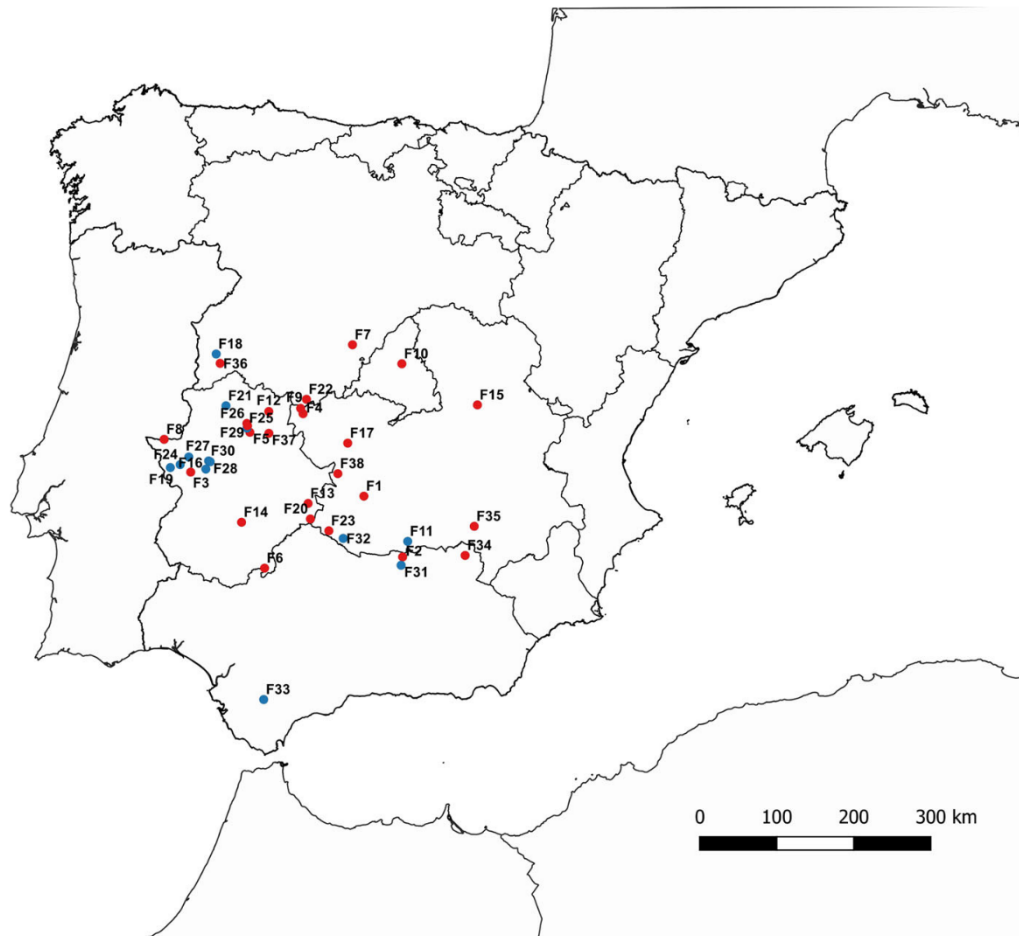


FIGURE 1 Location of the estates. Political map of the Iberian Peninsula locating the different estates sampled in this study. The red dots indicate estates with positive samples and the blue dots represent the estates where *Salmonella* was not detected [Colour figure can be viewed at wileyonlinelibrary.com]

2.3 | Phylogenetic analysis using pulsed-field gel electrophoresis (PFGE)

The determination of the genetic relationship between isolates was performed by PFGE (Chef-DR[®]III, BioRad[®]) following the PulseNet protocol (Ribot et al., 2006). The restriction enzyme used was *Xba*I and the pulse oscillated from 2.16 to 63.8 s for 21.5 hr. A *S. enterica* serotype Braenderup reference strain was used as control strain and was included in each gel to provide a global reference pattern. The different PFGE profiles (PFPs) were analysed by the InfoQuest FP Software (Version 4.5). The banding patterns were compared using Dice coefficients with a 1.5% band position tolerance.

3 | RESULTS

3.1 | Isolation of *Salmonella* from wild boars: sampling strategy

Salmonella spp. was isolated in 21 of the 36 hunting estates sampled (58.3%). A total of 1,467 samples from 1,041 wild boars were analysed by bacteriological culture. Samples comprised 838 faecal swabs, 415 submandibular lymph nodes (SLN) and 214 tonsils. Amongst them, 86 samples from 81 wild boars resulted positive for *Salmonella* spp. (5.9%–1.2% CI- of positive samples/7.7%–1.6% CI- of positive animals), being the tonsils the organs with the highest frequency of

isolates (40/214, 18.7%–5.2% CI-), followed by the lymph nodes (21/415, 5.1%–2.1% CI-) and the faecal samples (25/838, 2.9%–1.2% CI-).

The collection of all three types of samples from the same animal was carried out in 148 wild boars. In this group, the percentage of positive animals raised to 27.02%–7.2% CI-, as *Salmonella* spp. was detected in 40 of them. Regarding the sampling site, again the tonsils showed the highest number of isolates (31/148, 20.9%–6.6% CI-), followed by the SLN (12/148, 8.1%–4.4% CI-) and the faeces (2/148, 1.35%–1.9% CI-). None of these wild boars showed salmonellae in the three samples simultaneously, but in five cases these bacteria were isolated from the tonsils and SLN of the same animal. Except for one case, both samples (tonsils and SLN) from the same animal showed the same serotype. *Salmonella* spp. was detected in the faeces of just two animals from this group. The other samples of these two animals resulted negative.

3.2 | Serological characterization of salmonellae isolates from wild boars

The 86 *Salmonella* spp. isolates belonged to 34 different serovars classified into four different subspecies of *S. enterica*: *S. enterica* subsp. *enterica* ($n = 35$ strains, 40.7%–10.4% CI-, 16 serovars), *S. enterica* subsp. *diarizonae* ($n = 34$ strains, 39.5%–10.3% CI-, 11 serovars), *S. enterica* subsp. *salamae* ($n = 16$ strains, 18.6%–8.2% CI-, 6 serovars) and *S. enterica* subsp. *houtenae* ($n = 1$ strains, 1.2%–2.3% CI-, 1 serovars). In subsp. *enterica*, the predominant serovars were Enteritidis 9,12:g,m:- and Newport 6,8:e,h: 1,2 (five isolates in both cases); in subsp. *diarizonae* was 38:z10:z53 (nine isolates); and subsp. *salamae* was 4,12:b:- (six isolates). The serovar present in a greater number of estates was 48:i:z53 (five different estates) (Table 1).

3.3 | Genetic relationships among salmonellae isolated from wild boars

Pulsed-field gel electrophoresis was used to characterize 83 of the 86 *Salmonella* spp. recovered from wild boar. Two clusters could be distinguished with nearly 50% similarity, a cluster A, which has only two strains and showed the same profile (Sa48) and a major cluster, named B, which grouped the majority of the strains ($n = 81$) and 47 different PFGE profiles (PFPs), Sa1–Sa47. The cluster B could be divided in two subdivisions (B1 and B2), with different degrees of genetic diversity (Figure 2). B1 included eight isolates from different estates belonging to eight distinct serotypes and each one showing a different PFP (Sa1–Sa8), but being all them subsp. *enterica*, except one subsp. *houtenae*. Besides this, B2 revealed a clonal distribution of bacteria, with 75 isolates clustered in 39 PFPs (Sa9–Sa47). Thirteen of these clusters included between two and four closely linked isolates which matched identical serotype, estate and PFGE (Sa9, Sa13, Sa15, Sa16, Sa20, Sa21, Sa24, Sa32, Sa37, Sa40, Sa44, Sa45 and Sa46). However, B2 also presented evidences of clonal spread given that seven pulsotypes (Sa22, Sa23, Sa25, Sa35, Sa39, Sa41 and Sa47), included closely related isolates that came from different

estates, even from distant ones. In addition, isolates with the same serotype and a high genetic similarity (>80%) were detected in different estates with different pulsotypes (Sa13–Sa14, Sa26–Sa27, Sa33–Sa34, Sa42–Sa43).

4 | DISCUSSION

The results obtained in this study show a wide spread of *Salmonella* spp. in Spanish wild boars and highlight their potential role as carriers of this zoonotic agent. The prevalences of positive animals detected in this and previous studies in Spain are highly variable, although differences in detection techniques and geographical origin of animals and isolates might contribute to the differences observed.

The sampling strategy is known to have a major impact in the detection rate of salmonellae (Sanno et al., 2014; Wahlström et al., 2003). Besides the present work, where 2.9% of faecal samples from wild boars resulted positive for salmonellae, previous studies in the Iberian Peninsula reported highly variable prevalence values: 1.2% (Díaz-Sánchez et al., 2013), 5% (Dias et al., 2015), 22.1% (Vieira-Pinto et al., 2011) and 17.5%–35.6% (Navarro-Gonzalez et al., 2012). Great variability has been found in other European regions as Italy, with values of 10.8% (Zottola et al., 2013) and 24.8% (Chiari, Zanoni, Tagliabue, Lavazza, & Alborali, 2013). As described previously (Funk, Davies, & Nichols, 2000), the weight of the faecal sample processed substantially influences the sensitivity of the detection method, which might explain the lack of positive faecal samples in comparison with the rates of successful isolation of *Salmonella* spp. from lymph nodes or tonsils (Giorda et al., 2014; Wacheck et al., 2010). Similarly, the use of colon swabs in our study to determine the presence of salmonellae in faeces could have led to an underestimation of the prevalence. Moreover, it is known that salmonellae are not continuously excreted by the infected animals, excretion decreasing along time and becoming intermittent at the end, when the animal becomes an asymptomatic carrier (Beloil et al., 2003; Wood et al., 1989).

Although the faecal-oral route is considered the most frequent way of *Salmonella* spp. infection of swine, an alternative are the airways and the inhalation of aerosols or dust contaminated with salmonellae. By this route, they use the tonsils and the pulmonary macrophages as penetration sites (Fedorka-Cray, Kelley, Stabel, Gray, & Laufer, 1995), a kind of contagion that could be even more frequent than the faecal-oral one in intensive breeding farms and during the summer season, due to the dryness of the terrain (Baskerville & Dow, 1973; Baskerville, Dow, Curran, & Hanna, 1973). Tonsils are known to be the sites of multiplication for many microorganisms, including *Salmonella* spp. (Fedorka-Cray et al., 2000; Salles & Middleton, 2000), and the oral cavity has been recently reported as an organic location where *Salmonella* spp. can be isolated more frequently than from faeces (Van Damme, Mattheus, Bertrand, & De Zutter, 2018). As the lymphatic drainage of the oral cavity and tonsils pass through the submandibular lymph node (Horter, Yoon, & Zimmerman, 2003), we investigated the presence of salmonellae in

Subspecies/serotype	Estate	Faeces	L. Node	Tonsils
<i>S. enterica</i> subsp. <i>enterica</i>				
Enteriditis 9,12:g,m:-	F10-F26	3	1	1
Mikawasima 6,7 : y : e,n,z1	F12	1		
Typhimurium 4,12 : i : 1,2	F3-F17	2		
Typhimurium 1,4, 5, 12 : i : 1,2	F20			1
Thompson 6,7: k: 1,5	F14	1		
Hessarek 4, 12 : a : 1, 5	F4-F20	1		1
Choleraesuis: 6,7 : - : 1,5 var. Kunzendorf	F13-F14-F26	1	2	
Choleraesuis: 6,7 : c : 1,5	F4	2		
Muenchen 6,8 : d : 1,2	F23	1		
Newport 6,8:e,h: 1,2	F12-F4		1	4
Bardo 8: e,h:1,2	F12		1	2
Weilkade 16: 1v: 1,7	F20		2	1
Brandenburg 4,12:1,v: e,n,z15	F7		1	
Lille 6, 7:z38:-	F23-F26		2	1
Bredeney 4,12: 1,v:1,7	F3			1
Rissen 6,7:f,g:-	F7			1
<i>S. enterica</i> subsp. <i>salamanae</i>				
50:b:z6	F8	2		
42:b:e,n,x,z15	F22		2	1
4,12:b:-	F1-F2-F23	2		4
4,12,27: g,s,t:-	F4-F22	1		1
13,23:z29:e,n,x	F4	2		
13,22: k:-	F22			1
<i>S. enterica</i> subsp. <i>houtanae</i>				
45:z4,z23:-	F9	1		
<i>S. enterica</i> subsp. <i>diarizonae</i>				
38:z10:z53	F10-F4-F3	4	1	4
48: k: 1,5,7	F9-F12-F15	1	1	3
48:i:z53 p	F5-F29-F14-F17-F4		2	3
16: 1,v: 1,5,7	F4-F12		1	1
48:i:z	F9		1	
47:1,v:z53	F35-F9-F5-F4		2	3
61:k:1,5,7	F12		1	2
35:r:z35	F15			1
48: z10: e, n,x,z15	F4			1
50:z52:1,5,7	F36			1
61: 1,v:1,5,7	F4			1

TABLE 1 Serotypes isolated in the study and its origin

this location, obtaining rates of approximately one-third of the prevalence found in tonsils (5.9% vs. 17%). This fact represents the first description of *Salmonella* spp. isolation from mandibular lymph nodes of wild boars, and is similar to previous reports in this species for mesenteric lymph nodes (Gómez-Laguna et al., 2011). Regarding tonsils, our study analyses for the first time the presence of *Salmonella* spp. in this tissue in Spanish wild boars. The percentage of positive samples obtained was higher than those reported in the only two articles published before, regarding wild boars from

Switzerland and Sweden, 5.2% (Wacheck et al., 2010) and 2.9% (Sanno et al., 2014) respectively. These results highlight the importance of tonsils and mandibular lymph nodes in the study of the prevalence of *Salmonella* spp. in wild boars, as faeces may lead to an underestimation of the number of carriers. In the same line, these tissues should be discarded during the slaughtering process in order to prevent the contamination of the carcasses as it has been proposed in swine (Van Damme et al., 2018; Vieira-Pinto, Tenreiro, Arahna, & Martins, 2012).

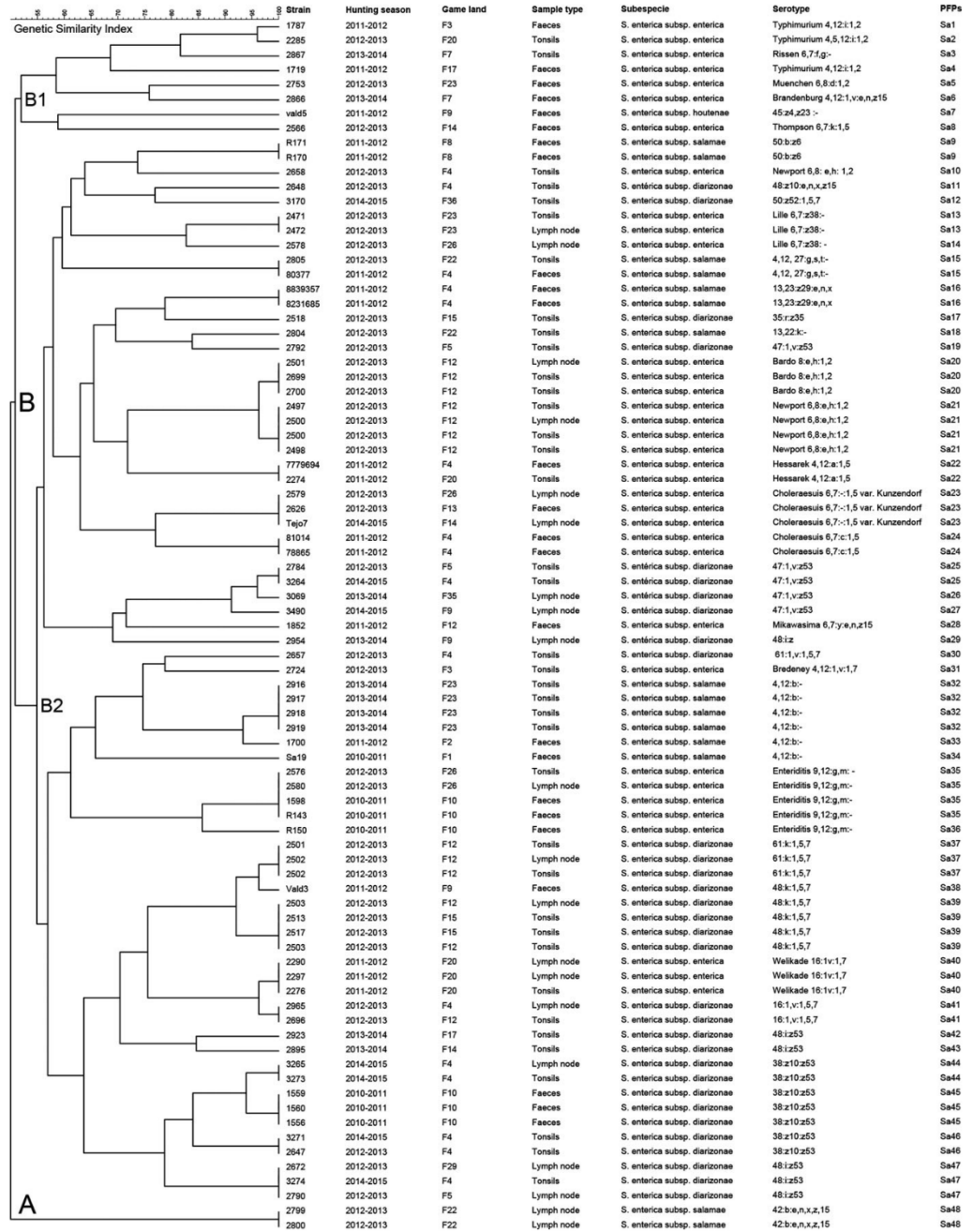


FIGURE 2 Genetic relationship between isolates. Phylogenetic relationship among 83 isolates of *Salmonella* spp. obtained in the study, listed with additional information about the date and place of the isolate, the sample type, serotype and pulstotype. Dendrogram shows 47 different profiles (Sa1-Sa47) further clustered in groups A and B. Cluster B is divided into B1 and B2 subgroups

Several detection techniques could be applied to determine the presence of salmonellae in organic samples. Differences of sensitivity between methods determine their ability to detect positive samples and, therefore, could also contribute to the variability observed in the prevalence of *Salmonella* spp. infection in wild boars. Among the techniques, PCR has been claimed to be the most sensitive in detecting salmonellae in swine samples (Sanno et al., 2014; Vieira-Pinto, Oliveira, Bernardo, & Martins, 2007; Wacheck et al., 2010), although one article reports better results for culture methods in experimentally infected samples (Eriksson & Aspan, 2007). Better results of PCR-based methods could rely on the existence of certain serotypes difficult to culture, but also on the possibility of false positives due to non-viable bacteria (Eriksson & Aspan, 2007).

The characterisation of the 86 isolates obtained in this investigation showed 34 different serovars belonging to four subspecies of *Salmonella* spp. This variability is higher than the observed in pig farms or slaughterhouses (Arguello, Carvajal, Collazos, García-Feliz, & Rubio, 2012; García-Feliz et al., 2007; Gómez-Laguna et al., 2011; Mejía, Casal, Sánchez, Martín, & Mateu, 2006; Sánchez-Rodríguez et al., 2018) and could be attributed to the omnivore feeding habits of wild boars which could consume small animals carrying salmonellae or contaminated carcasses (Gaffuri & Holmes, 2012; Millan et al., 2004). *S. enterica* subsp. *enterica* was the most frequent in our samples, which is consistent with the EFSA reports, that considers this subspecies the most widespread in mammals, food and the environment (EFSA, 2017). Traditionally, *Salmonella* spp. in wildlife has been associated with the serovar Typhimurium, but nowadays the spectrum of serovars isolated is much more diversified (Paulsen, Smulders, & Hilbert, 2012). This is also in accordance with our results, as none of the 16 serovars isolated was predominant. Enteritidis 9,12:g,m:-, Newport 6,8:e,h:1,2 and Choleraesuis resulted the most common, with similar prevalences, around 14%. These serovars are of great importance, as the EFSA describes *S. Enteritidis* as the most frequently identified serovar in European human salmonellosis cases in 2016, and *S. Newport* as the fifth most commonly reported (EFSA, 2017). In the case of *S. Choleraesuis*, although it is rarely detected in pigs from Western Europe (Fedorka-Cray et al., 2000), it is becoming more frequent in European wild boar outbreaks nowadays (Conedera et al., 2014; Gil Molino et al., 2019; Methner, Heller, & Bocklisch, 2010; Perez et al., 1999).

Most of the previous literature determined that the prevailing subspecies of *Salmonella* spp. in wild boars was *S. enterica* subsp. *enterica* (Chiari et al., 2013; Magnino et al., 2011; Sanno et al., 2014). This was not the case in our results, as the group of 'non-enterica' subspecies represented the 59% of the isolates. These subspecies are usually found in cold-blooded animals and the main route of transmission to other animals is the consumption of their meat or the use of these animals as pets in the case of humans (Lamas et al., 2018). However, some serotypes from these subspecies, specially *arizonae*, *diarizonae* and *salamanae*, are also adapted to warm-blooded animals, either wild mammals and birds or domestic animals (Bonke et al., 2012; Botti et al., 2013; Chiari et al., 2013; Evangelopoulou, Kritas, Govaris, & Burriel, 2014; Lamas et al., 2016). Two studies performed in Italy described similar results regarding the relative abundance of

subspecies found in wild boars. In Zottola et al. (2013) reported a prevalence of 'non-enterica' subspecies of 51.7%, with a 24% of *S. salamanae*, and in Giorda et al. (2014) found that subsp. *diarizonae* supposed 43.7% of the isolates, and the 'non-enterica' subspecies were predominant. In Spain, the only two studies published to date did not find any clear predominance of *Salmonella* spp. subspecies (Díaz-Sánchez et al., 2013; Navarro-Gonzalez et al., 2012).

In this study, the PFGE analysis revealed, in most cases, that strains pertaining to a certain serotype belonged to the same pulso-type, especially if they came from the same estate. However, when analysing strains from different estates, it was common to detect strains from the same serotype that belonged to different pulsotypes. This genetic variation between serotypes was previously described in pigs (Pedersen et al., 2015) and also by our group in wild boars (Gil Molino et al., 2019). The great diversity of serotypes and different genetic backgrounds found in the estates sampled in this study is striking. In contrast to most of the literature on pigs (Baloda, Christensen, & Trajcevska, 2001; Berends, Urlings, Snijders, & Van Knapen, 1996; Hurd, McKean, Wesley, & Karriker, 2001; Letellier, Messier, Pare, Menard, & Quessy, 1999), our data showed that the animals from the majority of the estates carried more than one serotype, reaching its maximum in F14, where 11 serotypes were detected. This fact is probably reflecting the free nature of the carrier animal and its habit of frequent moving for long distances (Andrzejewski & Jezierski, 1978; Casas-Díaz et al., 2013). In this way, the present study also shows the wide spread of *Salmonella* spp. clones associated with wild boars, increasing the potential risk of contamination with virulent and/or antimicrobial-resistant clones.

ACKNOWLEDGEMENTS

Dr. A. García was supported by contract TA13003 granted by Junta de Extremadura and the European Social Fund. Dr. D. Risco was supported by a Torres Quevedo Grant of the Ministerio de Economía y Competitividad of Spain (PTQ14-06663).

CONFLICT OF INTEREST

All the authors have read the manuscript and have approved this submission. All have made substantive contributions to this work. The authors report no conflicts of interest.

ORCID

Maria Gil Molino  <https://orcid.org/0000-0003-0797-3377>

Francisco Eduardo Martín Cano  <https://orcid.org/0000-0003-4971-4883>

REFERENCES

- Andrzejewski, R., & Jezierski, W. (1978). Management of a wild boar population and its effects on commercial land. *Acta Theriologica*, 23, 309–339.

- Arguello, H., Carvajal, A., Collazos, J. A., García-Feliz, C., & Rubio, P. (2012). Prevalence and serovars of *Salmonella enterica* on pig carcasses, slaughtered pigs and the environment of four Spanish slaughterhouses. *Food Research International*, 45, 905–912.
- Baloda, S. B., Christensen, L., & Trajcevska, S. (2001). Persistence of a *Salmonella enterica* serovar typhimurium DT12 clone in a piggery and in agricultural soil amended with *Salmonella*-contaminated slurry. *Applied and Environmental Microbiology*, 67, 2859–2862.
- Baskerville, A., & Dow, C. (1973). Pathology of experimental pneumonia in pigs produced by *Salmonella cholerae-suis*. *Journal of Comparative Pathology*, 83, 207–215.
- Baskerville, A., Dow, C., Curran, W. L., & Hanna, J. (1973). Further studies on experimental bacterial pneumonia: Ultrastructural changes produced in the lungs by *Salmonella cholerae-suis*. *British Journal of Experimental Pathology*, 54, 90–98.
- Beloeil, P., Chauvin, C., Proux, K., Rose, N., Queguiner, S., Eveno, E., ... Madec, F. (2003). Longitudinal serological responses to *Salmonella enterica* of growing pigs in a subclinically infected herd. *Preventive Veterinary Medicine*, 60, 207–226.
- Berends, B. R., Urlings, H. A. P., Sniijders, J. M. A., & Van Knapen, F. (1996). Identification and quantification of risk factors in animal management and transport regarding *Salmonella* spp. in pigs. *International Journal of Food and Microbiology*, 30, 37–53.
- Bonke, R., Wacheck, S., Bumann, C., Thum, C., Stüber, E., König, M., ... Fredriksson-Ahomaa, M. (2012). High prevalence of *Salmonella enterica* subsp. *diarizonae* in tonsils of sheep at slaughter. *Food Research International*, 45, 880–884.
- Botti, V., Navillod, F. V., Domenis, L., Orusa, R., Pepe, E., Robetto, S., & Guidetti, C. (2013). *Salmonella* spp. and antibiotic-resistant strains in wild mammals and birds in north-western Italy from 2002 to 2010. *Veterinaria Italiana*, 49, 195–202.
- Boyen, F., Pasmans, F., Van Immerseel, F., Morgan, E., Adriaensen, C., Hernalsteens, J.-P., ... Haesebrouck, F. (2006). *Salmonella* Typhimurium SPI-1 genes promote intestinal but not tonsillar colonization in pigs. *Microbes and Infection*, 8, 2899–2907.
- Brown, L. D., Cai, T. T., & DasGupta, A. (2001). Interval estimation for a binomial proportion. *Statistical Science*, 16(2), 101–117.
- Casas-Díaz, E., Ciosa-Sebastià, F., Peris, A., Miño, A., Torrentó, J., Casanovas, R., ... Serrano, E. (2013). Recorded dispersal of wild boar (*Sus scrofa*) in Northeast Spain: Implications for disease-monitoring programs. *Wildlife Biology in Practice*, 9(3), 19–26. <https://doi.org/10.2461/wbp.2013.ibeun.3>
- Chiari, M., Zanoni, M., Tagliabue, S., Lavazza, A., & Alborali, L. G. (2013). *Salmonella* serotypes in wild boars (*Sus scrofa*) hunted in northern Italy. *Acta Veterinaria Scandinavica*, 55, 1751–1757.
- Conedera, G., Ustulín, M., Barco, L., Bregoli, M., Re, E., & Vio, D. (2014). Outbreak of atypical *Salmonella* Choleraesuis in wild boar in North Eastern Italy. In: P. Paulsen, A. Bauer, & F. J. M. S (Eds.), *Trends in game meat hygiene* (pp. 151–159). Wageningen, The Netherlands: Wageningen Academic Publishers.
- Dias, D., Torres, R. T., Kronvall, G., Fonseca, C., Mendo, S., & Caetano, T. (2015). Assessment of antibiotic resistance of *Escherichia coli* isolates and screening of *Salmonella* spp. in wild ungulates from Portugal. *Research in Microbiology*, 166, 584–593.
- Díaz-Sánchez, S., Sánchez, S., Herrera-León, S., Porrero, C., Blanco, J., Dahbi, G., ... Hanning, I. (2013). Prevalence of Shiga toxin-producing *Escherichia coli*, *Salmonella* spp. and *Campylobacter* spp. in large game animals intended for consumption: Relationship with management practices and livestock influence. *Veterinary Microbiology*, 163, 274–281.
- EFSA. (2017). The European Union summary report on trends and sources of zoonoses, zoonotic agents and food-borne outbreaks in 2016. Control. E.F.S.A.a.E.C.f.D.P.a., ed.
- 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.
- Euden, P. R. (1990). *Salmonella* isolates from wild animals in Cornwall. *British Veterinary Journal*, 146, 228–232.
- Evangelopoulou, G., Kritas, S., Govaris, A., & Burriel, A. R. (2014). Pork meat as a potential source of *Salmonella enterica* subsp. *arizonae* infection in humans. *Journal of Clinical Microbiology*, 52, 741–744.
- Fedoroka-Cray, P. J., Gray, J. T., & Wray, C. (2000). *Salmonella* infections in pigs. In: C. Wray & A. Wray. (Eds.), *Salmonella in domestic animals* (pp. 191–207). CABI, London.
- Fedoroka-Cray, P. J., Kelley, L. C., Stabel, T. J., Gray, J. T., & Laufer, J. A. (1995). Alternate routes of invasion may affect pathogenesis of *Salmonella typhimurium* in swine. *Infection and Immunity*, 63, 2658–2664.
- Funk, J. A., Davies, P. R., & Nichols, M. A. (2000). The effect of fecal sample weight on detection of *Salmonella enterica* in swine feces. *Journal of Veterinary Diagnostic Investigation*, 12, 412–418.
- Gaffuri, A., & Holmes, J. P. (2012). *Salmonella* infections. In: D. Gavier-Widén, J. P. Duff & A. Meredith (Eds.), *Infectious Diseases of Wild Mammals and Bird in Europe* (pp. 398–407). Wiley-Blackwell, UK.
- García-Feliz, C., Collazos, J., Carvajal, A., Vidal, A., Aladuena, A., Ramiro, R., ... Rubio, P. (2007). *Salmonella enterica* infections in Spanish swine fattening units. *Zoonoses and Public Health*, 54, 294–300.
- Gil Molino, M., Risco Perez, D., Goncalves Blanco, P., Fernandez Llarío, P., Quesada Molina, A., García Sanchez, A., ... Rey Perez, J. (2019). Outbreaks of antimicrobial resistant *Salmonella* Choleraesuis in wild boars piglets from central-western Spain. *Transbound and Emerging Diseases*, 66(1), 225–233. <https://doi.org/10.1111/tbed.13003>
- Giorda, F., Zoppi, S., Mignone, V., Grattarola, C., Dondo, A., & Tittarelli, C. (2014). *Salmonella* infections in wild animals in Western Liguria. In: P. Paulsen, A. Bauer and F. J. M. Smulders (Eds.), *Trends in game meat hygiene: from forest to fork* (pp. 161–168). Wageningen, The Netherlands: Wageningen Academic Publishers.
- Gómez-Laguna, J., Hernández, M., Creus, E., Echeíta, A., Otal, J., Herrera-León, S., & Astorga, R. J. (2011). Prevalence and antimicrobial susceptibility of *Salmonella* infections in free-range pigs. *The Veterinary Journal*, 190, 176–178.
- Gonzalez, F. (2017). Los jabalíes destronan parques en Residencial Universidad y Vistahermosa. (Diario HOY de Extremadura (Badajoz, Spain)).
- Hoorfar, J., Ahrens, P., & Rådström, P. (2000). Automated 5' nuclease PCR assay for identification of *Salmonella enterica*. *Journal of Clinical Microbiology*, 38, 3429–3435.
- Horter, D. C., Yoon, K.-J., & Zimmerman, J. J. (2003). A review of porcine tonsils in immunity and disease. *Animal Health Research Reviews*, 4, 143–155.
- Hurd, H. S., McKean, J. D., Wesley, I. V., & Karriker, L. A. (2001). The effect of lairage on *Salmonella* isolation from market swine. *Journal of Food Protection*, 64, 939–944.
- Lamas, A., Fernandez-No, I., Miranda, J., Vázquez, B., Cepeda, A., & Franco, C. (2016). Prevalence, molecular characterization and antimicrobial resistance of *Salmonella* serovars isolated from north-western Spanish broiler flocks (2011–2015). *Poultry Science*, 95, 2097–2105.
- Lamas, A., Miranda, J. M., Regal, P., Vázquez, B., Franco, C. M., & Cepeda, A. (2018). A comprehensive review of non-enterica subspecies of *Salmonella enterica*. *Microbiological Research*, 206, 60–73.
- Letellier, A., Messier, S., Pare, J., Menard, J., & Quessy, S. (1999). Distribution of *Salmonella* in swine herds in Quebec. *Veterinary Microbiology*, 67, 299–306.
- Magnino, S., Frasnelli, M., Fabbri, M., Bianchi, A., Zanoni, M.G., Meriardi, G., ... Gaffuri, A. (2011). The monitoring of selected zoonotic diseases of wildlife in Lombardy and Emilia-Romagna, northern Italy. In: P. Paulsen, B. A. M. Vodnansky, R. Winkelmayr & F. J. M. Smulders (Eds.), *Game meat hygiene in focus: Microbiology, epidemiology, risk analysis and quality assurance* (pp. 223–244). Wageningen, The Netherlands: Wageningen Academic Publishers.
- Mejía, W., Casal, J., Sánchez, G. J., Martín, M., & Mateu, E. (2006). Epidemiology of salmonella infections in pig units and antimicrobial

- susceptibility profiles of the strains of salmonella species isolated. *Veterinary Record*, 159, 271–276.
- Methner, U., Heller, M., & Bocklisch, H. (2010). Salmonella enterica sub-species enterica serovar Choleraesuis in a wild boar population in Germany. *European Journal of Wildlife Research*, 56, 493–502.
- Millan, J., Aduriz, G., Moreno, B., Juste, R. A., & Barral, M. (2004). Salmonella isolates from wild birds and mammals in the Basque Country (Spain). *Revue Scientifique et Technique*, 23, 905–911.
- Murray, C. J. (2000). Environmental aspects of Salmonella. In C. W. A. Wray (Ed.), *Salmonella in Domestic Animals* (pp. 265–284). Wallingford, Oxford: CAB International.
- Navarro-Gonzalez, N., Casas-Díaz, E., Porrero, C. M., Mateos, A., Domínguez, L., Lavín, S., & Serrano, E. (2013). Food-borne zoonotic pathogens and antimicrobial resistance of indicator bacteria in urban wild boars in Barcelona, Spain. *Veterinary Microbiology*, 167, 686–689.
- Navarro-Gonzalez, N., Mentaberre, G., Porrero, C. M., Serrano, E., Mateos, A., López-Martín, J. M., ... Domínguez, L. (2012). Effect of cattle on Salmonella carriage, diversity and antimicrobial resistance in free-ranging wild boar (*Sus scrofa*) in northeastern Spain. *PLoS ONE*, 7, e51614.
- Paulsen, P., Smulders, F. J. M., & Hilbert, F. (2012). Salmonella in meat from hunted game: A Central European perspective. *Food Research International* 45, 609–616.
- Pedersen, K., Sørensen, G., Löfström, C., Leekitcharoenphon, P., Nielsen, B., Wingstrand, A., ... Baggesen, D. L. (2015). Reappearance of Salmonella serovar Choleraesuis var. Kunzendorf in Danish pig herds. *Veterinary Microbiology*, 176, 282–291.
- Perez, J., Astorga, R., Carrasco, L., Mendez, A., Perea, A., & Sierra, M. (1999). Outbreak of salmonellosis in farmed European wild boars (*Sus scrofa ferus*). *Veterinary Record* 145, 464–465.
- Ribot, E. M., Fair, M., Gautom, R., Cameron, D., Hunter, S., Swaminathan, B., & Barrett, T. J. (2006). Standardization of pulsed-field gel electrophoresis protocols for the subtyping of *Escherichia coli* O157:H7, *Salmonella*, and *Shigella* for PulseNet. *Foodborne Pathogens & Disease*, 3, 59–67.
- Salles, M., & Middleton, D. (2000). Lymphocyte subsets in porcine tonsillar crypt epithelium. *Veterinary Immunology and Immunopathology*, 77, 133–144.
- Sánchez-Rodríguez, J. A., Navas, L., Vinueza, F. M., Castells, C., Martínez, M. A., López, A., ... Cabrera-Vique, C. (2018). New insights on the risk factors associated with the presence of Salmonella on pig carcasses. Lessons from small slaughterhouses. *Food Control*, 87, 46–52.
- Sanno, A., Aspan, A., Hestvik, G., & Jacobson, M. (2014). Presence of Salmonella spp., *Yersinia enterocolitica*, *Yersinia pseudotuberculosis* and *Escherichia coli* O157:H7 in wild boars. *Epidemiology and Infection*, 142, 2542–2547.
- Türk, N. (2008). Sensory and microbiological examinations for an evaluation of game meat. Thesis. Hannover: University of Veterinary Medicine (in German).
- Van Damme, I., Mattheus, W., Bertrand, S., & De Zutter, L. (2018). Quantification of hygiene indicators and Salmonella in the tonsils, oral cavity and rectal content samples of pigs during slaughter. *Food Microbiology*, 71, 120–128.
- Vieira-Pinto, M., Morais, L., Caleja, C., Themudo, P., Aranha, J., Torres, C., ... Martins, C. (2011). Salmonella spp. wild boar (*Sus scrofa*): A public and animal health concern. In: P. Paulsen, B. A., M. Vodnansky, R. Winkelmayr & F. J. M. Smulders (Eds.), *Game meat hygiene in focus* (pp. 131–136). The Netherlands: Wageningen Academic Publishers.
- Vieira-Pinto, M., Oliveira, M., Bernardo, F., & Martins, C. (2007). Rapid detection of Salmonella sp. in pork samples using fluorescent in situ hybridization: A comparison with VIDAS[®]-SLM system and ISO 6579 cultural method. *Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia* 59, 1388–1393.
- Vieira-Pinto, M., Tenreiro, R., Aranha, J., & Martins, C. (2012). Relationship between tonsils and mandibular lymph nodes concerning Salmonella sp. infection. *Food Research International*, 45, 863–866.
- Wacheck, S., Fredriksson-Ahomaa, M., König, M., Stolle, A., & Stephan, R. (2010). Wild boars as an important reservoir for foodborne pathogens. *Foodborne Pathog Diseases*, 7, 307–312.
- Wahlström, H., Tysén, E., Olsson Engvall, E., Brändström, B., Eriksson, E., Mörrer, T., & Vågsholm, I. (2003). Survey of Campylobacter species, VTEC O157 and Salmonella species in Swedish wildlife. *Veterinary Record*, 153, 74–80.
- Wood, R. L., Pospischil, A., & Rose, R. (1989). Distribution of persistent Salmonella typhimurium infection in internal organs of swine. *American Journal of Veterinary Research*, 50, 1015–1021.
- Zottola, T., Montagnaro, S., Magnapera, C., Sasso, S., De Martino, L., Bragagnolo, A., ... Iovane, G. (2013). Prevalence and antimicrobial susceptibility of Salmonella in European wild boar (< i> Sus scrofa< /i>); Latium Region-Italy. *Comparative Immunology, Microbiology and Infectious Diseases*, 36, 161–168.

How to cite this article: Gil Molino M, García Sánchez A, Risco Pérez D, et al. Prevalence of *Salmonella* spp. in tonsils, mandibular lymph nodes and faeces of wild boar from Spain and genetic relationship between isolates. *Transbound Emerg Dis*. 2019;66:1218–1226. <https://doi.org/10.1111/tbed.13140>

5.2. Estudio de brotes de *Salmonella Choleraesuis* resistente a los antibióticos en jabatos de la zona centro-oeste de España.

Publicado en: *Transboundary and emerging diseases*. 2019;66(1):225-33. *Outbreaks of antimicrobial resistant Salmonella Choleraesuis in wild boars piglets from central-western Spain*.

Salmonella enterica serovar *Choleraesuis* afecta tanto al cerdo doméstico como al jabalí, provocando una salmonelosis clínica. La producción del cerdo Ibérico se basa en un sistema de producción en libertad, por lo que estos animales y el jabalí comparten ecosistemas. Este estudio se centra en el impacto negativo que tiene este serotipo de *Salmonella* sobre la producción porcina y su papel en la propagación de resistencias antimicrobianas (RAM) en un entorno de elevado potencial zoonótico. Para ello se analizaron 20 aislados de *S. Choleraesuis*, procedentes de 12 cerdos Ibéricos y 8 jabalíes pertenecientes a 6 y 8 fincas, respectivamente. Estos aislados se obtuvieron a partir de cultivos microbiológicos de diferentes órganos tras la correspondiente necropsia, y la confirmación de serotipo se realizó a través de una PCR específica basada en la detección del gen *fljC*. Por otro lado, para conocer la susceptibilidad frente a los antimicrobianos se realizaron antibiogramas de todas las cepas y además se realizó la detección por PCR de diferentes genes que pudieran ser los determinantes de las resistencias encontradas. Por último, la relación clonal entre los aislados se obtuvo mediante macrorestricción genómica y PFGE, mientras que la digestión con la nucleasa S1 y PFGE se utilizaron para conocer la variedad y tamaño de los plásmidos presentes en las cepas analizadas, incluyendo la hibridación Southern para la detección específica de un elemento conteniendo el gen *mcr-1*.

Los resultados mostraron que en el serotipo analizado, el 95% de los aislados fueron resistentes al menos a un antimicrobiano y el 65% mostró MR (multirresistencia, definida como resistencia a 4 o más antimicrobianos). La mayor incidencia de RAM se registró en los aislamientos de cerdo Ibérico, predominando la resistencia frente a β -lactámicos y sulfonamidas, a diferencia del jabalí, en cuyos aislamientos predominó la resistencia frente a aminoglucósidos, tetraciclinas y sulfonamidas. Los fenotipos de la RAM identificados presentaron una buena correlación con los determinantes genéticos predominantes encontrados en cerdos y jabalíes, *bla_{TEM}* y *tetA*, respectivamente. Por otro

lado, las cepas de ambos tipos de suidos presentaron susceptibilidad frente a quinolonas, cefalosporinas y colistina, con la única excepción de un aislado de cerdo, asociado a la presencia del gen *mcr-1*. En general se observó una gran diversidad de patrones de resistencia, incluso dentro de la misma especie hospedadora.


El análisis filogenético reveló 7 perfiles diferentes, agrupados en dos clústeres principales y con similitudes superiores al 75%. En clúster A, englobando la mayoría de los aislados, se observa la circulación de los mismos clones entre aislados de jabalíes y cerdos, así como clones idénticos entre animales de la misma especie hospedadora pero procedentes de diferentes fincas. Es remarcable la persistencia de estos clones a lo largo del tiempo, ya que algunas de estas cepas se han aislado en un periodo de 3-5 años. Sin embargo, lo que si hemos observado es que dentro de un mismo pulsotipo hay variabilidad en los patrones de resistencia frente a los antimicrobianos.

La técnica S1-PFGE evidenció que 19 cepas portan al menos un plásmido, incluyendo 5 aislados con varios simultáneamente. Un tamaño aproximado de 50 kb fue el más frecuente (75%), no estando asociado a ninguno de los determinantes de resistencia identificados. Distintos megaplásmidos, de un tamaño comprendido entre 100 y 300 kb, se detectaron en cepas que expresan MR. En general se observó una fuerte asociación entre el pulsotipo de las cepas y su contenido plasmídico, indicando una escasa movilidad horizontal de estos elementos. Debido a su mayor relevancia clínica, se realizó la localización del plásmido para el gen *mcr-1* que confiere resistencia a la colistina y que ha sido identificado en este estudio por primera vez en *S. Choleraesuis* en un aislado de porcino.


Received: 5 March 2018 | Revised: 24 July 2018 | Accepted: 15 August 2018

DOI: 10.1111/tbed.13003

ORIGINAL ARTICLE

WILEY  Transboundary and Emerging Diseases

Outbreaks of antimicrobial resistant *Salmonella* Choleraesuis in wild boars piglets from central-western Spain

María Gil Molino¹  | David Risco Pérez² | Pilar Gonçalves Blanco² | Pedro Fernandez Llarío² | Alberto Quesada Molina^{3,4} | Alfredo García Sánchez⁵ | Jesús María Cuesta Gerveno⁶ | Luis Gómez Gordo⁶ | Francisco Eduardo Martín Cano⁷ | Remigio Pérez Martínez¹ | Elisa Varela Fernández¹ | Joaquín Rey Pérez¹

¹Facultad de Veterinaria, Unidad de Patología Infecciosa, Universidad de Extremadura, Cáceres, Spain

²Innovación en Gestión y Conservación de Ungulados S.L., Cáceres, Spain

³Facultad de Veterinaria, Departamento de Bioquímica, Biología Molecular y Genética, Universidad de Extremadura, Cáceres, Spain

⁴INBIO G+C, Universidad de Extremadura, Cáceres, Spain

⁵Área de Producción Animal, CICYTEX-La Orden, Badajoz, Spain

⁶Facultad de Veterinaria, Unidad de Anatomía Patológica, Universidad de Extremadura, Cáceres, Spain

⁷Facultad de Enfermería y Terapia Ocupacional, Departamento de Fisiología, Universidad de Extremadura, Cáceres, Spain

Correspondence

Gil Molino María, Facultad de Veterinaria, Unidad de Patología Infecciosa, Universidad de Extremadura, 10003, Spain.
Email: maglmo84@gmail.com

Funding information

Junta de Extremadura y Fondo Social Europeo, Grant/Award Number: TA13003; Ministerio de Economía y Competitividad, Grant/Award Number: PTQ14-06663

Abstract

Salmonella enterica serovar Choleraesuis is the aetiological agent of swine paratyphoid being a highly invasive zoonotic pathogen. Wild boar natural populations are experiencing a demographical expansion as well as some farms are breeding this species to release for hunting with management sometimes identical to that of domestic pigs, including supplementation, grouping, and antibiotic treatments. This situation increases the chance of contact between wild boars and livestock, and potentially induces stress, with different sanitary consequences. The present work aims to describe the clinical features of recent outbreaks caused by *S. Choleraesuis* in wild boar from central-western Spain, as well as the antimicrobial resistance and phylogenetic relationships of isolates involved. 28 strains of *S. Choleraesuis* were isolated from 28 different wild boars belonging to 10 different game states located in central western Spain and submitted to the Clinical Veterinary Hospital (CVH) of the University of Extremadura. Samples were taken from different organs and cultured according to the ISO 6579:2002 procedure. Suspicious colonies were identified by PCR and antimicrobial resistance was evaluated by disc diffusion susceptibility test and the presence of the main resistance genes as well as 18 plasmid replicons frequently found among the *Enterobacteriaceae* was verified by PCR. Pulsed field gel electrophoresis was applied to determine the genetic relationship between isolates. The outbreaks under study were characterized by high mortality (35%–84%) and a septicemic presentation. *S. Choleraesuis* was isolated from all the wild boars analysed, and 26 of the 28 isolates presented resistance to at least one antibiotic. The predominant resistances found were against sulphonamide, streptomycin, tetracycline, and doxycycline and *sul1*, *strA-strB*, and *tetA* were the most prevalent resistance genes among isolates. 10 strains carried FIIA, FIB+H/1 or FIIA+H/1 plasmids. PFGE classified the isolates into four different profiles, grouped into two clusters. This results show that prevention against *S. Choleraesuis* must be considered in the sanitary programs of the wild boar breeders.

KEYWORDS

antibiotic resistance, epidemiology, *Salmonella* Choleraesuis, wild boar

1 | INTRODUCTION

Salmonella Choleraesuis is an intracellular facultative pathogen highly adapted to its host, agent of swine paratyphoid with clinical features of enterocolitis and septicæmia (Reed, Olander, & Thacker, 1986). Although infections in humans are unusual, they can be particularly severe if when occur (Cherubin, 1980). During the 1950s and 1960s, *S. Choleraesuis* was the predominant serovar in pigs all over the world and although it is still very common in North America and Asia, it is rarely detected in Australia and Western Europe (Fedorka-Cray, Gray, & Wray, 2000). Most cases reported in Europe came from Estonia and Romania (EFSA, 2015).

However, despite the low prevalence in pigs, *S. Choleraesuis* is becoming more prevalent in wild boars from Europe, whose population has increased during the last decades (Massei et al., 2015). In some areas of south-central Spain, the management of the wild boars populations for hunting purposes, including feeding and sometimes estate fencing, increases the risk of occurrence and transmission of diseases (Gortázar, Acevedo, Ruiz-Fons, & Vicente, 2006). Regarding Salmonellosis, several outbreaks have been reported in Europe in recent years. For example, septicaemic processes, very similar to those described in pigs, were reported in Germany and Italy between the years 2006 and 2013 (Conedera et al., 2014; Methner, Heller, & Bocklisch, 2010).

It has been suggested that a variety of stressors, including the presence of viral disease, could trigger or exacerbate the clinical outbreaks of salmonellosis (Schwartz, 1991). Specifically, most of the studies confirmed the coinfection with the porcine reproductive and respiratory syndrome virus PRRSV (Wills et al., 2000) and the porcine coronavirus type 2 PCV2 (Ha, Jung, Kim, Choi, & Chae, 2005; Lipej et al., 2007; Schulze et al., 2003). However, little is known about how these stressors would affect the course of the disease in wild boars.

From a sanitary and public health perspective, wild boars can play a prominent role in the interplay between *Salmonella*, livestock and the human population (Hilbert, Smulders, Chopra-Dewasthaly, & Paulsen, 2012). The continuous growth experienced in game meat consumption and the growing wild boar population density, are helping to increase the chances of disease transmission. Furthermore, it has been shown that 44% of the *Salmonella* samples isolated from meat or veterinary sources carried resistance to at least one type of antibiotic (Foley & Lynne, 2008). This fact is of major importance, as it is assumed that humans and livestock may be sources for antimicrobial resistance in wildlife (Mentaberre et al., 2013; Navarro-Gonzalez et al., 2012).

Despite the above stated relevance, little is known about the epidemiology, symptoms, triggering factors (PCV2 & PRRS), or antibiotic resistance profile of *Salmonella* in wild boars. This work aims to describe the clinical features of recent outbreaks caused by *Salmonella* Choleraesuis in wild boars from south western Spain, as well as its antimicrobial resistance and phylogenetic relationships.

2 | MATERIALS AND METHODS

2.1 | Sample collection

Between 2010 and 2016, 28 strains of *S. Choleraesuis* were isolated from 28 different dead wild boars at the University of Extremadura Clinical Veterinary Hospital (CVH). Biological samples from these animals were sent to the CVH by a hunting management company (Ingulados S.L.). Whole carcasses of 16 of the 28 affected wild boars were received, whereas in the rest of cases only aseptically obtained samples were received, consisting of the main organs of the dead animals (lung, liver, spleen, kidney) and faecal samples, were received. All animals/samples, were stored at 4°C and sent to CVH within the first 24 hr until analysis.

2.2 | Game estates

Wild boars came from 10 different game estates located in the central western zone of the Iberian Peninsula (Figure 1). Most of them were fenced estates (6/10), characterized by a perimeter hunting fence to avoid the pass or scape of animals. Game estate managers generally use cereals or feed as supplements to the natural diet for their wild boars, mostly during the summer. Additionally, two estates were open, with no fences at all, which allow the animals to move freely, where no supplementation is provided. And finally, the remainder 2 (F1 and F10) are considered as "hunting farms". They are larger estates with effective perimetral and internal fencing. Internal fences isolate an area which serve as breeding centre, supplying wild boars for hunting in specific areas of the same estate or to be sold and transported for hunting in different ones. The managing system in those farms is semi-intensive, but there are several differences between them. F1 is a 15 Ha farm divided into three identical plots. Plot number one contains 40 females, aged 4. Plot number two contains eight males also aged 4, and the last plot contains the weaned piglets. The animals are vaccinated only against Aujeszky's disease, as this is the only compulsory vaccination for this type of farms. The water is chlorinated and available in drinking troughs, although there were also places where rainwater accumulates. In contrast, F10 farm is divided only into two plots; a small one of approximately 2 Ha and another of 10 Ha. The first plot contained a mixed group of 120 wild boar piglets aging from 2.5 to 6 months that had been previously captured from the bigger plot. After an adaptation period, all the animals ageing 1 year old were moved to the bigger plot. F10 managers did not implement any vaccination protocol and the water supply was not chlorinated in this farm.

A summary of the main characteristics of the different estates is shown in Table 1.

2.3 | Postmortem examination

A complete necropsy was carried out in all the carcasses received. Tissue samples from lungs, liver, spleen, kidneys, and intestine were collected for later histopathological examination. These samples were

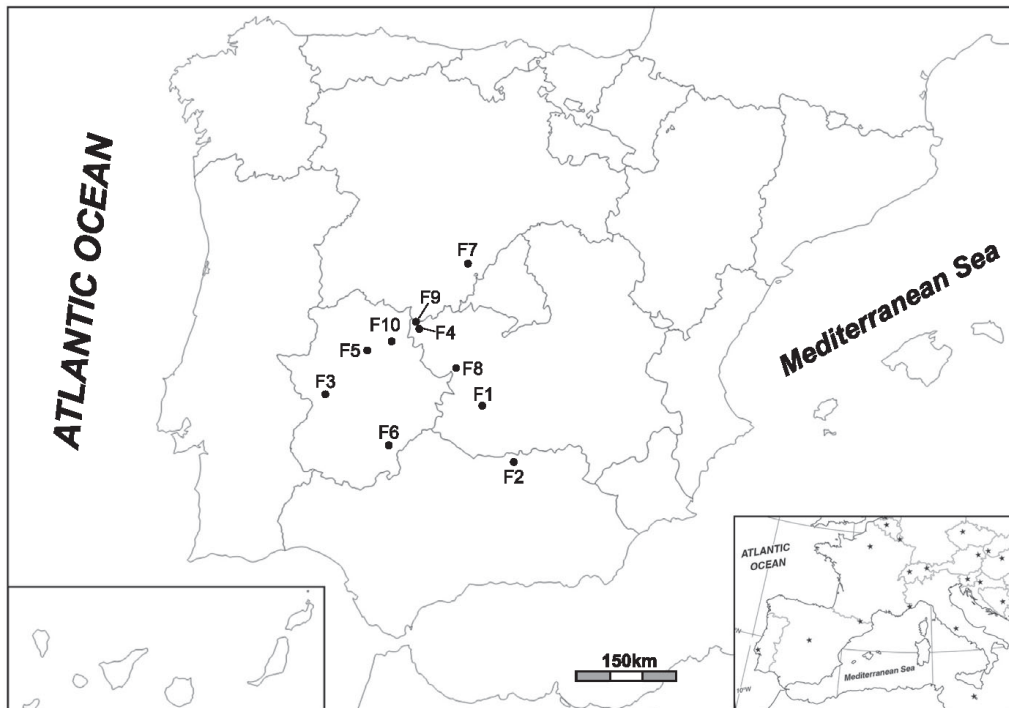


FIGURE 1 Location of the game estates. Political map of the Iberian Peninsula displaying the location of the different estates investigated in this study. (Inset: Location of the Iberian Peninsula in southwestern Europe)

fixed in 10% neutral buffered formalin and imbedded in paraffin. Tissue sections were cut at 4 μm , stained with H-E and examined under the microscope.

The age of the animals was determined by the tooth eruption and replacement pattern and also by dental attrition (Boitani & Mattei, 1992).

2.4 | Bacteriological culture and identification

All samples taken from the different organs (lungs, liver, kidneys, and spleen) were cultured on blood agar, McConkey agar, and xylose-lysine-desoxycholate agar (XLD) in aerobic conditions for 24 hr at 37°C. Faecal samples were pre-enriched with peptone water (18–24 hr/37°C), enriched in Rappaport-Vassiliadis *Salmonella* broth for 48 hr at 42°C, and later cultured in xilose-lysine-tergitol 4 (XLT4) and XLD for 48 hr. All procedures were carried out in accordance with ISO 6579:2002/Amd 1:2007 method for the detection of *Salmonella*.

Identification of compatible colonies was performed using the Phoenix 100 (Becton Dickinson) automated bacterial identification device and confirmed by detection of the *invA* gen by PCR (Hoorfar, Ahrens, & Rådström, 2000). PCR-confirmed isolates were sent to the National Reference Laboratory for *Salmonella* (Algete, Madrid, Spain) for Kauffman-White serotyping.

2.5 | Antimicrobial resistance, identification of antimicrobial resistance genes, and plasmid typing

The susceptibility testing method used was the antimicrobial disc diffusion susceptibility test in agar recommended by the Clinical and Laboratory Standards Institute (Cockerill, 2011) using 14 antimicrobials from different families which are routinely used in farms. The following discs (Bio-Rad[®]) were used: ampicillin (10 μg); cefoxitin (30 μg); ceftiofur (30 μg); gentamicin (10 μg); neomycin (30 μg); streptomycin (10 μg); tetracycline (30 μg); doxycycline (30 μg); enrofloxacin (5 μg); nalidixic Acid (30 μg); trimethoprim/sulphamethoxazole (23,75/1,25 μg); sulphonamide (200 μg); chloramphenicol (30 μg); colistin (50 μg). *Escherichia coli* ATCC 25922 was used as control strain.

The presence of antimicrobial resistance genes was verified by specific PCRs for genes *bla*-TEM, *bla*-OXA, *tet*(A), *tet*(B), *aadA*, *strA*, *strB*, and *sul1* (Aarestrup et al., 2003). Isolates were also examined for the presence of the 18 plasmid replicons frequently found among the *Enterobacteriaceae*, using three multiplex panels (Johnson et al., 2007). Positive controls used in the replicon typing procedure were kindly provided by Alessandra Carattoli (Istituto Superiore di Sanità, Rome, Italy).

Label	Handling system	Area (ha)	Density (Animals/100 ha)	Livestock presence (Cattle)	Outbreak date (No. animals studied)
F1	Game farm with open land *	15 [†]	826 [‡]	No	June 2010 (7) October 2010 (2)
F2	Open land	400	80	No	October 2010 (1)
F3	Fenced	600	40	Yes	May 2011 (1)
F4	Fenced	2000	40	No	July 2011 (2) November 2015 (1)
F5	Open land	1000	45	Yes	June 2012 (1)
F6	Fenced	700	100	No	July 2014(1)
F7	Fenced	550	90	No	July 2013 (1) July 2014 (2)
F8	Fenced	4500	18	No	March 2013 (1) November 2015 (1)
F9	Fenced	3000	25	No	June 2015 (1) June 2016 (1)
F10	Game farm with open land *	12 [†]	1000 [‡]	No	July 2015 (2) April 2016 (1) May 2016 (1) June 2016 (1)

[†]Fenced section of the estate occupied by the game farm. [‡]Animal density based only on the fenced surface occupied by the game farm.

TABLE 1 Game lands characteristics

2.6 | Phylogenetic analysis using pulsed-field gel electrophoresis (PFGE)

Determination of the genetic relationship between isolates was performed by macrorestriction with XbaI followed by PFGE (Chef-DR[®]III, BioRad[®]), according to the PulseNet protocol with pulse oscillated from 2.16 to 63.8 s for 21.5 hr (Ribot et al., 2006). The different PFGE profiles (PPFs) were analysed by InfoQuest FP Software (Version 4.5).

2.7 | Porcine circovirus type 2 (PCV-2) and Porcine Reproductive and Respiratory Syndrome Virus (PRRSV) analysis

Only 14 blood samples could be collected directly from heart cavities, preserved in refrigeration until centrifugation at 1500 g for 5 min. Serum obtained from each sample was stored at -20°C until use. To determine the presence of antibodies against PCV-2 and PRRSV, samples were analysed by commercial kits of enzymatic immunoassay technique (ELISA) (Ingezim Circovirus IgG/IgM and Ingezim PRRS Universal), following the manufacturer instructions (Ingenasa, Madrid, Spain).

3 | RESULTS

3.1 | Sample origin: outbreaks description

Farms F1 and F10 have a semi-intensive management system, which allows a close monitoring of the animals and almost daily checking of all individuals. The rest of the samples were collected in estates without that exhaustive control of the livestock, making impossible

to obtain accurate epidemiological data from those places. The age of the animals from those estates was estimated at around 2–5 months.

The outbreaks occurred in the estates F1 and F10. In F1, symptoms started 1 week after weaning, during June 2010, when a few wild boar piglets around 3 months-old from the common growing fence (Figure 2a) displayed anorexia and depression. Two days later, 15 wild piglets suddenly died with no symptoms and the rest were getting subsequently sick. The affected animals showed anorexia, depression, aqueous-greenish diarrhoea, walking difficulties, and finally prostration. The course of the infection in these animals lasted 2–3 days and, at the end, most of the diseased animals died, thus reaching a 100% morbidity with an 84.5% (68/76) mortality. The duration of this outbreak was approximately 2–3 weeks.

The outbreak in F10 occurred in July 2015, after the capture of 120 wild boar piglets ranging from 2.5 to 6 months of age. In this case, 32 animals died in the first 2 days (not showing previous clinical symptoms) and 10 more during the following week (displaying a profuse diarrhoea). The morbidity reached the 80% of the herd and the mortality was 35% (42/120).

3.2 | Pathological findings in wild boars

Externally, most carcasses showed distal cyanosis, especially in ears, legs, and lower part of the abdomen. All organs exhibited diffuse congestion (Figure 2b). The lungs presented pneumonic lesions affecting either the cranial or the apical lobes (Figure 2c). In the abdomen, the most common findings were hepatomegaly (Figure 2d) and splenomegaly, frequently accompanied by small white spots (≈ 2 mm) in the hepatic parenchyma. Renal petechial spots were also

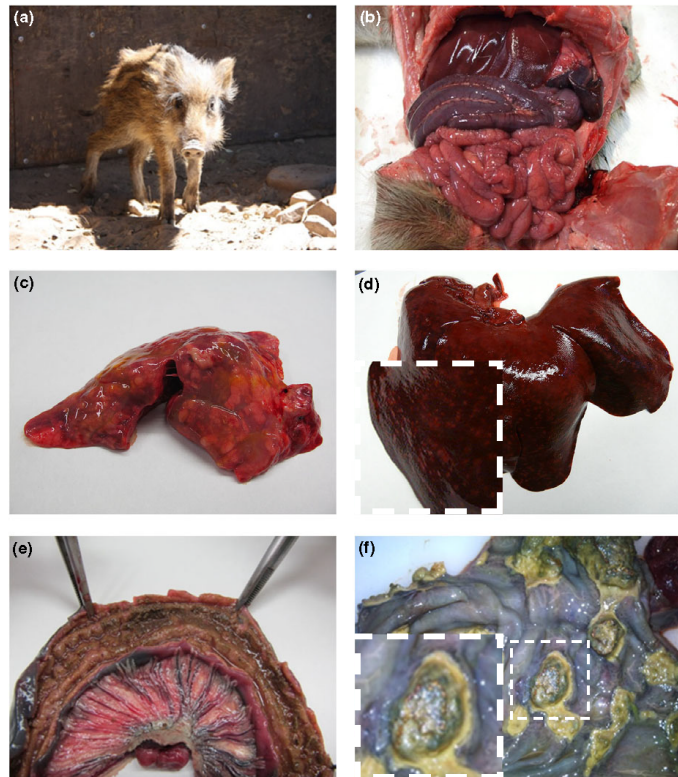


FIGURE 2 Clinical symptoms and pathological findings. (a) Wild boar piglet with poor corporal condition. (b) Intense congestion observed in the abdominal cavity from a wild boar piglet. (c) Congestive lung displaying multiple pneumonic lesions. (d) Liver showing hepatomegaly and congestion. *Inset:* Magnification of the border of the right medial hepatic lobe displaying white spots in the parenchima. (e) Longitudinally opened jejunum section revealing a thickened mucosa and a dark and gritty content. (f) Colonic mucosa with multiple ulcers. *Inset:* Magnification of one of the colonic ulcers [Colour figure can be viewed at wileyonlinelibrary.com]

observed in some animals. Regarding the intestine, the most frequent lesion was a mesenteric lymphadenitis as well as a congestion of the mesenteric vessels (Figure 2e). Enteritis and colitis were found in some animals. The jejunum and ileum from those animals showed a thickened mucosa covered by a brown fibrinous membrane (Figure 2e) and two of them presented well-defined rounded ulcers in colon and caecum (Figure 2f). The intestinal content was dark and gritty in most of the specimens.

Microscopically, an interstitial pneumonia was observed in the lung, together with oedema and congestion. The liver displayed interstitial nonpurulent hepatitis, with areas of cellular necrosis all over the hepatic parenchyma. In the spleen an increase in the white pulp was observed and the kidneys showed congestion with tubulonephrosis and interstitial nephritis.

3.3 | Isolation and characterization of *S. Choleraesuis*

A septicæmic process was detected in all animals under study. The bacterial analysis performed to the samples showed that only 4 of 28 animals (14.2%) were also excreting salmonella when they died,

as the samples taken from the intestine of those animals resulted positive.

Every one of the 28 bacterial strains, isolated from different animals, were classified as *S. enterica* subsp. *enterica* and their biochemical profiles and antigenic formulae were consistent with *S. Choleraesuis*, although more than a half (16/28) lacked the first flagellar antigen. The Kunzendorf variant was detected in 22 isolates, six presenting both flagellar antigens (Figure 3).

According to clinical breakpoints, 26 of the 28 strains were resistant to at least one antibiotic. Amongst these, 11 isolates showed resistance to 3–5 antibiotics and could be considered multiresistant. Regarding antimicrobial groups, predominant resistances are found against sulphonamide ($n = 22$), streptomycin ($n = 18$), tetracycline ($n = 12$), and doxycycline ($n = 10$). Finally, there were also two resistant strains against nalidixic acid and three with a single resistance, to ampicillin, neomicyn, and trimethoprim-sulfamethoxazole, respectively (Figure 3). All isolates were susceptible to ceftiofur, ceftioxitin, gentamicin, enrofloxacin, chloramphenicol, and colistin. *su11*, *strA-strB*, and *tetA* genes encoding antimicrobial resistance against sulphonamide, streptomycin, and tetracycline, respectively, were highly prevalent amongst isolates and closely linked to their corresponding

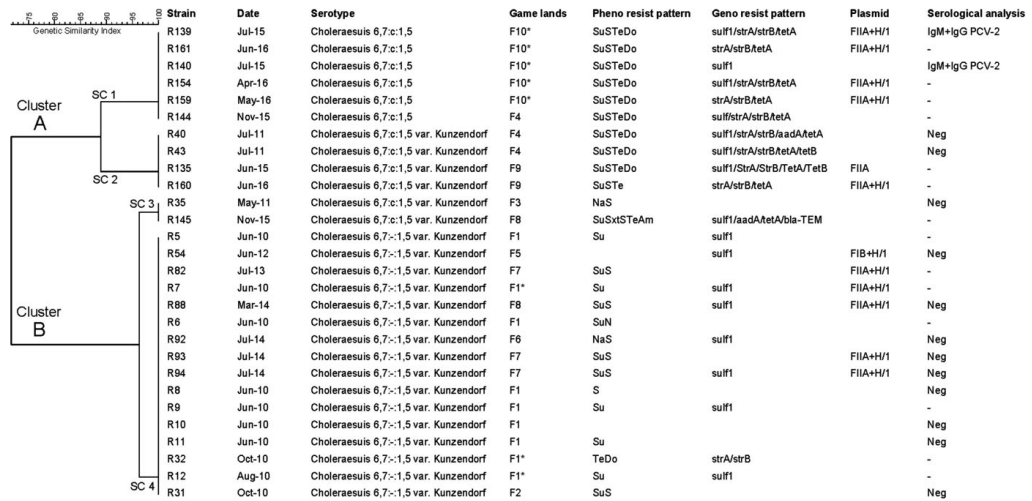


FIGURE 3 Phylogenetic relationship among 28 isolates of *Salmonella enterica* serotype Choleraesuis obtained from wild boars from the south-central part of the Iberian Peninsula, listed with additional information about the date and place of the isolate as well as its genotypic and phenotypic resistance profile, plasmid presence and serological analysis to the presence of PCV-2 and PRRSV. Dendrogram shows four different profiles (SC1-SC4) further clustered in groups A and B. Phenotypic resistance pattern: Su (sulphonamide); S (streptomycin); Te (tetracycline); Do (doxycycline); Na (nalidixic acid); N (neomycin); Sxt (trimethoprim/sulfamethoxazole); Am (ampicillin). Serological analysis: Neg (Negative); - (Not tested). (Blanks represent absence of resistance or plasmids)

resistant phenotypes, being SuSTeDo and SuS the major patterns with 9 and 6 isolates, respectively. Other antimicrobial resistance determinants were marginally observed, like *tetB* or *aadA* genes, each one in one different isolate and *bla-TEM* in the unique ampicillin resistant isolate amongst all the screened *S. Choleraesuis*. In addition, replicon typing detected 10 strains carrying plasmids, namely FIIA ($n = 1$), FIB+H/1 (1), or FIIA+H/1 (8) (Figure 3).

PFGE identified four different profiles, SC1-SC4, which are further clustered in groups A and B (Figure 3). SC1 and SC2 are represented by 10 strains coming from three different estates closely located: F4, F9, and F10 (Figures 1 and 3). Even higher is the similarity detected among SC3 and SC4 isolates from seven different estates lacking geographical connection.

3.4 | Serological analyses

The fourteen sera analysed were negative to PRRSV, although two of them resulted positive to PCV-2. These two samples belonged to the same farm (F10) and outbreak (July, 2015), and showed high levels of IgM and IgG, indicating an acute status of the infection.

4 | DISCUSSION

In this work, we described the occurrence of multiple cases of septicaemic salmonellosis in young wild boars from game estates located in central-western Spain. The outbreaks reported in this study were

characterized by remarkably high mortality rates, 35%–84.5%, much more elevated than the 10% reported in the only case known to date for farmed wild boars in Spain (Pérez et al., 1999), and more similar, but still higher than the 4.2%–33% rates described in pigs from Denmark and Japan (Murakami et al., 2006; Pedersen et al., 2015). Our results seem to contradict the idea that wild boars act only as reservoirs for *Salmonella*, being carriers and intermittent shedders (Ruiz-Fons, 2017). The age of the affected wild boars resulted similar than those described in the literature for pigs or wild boars, being related to the weaning period or other stressing conditions as well (Carlson, Barnhill, & Griffith, 2012; Perez et al., 1999). It should be noted that the highest rates came exclusively from the estates with semi-intensive management of the animals, F1 and F10, where stressful conditions may have a major impact on the health status of the animals (Giles, Belkhir, Barrow, & Foster, 2017). This fact, together with the poor specific immunity of wild boars against *S. Choleraesuis* (Methner et al., 2010), could decrease their natural resistance and even activate dormant *S. Choleraesuis* (Chiu, Su, & Chu, 2004). In our cases, weaning (F1) and grouping animals of different ages and origins (F10) were probably the situations that triggered the outbreaks. Both measures are likely to induce stress and thus facilitate the exchange and dissemination of pathogens (Giles et al., 2017; Roth & Thacker, 2006). The higher mortality observed in F1 could be due to the fact that at ages of 2-3 months the piglets show the lowest level of antibodies since birth, being much more susceptible to infections (Tizard, 2009).

The management strategies applied in the hunting areas are critical for the sanitary status of the animals. High animal densities would have a major impact on the hygienic habits of the animals and also on their social stress (Fernández-Llario, Carranza, & Hidalgo de Trucios, 1996; Morrow-Tesch, McGlone, & Salak-Johnson, 1994), facilitating the contagion and development of pathological processes. In addition, it should be considered that initially harmless pathogens such as *S. serovar Saintpaul*, could produce symptoms of marked virulence in wild boars (Ecco, Guedes, Tury, Santos, & Perecmanis, 2006). In the same way, some common porcine pathogens cause especially high mortalities in this species, e.g., *Erysipelothrix rhusiopathiae*, *Pasteurella multocida*, or *Staphylococcus hyicus* (Risco, Fernandez-Llario, Cuesta, et al., 2013; Risco, Fernandez-Llario, Velarde, et al., 2013; Risco et al., 2011). So, while the infective doses of *S. Choleraesuis* necessary for the onset of the disease in young pigs in natural conditions are $>10^8$ UFC/g. (Gray, Fedorka-Cray, Stabel, & Kramer, 1996), in wild boar, due to their poor specific immunity, these doses could be much smaller (Methner et al., 2010). Altogether, these findings highlight how critical an adequate management of wild boars could be in semi-intensive conditions.

Many previous reports pointed out the possibility of a triggering effect caused by immunosuppressant viruses (especially PCV-2) in activating *Salmonella* disease in pigs (Chiu et al., 2004; Ha et al., 2005; Schwartz, 1991; Wills et al., 2000). Nevertheless, in our samples, only two animals showed high values of both IgG and IgM against PCV-2, indicating an active status of this viral infection at the time of death. These two animals belonged to the same farm (F10) and outbreak (July, 2015). The rest of the animals resulted negative to the active presence of PCV-2 or PRRSV. Similar results were also described more recently in Italy (Conedera et al., 2014), where none of the wild boars analysed was positive to those viruses. Taken together, these data suggest that, in wild boar, *S. Choleraesuis* does not need a previous immunosuppressant infection in order to develop a pathological process.

The clinical symptoms and lesions observed in our animals were comparable to those described in similar processes affecting domestic pigs (Fedorka-Cray et al., 2000) and wild boars (Conedera et al., 2014; Pérez et al., 1999), with the exception of the distal cyanosis, affecting ears, extremities, and ventral area of the abdomen that had not been previously described. In accordance with the aforementioned reports, the lesions found in our study indicated a septicæmic presentation, as confirmed by the isolation of *S. Choleraesuis* from non-gastrointestinal organs, most notably lungs. This presentation is often related to an inhalatory transmission (Gray, Fedorka-Cray, Stabel, & Ackermann, 1995) which have been shown to be more frequent than oral (Clemmer, Hickey, Bridges, Schliessmann, & Shaffer, 1960), especially in intensive breeding farms and in the summer months, due to the dryness of soil (Baskerville & Dow, 1973). In our study, 18 of the 28 samples were collected in summer, similar to all the outbreaks reported previously in this species (Methner et al., 2010; Perez et al., 1999), suggesting that dust and aerosols generated by sneezing could have a mayor impact in the transmission and

dissemination of the disease in wild boars groups (Fedorka-Cray et al., 2000).

The *S. Choleraesuis* isolates found in the animals under study displayed a variety of resistances against different antimicrobials, being sulphonamides and tetracyclines the groups with the greatest percentages of resistant strains. This could be related to the regular use of single sulphonamides or combinations of sulphonamides with tetracyclines in the prophylaxis and treatment of diverse pathologies that historically affected some of the farms in this study. A similar result was also obtained in Danish pig herds, in the only study reported to date in Europe about antibiotic resistance in *S. Choleraesuis* from pigs (Pedersen et al., 2015). Studies from United States showed higher rates of resistance to tetracyclines (92.6%) (Huang, Lin, & Wu, 2009) while data from Japan revealed multidrug resistant isolates with resistance to fluoroquinolones and cephalosporines (Asai et al., 2010; Chang et al., 2005; Chiu et al., 2004). Other screening performed in wild boars from Germany revealed high resistance of *S. Choleraesuis* to sulphamethoxazole and streptomycin (Methner et al., 2010) whereas very high rates of resistance against streptomycin (73%), spiramicin, and tilimicosin (both at 100%) have been found in Italy (Donazzolo et al., 2017). To date, the present study is the only report that analyses the resistance genes and the plasmids replicons present in *S. Choleraesuis* isolates from wild boars.

The estates belonging to cluster A are located in same geographical region, specially F4 and F9, which were adjacent lands with no physical barriers between them and similar feeding management, commonly supplemented with sulphonamides. This fact explains the high degree of similarity in PFGE (SC2) or phenotypical resistance patterns (SuSTeDo) found in the strains from these places. The other estate from cluster A, F10, was located 44 km away from F4 and F9 but still in the same region. As mentioned above, F10 is a "hunting farm" that provides animals to other places and implements sanitary measures including antibiotics administration. F10 shared identical phenotypical resistance pattern with F4 and F9 but displayed the PFGE profile SC1. It should be mentioned that SC1 profile also appeared in F4 a few years later after the first outbreak was declared in this estate (Isolate R144), clearly supporting the hypothesis of genetic transfer between estates of this cluster. Regarding to cluster B, most of its isolates were classified into SC4. All the strains from this subgroup (SC4) lacked the flagellar antigen and presented the Kunzendorf variant. Besides, its phenotypical resistance pattern was much more limited than that from cluster A. Unlike SC4, strains from SC3 presented the flagellar antigen and showed different resistant patterns (genotypical and phenotypical) which could be due to a different evolution in their ecological niches, acquiring distinct resistances. Despite the high degree of similarity in cluster B (97%), there was no apparent geographical relation between the locations of the isolates in this group. This remarkable dispersion could be due to the ability of the strains of *Salmonella* to persist for long periods of time in asymptomatic carriers, as it was previously demonstrated in Germany (Methner et al., 2010). Such persistence would explain the distance between isolates as well as the time between different cases.

As concluding remarks, the special virulence observed in our data highlights the importance of the management-related stressors in this species. The dissemination of *S. Choleraesuis* triggered by the manipulation of the herd, together with the special susceptibility of this wild animals to the immunosuppressant effect caused by the stress, emphasise the necessity of specific management methods in this species. On the other hand, our results points to a possible relation between human intervention and the presence of higher rates of antibiotic resistance, as it has been previously reported in different wild mammals (Allen et al., 2010). In order to avoid future difficulties with the productive management of wild boars as well as to reduce the human impact on their environment, it is necessary to re-evaluate the management methods applied on this species. More studies are needed to implement procedures specifically designed for breeding of these wild animals with a minimal interaction from humans.

ACKNOWLEDGEMENTS

Dr. A. García was supported by contract TA13003 granted by Junta de Extremadura and the European Social Fund. Dr. D. Risco was supported by a Torres Quevedo Grant of the Ministerio de Economía y Competitividad of Spain (PTQ14-06663)

CONFLICT OF INTEREST

All the authors have read the manuscript and have approved this submission. All have made substantive contributions to this work. The authors report no conflicts of interest.

ORCID

María Gil Molino  <http://orcid.org/0000-0003-0797-3377>

REFERENCES

- Aarestrup, F. M., Lertworapreecha, M., Evans, M. C., Bangtrakulnonth, A., Chalermchaikit, T., Hendriksen, R. S., & Wegener, H. C. (2003). Antimicrobial susceptibility and occurrence of resistance genes among *Salmonella enterica* serovar Weltevreden from different countries. *The Journal of antimicrobial chemotherapy*, *52*(4), 715–718.
- Allen, H. K., Donato, J., Wang, H. H., Clout-Hansen, K. A., Davies, J., & Handelsman, J. (2010). Call of the wild: antibiotic resistance genes in natural environments. *Nature Reviews Microbiology*, *8*(4), 251–259.
- Asai, T., Namimatsu, T., Osumi, T., Kojima, A., Harada, K., Aoki, H., & Takahashi, T. (2010). Molecular typing and antimicrobial resistance of *Salmonella enterica* subspecies enterica serovar Choleraesuis isolates from diseased pigs in Japan. *Comparative Immunology, Microbiology and Infectious Diseases*, *33*(2), 109–119. <https://doi.org/doi:10.1016/j.cimid.2008.08.004>
- Baskerville, A., & Dow, C. (1973). Pathology of experimental pneumonia in pigs produced by *Salmonella cholerae-suis*. *Journal of Comparative Pathology*, *83*(2), 207–215.
- Boitani, L., & Mattei, L. (1992). Aging wild boar (*Sus scrofa*) by tooth eruption. In F. Spitz, G. Janeau, G. Gonzalez, & S. Aulagnier (Eds.), *Ongulés/Ungulates*. Société Française pour l'Étude et la Protection des Mammifères: Paris-Toulouse.
- Carlson, A., Barnhill, A. E., & Griffith, R. W. (2012). Salmonellosis. In J. J. Zimmerman (Ed.), *Diseases of Swine*, Vol. 1 (pp. 821–833). West Sussex, UK: John Wiley and Sons Ltd.
- Chang, C.-C., Lin, Y.-H., Chang, C.-F., Yeh, K.-S., Chiu, C.-H., Chu, C., & Chiou, C.-S. (2005). Epidemiologic relationship between fluoroquinolone-resistant *Salmonella enterica* serovar Choleraesuis strains isolated from humans and pigs in Taiwan (1997 to 2002). *Journal of Clinical Microbiology*, *43*(6), 2798–2804.
- Cherubin, C. (1980). Epidemiologic assessment of antibiotic resistance in salmonella. In D. J. Steele (Ed.), *CRC Handbook Series in Zoonosis* (Vol. 1 Sect, pp. 173–200). Boca Raton, FL: CRC Press.
- Chiu, C. H., Su, L. H., & Chu, C. (2004). *Salmonella enterica* serotype choleraesuis: Epidemiology, pathogenesis, clinical disease, and treatment. *Clinical Microbiology Reviews*, *17*(2), 311–322.
- Clemmer, D. I., Hickey, J. L., Bridges, J. F., Schliessmann, D. J., & Shaffer, M. F. (1960). Bacteriologic studies of experimental air-borne salmonellosis in chicks. *Journal of Infectious Diseases*, *106*, 197–210.
- Cockerill, F. R. (2011). *Performance standards for antimicrobial susceptibility testing: twenty-first informational supplement*. Wayne, PA: Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI).
- Conedera, G., Ustulin, M., Barco, L., Bregoli, M., Re, E., Vio, D. (2014). Outbreak of atypical *Salmonella Choleraesuis* in wild boar in North Eastern Italy. In P. Paulsen, A. Bauer, & F. J. M. Smulders (Eds.), *Trends in game meat hygiene* (pp. 151–159). Wageningen: Academic Publishers.
- Donazzolo, C., Turchetto, S., Ustulin, M., Citterio, C., Conedera, G., Vio, D., ... Cocchi, M. (2017). Antimicrobial susceptibility of *Salmonella enterica* subsp. enterica serovar Choleraesuis strains from wild boar (*Sus scrofa*) in Italy. In A. Bauer, P. Paulsen, F.J.M. & Smulders (Eds.), *Game meat hygiene* (pp. 307). The Netherlands: Wageningen Academic Publishers.
- Ecco, R., Guedes, R. M. C., Tury, E., Santos, H. L. Jr, & Perecmanis, S. (2006). Outbreak of enterocolitic salmonellosis on a wild pig farm. *Veterinary Record*, *158*, 242–243.
- EFSA (2015). The European Union summary report on trends and sources of zoonoses, zoonotic agents and food-borne outbreaks in 2014. *EFSA Journal*, *13*, 4329.
- Fedorca-Cray, P. J., Gray, J. T., & Wray, C. (2000). *Salmonella* infections in pigs. In C. Wray, & A. Wray (Eds.), *Salmonella in domestic animals* (pp. 191–207). London: CABI.
- Fernández-Llario, P., Carranza, J., & Hidaigo de Trucios, S. (1996). Social organization of the wild boar (*Sus scrofa*) in Doñana National Park. *Miscellanea Zoologica*, *19*, 8–18.
- Foley, S. L., & Lynne, A. M. (2008). Food animal-associated *Salmonella* challenges: Pathogenicity and antimicrobial resistance. *Journal of Animal Science*, *86*(14 Suppl), E173–E187. <https://doi.org/10.2527/jas.2007-0447>
- Giles, T. A., Belkhir, A., Barrow, P. A., & Foster, N. (2017). Molecular approaches to the diagnosis and monitoring of production diseases in pigs. *Research in Veterinary Science*, *114*, 266–272. <https://doi.org/10.1016/j.rvsc.2017.05.016>
- Gortázar, C., Acevedo, P., Ruiz-Fons, F., & Vicente, J. (2006). Disease risks and overabundance of game species. *European Journal of Wildlife Research*, *52*(2), 81–87. <https://doi.org/10.1007/s10344-005-0022-2>
- Gray, J. T., Fedorka-Cray, P. J., Stabel, T. J., & Ackermann, M. R. (1995). Influence of inoculation route on the carrier state of *Salmonella choleraesuis* in swine. *Veterinary Microbiology*, *47*(1–2), 43–59. [https://doi.org/doi:10.1016/0378-1135\(95\)00060-N](https://doi.org/doi:10.1016/0378-1135(95)00060-N)
- Gray, J. T., Fedorka-Cray, P. J., Stabel, T. J., & Kramer, T. T. (1996). Natural transmission of *Salmonella choleraesuis* in swine. *Applied and Environmental Microbiology*, *62*(1), 141–146.
- Ha, Y., Jung, K., Kim, J., Choi, C., & Chae, C. (2005). Outbreak of salmonellosis in pigs with postweaning multisystemic wasting syndrome. *Veterinary Record-English Edition*, *156*(18), 583–584.

- Hilbert, F., Smulders, F. J. M., Chopra-Dewasthaly, R., & Paulsen, P. (2012). Salmonella in the wildlife-human interface. *Food Research International*, 45(2), 603–608. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2011.08.015>
- Hoorfar, J., Ahrens, P., & Rådström, P. (2000). Automated 5' nuclease PCR assay for identification of *Salmonella enterica*. *Journal of Clinical Microbiology*, 38(9), 3429–3435.
- Huang, T. M., Lin, T., & Wu, C. (2009). Serovar distribution and antimicrobial susceptibility of swine *Salmonella* isolates from clinically ill pigs in diagnostic submissions from Indiana in the United States. *Letters in applied microbiology*, 48(3), 331–336.
- Johnson, T. J., Wannemuehler, Y. M., Johnson, S. J., Logue, C. M., White, D. G., Doetkott, C., & Nolan, L. K. (2007). Plasmid replicon typing of commensal and pathogenic *Escherichia coli* isolates. *Applied and Environmental Microbiology*, 73(6), 1976–1983.
- Lipej, Z., Segales, J., Jemeršić, L., Olvera, A., Roić, B., Novosel, D., & Manojlović, L. (2007). First description of postweaning multisystemic wasting syndrome (PMWS) in wild boar (*Sus scrofa*) in Croatia and phylogenetic analysis of partial PCV2 sequences. *Acta Veterinaria Hungarica*, 55(3), 389–404.
- Massei, G., Kindberg, J., Licoppe, A., Gacic, D., Sprem, N., Kamler, J., ... Nahlik, A. (2015). Wild boar populations up, numbers of hunters down? A review of trends and implications for Europe. *Pest Management Science*, 71(4), 492–500. <https://doi.org/10.1002/ps.3965>
- Mentaberre, G., Porrero, M. C., Navarro-Gonzalez, N., Serrano, E., Dominguez, L., & Lavin, S. (2013). Cattle drive *Salmonella* infection in the wildlife-livestock interface. *Zoonoses Public Health*, 60(7), 510–518. <https://doi.org/10.1111/zph.12028>
- Methner, U., Heller, M., & Böcklich, H. (2010). *Salmonella enterica* sub-species enterica serovar Choleraesuis in a wild boar population in Germany. *European Journal of Wildlife Research*, 56, 493–502.
- Morrow-Tesch, J. L., McGlone, J. J., & Salak-Johnson, J. L. (1994). Heat and social stress effects on pig immune measures. *Journal of Animal Science*, 72(10), 2599–2609.
- Murakami, S., Ogawa, A., Kinoshita, T., Matsumoto, A., Ito, N., & Nakane, T. (2006). Occurrence of swine salmonellosis in post-weaning multisystemic wasting syndrome (PMWS) affected pigs concurrently infected with porcine reproduction and respiratory syndrome virus (PRRSV). *Journal of Veterinary Medical Science*, 68(4), 387–391.
- Navarro-Gonzalez, N., Mentaberre, G., Porrero, C. M., Serrano, E., Mateos, A., Lopez-Martín, J. M., & Dominguez, L. (2012). Effect of cattle on *Salmonella* carriage, diversity and antimicrobial resistance in free-ranging wild boar (*Sus scrofa*) in northeastern Spain. *PLoS ONE*, 7(12), e51614. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0051614>
- Pedersen, K., Sorensen, G., Lofstrom, C., Leekitcharoenphon, P., Nielsen, B., Wingstrand, A., & Baggesen, D. L. (2015). Reappearance of *Salmonella serovar Choleraesuis* var. Kunzendorf in Danish pig herds. *Veterinary Microbiology*, 176(3–4), 282–291. <https://doi.org/10.1016/j.vetmic.2015.01.004>
- Perez, J., Astorga, R., Carrasco, L., Mendez, A., Perea, A., & Sierra, M. (1999). Outbreak of salmonellosis in farmed European wild boars (*Sus scrofa ferus*). *Veterinary Record*, 145(16), 464–465.
- Pérez, J., Astorga, R., Carrasco, L., Méndez, A., Perea, A., & Sierra, M. A. (1999). Outbreak of salmonellosis in farmed European wild boars (*Sus scrofa ferus*). *Veterinary Record*, 145, 464–465.
- Reed, W. M., Olander, H. J., & Thacker, H. L. (1986). Studies on the pathogenesis of *Salmonella typhimurium* and *Salmonella choleraesuis* var. kunzendorf infection in weaning pigs. *American Journal of Veterinary Research*, 47, 75–83.
- Ribot, E. M., Fair, M., Gautom, R., Cameron, D., Hunter, S., Swaminathan, B., & Barrett, T. J. (2006). Standardization of pulsed-field gel electrophoresis protocols for the subtyping of *Escherichia coli* O157: H7, *Salmonella*, and *Shigella* for PulseNet. *Foodborne Pathogens & Disease*, 3(1), 59–67.
- Risco, D., Fernandez-Llario, P., Cuesta, J. M., Garcia-Jimenez, W. L., Gil, M., Goncalves, P., & Hermoso de Mendoza, J. H. (2013). Fatal outbreak of systemic pasteurellosis in a wild boar (*Sus scrofa*) population from southwest Spain. *Journal of Veterinary Diagnostic Investigation*, 25(6), 791–794. <https://doi.org/10.1177/1040638713504411>
- Risco, D., Fernandez-Llario, P., Velarde, R., Cuesta, J. M., Garcia, W. L., Goncalves, P., & Hermoso de Mendoza, J. H. (2013). A case of exudative epidermitis in a young wild boar from a Spanish game estate. *Journal of Swine Health and Production*, 21(6), 4.
- Risco, D., Fernandez-Llario, P., Velarde, R., Garcia, W. L., Benitez, J. M., Garcia, A., & Gomez, L. (2011). Outbreak of swine erysipelas in a semi-intensive wild boar farm in Spain. *Transboundary and Emerging Diseases*, 58(5), 445–450. <https://doi.org/10.1111/j.1865-1682.2011.01234.x>
- Roth, J. A., & Thacker, E. L. (2006). Immune System. In B. E. Straw (Ed.), *Diseases of swine* (9, th ed. (pp. 15–36). Ames, Iowa: Blackwell Publishing.
- Ruiz-Fons, F. (2017). A review of the current status of relevant zoonotic pathogens in wild swine (*Sus scrofa*) populations: Changes modulating the risk of transmission to humans. *Transboundary and Emerging Diseases*, 64(1), 68–88. <https://doi.org/10.1111/tbed.12369>
- Schulze, C., Neumann, G., Grütze, I., Engelhardt, A., Mirle, C., Ehlert, F., & Hlinak, A. (2003). Case report: Porcine circovirus type 2 infection in an European wild boar (*Sus scrofa*) in the state of Brandenburg, Germany. *DTW. Deutsche tierärztliche Wochenschrift*, 110(10), 426–428.
- Schwartz, K. J. (1991). Salmonellosis in swine. *Compendium on Continuing Education for the Practising Veterinarian*, 13, 139–146.
- Tizard, I. R. (2009). Immunity in the fetus and newborn. In I. R. Tizard (Ed.), *Veterinary Immunology and Immunopathology*, 8th ed. (pp. 223–238). Philadelphia: Elsevier.
- Wills, R. W., Gray, J. T., Fedorka-Cray, P. J., Yoon, K. J., Ladely, S., & Zimmerman, J. J. (2000). Synergism between porcine reproductive and respiratory syndrome virus (PRRSV) and *Salmonella choleraesuis* in swine. *Veterinary Microbiology*, 71(3–4), 177–192.

How to cite this article: Gil Molino M, Risco Pérez D, Gonçalves Blanco P, et al. Outbreaks of antimicrobial resistant *Salmonella Choleraesuis* in wild boars piglets from central-western Spain. *Transbound Emerg Dis*. 2019;66:225–233. <https://doi.org/10.1111/tbed.13003>

5.3. Estudio de la diseminación de resistencias antimicrobianas en *Salmonella enterica* serovar *Choleraesuis* entre ambientes domésticos y salvajes.

Publicado en: Antibiotics (Basel, Switzerland). 2020;9(11). *Spread of Antimicrobial Resistance by Salmonella enterica Serovar Choleraesuis between Close Domestic and Wild Environments.*

Salmonella enterica serovar *Choleraesuis* es un patógeno zoonótico altamente invasivo que, además de infectar a suidos como el jabalí y el cerdo, provoca graves cuadros clínicos en el hombre. Las poblaciones naturales de jabalíes están experimentando una gran expansión demográfica y, además, algunas granjas están criando esta especie con fines cinegéticos, incluyendo un manejo a veces idéntico al de los cerdos domésticos que incluye suplementación, agrupación y tratamiento con antibióticos. Esta situación aumenta la posibilidad de contacto entre jabalíes y ganado, y potencialmente induce estrés, con diferentes consecuencias sanitarias. El presente trabajo tiene como objetivo describir las características clínicas-lesionales de los brotes causados por *S. Choleraesuis* en jabalíes del centro-oeste de España, así como las resistencias antimicrobianas y las relaciones clonales existentes entre aislamientos. Para ello se estudiaron 28 jabalíes de entre 2-6 meses de edad encontrados muertos en diversas fincas. Estos animales presentaban diferentes sistemas de manejo: la mayoría eran fincas cerradas (6/10), en las cuales se solía suplementar a los animales durante los meses de verano; dos fincas abiertas en las que no se producía ningún tipo de manejo; y finalmente, dos fincas consideradas como "granjas cinegéticas", utilizadas para la cría de jabalíes en las que se desarrollaba un manejo intensivo de los animales.

Los jabalíes analizados en este trabajo fueron llevados al Hospital Clínico Veterinario de la UEx donde se les realizó el examen post-mortem. Tras la necropsia reglada y completa de los animales, se tomaron muestras tanto para un estudio histopatológico como para cultivos microbiológicos, e incluso en algunos casos se pudo recoger muestras de sangre de la cavidad del corazón para hacer un estudio serológico frente a Circovirus Porcino Tipo 2 (PCV-2) y Síndrome Respiratorio y Reproductivo Porcino (PRRS). De entre todos los brotes incluidos en el estudio solo pudo llevarse a cabo un estudio detallado en aquellos declarados en las dos granjas cinegéticas, ya que en estas explotaciones pudo determinarse con precisión el número de jabalíes afectados. En ellos

encontramos una morbilidad del 80% y el 100% y mortalidad del 35% y 84.4% en la finca F10 y F1, respectivamente. En la finca con la mayor mortalidad todos los animales presentaban 3 meses de edad, comenzando los primeros síntomas una semana tras el destete, observándose anorexia y depresión. A los dos días, 15 animales murieron de forma repentina, sin mostrar sintomatología, mientras que el resto fueron enfermando progresivamente, presentando una diarrea acuosa-verdosa, dificultad para caminar y finalmente postración. El curso de la infección en estos animales duraba 2-3 días finalizando con la muerte. En la otra finca la edad de los afectados variaba un poco más (2.5-6 meses), la mayoría no presentaron sintomatología y murieron repentinamente, aunque en algunos casos precedió una diarrea muy profusa. El resto de los animales analizados fueron encontrados de forma casual por los guardas de las fincas sin poder obtener más datos epidemiológicos.

En cuanto a las lesiones encontradas, la mayoría de los animales presentaron cianosis distal, especialmente en orejas, piernas y parte inferior del abdomen. Todos los órganos exhibieron una congestión marcada. Los pulmones presentaban lesiones neumónicas y en el abdomen era muy remarcable la hepatomegalia, frecuentemente acompañada de pequeñas manchas blancas en el parénquima, que observadas microscópicamente revelaron áreas de necrosis. Además, la esplenomegalia apareció en la mayoría de los casos, en el riñón fueron frecuente las petequias renales y en el intestino llamó la atención la fusión de los ganglios mesentéricos de todos los animales. Sin embargo, la presencia de úlceras en el colon solamente ocurrió en un animal.

Los resultados microbiológicos mostraron en todos los animales una septicemia debida a *S. Choleraesuis*, que se aisló de todos los órganos en todos los animales, excepto en el intestino de 4 de ellos. Un aislado por animal fue procesado para la determinación por serotipificación, evidenciando que la mitad de las cepas carecían del primer antígeno flagelar (6,7:-:1,5), y que además el 78% presentan la variante Kunzendorf. El antibiograma realizado con estos aislados mostró que el 92.8% presentaban alguna resistencia y el 39.2% multiresistencia (MR, definida como resistencia a 4 ó más antimicrobianos). Las resistencias más frecuentes se expresaron frente a sulfonamida (78%), estreptomycin (64%), tetraciclina (42%) y doxiciclina (35%), correlacionándose con la elevada prevalencia de los genes *sul1*, *strA/strB* y *tetA*. Así, el patrón de resistencia SuSTDo apareció en todas las cepas procedentes de una granja cinegética, al igual que

en otra finca con vallado perimetral. Por otro lado, todas las cepas fueron sensibles a ceftiofur, cefotaxima, gentamicina, enrofloxacin, cloranfenicol y colistina. La detección de replicones plasmídicos que pudieran estar asociados a alguno de los determinantes de resistencia identificados se llevó a cabo mediante PCR, encontrándose positividad en el 42% de los aislados, incluyendo un 35% con los elementos FIIA+H/1 presentes en la misma cepa. El análisis filogenético mediante PFGE evidenció cuatro perfiles diferenciados, asociables a dos clústers con una similaridad genética cercana al 75%, observándose una estrecha relación clonal entre cepas con la misma procedencia geográfica, incluso transcurrido un año de diferencia entre aislamientos.

Por último, la serología reflejó que ningún animal analizado muestra anticuerpos frente a PRRS, y la mayoría tampoco frente a PCV-2, aunque en una de las granjas cinegéticas dos animales presentaban una infección aguda observándose la presencia de IgM y IgG específicos frente a este virus.



Article

Spread of Antimicrobial Resistance by *Salmonella enterica* Serovar Choleraesuis between Close Domestic and Wild Environments

María Gil Molino ^{1,*}, Alfredo García ², Sofía Gabriela Zurita ¹,
Francisco Eduardo Martín-Cano ³, Waldo García-Jiménez ⁴, David Risco ^{4,5},
Joaquín Rey ¹, Pedro Fernández-Llario ⁴ and Alberto Quesada ^{6,7}

¹ Unidad de Patología Infecciosa, Facultad de Veterinaria, Universidad de Extremadura, 10003 Cáceres, Spain; sofigz32@gmail.com (S.G.Z.); jmrey@unex.es (J.R.)

² Área de Producción Animal, CICYTEX-La Orden, 06187 Badajoz, Spain; fredgarsa@gmail.com

³ Unidad de Reproducción, Facultad de Veterinaria, Universidad de Extremadura, 10003 Cáceres, Spain; femartincano@unex.es

⁴ Innovación en Gestión y Conservación de Ingulados S.L. (INGULADOS), 10004 Cáceres, Spain; waldo@ingulados.com (W.G.-J.); david@ingulados.com (D.R.); pedro@ingulados.com (P.F.-L.)

⁵ Neobeitar S.L., 10004 Cáceres, Spain

⁶ Departamento de Bioquímica, Biología Molecular y Genética, Facultad de Veterinaria, Universidad de Extremadura, 10003 Cáceres, Spain; aquesada@unex.es

⁷ INBIO G+C, Universidad de Extremadura, 10003 Cáceres, Spain

* Correspondence: mariamilgm@unex.es

Received: 28 September 2020; Accepted: 28 October 2020; Published: 29 October 2020



Abstract: The *Salmonella enterica* serovar Choleraesuis affects domestic pig and wild boar (WB), causing clinical salmonellosis. Iberian swine production is based on a free-range production system where WB and Iberian pig (IP) share ecosystems. This study focuses on the negative impact on the pork industry of infections due to this serotype, its role in the spread of antibiotic resistance, and its zoonotic potential. Antibiotic resistance (AR) and genetic relationships were analyzed among 20 strains of *S. Choleraesuis* isolated from diseased WB and IP sampled in the southwest region of the Iberian Peninsula. AR was studied using the Kirby–Bauer method with the exception of colistin resistance, which was measured using the broth microdilution reference method. Resistance and Class 1 integrase genes were measured using PCR, and the genetic relationship between isolates and plasmid content by pulsed field gel electrophoresis. The results show a higher incidence of AR in isolates from IP. Phylogenetic analysis revealed seven profiles with two groups containing isolates from IP and WB, which indicates circulation of the same clone between species. Most pulsotypes presented with one plasmid of the same size, indicating vertical transmission. AR determinants *bla_{TEM}* and *tetA* were routinely found in IP and WB, respectively. One isolate from IP expressed colistin resistance and presented the *mcr-1* gene carried by a plasmid. This study suggests that *S. Choleraesuis* circulates between WB and IP living in proximity, and also that the mobilization of AR genes by plasmids is low. Furthermore, the detection of plasmid-mediated colistin resistance in bacteria from IP is alarming and should be monitored.

Keywords: *Salmonella Choleraesuis*; Iberian pig; wild boar; antibiotic resistance; phylogenetic relationship; plasmid replicon typing; colistin

1. Introduction

Salmonellosis in swine results in tremendous economic losses in the pork industry [1]. *Salmonella enterica* subsp. *enterica* serovar Choleraesuis (*S. Choleraesuis*) causes clinical salmonellosis

in pigs and wild boar (WB) [2], and the identification of epidemiologic groups strongly suggests an exchange of this serovar between WB and domestic pigs [3]. Nowadays, *S. Choleraesuis* is still very common in North America and Asia and, although it is not considered a dominant serovar in pigs from Europe [4,5], different outbreaks have occasionally been reported in recent years [6,7] including in WB [2,3,8–11].

The Iberian pig (IP) is an autochthonous breed that originated in the Iberian Peninsula, for which the production system is mainly associated with extensive management deeply linked to the Mediterranean ecosystem and traditional agroforestry in the southwest of the Iberian Peninsula [12]. This means that WB and IP share the same habitats, leading to subsequent interactions among them [13,14]. WB, as an omnivorous species, is prone to multiple pathogen exposure. They have been shown to carry resistant bacteria [15] and could be a gateway for spread of this resistance from domestic animals or humans to wildlife [16]. Besides, several studies have shown WB as a possible asymptomatic persistent reservoir of *S. Choleraesuis* [17,18].

Although *S. Choleraesuis* is swine-specific and rarely infects other hosts, it is the second most predominant serovar among human isolates in Taiwan and exhibits the highest degree of invasiveness [19,20], which may result in severe disease and death [21]. Most *S. Choleraesuis* isolates from humans and swine exhibit closely related DNA fingerprints, indicating that human infections were acquired from pigs [22], reinforcing the importance of controlling this serotype in Suidae.

Most *S. Choleraesuis* strains that have caused infections in humans, mainly in Asian countries, are multidrug resistant (MDR) [19,23], which has been associated with classical mobile genetic elements (i.e., transposons and plasmids) and integrative elements that can spread antimicrobial resistance genes within the bacterial host genome through gene cassettes by site-specific recombination [24,25]. In addition, plasmids can carry other gene functions such as those involved in virulence by pSCV50 in *S. Choleraesuis* [26]. This 50 kb plasmid does not carry antimicrobial resistance genes, although it can recombine with larger sized plasmids detected in *S. Choleraesuis* where *sul1*, *bla*_{TEM}, and extended-spectrum beta-lactamase genes are located [27–29].

In contrast to the limited administration of colistin (polymyxin E) to humans as a last resort antibiotic, it has historically been used for prophylaxis in animal production [30]. Consequently, a dramatic increase of colistin resistance has arisen in naturally sensitive Gram-negative bacteria, with the spread of plasmid carrying *mcr-1* among other resistance determinants [31]. Among different reservoirs, livestock is considered the main source of *mcr* genes worldwide [32], and a global concern exists due to their high mobilization potential by plasmids carrying other resistance determinants [33]. *S. enterica*, one of the most clinically relevant enterobacteria, carries colistin resistance genes in many serovars via different plasmids, including IncHI2 mega-plasmids larger than 200 kb with multiple resistance determinants [34]. In *S. Choleraesuis*, this has been described very recently in one MDR isolate from a human blood infection in Brazil, linked to a 40 kb IncX4 plasmid [35].

The aim of the present investigation was to study the genetic relationship between strains of *S. Choleraesuis* from IP and WB raised in the southwest of the Iberian Peninsula and to address the mechanism of spread of its antimicrobial resistance determinants, including through screening for low-susceptible isolates to colistin in this bacterial pathogen.

2. Results

2.1. Clustering of *S. Choleraesuis* Isolates by PFGE-*Xba*I

Pulsed-field gel electrophoresis (PFGE) (*Xba*I) macrorestriction displayed seven different profiles or pulsotypes (PT) grouped into two main clusters: A, with a degree of similarity higher than 75% and B, with more than 80% similarity (Figure 1). Whilst cluster B contains only 4 isolates from 2 estates, all of them from IP, cluster A groups 5 PT that contain 15 isolates from 12 different estates. Within this cluster PT1, PT2 and PT3 showed a degree of similarity higher than 95%. There is remarkable persistency over time for PT1, PT3, and PT5, which were isolated during 5, 3, and 4 year periods, respectively,

from the animal populations. Among them, PT1 and PT3 were detected in both IP and WB, indicating bacterial circulation between both suids. The distance between the estates with the same PT was not significantly different than the average distance between all the estates included in the study.

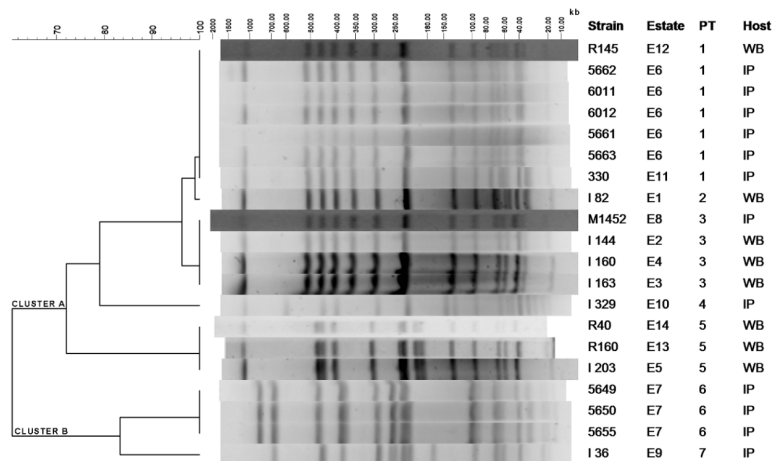


Figure 1. Dendrogram based on PFGE macrorestriction pattern of *S. Choleraesuis* isolates. Dendrogram showing 7 different profiles (PT) further divided into two clusters A and B. Dice coefficients had a 1.5% band position tolerance. The scales at the top indicate the similarity indices (in percentages) and molecular sizes (in kilobases).

2.2. Resistance Determinants against Clinically Relevant Antimicrobials in the *S. Choleraesuis* Isolates

Resistance against at least one of the 14 tested antibiotics was found in almost all tested strains (19/20; 95%); moreover, 65% (13/20) of the *S. Choleraesuis* isolates were multidrug resistant (MDR) with resistance to 4 or more antibiotics (Table 1). Antimicrobial resistance phenotypes were highly variable, with 14 different patterns existing among the 20 *S. Choleraesuis* isolates (Table 1), even within the same PT, especially if they came from different estates, as observed in PT1 and PT5 (Figure 1). Only three patterns appeared more than once: AMP–TRS–SUL–CHL (3 isolates from PT6), AMP–STR–TRS–SUL (2 isolates from PT1), and NEO (2 isolates from PT3), and none of them were shared between IP and WB. Indeed, the average number of antimicrobials to which isolates presented resistance depended on the host, with 4.9 resistances (or MDR), on average, per isolate in IP and 2.8 in WB. The host effect on MDR of isolates also affects the particular antibiotics found in every spectrum. Among isolates from IP, the most common resistance observed is against ampicillin, followed by sulfonamide, while in those from WB, the lowest susceptibilities were found against aminoglycosides (streptomycin and neomycin) followed by tetracycline and sulfonamide (Table 2). Resistance against colistin, a last resort antibiotic in human health, is found in only one isolate of PT1 from IP. Regardless of their origin, all isolates were susceptible to quinolones or the broad-spectrum cephalosporin cefotaxime.

Table 1. Antibiotic resistance characteristics of *S. Choleraesuis* isolates from Iberian pigs and wild boar in Spain.

PT ¹	Isolate	Origin	Resistance Phenotype	Resistance Genotype	Plasmid Size (kb) ²
1	R145	WB	AMP-STR-TET-TRS-SUL	<i>bla</i> _{TEM} - <i>aadA1</i> - <i>suI1</i> - <i>suI3</i> - <i>tetA</i>	>105
	5662	IP	AMP-DOX-TRS-SUL-CHL	<i>bla</i> _{TEM} - <i>aadA1</i> - <i>suI3</i> - <i>Int1</i>	55
	6011	IP	AMP-STR-TRS-SUL	<i>bla</i> _{TEM}	55
	6012	IP	AMP-STR		ND
	5661	IP	AMP-DOX	<i>bla</i> _{TEM}	55
	5663	IP	AMP-STR-TRS-SUL	<i>bla</i> _{TEM}	ND
2	330	IP	AMP-GEN-NEO-STR-TET-DOX-TRS-SUL-COL	<i>strA</i> - <i>strB</i> - <i>suI1</i> - <i>mcr-1</i>	55 + > 244 ³
	I 82	WB	AMP-NEO-TET-DOX	<i>bla</i> _{TEM}	55
3	M1452	IP	AMP-NEO-STR-TET-DOX-TRS-SUL-CHL	<i>bla</i> _{TEM} - <i>tetA</i> - <i>Int1</i> (<i>aadA1</i>) ⁴	55
	I 144	WB	-	-	55
	I 160	WB	NEO	-	55
	I 163	WB	NEO	-	55
4	I 329	IP	AMP-STR-TET-DOX-TRS-SUL	<i>bla</i> _{TEM} - <i>strA</i> - <i>strB</i> - <i>suI1</i> - <i>Int1</i> -(<i>bla</i> _{PSE1}) ⁴	55 + 244
5	R40	WB	STR-TET-DOX-SUL	<i>aadA1</i> - <i>strA</i> - <i>strB</i> - <i>suI1</i> - <i>tetA</i>	<33 + 55 + 310
	R160	WB	STR-TET-SUL	<i>strA</i> - <i>strB</i> - <i>tetA</i>	<33 + 55 + 240
	I 203	WB	STR-TRS-SUL	<i>strA</i> - <i>strB</i> - <i>tetA</i>	<33 + 55 + 310
6	5649	IP	AMP-TRS-SUL-CHL	<i>bla</i> _{TEM} - <i>aadA1</i> - <i>suI3</i> - <i>Int1</i>	105
	5650	IP	AMP-TRS-SUL-CHL	<i>bla</i> _{TEM} - <i>aadA1</i> - <i>suI3</i> - <i>Int1</i>	105
	5655	IP	AMP-TRS-SUL-CHL	<i>strA</i> - <i>suI3</i>	105
7	I 36	IP	AMP-NEO-STR-TET-DOX-SUL	<i>aadA1</i> - <i>strA</i> - <i>strB</i> - <i>suI2</i> - <i>tetB</i>	-

¹ Pulsotype, as deduced from Figure 1. ² DNA bands detected by PFGE-S1, with size (kb) deduced by proximity to corresponding bands in the *S. braenderup* standard; ³ hybridized to DIG-labeled *mcr-1*; ⁴ Genes identified in *int1*-linked gene cassettes. None detected. ND, not determined.

Table 2. Prevalence of antimicrobial resistance determinants among *S. Choleraesuis* isolates from Iberian pigs and wild boar in Spain.

Antimicrobials		IP		WB	
		N ¹	Genes ²	N ¹	Genes ²
Sulfonamides	Sulfadiazine	10		4	
	Cotrimoxazol	9	<i>sul1</i> (2), <i>sul2</i> (1), <i>sul3</i> (4)	2	<i>sul1</i> (2), <i>sul3</i> (1)
β-lactams	Ampicillin	12	<i>bla_{TEM}</i> (9), <i>bla_{PSE}</i> (1)	2	<i>bla_{TEM}</i> (2)
	Gentamycin	1	-	0	-
Aminoglycosides	Neomycin	3	-	3	-
	Streptomycin	7	<i>aadA</i> (5), <i>strA</i> (3), <i>strB</i> (3)	4	<i>aadA</i> (2), <i>strA</i> (3), <i>strB</i> (3)
Tetracyclines	Tetracycline	4		4	
	Doxycycline	6	<i>tetA</i> (1), <i>tetB</i> (1)	2	<i>tetA</i> (4)
Phenicol	Chloramphenicol	5		0	-
Polymixins	Colistin	1	<i>mcr-1</i> (1)	0	-

¹ Number of isolates sharing resistance to indicated antimicrobial. ² Number of resistance determinants between parenthesis. None detected.

Antimicrobial resistance determinants were found in all the strains from IP and most (seven out of eight) from WB. The antimicrobial resistance genes detected were highly variable among isolates, with a total of 10 different genotypes, 50% of them with four or more resistance genes (Table 1). Similarly to antimicrobial-resistant phenotypes, genotypes were variable among isolates, even from the same PT, with *bla_{TEM}*, *bla_{TEM}-aadA1-sul3*, and *strA-strB-tetA* found most frequently (Table 1). Considering each resistance gene, the β-lactamase-encoding *bla_{TEM}* was most common with nine strains from IP and two from WB, covering all PT except PT5. However, from WB the most prevalent was *tetA*, found in one isolate from PT1 and three from PT5 in addition to only one isolate from PT3 in IP. The *int1* gene, encoding the class 1 integrase that is frequently linked to antimicrobial resistance gene cassettes, was detected in five isolates, all from IP, although two of them share PT with WB isolates (PT1 and PT3, Figure 1). However, only two isolates presented *int1*-linked gene cassettes of 1000 or 1200 bp length which also coded for *aadA2* or *bla_{PSE1}* genes, respectively (Table 1).

Interestingly, the *mcr-1* (plasmid-mediated colistin resistance) gene was detected in one colistin-resistant isolate from IP belonging to PT1, the most common PT among *S. Choleraesuis* isolates (Table 1). In general, isolates carrying resistance determinants presented low susceptibility to the corresponding antimicrobial(s), although *aadA1* and *strA* genes may be expressed weakly or not at all.

2.3. Plasmid Content of *S. Choleraesuis* Isolates

S1 nuclease treatment and PFGE typing of plasmid content revealed that 19 out of the 20 strains carried at least one extrachromosomal molecule of DNA, with five isolates carrying multiple plasmids (Table 1 and Figure 2). The plasmid most frequently found was 50 kb in size, shared by 75% of isolates, including those fully sensitive to antibiotics and lacking resistance genes. Plasmids between 100 and 300 kb were also detected in strains mostly expressing MDR. Due to its clinical relevance, plasmid location was performed for the colistin-resistance *mcr-1* gene identified in this study for the first time in *S. Choleraesuis* isolated from swine (Figure 1). Thus, a plasmid slightly over 240 kb in size was detected that was carrying *mcr-1* from an IP necropsied in 2020, as revealed by specific hybridization with a DIG-labeled probe from a previously characterized sequence [36]. With exceptions, as for the mentioned plasmid carrying *mcr-1* in a PT1 strain, the number and size of plasmids was found to be stable in isolates within every PT.

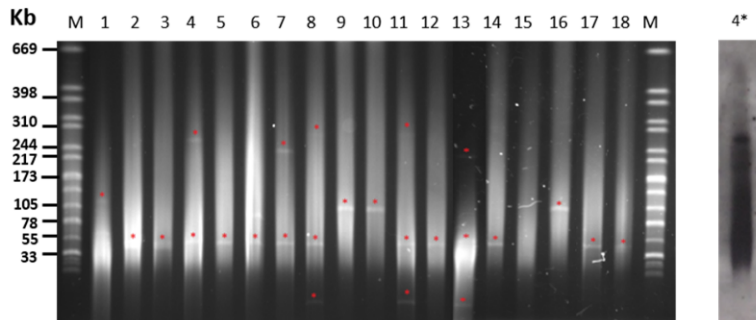


Figure 2. Plasmid analysis of *S. Choleraesuis* isolates from Iberian pigs and wild boar in Spain. PFGE-S1 analysis of isolates. Red asterisks indicate plasmids for which an approximate size has been estimated by comparison with *S. braenderup* molecular weight standards. Analyzed isolates are M, *S. braenderup* digested by XbaI; 1, R145; 2, 6011; 3, 5661; 4, I330; 5, I160; 6, I163; 7, I329; 8, I203; 9, 5655; 10, 5650; 11, R40; 12, M1452; 13, R160 14, I82; 15, 36; 16, 5649; 17, I144; 18, 5662. 4* Hybridization to a DIG-labeled *mcr-1* probe.

3. Discussion

In this study, isolates of *S. Choleraesuis* from IP and WB have been analyzed in order to trace the spread potential of antimicrobial resistance determinants carried by this serotype in the “dehesa”, a traditional agrosystem consisting of grassland with Holm’s oaks found in the Iberian Peninsula. The XbaI-PFGE profile of *S. Choleraesuis* isolates revealed different PT, but most of the strains (16/20) belonged to the same cluster with a degree of similarity above 75% (Cluster A), among which PT1, PT3, and PT5 might represent clones with high potential spread both in space and time, in agreement with previous studies in WB [2,3,17] and domestic pigs [5,6]. With regard to phylogeographic analysis, a recent study demonstrated cross-border transmission of *S. Choleraesuis* from pigs between countries that was concordant with the trading network [18]. In our study, genetic relationships were detected not only among bacteria from the same species, but also with the wild ancestor of pigs, the WB, which share the “dehesa” environment with IP [14]. In our study, the geographical link between animals is maximal for WB from estates E4 and E1, the closest to IP farms E6 and E11 (Figure 3) from which *S. Choleraesuis* isolates share PT1, PT2, or PT3 in closely related backgrounds (>95%, Figure 1). On the other hand, it should be noted that there are large distances between these estates; approximately 70 km between E6 and E1 and all of them (E1, E4, E6, and E11) in a radius of 90 km (Figure 3). Apart from the distance, the estates are also separated by several highways (E11 and E4) and a large river (E4). Moreover, one WB isolate from a faraway estate, E12, also shares PT1. When considered together, all these facts suggest that proximity itself is not the main reason for the bacterial relationship and that other factors may be responsible, i.e., human carriers or animal trading, although evidence is lacking. Together with studies showing the spread of *S. Choleraesuis* between WB and domestic pigs [3,18], including asymptomatic WB in Europe [17,37,38], our results show a wildlife reservoir that may spill over to farmed pigs or vice versa.

MDR was detected in 83.3% (10/12) of isolates from IP in this study, higher than the 37.5% (3/8) observed in WB. Similar prevalences of antimicrobial resistance have been reported in *S. Choleraesuis* from domestic pigs in Asia [26,39] but these are higher than previous reports in Europe [5,6]. The data from WB are similar to those previously described by our group [2]. Likewise, the antibiotic groups with higher resistances differ between *S. Choleraesuis* from the analyzed Suidae, showing resistance to ampicillin and sulfonamide for bacteria from IP, and sulfonamide, tetracycline, and streptomycin from WB, although streptomycin resistance had the same ratio in bacteria from both hosts, similarly

to previous reports [2,3,6,40,41]. The lack of resistance found against quinolones and cephalosporins is in accordance with most of the studies from Europe [18,42], although outbreaks or sporadic cases of infections caused by *Salmonella* spp. with resistance to these antibiotics are being increasingly reported [39,43].

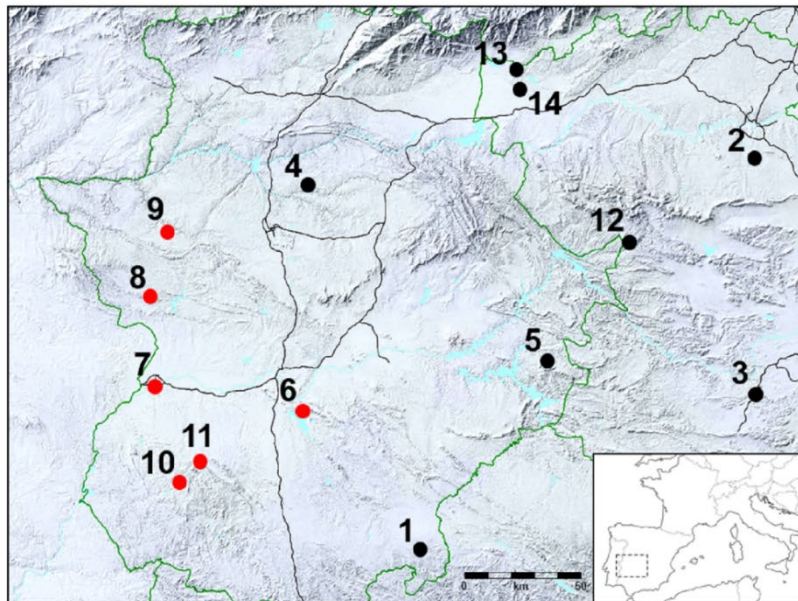


Figure 3. Location of the estates. Geographical map of the southwest Iberian Peninsula displaying the central location of the different estates from where *S. Choleraesuis* suid hosts were sampled. Black dots represent estates where WB were sampled and red dots IP farms. Black lines represent highways and green lines administrative division limits (inset: location of the Iberian Peninsula in southwestern Europe).

Isolates of *S. Choleraesuis* from the two hosts screened in this study, IP and WB, presented quantitative differences in antibiotic resistance found against ampicillin and trimethoprim/sulfamethoxazole, which are higher in the autochthonous pig breed. In contrast, resistance to chloramphenicol, gentamicin or colistin was only detected in IP. This could be due to the fact that many of these antibiotics have been extensively used as growth promoters (beta-lactams) or as prophylactic agents for common diseases such as colibacillosis (colistin) or coccidiosis (sulfonamides) in pig farms for a long time [44], which has been associated with increases in resistant bacteria [45]. Although the IP production system is linked to the dehesa in the last period of fattening, the first stages of breeding mostly take place on farms with semi intensive management systems. It was in these stages where antibiotic abuse has taken place in the past. Considering that frequent use has a stronger association with resistance than sporadic use [46,47], it could explain the lower number of resistances found in WB, as the treatments applied to them, when applied, are scarce and limited to certain short periods of time, which is different to the IP, especially in the early stages of breeding. However, even on estates that did not apply any antibiotic treatment, antibiotic resistances were found in *S. Choleraesuis* from WB. This could be due to the omnivorous behavior of WB, which means they

visit communal refuse sites as well as the proximity of farmed animals like IP in free range production systems, where horizontal transmission of bacteria might occur [48,49].

Resistance genes have been previously detected in *S. Choleraesuis* from pigs and humans [18,28,41], but information is scarce in WB [2]. In this study, we described Class 1 integrons in 42% of the *S. Choleraesuis* isolates from IP and none in WB. Around 41% of these integrons carried a resistance gene cassette. These genetic elements play an important role in the development of antibiotic resistance and have a worldwide distribution in Gram-negative bacteria, colonizing both humans and animals [50]. In *S. Choleraesuis* from pigs, finding these elements in a large number of isolates is very common [39,51]. Interestingly, our study shows that the *sul3* gene occurs in 3 out of 5 *Salmonella* isolates carrying class 1 integrons, although the presence of this integron is more frequently related to the spread of the *sul1* gene [52,53].

Our study reveals that, with exceptions, *S. Choleraesuis* strains from IP or WB carry plasmids which are around 50 kb in size (Figure 1), that isolates lacking antimicrobial resistance did not present additional plasmids, and that bacteria expressing multiple antimicrobial resistance share mega-plasmids, alone or in addition to the 50 kb bands (Table 1). The fact that only closely related isolates share plasmid bands and/or antimicrobial resistance patterns might suggest that clonal spread prevails over horizontal transfer as the common mechanism for dispersion of antimicrobial resistance determinants in the analyzed environment. This study also shows the presence of the colistin-resistant gene *mcr-1* in one of the isolates studied from IP. In this strain, *mcr-1* is carried by a high-molecular weight plasmid (>240 kb), possibly conferring MDR and most probably belonging to the IncHI2-type replicon (different to the recent finding in a human isolate) [35], which could represent a risk for accumulation and/or spread antimicrobial resistance determinants through food chain environments, as for Iberian pigs, and their processed products and humans. Although more studies are needed to determine its prevalence, due to its clinical importance in human health, the presence of these colistin-resistant *Salmonella* isolates should be monitored in order to control their evolution.

4. Materials and Methods

4.1. Bacterial Strains and Animal Sources

The 20 strains of *S. Choleraesuis* isolated from diseased WB ($n = 8$) and IP ($n = 12$) were analyzed at the Clinical Veterinary Hospital (CVH) at the University of Extremadura. The animals were submitted to the CVH by veterinarians or by a hunting management company (Ingulados S.L.) from Cáceres, Spain, in order to determine the cause of death and control disease on their farms/game estates. After routine necropsy and microbiological analysis, those animals with *S. Choleraesuis* were included in the study. Each isolate from WB was derived from a different outbreak (clinical disease in several animals in a short period of time) and estate (E1–E11), whilst IP belonged to six different estates, among which several animals from the same outbreak were sampled in E6 and E7. All fourteen estates were located in the Central West region of the Iberian Peninsula (Figure 3). The IP estates were either breeding farms connected to a large enclosure of the dehesa ecosystem or just an enclosure where IP underwent a fattening process. The fences or walls that surround those enclosures are strong enough to keep the IP inside, but not enough to prevent the entry of WB and their subsequent interactions with IP. The WB came from game estates where they were occasionally fed and subjected to periodical health inspections, where they are captured, analyzed, and returned to their natural environment.

The clinical isolates came from different organs (liver, kidneys, lungs, and spleen) and were cultured on blood agar, MacConkey agar, and xylose–lysine–deoxycholate agar (XLD) under aerobic conditions for 24 h/37 °C. Colonies compatible with *Salmonella* were confirmed using conventional microbiological methodologies and identified as *Salmonella enterica* serovar *Choleraesuis* based on *fljC* gene PCR [54].

4.2. Pulsed-Field Gel Electrophoresis (PFGE) Analysis

Determination of the dendrogram of PFGE clusters among isolates of *S. Choleraesuis* was performed by macrorestriction with XbaI followed by PFGE (Chef-DR[®]III, Bio-Rad; Hercules, CA, USA) according to the PulseNet protocol with pulses oscillating from 2.16 to 63.8 s for 21.5 h [55], and *S. braenderup* was used as the molecular weight standard. The gel was stained with ethidium bromide, and DNA bands were visualized with an UV transilluminator. Images were prepared using Quantity One software (Bio-Rad; Hercules, CA, USA). The different PFGE profiles (PT) were analyzed by InfoQuest FP Software (Version 4.5).

Plasmid size analysis was performed by PFGE under the same conditions described above after incubation of plugs with S1 nuclease (Thermo Fisher, Waltham, MA, USA) according to manufacturer's recommendations. For plasmid hybridization, PFGE was transferred to a nylon membrane and hybridized to a digoxigenin-labeled *mcr-1* probe that was PCR amplified from a previously described *E. coli* strain [36]. Digoxigenin labeling and detection were performed according to manufacturer's instructions (Merck; Darmstadt, Germany).

4.3. Antibiotic Susceptibility Testing

Antibiotic susceptibility was tested by the disc-diffusion method on Mueller–Hinton agar (Kirby–Bauer method) to 13 antimicrobial agents. The following discs (Bio-Rad; Hercules, CA, USA) were used: ampicillin (AMP-10 µg), cefotaxime (CTA-30 µg), ceftiofur (CTF-30 µg), gentamicin (GEN-10 µg), neomycin (NEO-30 µg), streptomycin (STR-10 µg), tetracycline (TET-30 µg), doxycycline (DOX-30 µg), enrofloxacin (ENR-5 µg), nalidixic acid (NAL-30 µg), trimethoprim/sulfamethoxazole (TRS-23.75/1.25 µg), sulfonamide (SUL-200 µg), and chloramphenicol (CHL-30 µg). *E. coli* ATCC 25922 was used as a control strain. Colistin (COL) was not included due to its incompatibility with the disc-diffusion method, but it was tested by MIC determination using the broth microdilution reference method according to ISO 20776–1:2006. Data were interpreted using EUCAST epidemiological cut-off values (www.EUCAST.org).

4.4. Screening for Antibiotic Resistance Genes

After antimicrobial susceptibility testing, resistant strains were screened by PCR for putative determinants with primers and previously described experimental conditions. The following resistance genes were analyzed: *bla*_{TEM} [56], *bla*_{OXA} [57], *tetA* and *tetB* [58], *strA* and *strB* [59], *aadA1* [60], *aph2* [61], *sul1*, *sul2* and *sul3* [62], and *mcr-1* [63]. The Class 1 integrase gene (*int1*) was screened for in all isolates [64] and the presence of a variable region linked to the Class 1 integron was amplified by PCR and sequenced to determine the composition of its gene cassette [65].

5. Conclusions

S. Choleraesuis from IP and WB raised in close environments were found clonally related and transfer antimicrobial resistance determinants mainly by vertical transmission, whereas megaplasmids were detected linked to MDR, including colistin resistance in a single isolate carrying *mcr-1*. The role of *S. Choleraesuis* in the spread of antimicrobial resistance between wild and domestic swine should be carefully surveyed.

Author Contributions: Conceptualization, A.Q. and J.R.; methodology, A.G.; validation, M.G.M., and S.G.Z.; formal analysis, F.E.M.-C. and D.R.; investigation, M.G.M.; resources, W.G.-J. and P.F.-L.; writing—original draft preparation, M.G.M. and A.G.; writing—review and editing, F.E.M.-C. and A.Q.; supervision, A.Q. and J.R.; project administration, A.Q. and J.R.; funding acquisition, A.Q. and J.R. All authors have read and agreed to the published version of the manuscript.

Funding: Work in A.Q. lab is funded by the Spanish Ministry of Economy, Industry and Competitiveness (MINECO, currently MICINN, Grant AGL2016-74882-C3), and the Junta de Extremadura and FEDER (IB16073, IB18047 and GR15075) of Spain. A. G. thanks his current contract (Extremadura government and European Social Fund).

Acknowledgments: The authors thanks Gemma Hannah Louise Gaitskell-Phillips for language editing assistance.

Conflicts of Interest: The authors declare no conflict of interest.

References

1. Khan, M.A.; Cao, L.; Riaz, A.; Li, Y.; Jiao, Q.; Liu, Z.; Wang, H.; Meng, F.; Ma, Z. The Harm of Salmonella to Pig Industry and Its Control Measures. *Int. J. Appl. Agric. Sci.* **2019**, *5*, 24.
2. Gil Molino, M.; Risco Pérez, D.; Gonçalves Blanco, P.; Fernandez Llario, P.; Quesada Molina, A.; García Sánchez, A.; Cuesta Gerveno, J.M.; Gómez Gordo, L.; Martín Cano, F.E.; Pérez Martínez, R. Outbreaks of antimicrobial resistant Salmonella Choleraesuis in wild boars piglets from central-western Spain. *Transbound Emerg. Dis.* **2019**, *66*, 225–233. [[CrossRef](#)]
3. Methner, U.; Heller, M.; Bocklisch, H. Salmonella enterica subspecies enterica serovar Choleraesuis in a wild boar population in Germany. *Eur. J. Wildl. Res.* **2010**, *56*, 493–502. [[CrossRef](#)]
4. Fedorka-Cray, P.J.; Gray, J.T.; Wray, C. Salmonella infections in pigs. In *Salmonella in Domestic Animals*; Wray, C., Wray, A., Eds.; CABI: London, UK, 2000; pp. 191–207.
5. Asai, T.; Namimatsu, T.; Osumi, T.; Kojima, A.; Harada, K.; Aoki, H.; Sameshima, T.; Takahashi, T. Molecular typing and antimicrobial resistance of Salmonella enterica subspecies enterica serovar Choleraesuis isolates from diseased pigs in Japan. *Comp. Immunol. Microbiol. Infect. Dis.* **2010**, *33*, 109–119. [[CrossRef](#)]
6. Pedersen, K.; Sørensen, G.; Löfström, C.; Leekitcharoenphon, P.; Nielsen, B.; Wingstrand, A.; Aarestrup, F.M.; Hendriksen, R.S.; Baggesen, D.L. Reappearance of Salmonella serovar Choleraesuis var. Kunzendorf in Danish pig herds. *Vet. Microbiol.* **2015**, *176*, 282–291. [[CrossRef](#)]
7. Baggesen, D.L.; Christensen, J.; Jensen, T.K.; Skov, M.; Sørensen, G.; Sørensen, V. Outbreak of salmonellosis caused by Salmonella enterica subsp. enterica serovar. choleraesuis var. Kunzendorf (*S. choleraesuis*) on a Danish pig farm. *Dan. Veterinærtidsskrift* **2000**, *83*, 6–12.
8. Conedera, G.; Ustulin, M.; Barco, L.; Bregoli, M.; Re, E.; Vio, D. Outbreak of atypical Salmonella Choleraesuis in wild boar in North Eastern Italy. In *Trends in Game Meat Hygiene*; Paulsen, P., Bauer, A.F.J.M.S., Eds.; Academic Publishers: Wageningen, The Netherlands, 2014; pp. 151–159.
9. Perez, J.; Astorga, R.; Carrasco, L.; Mendez, A.; Perea, A.; Sierra, M. Outbreak of salmonellosis in farmed European wild boars (*Sus scrofa ferus*). *Vet. Rec.* **1999**, *145*, 464–465. [[CrossRef](#)]
10. Müller, M.; Weber, A.; Tucher, R.; Naumann, L. Case report: Salmonella choleraesuis as a cause of haematogenous osteomyelitis in a wild boar (*Sus scrofa*). Fallbericht: Osteomyelitis bei einem wildschwein (*Sus scrofa*) durch salmonella choleraesuis. *Tierarztl. Umsch.* **2004**, *59*, 700–702.
11. Longo, A.; Petrin, S.; Mastorilli, E.; Tiengo, A.; Lettini, A.A.; Barco, L.; Ricci, A.; Losasso, C.; Cibir, V. Characterizing Salmonella enterica serovar Choleraesuis, var. Kunzendorf: A comparative case study. *Front. Vet. Sci.* **2019**, *6*, 316. [[CrossRef](#)]
12. Rodríguez, J.; Silió, L.; Rillo, S.M. El cerdo Ibérico y su sistema de producción. *Anim. Genet. Resour. Resour. Génétiques Anim. Recur. Genéticos Anim.* **1993**, *12*, 89–96. [[CrossRef](#)]
13. Rodríguez-Prieto, V.; Kukielka, D.; Martínez-López, B.; de las Heras, A.I.; Barasona, J.Á.; Gortázar, C.; Sánchez-Vizcaíno, J.M.; Vicente, J. Porcine reproductive and respiratory syndrome (PRRS) virus in wild boar and Iberian pigs in south-central Spain. *Eur. J. Wildl. Res.* **2013**, *59*, 859–867. [[CrossRef](#)]
14. Carrasco García de León, R. Factores de Transmisión de Enfermedades en Ungulados Cinegéticos del Centro y sur de España. Available online: <https://ruidera.uclm.es/xmlui/handle/10578/9753> (accessed on 30 December 2016).
15. Navarro-Gonzalez, N.; Mentaberre, G.; Porrero, C.M.; Serrano, E.; Mateos, A.; López-Martín, J.M.; Lavín, S.; Domínguez, L. Effect of cattle on Salmonella carriage, diversity and antimicrobial resistance in free-ranging wild boar (*Sus scrofa*) in northeastern Spain. *PLoS ONE* **2012**, *7*, e51614. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
16. Vittecoq, M.; Godreuil, S.; Prugnonne, F.; Durand, P.; Brazier, L.; Renaud, N.; Amal, A.; Aberkane, S.; Jean-Pierre, H.; Gauthier-Clerc, M. Antimicrobial resistance in wildlife. *J. Appl. Ecol.* **2016**, *53*, 519–529. [[CrossRef](#)]
17. Gil Molino, M.; García Sánchez, A.; Risco Pérez, D.; Gonçalves Blanco, P.; Quesada Molina, A.; Rey Pérez, J.; Martín Cano, F.E.; Cerrato Horrillo, R.; Hermoso-de-Mendoza Salcedo, J.; Fernández Llario, P. Prevalence of Salmonella spp. in tonsils, mandibular lymph nodes and faeces of wild boar from Spain and genetic relationship between isolates. *Transbound. Emerg. Dis.* **2019**, *66*, 1218–1266. [[CrossRef](#)]

18. Leekitcharoenphon, P.; Sørensen, G.; Löfström, C.; Battisti, A.; Szabo, I.; Wasyl, D.; Slowey, R.; Zhao, S.; Brisabois, A.; Kornschober, C.; et al. Cross-Border Transmission of Salmonella Choleraesuis var. Kunzendorf in European Pigs and Wild Boar: Infection, Genetics, and Evolution. *Front. Microbiol.* **2019**, *10*, 179. [[CrossRef](#)]
19. Chiu, C.H.; Su, L.H.; Chu, C. Salmonella enterica Serotype Choleraesuis: Epidemiology, Pathogenesis, Clinical Disease, and Treatment. *Clin. Microbiol. Rev.* **2004**, *17*, 311–322. [[CrossRef](#)]
20. Chen, P.; Wu, C.; Chang, C.; Lee, H.; Lee, N.; Shih, H.; Lee, C.; Ko, N.; Wang, L.; Ko, W. Extraintestinal focal infections in adults with Salmonella enterica serotype Choleraesuis bacteremia. *J. Microbiol. Immunol. Infect.* **2007**, *40*, 240–247.
21. Jean, S.; Wang, J.; Hsueh, P. Bacteremia caused by Salmonella enterica serotype Choleraesuis in Taiwan. *J. Microbiol. Immunol. Infect.* **2006**, *39*, 358.
22. Chiu, C.-H.; Wu, T.-L.; Su, L.-H.; Chu, C.; Chia, J.-H.; Kuo, A.-J.; Chien, M.-S.; Lin, T.-Y. The Emergence in Taiwan of Fluoroquinolone Resistance in Salmonella enterica Serotype Choleraesuis. *N. Engl. J. Med.* **2002**, *346*, 413–419. [[CrossRef](#)]
23. Ferstl, P.G.; Reinheimer, C.; Jozsa, K.; Zeuzem, S.; Kempf, V.A.; Waidmann, O.; Grammatikos, G. Severe infection with multidrug-resistant Salmonella choleraesuis in a young patient with primary sclerosing cholangitis. *World J. Gastroenterol.* **2017**, *23*, 2086. [[CrossRef](#)]
24. Goldstein, C.; Lee, M.D.; Sanchez, S.; Hudson, C.; Phillips, B.; Register, B.; Grady, M.; Liebert, C.; Summers, A.O.; White, D.G. Incidence of class 1 and 2 integrases in clinical and commensal bacteria from livestock, companion animals, and exotics. *Antimicrob. Agents Chemother.* **2001**, *45*, 723–726. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
25. Bass, L.; Liebert, C.A.; Lee, M.D.; Summers, A.O.; White, D.G.; Thayer, S.G.; Maurer, J.J. Incidence and characterization of integrons, genetic elements mediating multiple-drug resistance, in avian Escherichia coli. *Antimicrob. Agents Chemother.* **1999**, *43*, 2925–2929. [[CrossRef](#)]
26. Chu, C.; Chiu, C.-H.; Wu, W.-Y.; Chu, C.-H.; Liu, T.-P.; Ou, J.T. Large Drug Resistance Virulence Plasmids of Clinical Isolates of Salmonella enterica Serovar Choleraesuis. *Antimicrob. Agents Chemother.* **2001**, *45*, 2299–2303. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
27. Tzeng, J.-I.; Chu, C.-H.; Chen, S.-W.; Yeh, C.-M.; Chiu, C.-H.; Chiou, C.-S.; Lin, J.-H.; Chu, C. Reduction of Salmonella enterica serovar Choleraesuis carrying large virulence plasmids after the foot and mouth disease outbreak in swine in southern Taiwan, and their independent evolution in human and pig. *J. Microbiol. Immunol. Infect.* **2012**, *45*, 418–425. [[CrossRef](#)]
28. Sirichote, P.; Hasman, H.; Pulsrikarn, C.; Schönheyder, H.C.; Samulionienė, J.; Pornruangmong, S.; Bangtrakulnonth, A.; Aarestrup, F.M.; Hendriksen, R.S. Molecular characterization of extended-spectrum cephalosporinase-producing Salmonella enterica serovar Choleraesuis isolates from patients in Thailand and Denmark. *J. Clin. Microbiol.* **2010**, *48*, 883–888. [[CrossRef](#)]
29. Chen, C.-L.; Su, L.-H.; Janapatla, R.P.; Lin, C.-Y.; Chiu, C.-H. Genetic analysis of virulence and antimicrobial-resistant plasmid pOU7519 in Salmonella enterica serovar Choleraesuis. *J. Microbiol. Immunol. Infect.* **2020**, *53*, 49–59. [[CrossRef](#)]
30. Catry, B.; Cavaleri, M.; Baptiste, K.; Grave, K.; Grein, K.; Holm, A.; Jukes, H.; Liebana, E.; Navas, A.L.; Mackay, D. Use of colistin-containing products within the European Union and European Economic Area (EU/EEA): Development of resistance in animals and possible impact on human and animal health. *Int. J. Antimicrob. Agents* **2015**, *46*, 297–306. [[CrossRef](#)]
31. Darwich, L.; Vidal, A.; Seminati, C.; Albamonte, A.; Casado, A.; López, F.; Molina-López, R.A.; Migura-García, L. High prevalence and diversity of extended-spectrum β -lactamase and emergence of OXA-48 producing Enterobacteriales in wildlife in Catalonia. *PLoS ONE* **2019**, *14*, e0210686. [[CrossRef](#)]
32. Guenther, S.; Falgenhauer, L.; Semmler, T.; Imirzalioglu, C.; Chakraborty, T.; Roesler, U.; Roschanski, N. Environmental emission of multiresistant Escherichia coli carrying the colistin resistance gene mcr-1 from German swine farms. *J. Antimicrob. Chemother.* **2017**, *72*, 1289–1292.
33. Rhouma, M.; Beaudry, F.; Thériault, W.; Letellier, A. Colistin in Pig Production: Chemistry, Mechanism of Antibacterial Action, Microbial Resistance Emergence, and One Health Perspectives. *Front. Microbiol.* **2016**, *7*, 1789. [[CrossRef](#)]
34. Lima, T.; Domingues, S.; Da Silva, G.J. Plasmid-mediated colistin resistance in Salmonella enterica: A review. *Microorganisms* **2019**, *7*, 55. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]

35. Santos, C.A.d.; Cunha, M.P.V.; Bertani, A.M.d.J.; de Almeida, E.A.; Gonçalves, C.R.; Sacchi, C.T.; de Paiva, J.B.; Camargo, C.H.; Tiba-Casas, M.R. Detection of multidrug-and colistin-resistant *Salmonella* Choleraesuis causing bloodstream infection. *J. Antimicrob. Chemother.* **2020**, *75*, 2009–2010. [CrossRef]
36. Sánchez-Benito, R.; Iglesias, M.R.; Quijada, N.M.; Campos, M.J.; Ugarte-Ruiz, M.; Pazos, C.; Rodríguez-Lázaro, D.; Garduño, E.; Domínguez, L. *Escherichia coli* ST167 carrying plasmid mobilisable *mcr-1* and *bla*CTX-M-15 resistance determinants isolated from a human respiratory infection. *Int. J. Antimicrob. Agents* **2017**, *50*, 285. [CrossRef] [PubMed]
37. Zottola, T.; Montagnaro, S.; Magnapera, C.; Sasso, S.; De Martino, L.; Bragagnolo, A.; D'Amici, L.; Condoleo, R.; Pisanelli, G.; Iovane, G. Prevalence and antimicrobial susceptibility of *Salmonella* in European wild boar (*Sus scrofa*); Latium Region–Italy. *Comp. Immunol. Microbiol. Infect. Dis.* **2013**, *36*, 161–168. [PubMed]
38. Chiari, M.; Zanon, M.; Tagliabue, S.; Lavazza, A.; Alborali, L.G. *Salmonella* serotypes in wild boars (*Sus scrofa*) hunted in northern Italy. *Acta Vet. Scand.* **2013**, *55*, 1–4. [CrossRef]
39. Chang, C.-C.; Lin, Y.-H.; Chang, C.-F.; Yeh, K.-S.; Chiu, C.-H.; Chu, C.; Chien, M.-S.; Hsu, Y.-M.; Tsai, L.-S.; Chiou, C.-S. Epidemiologic relationship between fluoroquinolone-resistant *Salmonella enterica* serovar Choleraesuis strains isolated from humans and pigs in Taiwan (1997 to 2002). *J. Clin. Microbiol.* **2005**, *43*, 2798–2804. [CrossRef]
40. Donazzolo, C.; Turchetto, S.; Ustulin, M.; Citterio, C.; Conedera, G.; Vio, D.; Cocchi, M. Antimicrobial susceptibility of *Salmonella enterica* subsp. *enterica* serovar Choleraesuis strains from wild boar (*Sus scrofa*) in Italy. In *Game Meat Hygiene*; Paulsen, P.B.A., Smulders, F.J.M., Eds.; Wageningen Academic Publishers: Wageningen, The Netherlands, 2017; p. 307.
41. Hsu, Y.-M.; Tang, C.-Y.; Lin, H.; Chen, Y.-H.; Chen, Y.-L.; Su, Y.-H.; Chen, D.S.; Lin, J.-H.; Chang, C.-C. Comparative study of class 1 integron, ampicillin, chloramphenicol, streptomycin, sulfamethoxazole, tetracycline (ACSSuT) and fluoroquinolone resistance in various *Salmonella* serovars from humans and animals. *Comp. Immunol. Microbiol. Infect. Dis.* **2013**, *36*, 9–16. [CrossRef]
42. Chiu, C.-H.; Su, L.-H. *Salmonella*, Non-Typhoidal Species (*S. choleraesuis*, *S. enteritidis*, *S. hadar*, *S. typhimurium*). Available online: <http://www.antimicrobe.org/b258.asp> (accessed on 28 October 2020).
43. Su, L.H.; Chiu, C.H.; Chu, C.; Ou, J.T. Antimicrobial resistance in nontyphoid *Salmonella* serotypes: A global challenge. *Clin. Infect. Dis.* **2004**, *39*, 546–551. [CrossRef]
44. Prescott, J.F. Sulfonamides, Diaminopyrimidines, and Their Combinations. In *Antimicrobial Therapy in Veterinary Medicine*, 5th ed.; Giguère, S., Prescott, J.F., Dowling, P.M., Eds.; John Wiley & Sons, Inc.: Ames, IA, USA, 2013.
45. Nature, E. The antibiotic alarm. *Nature* **2013**, *495*, 141.
46. Sato, T.; Okubo, T.; Usui, M.; Yokota, S.-I.; Izumiyama, S.; Tamura, Y. Association of Veterinary Third-Generation Cephalosporin Use with the Risk of Emergence of Extended-Spectrum-Cephalosporin Resistance in *Escherichia coli* from Dairy Cattle in Japan. *PLoS ONE* **2014**, *9*, e96101. [CrossRef]
47. Olesen, S.W.; Barnett, M.L.; MacFadden, D.R.; Brownstein, J.S.; Hernández-Díaz, S.; Lipsitch, M.; Grad, Y.H. The distribution of antibiotic use and its association with antibiotic resistance. *Elife* **2018**, *7*, e39435. [CrossRef] [PubMed]
48. Navarro-Gonzalez, N.; Casas-Díaz, E.; Porrero, C.M.; Mateos, A.; Domínguez, L.; Lavín, S.; Serrano, E. Food-borne zoonotic pathogens and antimicrobial resistance of indicator bacteria in urban wild boars in Barcelona, Spain. *Vet. Microbiol.* **2013**, *167*, 686–689. [CrossRef] [PubMed]
49. Navarro-Gonzalez, N.; Castillo-Contreras, R.; Casas-Díaz, E.; Morellet, N.; Porrero, M.C.; Molina-Vacas, G.; Torres, R.T.; Fonseca, C.; Mentaberre, G.; Domínguez, L. Carriage of antibiotic-resistant bacteria in urban versus rural wild boars. *Eur. J. Wildl. Res.* **2018**, *64*, 60. [CrossRef]
50. Fluit, A.; Schmitz, F.J. Resistance integrons and super-integrons. *Clin. Microbiol. Infect.* **2004**, *10*, 272–288. [CrossRef]
51. Lee, M.-F.; Chen, Y.-H.; Peng, C.-F. Molecular characterisation of class 1 integrons in *Salmonella enterica* serovar Choleraesuis isolates from southern Taiwan. *Int. J. Antimicrob. Agents* **2009**, *33*, 216–222. [CrossRef]
52. Sköld, O. Resistance to trimethoprim and sulfonamides. *Vet. Res.* **2001**, *32*, 261–273. [CrossRef]
53. Antunes, P.; Machado, J.; Sousa, J.C.; Peixe, L. Dissemination of sulfonamide resistance genes (*su11*, *su12*, and *su13*) in Portuguese *Salmonella enterica* strains and relation with integrons. *Antimicrob. Agents Chemother.* **2005**, *49*, 836–839. [CrossRef]

54. Chiu, T.H.; Pang, J.C.; Hwang, W.Z.; Tsen, H.Y. Development of PCR primers for the detection of *Salmonella enterica* serovar Choleraesuis based on the *fliC* gene. *J. Food Prot.* **2005**, *68*, 1575–1580. [[CrossRef](#)]
55. Ribot, E.M.; Fair, M.; Gautom, R.; Cameron, D.; Hunter, S.; Swaminathan, B.; Barrett, T.J. Standardization of pulsed-field gel electrophoresis protocols for the subtyping of *Escherichia coli* O157: H7, *Salmonella*, and *Shigella* for PulseNet. *Foodborne Pathog. Dis.* **2006**, *3*, 59–67. [[CrossRef](#)]
56. Briñas, L.; Zarazaga, M.; Sáenz, Y.; Ruiz-Larrea, F.; Torres, C. β -Lactamases in ampicillin-resistant *Escherichia coli* isolates from foods, humans, and healthy animals. *Antimicrob. Agents Chemother.* **2002**, *46*, 3156–3163. [[CrossRef](#)]
57. Chen, X.; Gao, S.; Jiao, X.; Liu, X.F. Prevalence of serogroups and virulence factors of *Escherichia coli* strains isolated from pigs with postweaning diarrhoea in eastern China. *Vet. Microbiol.* **2004**, *103*, 13–20. [[CrossRef](#)]
58. Sengelov, G.; Agerso, Y.; Halling-Sorensen, B.; Baloda, S.B.; Andersen, J.S.; Jensen, L.B. Bacterial antibiotic resistance levels in Danish farmland as a result of treatment with pig manure slurry. *Environ. Int.* **2003**, *28*, 587–595. [[CrossRef](#)]
59. Aarestrup, F.M.; Lertworapreecha, M.; Evans, M.C.; Bangtrakulnonth, A.; Chalmchaiakit, T.; Hendriksen, R.S.; Wegener, H.C. Antimicrobial susceptibility and occurrence of resistance genes among *Salmonella enterica* serovar Weltevreden from different countries. *J. Antimicrob. Chemother.* **2003**, *52*, 715–718. [[CrossRef](#)]
60. Hendriksen, R.S.; Bangtrakulnonth, A.; Pulsrikam, C.; Pomreongwong, S.; Hasman, H.; Song, S.W.; Aarestrup, F.M. Antimicrobial resistance and molecular epidemiology of *Salmonella* Rissen from animals, food products, and patients in Thailand and Denmark. *Foodborne Pathog. Dis.* **2008**, *5*, 605–619. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
61. Rahmani, M.; Peighambari, S.M.; Svendsen, C.A.; Cavaco, L.M.; Agerso, Y.; Hendriksen, R.S. Molecular clonality and antimicrobial resistance in *Salmonella enterica* serovars Enteritidis and Infantis from broilers in three Northern regions of Iran. *BMC Vet. Res.* **2013**, *9*, 66. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
62. Kozak, G.K.; Boerlin, P.; Janecko, N.; Reid-Smith, R.J.; Jardine, C. Antimicrobial resistance in *Escherichia coli* isolates from swine and wild small mammals in the proximity of swine farms and in natural environments in Ontario, Canada. *Appl. Environ. Microbiol.* **2009**, *75*, 559–566. [[CrossRef](#)]
63. Liu, Y.-Y.; Wang, Y.; Walsh, T.R.; Yi, L.-X.; Zhang, R.; Spencer, J.; Doi, Y.; Tian, G.; Dong, B.; Huang, X. Emergence of plasmid-mediated colistin resistance mechanism MCR-1 in animals and human beings in China: A microbiological and molecular biological study. *Lancet Infect. Dis.* **2016**, *16*, 161–168. [[CrossRef](#)]
64. Leverstein-van Hall, M.; Paauw, A.; Box, A.; Blok, H.; Verhoef, J.; Fluit, A. Presence of integron-associated resistance in the community is widespread and contributes to multidrug resistance in the hospital. *J. Clin. Microbiol.* **2002**, *40*, 3038–3040. [[CrossRef](#)]
65. Levesque, C.; Piche, L.; Larose, C.; Roy, P.H. PCR mapping of integrons reveals several novel combinations of resistance genes. *Antimicrob. Agents Chemother.* **1995**, *39*, 185–191. [[CrossRef](#)]

Publisher's Note: MDPI stays neutral with regard to jurisdictional claims in published maps and institutional affiliations.



© 2020 by the authors. Licensee MDPI, Basel, Switzerland. This article is an open access article distributed under the terms and conditions of the Creative Commons Attribution (CC BY) license (<http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>).

5.4. Propagación de aislados de *Salmonella spp.* resistentes a los antimicrobianos en jabalíes y su relación con prácticas de manejo.

Trabajo en revisión TBED-OA-720-21: Transboundary and emerging diseases;. *Dissemination of antimicrobial resistant isolates of Salmonella spp. in wild boars and its relationship with management practices.*

La resistencia frente a los antimicrobianos (RAM) es un fenómeno con un gran impacto clínico a nivel mundial, por lo que controlar su propagación es fundamental para optimizar la eficacia de los antibióticos. Los miembros del género *Salmonella* están ampliamente distribuidos entre diversos hospedadores y los jabalíes, debido a sus frecuentes interacciones con el ganado o la basura humana, pueden jugar un papel importante en su circulación entre las áreas periurbanas y el medio ambiente. Dado que la población de estos animales está aumentando debido a su manejo en determinados cotos de caza o la ausencia de depredadores naturales, el objetivo del presente trabajo es identificar los determinantes de RAM expresados y/o presentes en aislados de *Salmonella spp.* de poblaciones de jabalíes y determinar el posible papel en su selección de indicadores relacionados con la gestión cinegética de fincas ubicadas en el centro-oeste de España. La detección de *Salmonella spp.* se llevó a cabo en 121 jabalíes, de los cuales 86 animales procedían de animales cazados en montería y 35 fueron encontrados ya muertos, todos ellos en un total de 24 fincas. Las características de la RAM se determinaron mediante pruebas de susceptibilidad a los antibióticos y detección de sus determinantes genéticos, evaluándose el efecto de la suplementación alimentaria, la proximidad del ganado, la existencia de un vallado y la densidad de los animales.

Los resultados mostraron una gran diversidad de serotipos, aunque la mayoría de los aislados pertenecían a *S. enterica* subsp. *enterica* (57%). Dentro de esta subespecie, los más frecuentes eran *S. Choleraesuis* (48%) y *S. Typhimurium* (10%). Del total de las cepas se observó que el 75.2% presentaban resistencia frente a al menos un antimicrobiano y que el 15.7% eran multirresistentes (MR, definido como resistencia frente a 4 o más antimicrobianos). Considerando únicamente *S. enterica* subsp. *enterica*, se detectó RAM en el 82.6% y MR en el 26.1% de los aislados, siendo *S. Typhimurium* el serotipo con mayor prevalencia de cepas resistentes. En general la sulfonamida (85.7%), estreptomina (46.2%), tetraciclina (25.3%) y ampicilina (17.6%) fueron los

antimicrobianos frente a los que se detectó mayor resistencia. Por el contrario, menos del 10% de las cepas presentaron resistencia frente al ácido nalidíxico, cloranfenicol, neomicina y cefalosporinas, solamente se detectó resistencia intermedia frente a enrofloxacin y gentamicina, y el único antimicrobiano completamente efectivo con todos los aislados fue la colistina. Una gran parte de esta expresión fenotípica pudo correlacionarse consistentemente con los determinantes génicos detectados, presentando el 53.8% de los aislados al menos un gen determinante de RAM, e incluso el 18.7% contenían cuatro o más genes, coincidiendo con las cepas que presentaban MR. Las familias de antimicrobianos que presentaban una mayor asociación entre fenotipo y genotipo de la RAM fueron fenicoles (83.3%), tetraciclinas (78.3%), β -lactámicos (75%) y quinolonas (71.4%), a diferencia de lo que se observó con las sulfonamidas, ya que solamente en el 34.6% de las cepas que expresaron resistencia frente a estos antimicrobianos se detectó alguno de los genes escrutados.

En cuanto a los elementos genéticos móviles identificados, el integrón de clase 1 (*int1*) fue detectado en el 5.8% de los aislados, de los cuales el 57.1% llevaban asociados casetes génicos. Los replicones plasmídicos estaban presentes en el 38.8% de los aislados, apareciendo con mayor frecuencia HI1, FIIA y FIA. Aunque no se observó una clara asociación entre replicones y determinantes de resistencia, más del 40% de los aislados que presentaban *strA*, *strB* y *tetA* fueron también positivos a HI1/FIIA. No se observó tampoco ninguna asociación entre replicones y subespecies o serotipos.

Por último, observamos que la RAM está asociada a fincas en las que se suplementa la alimentación de los animales, presentaban además vallado perimetral, mientras que ni la densidad de los animales ni la presencia de ganado en la finca parecen guardar ninguna relación.

1 TITLE

2 Dissemination of antimicrobial resistant isolates of *Salmonella spp.* in wild boars and its

3 relationship with management practices

4 **Running Title:** Antibiotic resistance in *salmonella spp.* from wild boars.

5

6 **Authors:** María Gil-Molino*¹, Pilar Gonçalves², David Risco²⁻³, Francisco Eduardo Martín-

7 Cano⁴, Alfredo García⁵, Joaquín Rey¹, Pedro Fernández-Llario², Alberto Quesada⁶⁻⁷.

8

9 **Author's affiliation:**

10 ¹ Unidad de Patología Infecciosa. Facultad de Veterinaria, Universidad de Extremadura, 10003,

11 Spain.

12 ² Innovación en Gestión y Conservación de Ingulados S.L. Cáceres, 10004, Spain.

13 ³ Neobeitar S.L. Cáceres, 10005, Spain.

14 ⁴ Área de Reproducción, Facultad de Veterinaria, Universidad de Extremadura, 10003, Spain.

15 ⁵ Área de Producción Animal, CICYTEX-La Orden, Badajoz, Spain.

16 ⁶ Departamento de Bioquímica, Biología Molecular y Genética, Facultad de Veterinaria,

17 Universidad de Extremadura, Cáceres, Spain.

18 ⁷ INBIO G+C, Universidad de Extremadura, Cáceres, Spain.

19 * Corresponding author: mariamilgm@unex.es Unidad de Patología Infecciosa, Facultad de

20 Veterinaria, Universidad de Extremadura, 10003, Spain.

21 **Acknowledgements:**

22 This research has been sponsored by the Spanish Ministry of Economy, Industry and

23 Competitiveness (MINECO, currently MICINN, Grant AGL2016-74882-C3), and the Regional

24 Government of Extremadura (Consejería de Economía e Infraestructuras) through the research

25 projects IB16073, IB18047, GR15075 and IB20181, as well as by the European Regional

26 Development Funds (FEDER). A. G. thanks his current contract (Government of Extremadura

27 and European Social Fund)

28 **SUMMARY**

29 Antimicrobial resistance (AMR) is a global concern and controlling its spread is critical for the
30 effectiveness of antibiotics. The members of the genus *Salmonella* are broadly distributed, and
31 wild boars may play an important role in its circulation between peri-urban areas and
32 environment, due to its frequent interactions either with livestock or human garbage. As the
33 population of these animals is rising due to its management in certain hunting estates or the
34 absence of natural predators, the aim of the present work is to identify the mechanisms of AMR
35 present and/or expressed in *Salmonella spp.* from wild boar populations and to determine the
36 possible role of management-related factors applied to different game states located in central
37 Spain. The detection of *Salmonella spp.* was carried out in 121 dead wild boars from 24 game
38 estates, and antimicrobial resistance traits were determined by antibiotic susceptibility testing and
39 screening for their genetic determinants. The effects of feeding supplementation, the proximity
40 of livestock, the existence of a surrounding fence and the density of wild boar on the AMR of the
41 isolates were evaluated. The predominant subspecies and serovar found were *S. enterica* subsp.
42 *enterica* (n=69) and *S. Choleraesuis* (n=33), respectively. The other subspecies found were *S.*
43 *enterica* subsp. *diarizonae*, *S. enterica* subsp. *salamae* and *S. enterica* subsp. *houtenae*. AMR was
44 common among isolates (75.2%) and 15.7% showed multi drug resistance (MDR). Resistance to
45 sulphonamide was the most frequent (85.7%), as well as *sul1* was the AMR determinant most
46 commonly found. Plasmids appeared in 38.8% of the isolates, with IncHI1 being the replicon
47 detected with the highest prevalence. The AMR of the isolates increased when the animals were
48 raised with feeding supplementation and enclosed by fences around the estates.

49

50 **KEYWORDS**

51 *Salmonella*, antimicrobial resistance (AMR), wild boar, AMR determinant, management

52 INTRODUCTION

53 The spread of antimicrobial resistance (AMR) in *Salmonella* strains, especially multidrug
54 resistant (MDR) strains, has become a major health problem that involves the interaction between
55 humans, livestock and wildlife (Karp et al., 2017; Torres et al., 2020). The study of wild species
56 as environmental sentinels of AMR has acquired increasing consideration worldwide (Darwich
57 et al., 2019; Furness, Campbell, Zhang, Gaze, & McDonald, 2017; Hassell et al., 2019; Martín-
58 Maldonado et al., 2020; Swift et al., 2019; Vittecoq et al., 2016). Several studies have shown that
59 wildlife carries antimicrobial-resistant bacteria in a wide range of habitats relating AMR, hosts,
60 bacterial species and their geographic locations (Botti et al., 2013; Dias et al., 2015; Gil Molino,
61 Risco Perez, et al., 2019; Gonçalves et al., 2013; Radhouani et al., 2013; Zottola et al., 2013), a
62 phenomenon that can impact human health through zoonotic diseases and/or emerging resistant
63 pathogens (Radhouani et al., 2014).

64 The proximity of human activities to wildlife influences their microbiological communities,
65 making them more prone to acquire AMR (Allen et al., 2010; Nora Navarro-Gonzalez et al., 2013;
66 Nora Navarro-Gonzalez et al., 2018). Additionally, the feeding habits, climate and migration are
67 also environmental factors contributing to the dissemination of resistant bacteria in wildlife
68 (Vittecoq et al., 2016). Among this, the wild boar is highly adapted to the human presence, its
69 population has increased considerably in recent decades throughout Europe, and it has become a
70 regular visitor to communal garbage dumps as well as to animal farms in search of food (Torres
71 et al., 2020). The consumption of waste from those places may be linked to antimicrobial
72 resistance carriage (Literak et al., 2010) and could represent a major epidemiological link between
73 domestic animals, humans and wildlife (N. Navarro-Gonzalez et al., 2012; Vittecoq et al., 2016).
74 The rapid dissemination of resistance genes and their accumulation in MDR bacteria present in
75 different hosts has been largely attributed to inter- and intraspecific DNA exchange, mainly
76 through the horizontal transfer of integrons and/or plasmids carrying linked determinants against
77 different families of antibiotics (Fluit & Schmitz, 2004).

78 Several studies have focused the phenotypic characterization of AMR in *Salmonella* spp. isolates
79 recovered from wild boar (Dias et al., 2015; Methner, Heller, & Bocklisch, 2010; Nora Navarro-

80 Gonzalez et al., 2013; N. Navarro-Gonzalez et al., 2012; Razzuoli et al., 2021; Zottola et al.,
81 2013). However, little is still known about the interactions between environmental and genetic
82 determinants of AMR in bacteria from this animal species since available information is limited
83 to a few screenings (Caleja et al., 2011b; Gil Molino, Risco Perez, et al., 2019; Literak et al.,
84 2010).

85 Therefore, the aim of the present work was to identify the mechanisms of AMR present and/or
86 expressed in *Salmonella spp.* from wild boar populations and to determine the possible role of
87 management-related factors applied to different game states located in central Spain.

88 MATERIAL AND METHODS

89 1. Game estates

90 The main characteristics of the 24 game estates included in this study are listed in table 1. Briefly,
91 all the estates were located in the south-west quadrant of the Iberian Peninsula and, depending on
92 its degree of human intervention, were categorized as estates with or without management. The
93 latter did not have any human intervention aimed to influence the wild boar populations present
94 in the estate and the estates with management included those on which the wild boars populations
95 were controlled by census and certain management measures were applied occasionally (Feeding
96 supplementation, vaccination, grouping of animals...). The density of animals in each of the
97 estates was categorized in either Medium-Low, High or Very high (1-20, 21-40, >40 wild
98 boars/100ha) according to the most common densities in central-south Spain, which are greater
99 than those from the rest of Europe (Gonçalves Blanco, 2017). The estates were categorised also
100 by the presence of a surrounding hunting fence that prevents the free circulation of animals.

101 2. Sampling and bacteria.

102 A total of 121 isolates of *Salmonella spp.* were obtained from dead wild boars originating from
103 24 different game estates (Table 1) over a 5-year period (2010-2015). The wild boars were either
104 killed by hunting parties or found dead by the estate gamekeepers (86 hunted/35 found dead).
105 Samples from these animals were obtained and sent to the Clinical Veterinary Hospital (CVH) of
106 the University of Extremadura by a hunting management company (Ingulados S.L. Cáceres,
107 Spain). Samples were split between different studies, including the present one (Gil Molino,

108 García Sánchez, et al., 2019; Gil Molino, Risco Perez, et al., 2019), so the sampling procedure
109 differed between the hunted specimens and the wild boars found dead on the estates. The latter
110 included samples from the lungs, liver, spleen, kidneys, and intestinal content, while the other
111 procedure included colon swabs, submandibular lymph nodes and tonsils. As no information
112 about prevalence of *Salmonella* in the wild boar was intended in this study, the authors considered
113 the inclusion of a larger number of samples beneficial, in order to increase the impact of the
114 results.

115 The isolation method for the colon swabs, intestinal content, tonsils, and lymph nodes consisted
116 of the incubation of the swab or 1g of content/tissue in sterile sampling bags with 10 ml of
117 buffered peptone water (1/10 dilution in BPW according to ISO 6579:2002) at 37°C for 24 hrs;
118 thereafter, 0.1 ml was inoculated in enrichment broth (Rappaport-Vassiliadis) and kept at 42°C
119 for 24 hrs. Then, 10 µl of broth was inoculated onto two plates of selective media, xylose lysine
120 dioxycholate agar (XLD) and xylose lysine tergitol 4 (XLT4). The plates were incubated for 48
121 hrs at 37°C. In the case of the samples from the lungs, liver, spleen and kidneys, they were cultured
122 on blood agar, McConkey agar, and xylose lysine dioxycholate agar (XLD) in aerobic conditions
123 for 24 hrs at 37°C.

124 Identification of morphologically compatible colonies (1 per animal) was carried out by
125 automated bacterial identification (Phoenix 100, Becton Dickinson) and confirmed by detection
126 of the *invA* gen by PCR (Hoorfar, Ahrens, & Rådström, 2000).

127 **AMR, genetic determinants and plasmid replicons.**

128 Antibiotic susceptibility testing was performed in all 121 *Salmonella* isolates by disk diffusion in
129 agar of 13 antibiotics whereas polymyxin (colistin) resistance was screened by inoculating
130 Mueller Hinton II plates containing 2 mg/L colistin, its clinical breakpoint according to the
131 Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI, 2020b). The following discs (Bio-Rad®) were
132 used: ampicillin (10 µg); cefotaxime (30 µg); ceftiofur (30 µg) gentamicin (10 µg); neomycin (30
133 µg); streptomycin (10 µg); tetracycline (30 µg); doxycycline (30 µg); enrofloxacin (5 µg);
134 nalidixic acid (30 µg); trimethoprim/sulphamethoxazole (23,75/1,25 µg); sulphonamide (200 µg);
135 and chloramphenicol (30 µg), with *Escherichia coli* ATCC 25922 being used as control strain.

136 Isolates were classified as susceptible, intermediate or resistant according to the Clinical and
137 Laboratory Standards Institute (CLSI, 2020a, 2020b). Any isolate resistant to ≥ 4 antimicrobials
138 was considered as MDR. Multiple Antibiotics Resistance index (MAR) was calculated as the ratio
139 between the number of antibiotics to which the organism is resistant and the total number of
140 compounds tested (P. H. Krumpferman, 1983).

141 The presence of AMR-linked sequences was verified in all isolates by specific PCRs for: *bla*_{OXA}
142 (Chen, Gao, Jiao, & Liu, 2004), *bla*_{TEM}, *bla*_{SHV} and *bla*_{CTXM} (Monstein et al., 2007) *tetA*, *tetB*,
143 *strA*, *strB*, *aadA* (Rahmani et al., 2013), *aph2* (Aarestrup, Lertworapreecha, et al., 2003), *su1*,
144 *su2* and *su3* (Kozak, Boerlin, Janecko, Reid-Smith, & Jardine, 2009), and the class 1 integrase
145 gene *Int1* and associated gene-cassettes (Leverstein-van Hall et al., 2002). The quinolone
146 resistance determinant regions (QRDRs) of *gyrA* and *gyrB* genes from isolates sharing low
147 susceptibility to nalidixic acid were amplified by PCR (Randall, Coldham, & Woodward, 2005).
148 DNA fragments were sequenced (STABVIDA, Caparica, Portugal) and analysed to confirm their
149 identity or, for topoisomerase encoding genes, to detect polymorphisms involved in AMR. In
150 addition, the presence of any among the 18 plasmid replicons frequently found in
151 *Enterobacteriaceae* was screened by using the three multiplex panels PCR described elsewhere
152 (Johnson et al., 2007), with positive controls kindly provided by Alessandra Carattoli (Istituto
153 Superiore di Sanità, Rome, Italy).

154 3. Statistics.

155 *Salmonella enterica* subsp. *enterica* Choleraesuis The effects on AMR of certain management
156 measures (Feeding supplementation, livestock and surrounding fence) and the wild boar density
157 were evaluated by comparing the Phenotypic Resistance Intensity (PRI) or the Genetic Resistance
158 Intensity (GRI) between groups subjected to different management conditions. PRI and GRI are
159 artificial indexes obtained by the sum for a given isolate of the number of different traits involved
160 in resistance, either phenotypes (PRI) or genotypes (GRI). Thus, 0 attributes gives an index of 1,
161 whereas isolates with 1, 2 or 3 resistance traits have an index of 2 and isolates with 4 or more
162 have an index of 3. Differences between groups were evaluated by Mann-Whitney tests and *P*
163 values smaller than 0.05 were considered significant. Two-tailed tests were always applied except

164 when evaluating the effect of the presence of plasmids on the AMR of the isolates. As the only
165 possible result was an increase in AMR or no change, a one-tailed test was applied (Motulsky,
166 2016).

167 Variance Analysis followed by the Dunn's test evaluated the differences in the number of AMR
168 per isolate between subspecies and between serovars. The significance threshold used was *P*
169 values smaller than 0.05. Correlation between the number of plasmids and the presence of AMR
170 in the isolates was studied with Pearson *r*. Results were considered significant when *P* values
171 were less or equal to 0.05.

172 RESULTS

173 *Serotype diversity of S. enterica from wild boar*

174 The 121 isolates from wild boar belong to four of the six subspecies of *S. enterica* and represent
175 44 serovars (Fig. 1): *S. enterica* subsp. *enterica* (*n* = 69 strains, 57% of isolates), 22 serovars; *S.*
176 *enterica* subsp. *diarizonae* (*n* = 34 strains, 28.1%), 14 serovars; *S. enterica* subsp. *salamae* (*n* =
177 17 strains, 14%), 7 serovars; and *S. enterica* subsp. *houtenae* (*n* = 1 strain, 0.8%). The two main
178 serovars found within each subspecies were: *enterica*, *S. Choleraesuis* (*n* = 33, 48%) and *S.*
179 *Typhimurium* (*n* = 7, 10%); *diarizonae*, 38:z10:z53 and 48:i:z53; and *salamae*, 4, 12:b:- and
180 42:b:e,n,x,z,15. The only isolate present in the subspecies *houtenae* was serotyped as 45:z4,z23:-
181 .

182 *AMR of S. enterica from wild boar*

183 Antibiotic resistance was frequently found in the 121 strains analysed (Figure 2), since 91 (75.2%)
184 of them showed resistance to at least one antimicrobial. 19 isolates (15.7%) presented a MDR
185 phenotype and one unique isolate (*Salmonella* Bredeney 4,12:1,v:1,7) was resistant to the 9
186 antibiotics tested. In addition, 26 isolates (21.5%) shared a multiple antibiotic resistance index
187 (MAR, the ratio between AMR and the number of antibiotics tested) higher than 0.2, which
188 indicates that those isolates are likely to come from a source exposed to high use of antibiotics
189 (PAUL H Krumperman, 1983). Regarding the data for resistance by subspecies and serotypes,
190 subspecies *enterica* presented both the highest rate of isolates carrying MDR or AMR (26.1% or
191 82.6%, respectively; Figure 2) as well as the highest number of resistances per isolate (2.28±0.24.

192 Fig. 3A). Particularly, those isolates from the Typhimurium serotype, of special relevance to
193 human health (especially its monophasic variant; (EFSA & ECDC, 2020; WHO, 2019), reached
194 on average more than 4 resistances per isolate (Fig. 3B).

195 The occurrence of AMR depends strongly on antibiotic nature (Table 2), with maximal resistance
196 found to sulphonamide (85.7%) followed by streptomycin (46.2%), tetracycline (25.3%) and
197 ampicillin (17.6%). In contrast, AMR rates to nalidixic acid, chloramphenicol, neomycin or
198 cephalosporins (cefotaxime and ceftiofur) were lower than 10%. No strain was found to be
199 resistant to polymyxin E (colistin) and the antibiograms for gentamicin and enrofloxacin showed
200 only intermediate sensitivity. The high prevalence of intermediate sensitivity to streptomycin and
201 neomycin (46.2% and 25.3% respectively) is noteworthy, which is not counted as true AMR
202 although it could compromise antibiotic efficacy (see below).

203 Among 26 AMR profiles found (Table 3), the most frequent was SUL (22%), followed by SUL-
204 TRS (18.7%) and DOX-STR-SUL-TET (11%). No association was found between subspecies
205 and specific AMR profiles.

206 *AMR determinants: genotype-phenotype relationships of S. enterica from wild boar*

207 Detection of AMR determinants revealed that 49 out of the 91 resistant isolates (53.8%) contained
208 at least one genetic marker and that, among them, 17 isolates (18.7%) carried four or more (Table
209 4). The most frequent genotype profile was *sul1*, followed by *gyrA*, and *strA-strB-sul2-tetA* (Table
210 4), although not all isolates with resistance genes developed phenotypic resistance, since 12
211 isolates carried AMR determinants that were not expressed (Table 2 and Supplementary Table).
212 Particularly interesting is the case of the *aadA1* gene, detected in 5 isolates but conferring
213 resistance to streptomycin in only one of them (Table 2). Phenicol and tetracyclines were the
214 antimicrobial groups whose resistances were expressed higher with, respectively, 83.3% and
215 78.3% of resistant isolates among those carrying AMR determinants, followed by β -Lactams and
216 quinolones, 75% and 71.4%, whereas resistance to sulphonamides was only expressed in 34.6%
217 of the isolates carrying *sul* genes (Table 2).

218 Screening the QRDR of genes encoding topoisomerase II, where mutations that confer nalidixic-
219 acid resistance are frequently located, single missense polymorphisms producing *gyrA* mutations

220 D87N or D87Y were found in two *S. Enteritidis* and three *S. Choleraesuis* isolates, among the
221 seven isolates sharing resistance to nalidixic-acid and intermediate sensibility to enrofloxacin
222 (Table 2, Supplementary Table), while *gyrB* mutations were not observed.

223 The *Int1* element was rarely detected (7/121, 5.8%) and even less frequently *int1*-associated gene
224 cassette (GC) (4/7, 57.1% of *Int1*+) among *S. enterica* isolates from wild boar (Table 2). The
225 *dfrA1-aadA1* containing GC was found in two isolates, *S. Typhimurium* and 48:i:z53, whereas
226 GC containing single genes were linked to *int1* in two isolates, an *S. Bredeney* carrying *aadA1*
227 and an *S. Typhimurium* 1,4,5,12:i:1,2 that presented *aadA1* and *bla_{PER}* in two separated elements.
228 In addition, five out of the six isolates expressing resistance to chloramphenicol carried *int1*
229 (Table 2), presumably because this mobilization element is usually linked to the *Salmonella*
230 genomic island I (SGII), a plastic region of the chromosome to which the *floR* gene conferring
231 phenicol resistance is associated (Carattoli, 2001).

232 Replicon typing revealed that 47 out of the 121 isolates (38.8%) presented PCR signatures from
233 between 1 to five plasmids (Supplementary Table), which were: HI1, found in 34 isolates; FIIA,
234 15; FIA, 6; I1, 5; B/O, 4; K/B, 4; HI2, 4; FIB, 3; FIC, 2; W, 2; Y, 2; A/C, 1; N, 1; whereas P, T,
235 Frep, X and L/M replicons were not found in any isolate. Interestingly, only those isolates
236 carrying the FIIA incompatibility group presented more AMR and resistance genes per isolate
237 than the average (AMR per isolate: 2.60±0.40 vs 1.85±0.16 //Res. genes per isolate: 2.33±0.55
238 vs. 1.10±0.16 // $p<0.05$ Mann-Whitney test). Although there was no clear association between
239 replicons and the presence of certain resistance genes, it is noteworthy that more than 40% of the
240 isolates with *strA*, *strB* or *tetA* resistance genes, also presented HI1 or FIIA plasmids. The number
241 of plasmids and AMR per isolate was not positively correlated, nor was any association detected
242 between replicons, subspecies, or particular serotypes.

243 *Management conditions and AMR of S. enterica from wild boar*

244 AMR of *S. enterica* isolates from wild boars increased when screened in animals grown under
245 feeding supplementation and enclosed by fences around the estates. The intensities of resistance,
246 both genotypic and phenotypic (See Material and Methods section) were higher in fenced estates
247 or in those where feeding supplementation was applied (Figure 4A and B). In contrast, neither the

248 density of animals nor their proximity to livestock significantly were related to AMR (Figure 4C
249 and D).

250 DISCUSSION

251 This study extends the knowledge on the spread of AMR by *Salmonella* spp. isolated from wild
252 boars in central Spain, contrasting phenotype expression from genotype traits found in 121
253 bacterial strains. The number of isolates studied make this the most extensive study regarding
254 AMR and its genetic determinants in *Salmonella* spp. performed in European wild boar (Caleja
255 et al., 2011a; Madalena Vieira-Pinto et al., 2011). More than half of these 121 strains were
256 classified as *S. enterica* subsp. *enterica*, which is in accordance with previous studies in this
257 species (Chiari, Zanoni, Tagliabue, Lavazza, & Alborali, 2013; Mentaberre et al., 2013; N.
258 Navarro-Gonzalez et al., 2012; M. Vieira-Pinto et al., 2011) and also reported by EFSA (European
259 Food Safety, European Centre for Disease, & Control, 2019).

260 Our results evidence that AMR is a major character in *Salmonella* isolates from wild boars (75%)
261 in line with previous studies in Portugal (Caleja et al., 2011b; Pinto et al., 2010) or in Italy
262 (Bonardi et al., 2019; Zottola et al., 2013), although much lower rates have been reported in other
263 regions of Spain (Nora Navarro-Gonzalez et al., 2013; N. Navarro-Gonzalez et al., 2012).
264 Common environmental factors like climate, ecology and/or animal management practices could
265 explain the similar prevalence observed between AMR of bacteria isolated from Central-Western
266 Spain and that reported in studies carried out in Portugal. The western part of Spain is much closer
267 to Portugal than to the north-eastern part of the country, where the other Spanish studies were
268 conducted. In addition, the prevalence of *Salmonella* found in the wild boar in these studies was
269 very low, which does not favour significant results regarding AMR in *Salmonella* in the wild boar
270 population being obtained.

271 The association of AMR traits in the same cell giving rise to MDR strains is a matter of serious
272 concern (EFSA & ECDC, 2020) and given the fast expansion of wild boars all over Europe and
273 their increasing interactions with humans, it has been recommended to monitor the carriage of
274 MDR bacteria by this animal species in order to prevent future sanitary problems (Torres et al.,
275 2020). Following this, we have detected MDR *Salmonella* from wild boar, with an intermediate

276 rate (15.7%) compared to those reported for Portugal (68.2%; (Caleja et al., 2011b) and Italy
277 (9.6%-5.5%; (Cilia et al., 2021; Zottola et al., 2013). On the other hand, considering wild boar as
278 sentinel species for AMR and particularly MDR in their environment, our results could indicate
279 a better health status of these settings when compared with *Salmonella* isolates from humans or
280 pigs, which average 28.5% and 51.3% in the EU (EFSA & ECDC, 2020). Indeed, contact with
281 humans or livestock has been pointed out as a risk factor for the spread of AMR in the
282 environment (Nora Navarro-Gonzalez et al., 2018; Skurnik et al., 2006). These percentages of
283 MDR should be compared carefully, as some cross-resistances could appear when including more
284 than one agent from the same antimicrobial family. Once this was taken into account, the
285 percentage of MDR isolates in the present study was 7.4%.

286 Apart from human or livestock contact, prevalence of *Salmonella* in wild boars could be related
287 to factors like animal age, animal density, geographical zone, season or sampling strategy
288 (Bonardi et al., 2019; Gil Molino, García Sánchez, et al., 2019; Magnino et al., 2011; N. Navarro-
289 Gonzalez et al., 2012; Sannö, Rosendal, Aspán, Backhans, & Jacobson, 2018). However, very
290 few studies analyse the influence of such factors over the presence of AMR in *Salmonella* in wild
291 boars. This work present evidence indicating that cohabitation with livestock did not modify
292 AMR of *Salmonella* isolates from wild boar, in agreement with other study also performed in
293 Spain (N. Navarro-Gonzalez et al., 2012). It has been suggested that additional factors might
294 contribute to the spread of bacteria between far away livestock and wild boar, like small rodents
295 or birds, which could also be attracted to the livestock feed and could be eaten by wild boars or
296 transmit them bacteria by faeces due to its omnivorous behaviour and rooting habits (N. Navarro-
297 Gonzalez et al., 2012; Schley & Roper, 2003). Animals living in urban areas show higher levels
298 of antimicrobial resistance than those living in remote areas, due to the possibility of contact with
299 resistant bacteria and selective agents (Radhouani et al., 2014).

300 This study, besides the proximity to livestock, integrates management data from the game estates
301 where the wild boars were hunted or captured. In Spain, especially in the Central and Southern
302 regions, it is common to apply management measures to control wild boar populations, their
303 sanitary status and the quality of the hunting trophies (Cano-Terriza et al., 2018). According to

304 data presented in this work, the temporary concentration of animals is a key factor for the spread
305 of AMR *Salmonella*, which were more prevalent in animals raised in fenced estates and/or
306 receiving supplementary feeding, following the trend of *Salmonella* prevalence in this species
307 that has been explained by the contamination of the same frequented area favoured by the
308 restriction of the animal movement (Ortega et al., 2020).

309 Regarding the serotypes found in the samples from the present study, the high percentage of
310 resistant isolates in *S. Typhimurium* is remarkable, more specifically in its monophasic variant,
311 which represents 3 out of the 7 isolates of *S. Typhimurium*. This serotype, and especially its
312 monophasic variant, has been reported by the EFSA as one of the serotypes with the highest
313 proportion of resistance and MDR isolates (EFSA & ECDC, 2020). Such high resistance rates
314 have previously been described in wild boar (Razzuoli et al., 2021; Zottola et al., 2013), however,
315 the presence of *S. Choleraesuis* is an unusual finding only mentioned previously in one study with
316 just one isolate of this serotype (Zottola et al., 2013). The frequent appearance of *S. Choleraesuis*
317 among the isolates of the present study is in line with the proportion of wild boars analysed with
318 septicaemic processes, something uncommon in previous studies in this species. The high
319 proportion of AMR observed in this serotype is in accordance with previous reports in this species
320 (Donazzolo C., 2017; Gil-Molino et al., 2020), although some studies did not find AMR in *S.*
321 *Choleraesuis* from European wild boars (Leekitcharoenphon et al., 2019). The frequency of
322 appearance of AMR in the other subspecies from this study was lower than in *S. enterica* subsp.
323 *enterica*, but it should be noted that some of the isolates from subspecies *salamae* or *houtenae*
324 were MDR, as recently reported by other authors (Razzuoli et al., 2021).

325 The AMR most frequently observed in this study were in accordance with those reported in
326 *Salmonella* isolates from swine in Spain (P. Antunes, Mourao, Pestana, & Peixe, 2011; Arguello
327 et al., 2013; Astorga et al., 2007; García-Feliz et al., 2008; Gomez-Laguna et al., 2011; Mejia et
328 al., 2006) and other locations (Bolton, Ivory, & McDowell, 2013; Bonardi et al., 2013; Frye et
329 al., 2011). Resistances against compounds such as sulphonamides, streptomycin or tetracyclines
330 are generally attributed to their misuse as growth promoters in the past (Aragaw et al., 2007;
331 Threlfall et al., 2003).

332 The predominant resistant patterns detected in this work were SUL and TRS-SUL, similarly to
333 previously reported for bacteria from wild boars, where a great variety of resistance patterns was
334 described (Cilia et al., 2021; Zottola et al., 2013). In contrast, other studies described only a few
335 AMR patterns, which might be attributed to differences in sampling methods and/or in
336 environmental conditions of the wild boar population from which bacteria were isolated (Bonardi
337 et al., 2019; Donazzolo C., 2017; Methner et al., 2010).

338 Among AMR genotypes detected in this work, the most frequently found were *sul1*, *gyrA* and
339 *strA-strB-sul2-tetA*, in agreement with phenotypic profiles detected, although 12 isolates did not
340 express their AMR determinants during in vitro growth. These cryptic determinants could be
341 activated under certain conditions or stressors and might constitute a potential reservoir for AMR
342 spread (Srikumar et al., 2015). In contrast, and despite the search of 23 AMR determinants, to our
343 knowledge the deepest screening performed in *Salmonella* isolates from wild boar, genotypes
344 were not identified for 46,2% of the isolates expressing AMR. This is the case for sulphonamide
345 resistant *Salmonella*, among which only in a 34.6% of isolates any of the *sul1* to *sul3* genes were
346 detected. Previous studies in wild boars vary greatly in the prevalence of *sul* genes, ranging from
347 72% of *sul1* (Caleja et al., 2011b) to none detected among sulphonamide-resistant isolates (Pinto
348 et al., 2010), although *sul1* is the most frequently reported sulphonamide resistance determinant
349 (Patrícia Antunes, Machado, Sousa, & Peixe, 2005; Argüello, Guerra, Rodríguez, Rubio, &
350 Carvajal, 2018; Caleja et al., 2011b). Our data show a similar prevalence of *sul1* and *sul2* and also
351 the frequent association between *sul1* and *sul3* genes, two uncommon characteristics (Argüello et
352 al., 2018; Guerra, Junker, & Helmuth, 2004).

353 Streptomycin is the aminoglycoside against which the highest prevalence of resistance has been
354 found in this work, similarly to previous reports on *Salmonella* isolates from wild boars (Bonardi
355 et al., 2019; Caleja et al., 2011b; Cilia et al., 2021; Donazzolo C., 2017; Methner et al., 2010;
356 Pinto et al., 2010; Zottola et al., 2013). The high proportion of isolates sharing streptomycin
357 resistance is consistent with the frequency of genetic determinants found. Thus, *strA*, *strB* and
358 *aadA* genes were found in 40.9, 38.6 and 11.3% of resistant isolates, respectively. Similarly, high
359 occurrences have been described in pigs (Leekitcharoenphon et al., 2019), while *aadA* was the

360 major determinant found in *Salmonella* from wild boar, but in a much lower frequency (Caleja et
361 al., 2011b; Pinto et al., 2010). Interestingly, intermediate sensitivity to streptomycin and to
362 neomycin were frequently detected in this work. A recent study in Italian wild boars obtained
363 similar results, with very much the same percentages of intermediate sensitivity to streptomycin
364 (Razzuoli et al., 2021). This is often a preliminary step preceding the rise of resistant strains (Koch
365 et al., 2014) that could be selected and stably maintained in environments with low antibiotic
366 concentration because this phenotype might not interfere the biological fitness of bacteria
367 (Howden, Peleg, & Stinear, 2014).

368 After sulphonamides and aminoglycosides, resistance to tetracyclines was also frequently found.
369 However, the detection of AMR determinants to tetracyclines was higher than in the case of
370 aminoglycosides or sulphonamides, reaching levels close to 80%. The major gene found was *tetA*,
371 reflecting results from other studies in wild boars (Caleja et al., 2011b), swine (Argüello et al.,
372 2018; Okubo et al., 2019) and others animals and food (Gargano et al., 2021; Tawyabur et al.,
373 2020). This resistance gene, is highly persistent in the wild, even in the absence of selective
374 pressure (Tamminen et al., 2011) and is capable of faster propagation than the other genes which
375 code resistance against tetracyclines (Yu, Liu, & Li, 2015).

376 AMR against β -lactams and quinolones are very rarely found in isolates of *Salmonella* spp. from
377 wild boars (Bonardi et al., 2019; Donazzolo C., 2017; Leekitcharoenphon et al., 2019) but,
378 however, here we described percentages of resistance to β -lactams close to 20% and around 6%
379 to nalidixic acid. The first is mainly carried by the serovar Typhimurium and the subspecies
380 *salamae*, with 6/7 and 5/17 of isolates expressing resistance to ampicillin, respectively. These
381 findings are in line with studies carried out in wild boars and that focused in the *S.* Typhimurium
382 serovar, which reported values of resistance to ampicillin around 70-80% (Caleja et al., 2011b;
383 Pinto et al., 2010). In contrast, the resistance to nalidixic acid showed by the present study is
384 above that previously reported in *Salmonella* from wild boars in Europe. In Spain, only one strain
385 with this characteristics has been described (N. Navarro-Gonzalez et al., 2012) and, in Italy, a 1.8-
386 0.8% of resistance to nalidixic acid was reported (Zottola et al., 2013), besides a 3.4% rate in
387 *Salmonella* from other wild animals (Botti et al., 2013). All nalidixic acid resistant isolates from

388 the present study displayed an intermediate sensitivity to enrofloxacin, like previously described
389 (Astorga et al., 2007; Caleja et al., 2011b; Foti, Sclari, Mascetti, & Fisichella, 2018; Gomez-
390 Laguna et al., 2011). Although MIC determination by microdilution is more appropriate for
391 fluoroquinolone resistance in *Salmonella* (Parry et al., 2010) than the disk diffusion technique
392 used in this work, the pattern observed must be related to detected *gyrA* genotypes, D87Y or
393 D87N, closely linked to nalidixic acid resistance (Levy, Sharma, & Cebula, 2004; Palomo
394 Guijarro, 2011; Rahmani et al., 2013). Furthermore, *gyrB* mutations were not detected in isolates
395 from this work, which is commonly described in *Salmonella* expressing fluoroquinolone
396 resistance (Hopkins, Davies, & Threlfall, 2005), whereas the single *gyrA* mutations found are
397 enough for nalidixic acid resistance and additional polymorphisms in this gene would be required
398 to reach fluoroquinolone resistance (Ruiz et al., 1997). The resistance against quinolones
399 described in the present work is also common in pigs and other species (García-Feliz et al., 2007;
400 Morshed & Peighambari, 2010; Rad, Kooshan, & Mesgarani, 2010) and could be related to
401 treatment failures with these agents of invasive gastrointestinal infections (Aarestrup, Wiuff,
402 Molbak, & Threlfall, 2003).

403 Similar percentages of resistance to those described in the previous paragraph appear against
404 chloramphenicol, which has been banned for use in livestock in several countries, including the
405 EU, but is still used in human health in the treatment of infections by *Salmonella* with low
406 susceptibility to other compounds (EFSA & ECDC, 2020). Since AMR against phenicols is still
407 lower in *Salmonella* from humans (6.5%) than from pig samples (14.6%), results in the present
408 work suggest that *Salmonella* from wild boars are nearest the human isolates, probably indicating
409 that this animal is relatively free of exposure to these antimicrobials in comparison with the
410 management required for swine production. Similarly, this work indicates that gentamicin and
411 colistin are more effective for *Salmonella* from Spanish wild boars than from swine (EFSA &
412 ECDC, 2020), from other wild animals in Spain (Darwich et al., 2019) or from wild boar in Italy
413 (Zottola et al., 2013).

414 Genetic determinants of antimicrobial resistance are commonly associated with mobile elements
415 in bacterial genomes, mainly plasmids and/or integrons (J. G. Frye & C. R. Jackson, 2013). Class

416 1 integrons, among the most important elements contributing to the spread of antimicrobial
417 resistance in *Salmonella* (S. Chen et al., 2004), were detected in 7 isolates of the present study
418 and 4 of them harboured different gene cassettes conferring resistance to β -lactam (*bla_{PESE-1}*),
419 streptomycin (*aadA*), and trimethoprim (*dfrA*), a linkage previously described in *Salmonella* and
420 *E. coli* from wild boars (Caleja et al., 2011b; Literak et al., 2010). These mobile multidrug
421 resistance determinants have the potential to transfer horizontally to other *Salmonella* and could
422 potentially acquire and integrate new GC into their genome structure (Levings, Lightfoot,
423 Partridge, Hall, & Djordjevic, 2005; Toleman, Bennett, & Walsh, 2006). Apart from integrons,
424 plasmids are the other most influential genetic elements in the bacterial antimicrobial resistance
425 (McMillan, Jackson, & Frye, 2020). Studies of antimicrobial resistant *Salmonella* have
426 determined that specific plasmid replicon types are associated with resistance, geographic origin,
427 and source host (Carattoli, 2009; Jonathan Gray Frye & Charlene Rene Jackson, 2013; Frye et al.,
428 2011; Lindsey, Fedorka-Cray, Frye, & Meinersmann, 2009). Results from the present study
429 showed an increment in AMR associated with the carriage of IncFIIA replicons, which has been
430 recognized as the major virulence-associated replicon in *Salmonella* (Carattoli et al., 2005). This
431 plasmid is also the most frequently reported in cases of clinical salmonellosis in livestock
432 (Abraham et al., 2014; Leekitcharoenphon et al., 2019). On the other hand, the presence of
433 plasmids in the isolates did not ensure AMR in these isolates (Leekitcharoenphon et al., 2019).
434 Several strains from our samples carried replicons and did not manifest any AMR. Moreover,
435 resistance genes have been identified in isolates with no replicons detected, which could be due
436 to the location of such gene/s on an undetected plasmid or elsewhere in the genome (Frye et al.,
437 2011). Apart from the association with AMR, it is evident that strains from the collection do carry
438 mobile genetic elements such as integrons and plasmids, that may facilitate the acquisition of
439 additional resistance determinants if selection is further sustained or intensified.

440 In conclusion, the AMR traits detected in *Salmonella* isolates from wild boar highlight the
441 transcendence of the interface between wildlife and anthropogenic environments, where
442 microbiological surveillance is a valuable element of the One Health approach to contain the
443 potential for the AMR spread.

444 **AUTHOR CONTRIBUTION**

445 MGM, JR, PFL and AQ conceived and planned the study; MGM, PG and DR collected the
446 samples; DR, FEMC and MGM analysed the data; AG, FEMC and MGM drafted the manuscript,
447 AQ revised the manuscript; JR and AQ obtained the funding.

448 **CONFLICT OF INTEREST**

449 All the authors have read the manuscript and have approved this submission. The authors report
450 no conflicts of interest.

451 **DATA AVAILABILITY**

452 The data that support the findings of this study are available from the corresponding author upon
453 reasonable request.

454 **ETHICAL STATEMENT**

455 Ethical statement is not applicable because samples have been gathered from death animals.

456

UNDER REVIEW

457 **FIGURE CAPTIONS**

458 **FIGURE 1:**

459 **Subspecies and serotypes distribution.** Circular plots showing the number of isolates per
460 subspecies (*upper left*) and the percentage of isolates from a certain serotype in the subspecies
461 *enterica* (*upper right*), *salamae* (*lower middle*) y *diarizonae* (*lower right*)

462 **FIGURE 2:**

463 Donut charts showing the percentage of susceptible isolates (0) and the percentage of isolates
464 with one, two, three or four and more resistances (MDR-Multi drug resistance) in all the isolates
465 and in the subspecies *enterica*, *diarizonae* and *salamae*.

466 **FIGURE 3:**

467 **A)** Histogram showing the mean+SEM of the number of antibiotic resistances observed in the
468 isolates belonging to the different *Salmonella* subspecies found in the study. (* $p < 0,05$ Dunn's
469 post test *enterica* vs. *diarizonae*. n: 69-34). **B)** Histogram showing the mean+SEM of the number
470 of antibiotic resistances observed in the *Salmonella enterica* subsp. *enterica* isolates and in the
471 isolates belonging to serotypes *Choleraesuis* and *Typhimurium*. (* $p < 0,05$ Dunn's post test
472 *enterica* vs. *Typhimurium*. n: 69-7).

473 **FIGURE 4:**

474 **Influence of management in the appearance of resistances.** Histograms showing the influence
475 of the supplementation (A), the estate fencing (B), the presence of livestock (C) and the wild boar
476 density (D) over the average \pm SEM of the phenotypic resistance intensity (PRI) and genotypic
477 resistance intensity (GRI) (1; 0 resist. / 2; 1-3 resist. / 3; ≥ 4 resist.) of the *Salmonella* isolates
478 from this study. (***) $p < 0,05/0,01$; Mann-Whitney test). (Density categories: Low-Med, High or
479 Very high // 1-20, 21-40, >40 wild boars/100ha)

480

481

References

482

- 483 Aarestrup, F. M., Lertworapreecha, M., Evans, M. C., Bangtrakulnonth, A., Chalermchaikit, T.,
 484 Hendriksen, R. S., & Wegener, H. C. (2003). Antimicrobial susceptibility and occurrence
 485 of resistance genes among *Salmonella enterica* serovar Weltevreden from different
 486 countries. *The Journal of antimicrobial chemotherapy*, 52(4), 715-718. Retrieved from
 487 <http://jac.oxfordjournals.org/content/52/4/715.full.pdf>
- 488 Aarestrup, F. M., Wiuff, C., Molbak, K., & Threlfall, E. J. (2003). Is it time to change
 489 fluoroquinolone breakpoints for *Salmonella* spp.? *Antimicrob Agents Chemother*, 47(2),
 490 827-829. doi:10.1128/aac.47.2.827-829.2003
- 491 Abraham, S., Groves, M. D., Trott, D. J., Chapman, T. A., Turner, B., Hornitzky, M., & Jordan,
 492 D. (2014). *Salmonella enterica* isolated from infections in Australian livestock remain
 493 susceptible to critical antimicrobials. *International Journal of Antimicrobial Agents*,
 494 43(2), 126-130. doi:<http://dx.doi.org/10.1016/j.ijantimicag.2013.10.014>
- 495 Allen, H. K., Donato, J., Wang, H. H., Cloud-Hansen, K. A., Davies, J., & Handelsman, J. (2010).
 496 Call of the wild: antibiotic resistance genes in natural environments. *Nat Rev Micro*, 8(4),
 497 251-259. Retrieved from <http://dx.doi.org/10.1038/nrmicro2312>
- 498 Antunes, P., Machado, J., Sousa, J. C., & Peixe, L. (2005). Dissemination of sulfonamide
 499 resistance genes (*sul1*, *sul2*, and *sul3*) in Portuguese *Salmonella enterica* strains and
 500 relation with integrons. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 49(2), 836-839.
 501 Retrieved from [https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC547296/pdf/0785-](https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC547296/pdf/0785-04.pdf)
 502 [04.pdf](https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC547296/pdf/0785-04.pdf)
- 503 Antunes, P., Mourao, J., Pestana, N., & Peixe, L. (2011). Leakage of emerging clinically relevant
 504 multidrug-resistant *Salmonella* clones from pig farms. *J Antimicrob Chemother*, 66(9),
 505 2028-2032. doi:10.1093/jac/dkr228
- 506 Aragaw, K., Molla, B., Muckle, A., Cole, L., Wilkie, E., Poppe, C., . . . Hildebrandt, G. (2007).
 507 The characterization of *Salmonella* serovars isolated from apparently healthy slaughtered
 508 pigs at Addis Ababa abattoir, Ethiopia. *Prev Vet Med*, 82(3-4), 252-261.
 509 doi:10.1016/j.prevetmed.2007.05.022
- 510 Argüello, H., Guerra, B., Rodríguez, I., Rubio, P., & Carvajal, A. (2018). Characterization of
 511 antimicrobial resistance determinants and class 1 and class 2 integrons in *Salmonella*
 512 *enterica* spp. multidrug-resistant isolates from pigs. *Genes*, 9(5), 256.
- 513 Arguello, H., Sørensen, G., Carvajal, A., Baggesen, D. L., Rubio, P., & Pedersen, K. (2013).
 514 Prevalence, serotypes and resistance patterns of *Salmonella* in Danish pig production. *Res*
 515 *Vet Sci*, 95(2), 334-342. doi:<http://dx.doi.org/10.1016/j.rvsc.2013.04.001>
- 516 Astorga, R. J., Salaberria, A. E., Garcia, A. M., Jimenez, S. V., Martinez, A. C., Garcia, A. A., &
 517 Casas, A. A. (2007). Surveillance and antimicrobial resistance of *Salmonella* strains
 518 isolated from slaughtered pigs in Spain. *J Food Prot*, 70(6), 1502-1506.
- 519 Bolton, D. J., Ivory, C., & McDowell, D. (2013). A study of *Salmonella* in pigs from birth to
 520 carcass: serotypes, genotypes, antibiotic resistance and virulence profiles. *Int J Food*
 521 *Microbiol*, 160(3), 298-303. doi:10.1016/j.ijfoodmicro.2012.11.001
- 522 Bonardi, S., Bassi, L., Brindani, F., D'Incau, M., Barco, L., Carra, E., & Pongolini, S. (2013).
 523 Prevalence, characterization and antimicrobial susceptibility of *Salmonella enterica* and
 524 *Yersinia enterocolitica* in pigs at slaughter in Italy. *International Journal of Food*
 525 *Microbiology*, 163(2-3), 248-257.
 526 doi:<http://dx.doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2013.02.012>
- 527 Bonardi, S., Bolzoni, L., Zanoni, R. G., Morganti, M., Corradi, M., Gilioli, S., & Pongolini, S.
 528 (2019). Limited Exchange of *Salmonella* Among Domestic Pigs and Wild Boars in Italy.
 529 *EcoHealth*, 1-9.
- 530 Botti, V., Navillod, F. V., Domenis, L., Orusa, R., Pepe, E., Robetto, S., & Guidetti, C. (2013).
 531 *Salmonella* spp. and antibiotic-resistant strains in wild mammals and birds in north-
 532 western Italy from 2002 to 2010. *Vet. Ital*, 49(2), 195-202.
- 533 Caleja, C., de Toro, M., Gonçalves, A., Themudo, P., Vieira-Pinto, M., Monteiro, D., . . . Igrejas,
 534 G. (2011a). Antimicrobial resistance and class I integrons in *Salmonella enterica* isolates
 535 from wild boars and Bísaro pigs. *International Microbiology*, 14(1), 19-24.

- 536 Caleja, C., de Toro, M., Gonçalves, A., Themudo, P., Vieira-Pinto, M., Monteiro, D., . . . Igrejas,
537 G. (2011b). Antimicrobial resistance and class I integrons in *Salmonella enterica* isolates
538 from wild boars and Bísaro pigs. *Int Microbiol*, 14(1), 19-24.
- 539 Cano-Terriza, D., Riscalde, M. A., Jimenez-Ruiz, S., Vicente, J., Isla, J., Paniagua, J., . . . Garcia-
540 Bocanegra, I. (2018). Management of hunting waste as control measure for tuberculosis
541 in wild ungulates in south-central Spain. *Transbound Emerg Dis*, 65(5), 1190-1196.
542 doi:10.1111/tbed.12857
- 543 Carattoli, A. (2001). Importance of integrons in the diffusion of resistance. *Veterinary Research*,
544 32(3-4), 243-259.
- 545 Carattoli, A. (2009). Resistance plasmid families in Enterobacteriaceae. *Antimicrobial Agents and*
546 *Chemotherapy*, 53(6), 2227-2238. Retrieved from
547 <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC2687249/pdf/1707-08.pdf>
- 548 Carattoli, A., Bertini, A., Villa, L., Falbo, V., Hopkins, K. L., & Threlfall, E. J. (2005).
549 Identification of plasmids by PCR-based replicon typing. *Journal of Microbiological*
550 *Methods*, 63(3), 219-228. Retrieved from
551 <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0167701205001132?via%3Dihub>
- 552 Chen, S., Zhao, S., White, D. G., Schroeder, C. M., Lu, R., Yang, H., . . . Meng, J. (2004).
553 Characterization of multiple-antimicrobial-resistant *Salmonella* serovars isolated from
554 retail meats. *Applied and Environmental Microbiology*, 70(1), 1-7. Retrieved from
555 <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC321239/pdf/0639.pdf>
- 556 Chen, X., Gao, S., Jiao, X., & Liu, X. F. (2004). Prevalence of serogroups and virulence factors
557 of *Escherichia coli* strains isolated from pigs with postweaning diarrhoea in eastern
558 China. *Vet Microbiol*, 103(1-2), 13-20. doi:10.1016/j.vetmic.2004.06.014
- 559 Chiari, M., Zaroni, M., Tagliabue, S., Lavazza, A., & Alborali, L. G. (2013). *Salmonella*
560 serotypes in wild boars (*Sus scrofa*) hunted in northern Italy. *Acta Vet Scand*, 55(42), 42.
561 doi:10.1186/1751-0147-55-42
- 562 Cilia, G., Turchi, B., Fratini, F., Bilei, S., Bossù, T., De Marchis, M. L., . . . Bertelloni, F. (2021).
563 Prevalence, Virulence and Antimicrobial Susceptibility of *Salmonella* spp., *Yersinia*
564 *enterocolitica* and *Listeria monocytogenes* in European Wild Boar (*Sus scrofa*) Hunted
565 in Tuscany (Central Italy). *Pathogens*, 10(2), 93.
- 566 CLSI. (2020a). Clinical and Laboratory Standards Institute. Performance Standards for
567 Antimicrobial Disk and Dilution Susceptibility Tests for Bacteria Isolated From Animals.
568 In (Vol. VET01S-ED5). Wayne, PA, USA.
- 569 CLSI. (2020b). Clinical and Laboratory Standards Institute. Performance Standards for
570 Antimicrobial Susceptibility Testing In (30th ed., Vol. M100-ED30). Wayne, PA, USA.
- 571 Darwich, L., Vidal, A., Seminati, C., Albamonte, A., Casado, A., López, F., . . . Migura-García,
572 L. (2019). High prevalence and diversity of extended-spectrum β -lactamase and
573 emergence of OXA-48 producing Enterobacterales in wildlife in Catalonia. *PLoS ONE*,
574 14(8), e0210686.
- 575 Dias, D., Torres, R. T., Kronvall, G., Fonseca, C., Mendo, S., & Caetano, T. (2015). Assessment
576 of antibiotic resistance of *Escherichia coli* isolates and screening of *Salmonella* spp. in
577 wild ungulates from Portugal. *Research in Microbiology*, 11(15), 00058-00053.
- 578 Donazzolo C., T. S., Ustulin M. Citterio C, Conedera G., Vio D., Deotto S., Digiusto T., Cocchi
579 M. (2017). Antimicrobial susceptibility of *Salmonella enterica* subsp. *enterica* serovar
580 *Choleraesuis* strains from wild boar (*Sus scrofa*) in Italy. In B. A. Paulsen P., Smulders
581 F.J.M. (Ed.), *Game meat hygiene* (pp. 307). The Netherlands: Wageningen Academic
582 Publishers.
- 583 EFSA, & ECDC. (2020). *The European Union Summary Report on Antimicrobial Resistance in*
584 *zoonotic and indicator bacteria from humans, animals and food in 2017/2018* (1831-
585 4732 (Electronic)
- 586 1831-4732 (Linking)). Retrieved from <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/32874244>
- 587 European Food Safety, A., European Centre for Disease, P., & Control. (2019). The European
588 Union One Health 2018 Zoonoses Report. *EFSA J*, 17(12), e05926.
589 doi:10.2903/j.efsa.2019.5926

- 590 Fluit, A., & Schmitz, F. J. (2004). Resistance integrons and super-integrons. *Clinical*
 591 *Microbiology and Infection*, 10(4), 272-288. Retrieved from
 592 [https://www.clinicalmicrobiologyandinfection.com/article/S1198-743X\(14\)62617-3/pdf](https://www.clinicalmicrobiologyandinfection.com/article/S1198-743X(14)62617-3/pdf)
- 593 Foti, M., Siclari, A., Mascetti, A., & Fisichella, V. (2018). Study of the spread of antimicrobial-
 594 resistant Enterobacteriaceae from wild mammals in the National Park of Aspromonte
 595 (Calabria, Italy). *Environmental Toxicology and Pharmacology*, 63, 69-73.
 596 doi:<https://doi.org/10.1016/j.etap.2018.08.016>
- 597 Frye, J. G., & Jackson, C. R. (2013). Genetic mechanisms of antimicrobial resistance identified
 598 in *Salmonella enterica*, *Escherichia coli*, and *Enterococcus* spp. isolated from U.S. food
 599 animals. *Front Microbiol*, 4, 135. doi:10.3389/fmicb.2013.00135
- 600 Frye, J. G., & Jackson, C. R. (2013). Genetic mechanisms of antimicrobial resistance identified
 601 in *Salmonella enterica*, *Escherichia coli*, and *Enterococcus* spp. isolated from US food
 602 animals. *Frontiers in microbiology*, 4, 135.
- 603 Frye, J. G., Lindsey, R. L., Meinersmann, R. J., Berrang, M. E., Jackson, C. R., Englen, M. D., .
 604 . . Fedorka-Cray, P. J. (2011). Related antimicrobial resistance genes detected in different
 605 bacterial species co-isolated from swine fecal samples. *Foodborne Pathog Dis*, 8(6), 663-
 606 679.
- 607 Furness, L. E., Campbell, A., Zhang, L., Gaze, W. H., & McDonald, R. A. (2017). Wild small
 608 mammals as sentinels for the environmental transmission of antimicrobial resistance.
 609 *Environmental Research*, 154, 28-34. doi:<https://doi.org/10.1016/j.envres.2016.12.014>
- 610 Garcia-Feliz, C., Collazos, J., Carvajal, A., Herrera, S., Echeita, M., & Rubio, P. (2008).
 611 Antimicrobial resistance of *Salmonella enterica* isolates from apparently healthy and
 612 clinically ill finishing pigs in Spain. *Zoonoses Public Health*, 55(4), 195-205. Retrieved
 613 from <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/abs/10.1111/j.1863-2378.2008.01110.x>
- 614 Garcia-Feliz, C., Collazos, J., Carvajal, A., Vidal, A., Aladuena, A., Ramiro, R., . . . Rubio, P.
 615 (2007). *Salmonella enterica* infections in Spanish swine fattening units. *Zoonoses Public*
 616 *Health*, 54(8), 294-300. Retrieved from
 617 <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/abs/10.1111/j.1863-2378.2007.01065.x>
- 618 Gargano, V., Sciortino, S., Gambino, D., Costa, A., Agozzino, V., Reale, S., . . . Vicari, D. (2021).
 619 Antibiotic Susceptibility Profile and Tetracycline Resistance Genes Detection in
 620 *Salmonella* spp. Strains Isolated from Animals and Food. *Antibiotics*, 10(7), 809.
- 621 Gil-Molino, M., Garcia, A., Zurita, S. G., Martín-Cano, F. E., Garcia-Jimenez, W., Risco, D., . .
 622 . Quesada, A. (2020). Spread of Antimicrobial Resistance by *Salmonella enterica* Serovar
 623 *Choleraesuis* between Close Domestic and Wild Environments. *Antibiotics (Basel)*,
 624 9(11). doi:10.3390/antibiotics9110750
- 625 Gil Molino, M., García Sánchez, A., Risco Pérez, D., Gonçalves Blanco, P., Quesada Molina, A.,
 626 Rey Pérez, J., . . . Fernández Llarío, P. (2019). Prevalence of *Salmonella* spp. in tonsils,
 627 mandibular lymph nodes and faeces of wild boar from Spain and genetic relationship
 628 between isolates. *Transbound Emerg Dis*.
- 629 Gil Molino, M., Risco Perez, D., Goncalves Blanco, P., Fernandez Llarío, P., Quesada Molina,
 630 A., Garcia Sanchez, A., . . . Rey Perez, J. (2019). Outbreaks of antimicrobial resistant
 631 *Salmonella Choleraesuis* in wild boars piglets from central-western Spain. *Transbound*
 632 *Emerg Dis*, 66(1), 225-233. doi:10.1111/tbed.13003
- 633 Gomez-Laguna, J., Hernandez, M., Creus, E., Echeita, A., Otal, J., Herrera-Leon, S., & Astorga,
 634 R. J. (2011). Prevalence and antimicrobial susceptibility of *Salmonella* infections in free-
 635 range pigs. *Vet J*, 190(1), 176-178. doi:10.1016/j.tvjl.2010.09.009
- 636 Gonçalves, A., Igrejas, G., Radhouani, H., Santos, T., Monteiro, R., Pacheco, R., . . . Poeta, P.
 637 (2013). Detection of antibiotic resistant enterococci and *Escherichia coli* in free range
 638 Iberian Lynx (*Lynx pardinus*). *Science of the Total Environment*, 456-457, 115-119.
 639 doi:<http://dx.doi.org/10.1016/j.scitotenv.2013.03.073>
- 640 Gonçalves Blanco, P. (2017). *Indicadores biológicos para la gestión del jabali en ecosistemas*
 641 *mediterráneos*. Universidad de Extremadura,
- 642 Guerra, B., Junker, E., & Helmuth, R. (2004). Incidence of the recently described sulfonamide
 643 resistance gene *sul3* among German *Salmonella enterica* strains isolated from livestock

- 644 and food. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 48(7), 2712-2715. Retrieved from
645 <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC434208/pdf/1285-03.pdf>
- 646 Haq, I., Durrani, A. Z., Khan, M. S., Mushtaq, M. H., & Ahmad, I. (2017). Study of antimicrobial
647 resistance and physiological biomarkers with special reference to Salmonellosis in
648 diarrheic foals in Punjab, Pakistan. *Acta Trop*, 176, 144-149.
649 doi:10.1016/j.actatropica.2017.08.003
- 650 Hassell, J. M., Ward, M. J., Muloi, D., Bettridge, J. M., Robinson, T. P., Kariuki, S., . . . Kang'ethe,
651 E. K. (2019). Clinically relevant antimicrobial resistance at the wildlife–livestock–human
652 interface in Nairobi: an epidemiological study. *The Lancet Planetary Health*, 3(6), e259-
653 e269. Retrieved from [https://www.thelancet.com/pdfs/journals/lanplh/PIIS2542-
654 5196\(19\)30083-X.pdf](https://www.thelancet.com/pdfs/journals/lanplh/PIIS2542-5196(19)30083-X.pdf)
- 655 Hoorfar, J., Ahrens, P., & Rådström, P. (2000). Automated 5' nuclease PCR assay for
656 identification of *Salmonella enterica*. *Journal of Clinical Microbiology*, 38(9), 3429-
657 3435. Retrieved from
658 <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC87399/pdf/jm003429.pdf>
- 659 Hopkins, K. L., Davies, R. H., & Threlfall, E. J. (2005). Mechanisms of quinolone resistance in
660 *Escherichia coli* and *Salmonella*: recent developments. *International Journal of*
661 *Antimicrobial Agents*, 25(5), 358-373.
- 662 Howden, B. P., Peleg, A. Y., & Stinear, T. P. (2014). The evolution of vancomycin intermediate
663 *Staphylococcus aureus* (VISA) and heterogenous-VISA. *Infect Genet Evol*, 21, 575-582.
664 doi:10.1016/j.meegid.2013.03.047
- 665 Johnson, T. J., Wannemuehler, Y. M., Johnson, S. J., Logue, C. M., White, D. G., Doetkott, C.,
666 & Nolan, L. K. (2007). Plasmid replicon typing of commensal and pathogenic
667 *Escherichia coli* isolates. *Applied and Environmental Microbiology*, 73(6), 1976-1983.
668 Retrieved from [https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC1828809/pdf/2171-
669 06.pdf](https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC1828809/pdf/2171-06.pdf)
- 670 Karp, B. E., Tate, H., Plumblee, J. R., Dessai, U., Whichard, J. M., Thacker, E. L., . . . Griffin, P.
671 M. (2017). National Antimicrobial Resistance Monitoring System: two decades of
672 advancing public health through integrated surveillance of antimicrobial resistance.
673 *Foodborne Pathogens and Disease*, 14(10), 545-557.
- 674 Koch, G., Yepes, A., Forstner, K. U., Wermser, C., Stengel, S. T., Modamio, J., . . . Lopez, D.
675 (2014). Evolution of resistance to a last-resort antibiotic in *Staphylococcus aureus* via
676 bacterial competition. *Cell*, 158(5), 1060-1071. doi:10.1016/j.cell.2014.06.046
- 677 Kozak, G. K., Boerlin, P., Janecko, N., Reid-Smith, R. J., & Jardine, C. (2009). Antimicrobial
678 resistance in *Escherichia coli* isolates from swine and wild small mammals in the
679 proximity of swine farms and in natural environments in Ontario, Canada. *Applied and*
680 *Environmental Microbiology*, 75(3), 559-566. Retrieved from
681 <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC2632148/pdf/1821-08.pdf>
- 682 Kruperman, P. H. (1983). Multiple antibiotic resistance indexing of *Escherichia coli* to identify
683 high-risk sources of fecal contamination of foods. *Applied and Environmental*
684 *Microbiology*, 46(1), 165-170. Retrieved from
685 <https://aem.asm.org/content/aem/46/1/165.full.pdf>
- 686 Kruperman, P. H. (1983). Multiple antibiotic resistance indexing of *Escherichia coli* to identify
687 high-risk sources of fecal contamination of foods. *Appl. Environ. Microbiol.*, 46(1), 165-
688 170.
- 689 Leekitcharoenphon, P., Sorensen, G., Löfström, C., Battisti, A., Szabo, I., Wasyl, D., . . .
690 Hendriksen, R. S. (2019). Cross-Border Transmission of *Salmonella Choleraesuis* var.
691 *Kunzendorf* in European Pigs and Wild Boar: Infection, Genetics, and Evolution. *Front*
692 *Microbiol*, 10(179). doi:10.3389/fmicb.2019.00179
- 693 Leverstein-van Hall, M., Paauw, A., Box, A., Blok, H., Verhoef, J., & Fluit, A. (2002). Presence
694 of integron-associated resistance in the community is widespread and contributes to
695 multidrug resistance in the hospital. *Journal of Clinical Microbiology*, 40(8), 3038-3040.
696 Retrieved from <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC120645/pdf/0334.pdf>
- 697 Levings, R. S., Lightfoot, D., Partridge, S. R., Hall, R. M., & Djordjevic, S. P. (2005). The
698 genomic island SGI1, containing the multiple antibiotic resistance region of *Salmonella*

- 699 enterica serovar Typhimurium DT104 or variants of it, is widely distributed in other S.
700 enterica serovars. *Journal of Bacteriology*, 187(13), 4401-4409.
- 701 Levy, D. D., Sharma, B., & Cebula, T. A. (2004). Single-nucleotide polymorphism mutation
702 spectra and resistance to quinolones in Salmonella enterica serovar Enteritidis with a
703 mutator phenotype. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 48(7), 2355-2363.
- 704 Lindsey, R. L., Fedorka-Cray, P. J., Frye, J. G., & Meinersmann, R. J. (2009). Inc A/C plasmids
705 are prevalent in multidrug-resistant Salmonella enterica isolates. *Applied and
706 Environmental Microbiology*, 75(7), 1908-1915.
- 707 Literak, I., Dolejska, M., Radimersky, T., Klimes, J., Friedman, M., Aarestrup, F. M., . . . Cizek,
708 A. (2010). Antimicrobial-resistant faecal Escherichia coli in wild mammals in central
709 Europe: multiresistant Escherichia coli producing extended-spectrum beta-lactamases in
710 wild boars. *J Appl Microbiol*, 108(5), 1702-1711. doi:10.1111/j.1365-2672.2009.04572.x
- 711 Magnino, S., Frasnelli, M., Fabbi, M., Bianchi, A., Zanoni, M. G., Meriardi, G., . . . Gaffuri, A.
712 (2011). The monitoring of selected zoonotic diseases of wildlife in Lombardy and Emilia-
713 Romagna, northern Italy. In B. A. Paulsen P., Vodnansky M., Winkelmayr R. and
714 Smulders F.J.M. (Ed.), *Game meat hygiene in focus: Microbiology, epidemiology, risk
715 analysis and quality assurance* (pp. 223-244). Wageningen: Wageningen Academic
716 Publishers.
- 717 Martín-Maldonado, B., Vega, S., Mencía-Gutiérrez, A., Lorenzo-Rebenaque, L., de Frutos, C.,
718 González, F., . . . Marin, C. (2020). Urban birds: An important source of antimicrobial
719 resistant Salmonella strains in Central Spain. *Comparative Immunology, Microbiology
720 and Infectious Diseases*, 72, 101519.
- 721 McMillan, E. A., Jackson, C. R., & Frye, J. G. (2020). Transferable Plasmids of Salmonella
722 enterica Associated With Antibiotic Resistance Genes. *Front Microbiol*, 11, 562181.
723 doi:10.3389/fmicb.2020.562181
- 724 Mejia, W., Casal, J., Zapata, D., Sanchez, G. J., Martin, M., & Mateu, E. (2006). Epidemiology
725 of salmonella infections in pig units and antimicrobial susceptibility profiles of the strains
726 of Salmonella species isolated. *Vet Rec*, 159(9), 271-276. doi:10.1136/vr.159.9.271
- 727 Mentaberre, G., Porrero, M. C., Navarro-Gonzalez, N., Serrano, E., Dominguez, L., & Lavin, S.
728 (2013). Cattle drive Salmonella infection in the wildlife-livestock interface. *Zoonoses
729 Public Health*, 60(7), 510-518. doi:10.1111/zph.12028
- 730 Methner, U., Heller, M., & Bocklisch, H. (2010). Salmonella enterica subspecies enterica serovar
731 Choleraesuis in a wild boar population in Germany. *European Journal of Wildlife
732 Research*, 56, 493-502. Retrieved from [http://www.scopus.com/inward/record.url?eid=2-
733 s2.0-77955049250&partnerID=40&md5=8e15edb9a6eaca64bc7e5a12d97bebdb](http://www.scopus.com/inward/record.url?eid=2-s2.0-77955049250&partnerID=40&md5=8e15edb9a6eaca64bc7e5a12d97bebdb)
- 734 Monstein, H.-J., Östholm-Balkhed, Å., Nilsson, M., Nilsson, M., Dornbusch, K., & Nilsson, L.
735 (2007). Multiplex PCR amplification assay for the detection of blaSHV, blaTEM and
736 blaCTX-M genes in Enterobacteriaceae. *Apmis*, 115(12), 1400-1408.
- 737 Morshed, R., & Peighambari, S. M. (2010). Drug resistance, plasmid profile and random
738 amplified polymorphic DNA analysis of Iranian isolates of Salmonella enteritidis. *New
739 Microbiol*, 33(1), 47-56. Retrieved from
740 <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20402413>
- 741 Motulsky, H. J. (2016). "One-tail vs. two-tail P values". GraphPad Statistics Guide. Retrieved
742 from [https://www.graphpad.com/guides/prism/8/statistics/one-tail_vs_two-
743 tail_p_values.htm?q=one+tailed](https://www.graphpad.com/guides/prism/8/statistics/one-tail_vs_two-tail_p_values.htm?q=one+tailed)
- 744 Navarro-Gonzalez, N., Casas-Díaz, E., Porrero, C. M., Mateos, A., Domínguez, L., Lavin, S., &
745 Serrano, E. (2013). Food-borne zoonotic pathogens and antimicrobial resistance of
746 indicator bacteria in urban wild boars in Barcelona, Spain. *Vet Microbiol*, 167(3-4), 686-
747 689. doi:<http://dx.doi.org/10.1016/j.vetmic.2013.07.037>
- 748 Navarro-Gonzalez, N., Castillo-Contreras, R., Casas-Díaz, E., Morellet, N., Porrero, M. C.,
749 Molina-Vacas, G., . . . Domínguez, L. (2018). Carriage of antibiotic-resistant bacteria in
750 urban versus rural wild boars. *European Journal of Wildlife Research*, 64(5), 60.
- 751 Navarro-Gonzalez, N., Mentaberre, G., Porrero, C. M., Serrano, E., Mateos, A., Lopez-Martin, J.
752 M., . . . Domínguez, L. (2012). Effect of cattle on Salmonella carriage, diversity and

- 753 antimicrobial resistance in free-ranging wild boar (*Sus scrofa*) in northeastern Spain.
754 *PLoS One*, 7(12), e51614. doi:10.1371/journal.pone.0051614
- 755 Okubo, T., Yossapol, M., Maruyama, F., Wampande, E. M., Kakooza, S., Ohya, K., . . . Ushida,
756 K. (2019). Salmonella seroprevalence and genotypic analyses of antimicrobial resistant bacteria in
757 livestock in Uganda. *Transbound Emerg Dis*, 66(1), 317-326.
758 doi:doi:10.1111/tbed.13024
- 759 Ortega, N., Fanelli, A., Serrano, A., Martínez-Carrasco, C., Escribano, F., Tizzani, P., & Candela,
760 M. G. (2020). Salmonella seroprevalence in wild boar from Southeast Spain depends on
761 host population density. *Res Vet Sci*, 132, 400-403. doi:10.1016/j.rvsc.2020.07.026
- 762 Palomo Guijarro, G. (2011). *Resistencia a los antimicrobianos en cepas de salmonella*
763 *entérica de origen animal*. (PhD). Universidad de Extremadura,
- 764 Parry, C. M., Thuy, C. T., Dongol, S., Karkey, A., Vinh, H., Chinh, N. T., . . . Hoang, N. V. M.
765 (2010). Suitable disk antimicrobial susceptibility breakpoints defining *Salmonella*
766 enterica serovar Typhi isolates with reduced susceptibility to fluoroquinolones.
767 *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 54(12), 5201-5208.
- 768 Pinto, L., Poeta, P., Vieira, S., Caleja, C., Radhouani, H., Carvalho, C., . . . Igrejas, G. (2010).
769 Genomic and proteomic evaluation of antibiotic resistance in *Salmonella* strains. *Journal*
770 *of Proteomics*, 73(8), 1535-1541. doi:10.1016/j.jprot.2010.03.009
- 771 Rad, M., Kooshan, M., & Mesgarani, H. (2010). Quinolone resistance among *Salmonella enterica*
772 and *Escherichia coli* of animal origin. *Comparative Clinical Pathology*, 21(2), 161-165.
773 doi:10.1007/s00580-010-1078-2
- 774 Radhouani, H., Igrejas, G., Gonçalves, A., Pacheco, R., Monteiro, R., Sargo, R., . . . Poeta, P.
775 (2013). Antimicrobial resistance and virulence genes in *Escherichia coli* and enterococci
776 from red foxes (*Vulpes vulpes*). *Anaerobe*, 23, 82-86.
777 doi:<http://dx.doi.org/10.1016/j.anaerobe.2013.06.013>
- 778 Radhouani, H., Silva, N., Poeta, P., Torres, C., Correia, S., & Igrejas, G. (2014). Potential impact
779 of antimicrobial resistance in wildlife, environment and human health. *Front Microbiol*,
780 5, 23. Retrieved from
781 <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3913889/pdf/fmicb-05-00023.pdf>
- 782 Rahmani, M., Peighambari, S. M., Svendsen, C. A., Cavaco, L. M., Agersø, Y., & Hendriksen,
783 R. S. (2013). Molecular clonality and antimicrobial resistance in *Salmonella enterica*
784 serovars Enteritidis and Infantis from broilers in three Northern regions of Iran. *BMC Vet*
785 *Res*, 9(1), 66.
- 786 Randall, L., Coldham, N., & Woodward, M. J. (2005). Detection of mutations in *Salmonella*
787 enterica *gyrA*, *gyrB*, *parC* and *parE* genes by denaturing high performance liquid
788 chromatography (DHPLC) using standard HPLC instrumentation. *Journal of*
789 *Antimicrobial Chemotherapy*, 56(4), 619-623. Retrieved from
790 <https://academic.oup.com/jac/article/56/4/619/769331>
- 791 Razzuoli, E., Listorti, V., Martini, I., Migone, L., Decastelli, L., Mignone, W., . . . Serracca, L.
792 (2021). Prevalence and Antimicrobial Resistances of *Salmonella* spp. Isolated from Wild
793 Boars in Liguria Region, Italy. *Pathogens*, 10(5), 568.
- 794 Roberts, M. C., & Schwarz, S. (2009). Tetracycline and Chloramphenicol Resistance
795 Mechanisms. 183-193. doi:10.1007/978-1-59745-180-2_15
- 796 Ruiz, J., Castro, D., Goni, P., Santamaria, J., Borrego, J., & Vila, J. (1997). Analysis of the
797 mechanism of quinolone resistance in nalidixic acid-resistant clinical isolates of
798 *Salmonella* serotype Typhimurium. *Journal of Medical Microbiology*, 46(7), 623-628.
- 799 Sannö, A., Rosendal, T., Aspán, A., Backhans, A., & Jacobson, M. (2018). Distribution of
800 enteropathogenic *Yersinia* spp. and *Salmonella* spp. in the Swedish wild boar population,
801 and assessment of risk factors that may affect their prevalence. *Acta Vet Scand*, 60(1), 40.
802 doi:10.1186/s13028-018-0395-3
- 803 Schley, L., & Roper, T. J. (2003). Diet of wild boar *Sus scrofa* in Western Europe, with particular
804 reference to consumption of agricultural crops. 33(1), 43-56.
805 doi:<https://doi.org/10.1046/j.1365-2907.2003.00010.x>
- 806 Skurnik, D., Ruimy, R., Andremont, A., Amarin, C., Rouquet, P., Picard, B., & Denamur, E.
807 (2006). Effect of human vicinity on antimicrobial resistance and integrons in animal

- 808 faecal *Escherichia coli*. *J Antimicrob Chemother*, 57(6), 1215-1219.
 809 doi:10.1093/jac/dkl122
- 810 Srikumar, S., Kroger, C., Hebrard, M., Colgan, A., Owen, S. V., Sivasankaran, S. K., . . . Hinton,
 811 J. C. (2015). RNA-seq Brings New Insights to the Intra-Macrophage Transcriptome of
 812 *Salmonella Typhimurium*. *PLoS Pathog*, 11(11), e1005262.
 813 doi:10.1371/journal.ppat.1005262
- 814 Swift, B. M., Bennett, M., Waller, K., Dodd, C., Murray, A., Gomes, R. L., . . . Whitlock, S. E.
 815 (2019). Anthropogenic environmental drivers of antimicrobial resistance in wildlife.
 816 *Science of the Total Environment*, 649, 12-20. Retrieved from
 817 <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0048969718331449>
- 818 Tamminen, M., Karkman, A., Lohmus, A., Muziasari, W. I., Takasu, H., Wada, S., . . . Virta, M.
 819 (2019). Tetracycline resistance genes persist at aquaculture farms in the absence of
 820 selection pressure. *Environ Sci Technol*, 45(2), 386-391. doi:10.1021/es102725n
- 821 Tawyabur, M., Islam, M. S., Sobur, M. A., Hossain, M. J., Mahmud, M. M., Paul, S., . . . Rahman,
 822 M. T. (2020). Isolation and Characterization of Multidrug-Resistant *Escherichia coli* and
 823 *Salmonella* spp. from Healthy and Diseased Turkeys. *Antibiotics*, 9(11), 770. Retrieved
 824 from <https://www.mdpi.com/2079-6382/9/11/770>
- 825 Threlfall, E. J., Teale, C. J., Davies, R. H., Ward, L. R., Skinner, J. A., Graham, A., . . . Speed, K.
 826 (2003). A comparison of antimicrobial susceptibilities in nontyphoidal salmonellas from
 827 humans and food animals in England and Wales in 2000. *Microb Drug Resist*, 9(2), 183-
 828 189. doi:10.1089/107662903765826787
- 829 Toleman, M. A., Bennett, P. M., & Walsh, T. R. (2006). ISCR elements: novel gene-capturing
 830 systems of the 21st century? *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 70(2), 296-
 831 316.
- 832 Torres, R. T., Fernandes, J., Carvalho, J., Cunha, M. V., Caetano, T., Mendo, S., . . . Fonseca, C.
 833 (2020). Wild boar as a reservoir of antimicrobial resistance. *Sci Total Environ*, 717,
 834 135001. doi:10.1016/j.scitotenv.2019.135001
- 835 Vieira-Pinto, M., Morais, L., Caleja, C., Themudo, P., Aranha, J., Torres, C., . . . Martins, C.
 836 (2011). *Salmonella* spp. in wild boar (*Sus scrofa*): a public and animal health concern. In
 837 P. P., B. A., V. M., W. R., & F. J. M. Smulders (Eds.), *Game meat hygiene in focus* (pp.
 838 131-136). The Netherlands: Wageningen Academic Publishers.
- 839 Vieira-Pinto, M., Morais, L., Caleja, C., Themudo, P., Torres, C., Igrejas, G., . . . Martins, C.
 840 (2011). *Salmonella* sp. in game (*Sus scrofa* and *Oryctolagus cuniculus*). *Foodborne*
 841 *Pathog Dis*, 8(6), 739-740. doi:10.1089/fpd.2010.0742
- 842 Vittecoq, M., Godreuil, S., Prugnolle, F., Durand, P., Brazier, L., Renaud, N., . . . Gauthier-Clerc,
 843 M. (2016). Antimicrobial resistance in wildlife. *Journal of applied ecology*, 53(2), 519-
 844 529.
- 845 WHO. (2019). *Critically important antimicrobials for human medicine, 6th revision*: WHO.
- 846 Yu, J., Liu, D., & Li, K. (2015). Influence of tetracycline on tetracycline-resistant heterotrophs
 847 and tet genes in activated sludge process. *Current microbiology*, 70(3), 415-422.
 848 Retrieved from <https://link.springer.com/article/10.1007%2Fs00284-014-0731-4>
- 849 Zottola, T., Montagnaro, S., Magnapera, C., Sasso, S., De Martino, L., Bragagnolo, A., . . .
 850 Pagnini, U. (2013). Prevalence and antimicrobial susceptibility of salmonella in European
 851 wild boar (*Sus scrofa*); Latium Region - Italy. *Comp Immunol Microbiol Infect Dis*, 36(2),
 852 161-168. doi:10.1016/j.cimid.2012.11.004

Table 1. Game estates included in the study.

Code	Density †	EMT ‡	Livestock §	Supplementation ¶	Fence #	N° Isolates	N° subspecies/serotypes
E1	Very High	HF	No	Yes	Yes	10	2 / 2
E2	Very High	Yes	No	Yes	No	2	2 / 2
E3	High	Yes	Yes	Yes	Yes	5	2 / 4
E4	High	Yes	Yes	Yes	Yes	22	3 / 15
E5	High	No	Yes	No	No	4	2 / 3
E6	Very High	Yes	No	Yes	Yes	3	1 / 3
E7	Very High	Yes	No	Yes	Yes	5	1 / 3
E8	High	No	No	No	Yes	2	1 / 2
E9	High	No	No	No	Yes	6	3 / 5
E10	Medium-Low	No	Yes	No	No	7	2 / 2
E12	High	Yes	No	Yes	Yes	13	2 / 8
E13	Very High	Yes	No	Yes	Yes	1	1 / 1
E14	Very High	Yes	No	Yes	Yes	3	2 / 3
E15	Very High	Yes	No	Yes	Yes	3	1 / 2
E17	High	Yes	No	Yes	Yes	3	2 / 3
E20	Medium-Low	Yes	No	Yes	Yes	5	1 / 4
E22	Medium-Low	No	No	No	No	3	1 / 1
E23	Medium-Low	No	Yes	No	No	7	2 / 3
E26	Medium-Low	No	Yes	No	No	4	1 / 3
E29	High	No	No	No	No	1	1 / 1
E35	Medium-Low	Yes	No	Yes	Yes	1	1 / 1
E36	Very High	Yes	Yes	Yes	Yes	1	1 / 1
E37	Very High	HF	No	Yes	Yes	7	2 / 3
E38	Medium-Low	Yes	No	Yes	Yes	3	1 / 3

† Density categories (wild boars/100ha): Medium-Low 1-20; High 21-40; Very high >40

‡ Estate management type (EMT): No (without management); Yes (with management);

HF (Hunting farms). § Presence of livestock in the same fields as the wild boars. ¶

Feeding supplementation to the wild boars. # Fenced estate.

Table 2: AMR characteristics: genotype-phenotype associations.

<i>Antimicrobials</i>	<i>Resistant isolates</i> †	<i>Determinant found</i>	<i>Gene (+) isolates</i>		% <i>G+/Ph+</i> ‡
			<i>G+/Ph+</i> ‡	<i>G+/Ph-</i> §	
Sulphonamides					
Sulphonamide	78 (85.7%)	<i>sul1</i>	18	4	34.6%
Trimethoprim/ sulphamethoxazole	29 (31.9%)	<i>sul2</i> <i>sul3</i>	12 5	5 1	(27/78)
Aminoglycosides					
Neomycin	2 (2.2%)	<i>aadA1</i>	5	4	47.7%
Streptomycin	42 (46.2%)	<i>strA</i> <i>strB</i>	18 17	1 1	(21/44)
Tetracyclines					
Doxycycline	19 (20.9%)	<i>tetA</i>	14	0	78.3%
Tetracycline	23 (25.3%)	<i>tetB</i>	6	2	(18/23)
β-lactams					
Ampicillin	16 (17.6%)				
Cefotaxime	1 (1.1%)	<i>bla_{TEM}</i>	11	0	75% (11/16)
Ceftiofur	1 (1.1%)				
Quinolones					
Nalidixic acid	7 (6.6%)	<i>gyrA</i>	5	0	71.4% (5/7)
Phenicol					
Chloramphenicol	6 (6.6%)	<i>int1</i> [#]	5	2	83.3% (5/6)

† Number of isolates resistant to a certain antibiotic and its percentage referred to the total number of resistant isolates in the study.

‡ Number of resistant isolates (Ph+) with a candidate gene identified (G+).

§ Number of susceptible isolates (Ph-) presenting a resistance determinant identified (G+).

¶ Percentage of isolates with any of the genes studied amongst the isolates resistant to any of the members of the antimicrobial family.

[#] *Int1* is frequently associated to the *floR* genes, which confer resistance to phenicol (Carattoli, 2001).

Table 3: phenotype-AMR profiles.

<i>Phenotype profile</i>	<i>n</i>	<i>%</i>	<i>S. enterica</i>	<i>S. diarizonae</i>	<i>S. salamae</i>	<i>Estates (E)</i>
SUL-	20	22,0	14	5	1	1, 3, 4, 7, 12, 15, 17, 23, 26, 37
SUL-TRS-	17	18,7	5	8	4	4, 5, 12, 13, 15, 22, 23
DOX-STR-SUL-TET-	10	11,0	9	1	-	4, 9, 15, 36, 37
STR-SUL-	8	8,8	5	3	-	7, 9, 10, 14, 20
STR-SUL-TRS-	4	4,4	-	4	-	7, 10, 14, 17
STR-	4	4,4	1	3	-	1, 4, 38
NAL-STR-	3	3,3	3	-	-	1, 6, 29
NAL-	2	2,2	2	-	-	10
AMP-DOX-STR-SUL-TET-	2	2,2	2	-	-	3, 37
AMP-DOX-STR-SUL-TET-TRS-	2	2,2	2	-	-	6, 38
STR-SUL-TET-	2	2,2	2	-	-	4, 9
AMP-SUL-TRS-	2	2,2	1	-	1	4, 12
AMP-CHL-DOX-STR-SUL-TET-TRS-	2	2,2	2	-	-	14, 20
DOX-TET-	1	1,1	1	-	-	2
NEO-SUL-	1	1,1	1	-	-	1
AMP-CHL-SUL-	1	1,1	1	-	-	3
AMP-CHL-CTA-CTF-DOX-STR-SUL-TET-TRS-	1	1,1	1	-	-	3
NAL-STR-SUL-	1	1,1	1	-	-	26
NEO-	1	1,1	1	-	-	26
AMP-NAL-TET-	1	1,1	-	-	1	4
AMP-	1	1,1	-	-	1	4
AMP-STR-SUL-	1	1,1	-	-	1	4
AMP-SUL-	1	1,1	-	-	1	4
AMP-CHL-DOX-SUL-TET-	1	1,1	1	-	-	5
CHL-STR-SUL-	1	1,1	1	-	-	7
AMP-STR-SUL-TET-TRS-	1	1,1	1	-	-	38

AMP-Ampicillin; CHL-Chloramphenicol; DOX-Doxicielin; STR-Streptomycin; SUL-Sulphonamide, TET-Tetracycline; TRS- trimethoprim/sulphamethoxazole

Table 4: Genotype-AMR profiles.

<i>Genotype profile</i>	<i>n</i>	<i>%</i>	<i>S. enterica</i>	<i>S. diarizonae</i>	<i>S. salamae</i>	<i>Estates (E)</i>
<i>sul1-</i>	9	18,4	9	-	-	1, 4, 5, 7, 37, 38
<i>gyrA-</i>	4	8,2	4	-	-	3, 10, 26
<i>strA-strB-sul2-tetA-</i>	4	8,2	4	-	-	4, 37
<i>blaTEM-strA-strB-sul2-tetB-</i>	3	6,1	3	-	-	3, 6, 37
<i>sul2-</i>	3	6,1	-	2	-	9, 12, 22
<i>blaTEM-</i>	3	6,1	-	-	3	4
<i>strA-strB-sul1-sul2-tetA-tetB-</i>	2	4,1	2	-	-	4, 9
<i>strA-strB-tetA-</i>	2	4,1	1	1	-	9, 37
<i>aadA1-blaTEM-dhfrA1-sul1-sul3-</i>	2	4,1	2	-	-	14, 20
<i>strA-strB-</i>	1	2,0	1	-	-	1
<i>aadA1-blaPSE-sul1-</i>	1	2,0	1	-	-	3
<i>aadA1-strA-strB-sul1-sul2-</i>	1	2,0	1	-	-	3
<i>gyrA-sul1-</i>	1	2,0	1	-	-	6
<i>sul3-</i>	1	2,0	1	-	-	26
<i>tetB-</i>	1	2,0	-	1	-	12
<i>aadA1-strA-strB-sul1-sul2-tetA-</i>	1	2,0	1	-	-	4
<i>strA-</i>	1	2,0	-	1	-	4
<i>blaTEM-strA-strB-sul1-sul2-sul3-tetA-</i>	1	2,0	-	-	1	4
<i>aadA1-blaTEM-tetB-</i>	1	2,0	-	-	1	4
<i>sul1-sul2-</i>	1	2,0	1	-	-	23
<i>aadA1-</i>	1	2,0	1	-	-	23
<i>aadA1-sul3-tetA-</i>	1	2,0	1	-	-	7
<i>strA-strB-tetB-</i>	1	2,0	1	-	-	38
<i>aadA1-blaTEM-sul1-sul3-tetA-</i>	1	2,0	1	-	-	38
<i>strA-strB-sul1-tetA-</i>	1	2,0	1	-	-	37
<i>strA-strB-sul1-sul2-tetA-</i>	1	2,0	1	-	-	37

Supplementary table: Antimicrobial resistance pattern and genotype of all isolates.

Isolate	Estate	Subspecies	Serotype	AMR phenotype	AMR genotype	Replicon profile	Class 1 Integrase
10.1	E10	diarizonae	38:z10:z53	-	-	-	-
10.2	E10	diarizonae	38:z10:z53	STR-SUL-TRS	-	-	-
10.3	E10	diarizonae	38:z10:z53	STR-SUL-(GEN-NEO)	-	-	-
10.4	E10	diarizonae	38:z10:z53	STR-SUL-(NEO)	-	-	-
10.5	E10	enterica	Enteritidis 9,12:g.m:-	NAL-(ENR)	gyrA _{087Y}	-	-
10.6	E10	enterica	Enteritidis 9,12:g.m:-	(SUL)	-	-	-
10.7	E10	enterica	Enteritidis 9,12:g.m:-	NAL-(ENRO)	gyrA _{087Y}	-	-
2.1	E2	enterica	Choleraesuis 6,7:-:1,5 (v.Krf)	STR-SUL	-	-	-
2.2	E2	salamae	4,12:b:-	(STR)	-	-	-
1.1	E1	enterica	Choleraesuis 6,7:-:1,5 (v.Krf)	DOX-TET	strA-strB	-	-
1.2	E1	salamae	4,12:b:-	(NEO-STR)	-	-	-
1.3	E1	enterica	Choleraesuis 6,7:-:1,5 (v.Krf)	SUL-(STR)	sulI	-	-
1.4	E1	enterica	Choleraesuis 6,7:-:1,5 (v.Krf)	SUL-(STR)	sulI	-	-
1.5	E1	enterica	Choleraesuis 6,7:-:1,5 (v.Krf)	NEO-SUL-(STR)	-	-	-
1.6	E1	enterica	Choleraesuis 6,7:-:1,5 (v.Krf)	SUL-(STR)	sulI	-	-
1.7	E1	enterica	Choleraesuis 6,7:-:1,5 (v.Krf)	STR-(NEO)	-	-	-
1.8	E1	enterica	Choleraesuis 6,7:-:1,5 (v.Krf)	SUL-(STR)	sulI	-	-
1.9	E1	enterica	Choleraesuis 6,7:-:1,5 (v.Krf)	(STR)	-	-	-
1.10	E1	enterica	Choleraesuis 6,7:-:1,5 (v.Krf)	SUL-(NEO-STR)	-	-	-
3.1	E3	enterica	Choleraesuis 6,7:c:1,5 (v.Krf)	NAL-STR-(ENR)	gyrA _{087N}	-	-
3.2	E3	enterica	Typhimurium 1,4,5,12:i:1,2	AMP-CHL-SUL-(TET)	blaPSE-acdA1-sulI	-	+
3.3	E3	enterica	Bredeney 4,12:1,v:1,7	AMP-CHL-CTA-CTF-DOX-STR-SUL-TET-TRS	acda1-strA-strB-sulI-sul2	-	+

(---) Antimicrobial intermediate sensitivity // (v. Krf) *Kaizendorfer* variant.

Supplementary table (cont-D): Antimicrobial resistance pattern and genotype of all isolates.

Isolate	Estate	Subspecies	Serotype	AMR phenotype	AMR genotype	Replicon profile	Class I integrase
3.4	E3	<i>diarizonae</i>	38:z10:z53	SUL-(STR)	-	FIIA-HII-HI2-K/B	-
3.5	E3	<i>enterica</i>	Typhimurium 1,4,5,12:i:1,2	AMP-DOX-STR-SUL-TET	<i>blaTEM-strA-strB-sul2-tetB</i>	-	-
6.1	E6	<i>enterica</i>	Hessarek 4,12:a:1,5	SUL	-	-	-
6.2	E6	<i>enterica</i>	Typhimurium monofásica 4,5,12:i :-	AMP-DOX-STR-SUL-TET-TRS-(NEO)	<i>blaTEM-strA-strB-sul2-tetB</i>	-	-
6.3	E6	<i>enterica</i>	Choleraesuis 6,7:-:1,5 (v.Krf)	NAL-STR-(ENR-TET)	<i>sul1-gyrA(ORF8)</i>	-	-
8.1	E8	<i>salamae</i>	50:bz6	-	-	-	-
8.2	E8	<i>salamae</i>	50:bz7	(NEO)	-	-	-
26.1	E26	<i>enterica</i>	Enteritidis 9,12:g,m:-	-	-	-	-
26.2	E26	<i>enterica</i>	Lille 6,7:z38:-	-	-	FIC-I1	-
26.3	E26	<i>enterica</i>	Choleraesuis 6,7:-:1,5 (v.Krf)	NAL-STR-SUL-(ENR)	<i>gyrA(ORF8)</i>	-	-
26.4	E26	<i>enterica</i>	Enteritidis 9,12:g,m:-	SUL-(NEO)	<i>sul3</i>	HII	-
17.1	E17	<i>enterica</i>	Hessarek 4,12:a:1,5	NEO-(CTA-CTF)	-	-	-
17.2	E17	<i>diarizonae</i>	Typhimurium 1,4,12:i:1,2	STR-SUL-TRS	-	-	-
17.3	E17	<i>enterica</i>	45:z4,z23:-	SUL	-	-	-
9.1	E9	<i>houtenae</i>	48:i:z	-	-	-	-
9.2	E9	<i>diarizonae</i>	48:i:z	(STR)	<i>sul2</i>	-	-
9.3	E9	<i>enterica</i>	Choleraesuis 6,7:c:1,5 (v.Krf)	DOX-STR-SUL-TET	<i>strA-strB-sul1-sul2-tetA-tetB</i>	FIIA	-
9.4	E9	<i>diarizonae</i>	47:1,v:z53	STR-SUL	-	-	-
9.5	E9	<i>enterica</i>	Choleraesuis 6,7:c:1,5 (v.Krf)	STR-SUL-TET	<i>strA-strB-tetA</i>	FIIA-HII	-
9.6	E9	<i>diarizonae</i>	48:k:1,5,7	(STR)	-	-	-
12.1	E12	<i>enterica</i>	Mikawasima 6,7:y:e,n,z15	(DOX)	-	I1	-

(-) Antimicrobial intermediate sensitivity // (v. Krf) *Kimzendorf* variant.

Supplementary table (cont-2): Antimicrobial resistance pattern and genotype of all isolates.

Isolate	Estate	Subspecies	Serotype	AMR phenotype	AMR genotype	Replicon profile	Class 1 integrase
12.2	E12	enterica	Bardo 8:e,h:1,2	SUL-TRS	-	HI1	-
12.3	E12	enterica	Bardo 8:e,h:1,2	AMP-SUL-TRS	-	HI1	-
12.4	E12	enterica	Newport 6,8:e,h:1,2	SUL-TRS	-	HI1	-
12.5	E12	diarizonae	61:k:1,5,7	SUL-TRS	-	HI1	-
12.6	E12	diarizonae	61:k:1,5,8	SUL-TRS	<i>tetB</i>	FIA-HI1-K/B-W	-
12.7	E12	enterica	Bardo 8:e,h:1,2	SUL-TRS	-	HI1	-
12.8	E12	diarizonae	48:k:1,5,7	SUL-TRS-(STR)	-	HI1	-
12.9	E12	diarizonae	48:k:1,5,8	SUL-(NEO-STR)	-	-	-
12.10	E12	enterica	Newport 6,8:e,h:1,2	SUL-TRS-(NEO)	-	HI1	-
12.11	E12	enterica	Newport 6,8:e,h:1,2	SUL-TRS	-	-	-
12.12	E12	diarizonae	16: 1,y: 1,5,7	-	<i>sul2</i>	-	-
12.13	E12	enterica	Newport 6,8:e,h:1,2	(TET)	-	-	-
20.1	E20	enterica	Welkade 16:1v:1,7	(STR)	-	-	-
20.2	E20	enterica	Welkade 16:1v:1,8	(NEO-STR)	-	FIA	-
20.3	E20	enterica	Typhimurium 4,5,12:i:1,2	AMP-CHL-DOX-STR-SUL-TET-TRS-(NEO)	<i>blaTEM-dhfrA1-acadA1-sul1-sul3</i>	HI1	+
20.4	E20	enterica	Welkade 16:1v:1,8	STR-SUL	-	FIA-HI1	-
20.5	E20	enterica	Hessarek 4,12:a:1,5	-	-	HI1-I1	-
15.1	E15	diarizonae	35:r.z35	-	-	FIA	-
15.2	E15	diarizonae	48:k:1,5,7	SUL-TRS-(NEO-STR)	-	-	-
15.3	E15	diarizonae	48:k:1,5,7	SUL-(NEO-STR)	-	FIA-HI1-K/B-W	-
4.1	E4	enterica	Choleraesuis 6,7:c:1,5 (v:Krf)	DOX-STR-SUL-TET	<i>acadA1-strA-strB-sul1-sul2-tet4</i>	-	-

(---) Antimicrobial intermediate sensitivity //(v:Krf) Künzendorf variant.

Supplementary table (cont-3): Antimicrobial resistance pattern and genotype of all isolates.

Isolate	Estate	Subspecies	Serotype	AMR phenotype	AMR genotype	Replicon profile	Class I integrase
4.2	E4	<i>enterica</i>	Choleraesuis 6,7:c:1,5 (v, Krf)	STR-SUL-TET-(DOX)	<i>strA-strB-sul1-sul2-tetA-tetB</i>	-	-
4.3	E4	<i>salamae</i>	13,22:k:-	(STR)	-	-	-
4.4	E4	<i>enterica</i>	Choleraesuis 6,7:c:1,5	DOX-STR-SUL-TET-(CTA)	<i>sul1</i>	-	-
4.5	E4	<i>enterica</i>	Newport 6,8:e,h:1,2	SUL-(NEO)	-	-	-
4.6	E4	<i>diarizonae</i>	48:z10:e,n,x,z15	SUL-(STR)	<i>strA</i>	-	-
4.7	E4	<i>diarizonae</i>	38:z10:z53	SUL-(NEO-STR)	-	-	-
4.8	E4	<i>diarizonae</i>	61:1,v:1,5,7	(STR)	-	-	-
4.9	E4	<i>salamae</i>	13,22:k:-	AMP-NAL-TET-(DOX-ENR-NEO)	<i>blaTEM-strA-strB-sul1-sul2-sul3-tetA</i>	HI1	+
4.10	E4	<i>salamae</i>	4,12,27: g,s,t:-	AMP-(STR)	<i>blaTEM</i>	-	-
4.11	E4	<i>salamae</i>	4,12,27: g,s,t:-	AMP-SUL-TRS-(STR)	<i>blaTEM</i>	FIA-HI1	-
4.12	E4	<i>enterica</i>	Choleraesuis 6,7:c:1,5	DOX-STR-SUL-TET	<i>strA-strB-sul2-tetA</i>	B/O-FIIA-HI1-II	-
4.13	E4	<i>enterica</i>	Choleraesuis 6,7:c:1,6	DOX-STR-SUL-TET	<i>strA-strB-sul2-tetA</i>	-	-
4.14	E4	<i>enterica</i>	Hessarek 4,12:a:1,5	SUL-(NEO)	-	-	-
4.15	E4	<i>salamae</i>	13,23;z29:e,n,x	AMP-STR-SUL	<i>blaTEM</i>	-	-
4.16	E4	<i>salamae</i>	13,23;z29:e,n,x	AMP-SUL-(NEO-STR)	<i>blaTEM-acadA1-tetB</i>	-	+
4.17	E4	<i>diarizonae</i>	48:1;z53	STR-(TET)	-	-	-
4.18	E4	<i>diarizonae</i>	47:1,v;z53	STR-(TET)	-	-	-
4.19	E4	<i>diarizonae</i>	38:z10:z53	(STR)	-	Y	-
4.20	E4	<i>diarizonae</i>	38:z10:z53	(STR-TET)	-	-	-
4.21	E4	<i>diarizonae</i>	38:z10:z53	(STR)	-	-	-
4.22	E4	<i>diarizonae</i>	16:1,v:1,5,7	SUL-TRS-(STR)	-	-	-
23.1	E23	<i>enterica</i>	Lille 6,7:z38:-	(STR)	<i>sul1-sul2</i>	-	-

(--): Antimicrobial intermediate sensitivity // (v, Krf) *Kinzenzendorf* variant.

Supplementary table (cont-4): Antimicrobial resistance pattern and genotype of all isolates.

Isolate	Estate	Subspecies	Serotype	AMR phenotype	AMR genotype	Replicon profile	Class 1 integrase
23.2	E23	<i>enterica</i>	Muenchen 6,8:d:1,2	SUL-(NEO-STR)	<i>acaA1</i>	-	-
23.3	E23	<i>enterica</i>	Lille 6,7:z38:-	SUL-(STR)	-	-	-
23.4	E23	<i>salamae</i>	4,12:b:-	SUL-TRS-(STR)	-	-	-
23.5	E23	<i>salamae</i>	4,12:b:-	SUL-TRS-(NEO-STR)	-	-	-
23.6	E23	<i>salamae</i>	4,12:b:-	SUL-TRS-(STR)-	-	-	-
23.7	E23	<i>salamae</i>	4,12:b:-	SUL-(STR)	-	FIIA	-
22.1	E22	<i>salamae</i>	42:b:e,n,x,z,15	-	<i>stu2</i>	B/O-HI1	-
22.2	E22	<i>salamae</i>	42:b:e,n,x,z,15	SUL-TRS-(NEO)	-	-	-
22.3	E22	<i>salamae</i>	42:b:e,n,x,z,15	-	-	B/O-HI1- A/C-B/O-FIC- HI1-K/B	-
13.1	E13	<i>enterica</i>	Choleraesuis 6,7:-:1,5 (v.Krf)	-	-	-	-
5.1	E5	<i>diarizonae</i>	48:i:z53	SUL-TRS	-	-	-
5.2	E5	<i>diarizonae</i>	47:1,v:z53	SUL-TRS-(NEO-STR)	-	FIA-FIB -HI1-I1	-
5.3	E5	<i>diarizonae</i>	47:1,v:z53	SUL-TRS-(STR)	-	HI1-HI2	-
5.4	E5	<i>enterica</i>	Choleraesuis 6,7:-:1,5 (v.Krf)	(STR)	<i>stu1</i>	FIB-HI1	-
7.1	E7	<i>enterica</i>	Rissen 6,7:f:g:-	AMP-CHL-DOX-SUL-TET-(STR)	<i>acaA1-stu3-tet4</i>	HI1	+
7.2	E7	<i>enterica</i>	Brandenburg 4,12:1,v:e,n,z15	SUL-(STR)	-	HI1	-
7.3	E7	<i>enterica</i>	Choleraesuis 6,7:-:1,5 (v.Krf)	STR-SUL	-	FIIA-HI1	-
7.4	E7	<i>enterica</i>	Choleraesuis 6,7:-:1,5 (v.Krf)	STR-SUL	<i>stu1</i>	FIIA	-
7.5	E7	<i>enterica</i>	Choleraesuis 6,7:-:1,5 (v.Krf)	CHL-STR-SUL	-	HI1	-
29.1	E29	<i>diarizonae</i>	48:i:z53	STR-SUL-TRS	-	-	-
14.1	E14	<i>enterica</i>	Choleraesuis 6,7:-:1,5 (v.Krf)	NAL-STR-(ENR-TET)	-	-	-

(--): antimicrobial intermediate sensitivity // (v. Krf) *Kimzenhof* variant.

Supplementary table (cont-5): Antimicrobial resistance pattern and genotype of all isolates.

Isolate	Estate	Subspecies	Serotype	AMR phenotype	AMR genotype	Replicon profile	Class 1 integrase
14.2	E14	<i>enterica</i>	Thompson 6,7:k:1,5	AMP-CHI-DOX-STR-SUL-TET-TRS	<i>blaTEM-dhfr-A1-acadA1-sul1-sul3</i>	HI2-N	+
14.3	E14	<i>diarizonae</i>	48:i:z53	STR-SUL-TRS	-	-	-
38.1	E38	<i>enterica</i>	Choleraesuis 6,7:-:1,5 (v.Krf)	STR-SUL	<i>sul1</i>	FIIA-HII	-
38.2	E38	<i>enterica</i>	Typhimurium monofásica 4,12:i:-	AMP-DOX-STR-SUL-TET-TRS	<i>strA-strB-tetB</i>	HI1	-
38.3	E38	<i>enterica</i>	Choleraesuis 6,7:c:1,5 (v.Krf)	AMP-STR-SUL-TET-TRS	<i>blaTEM-acadA1-sul1-sul3-tetA</i>	-	-
35.1	E35	<i>diarizonae</i>	47:1v:z53	STR	-	FIB	-
36.1	E36	<i>diarizonae</i>	50:z2:1,5,7	-	-	FIIA-FIB	-
37.1	E37	<i>enterica</i>	Choleraesuis 6,7:c:1,5	DOX-STR-SUL-TET	<i>strA-strB-sul1-tetA</i>	FIIA-HII	-
37.2	E37	<i>diarizonae</i>	65:k:HMIII	DOX-STR-SUL-TET	<i>strA-strB-tetA</i>	FIIA-HII	-
37.3	E37	<i>enterica</i>	Choleraesuis 6,7:c:1,5	SUL-(STR)	<i>sul1</i>	-	-
37.4	E37	<i>enterica</i>	Typhimurium monofásica 4,12:i:-	AMP-DOX-STR-SUL-TET	<i>strA-strB-sul2-tetB</i>	Y	-
37.5	E37	<i>enterica</i>	Choleraesuis 6,7:c:1,5	DOX-STR-SUL-TET-(CTA)	<i>strA-strB-sul1-sul2-tetA</i>	FIIA-HII	-
37.6	E37	<i>enterica</i>	Choleraesuis 6,7:c:1,5	DOX-STR-SUL-TET	<i>strA-strB-sul2-tetA</i>	FIIA-HII	-
37.8	E37	<i>enterica</i>	Choleraesuis 6,7:c:1,5	DOX-STR-SUL-TET	<i>strA-strB-sul2-tetA</i>	FIIA-HI2	-

(---) Antimicrobial intermediate sensitivity // (v. Krf) Kinzendorf variant.

Figure 1

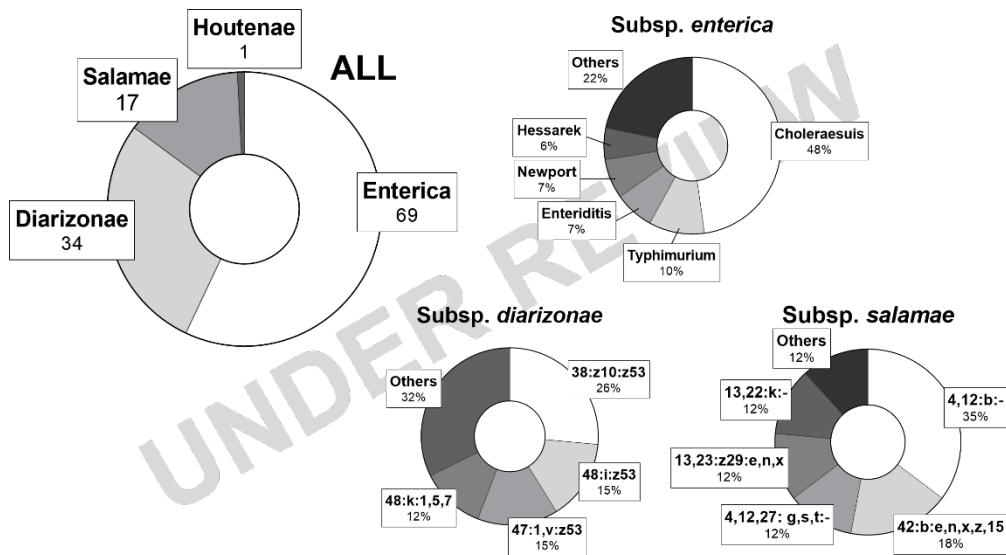


Figure 2

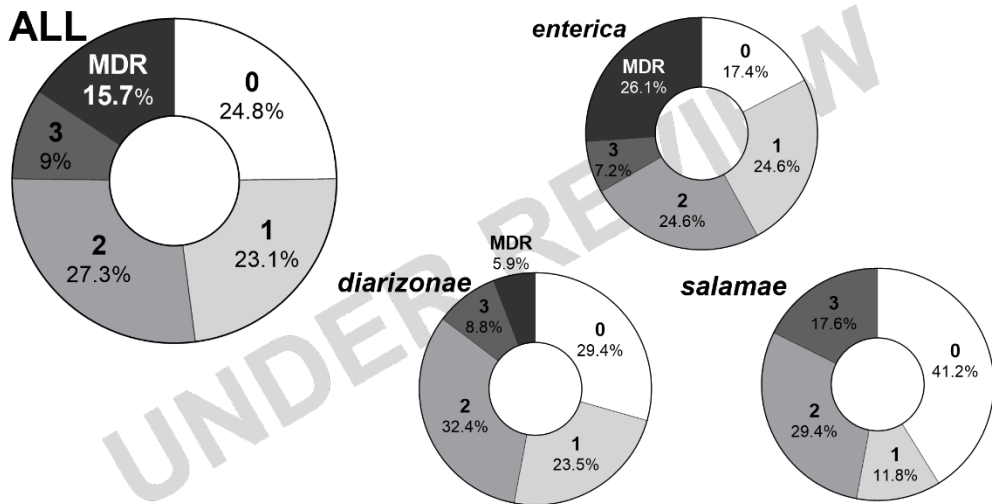


Figure 3

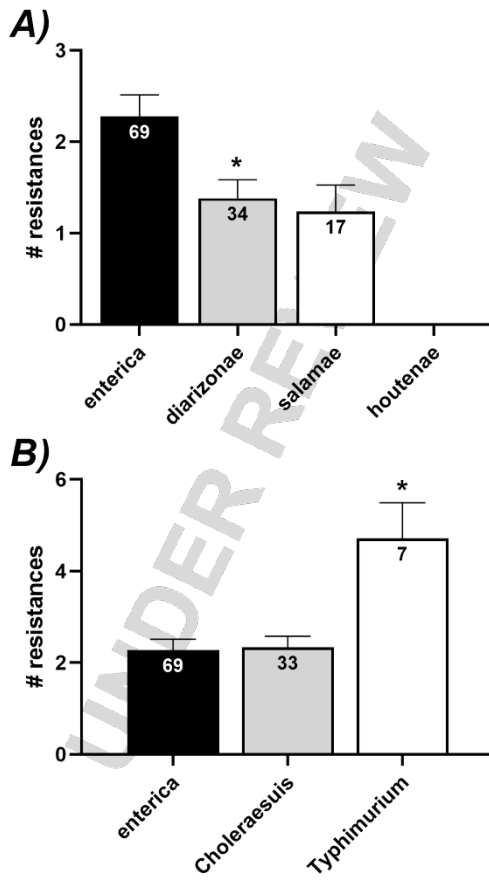
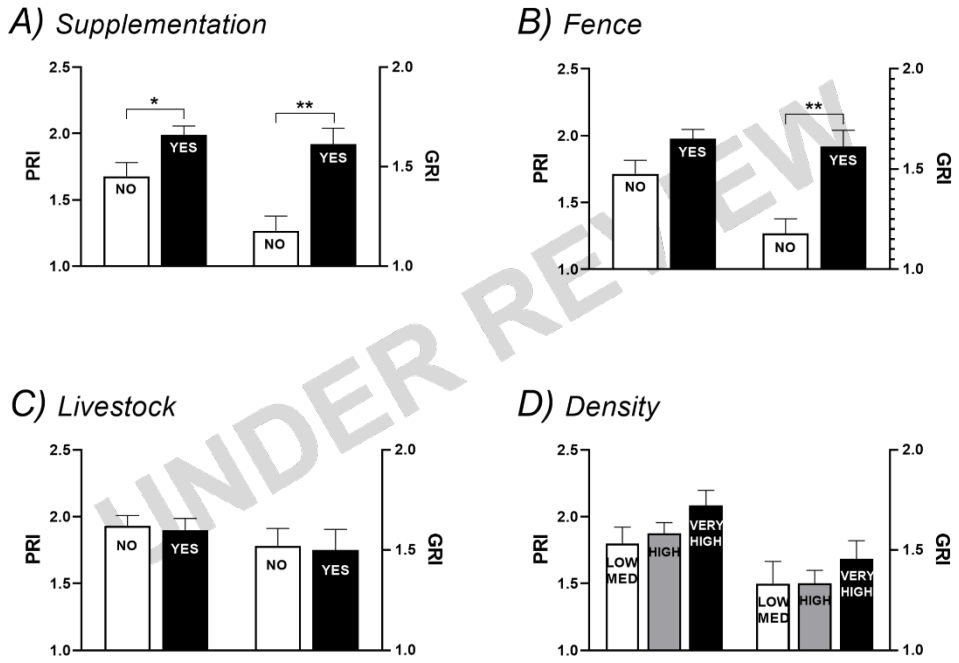


Figure 4



VII. DISCUSIÓN

En la presente tesis doctoral se estudian diferentes aspectos relativos a la infección por *Salmonella* en el jabalí, poniendo énfasis en la patología provocada en esta especie por el serotipo *S. Choleraesuis*, en el papel del jabalí como reservorio natural de *Salmonella*, y en la importancia de las resistencias antimicrobianas en este género de bacterias. *Salmonella* ha sido descrita en multitud de especies salvajes donde, con frecuencia, causa un cuadro clínico casi asintomático. Está ampliamente aceptado que la presencia de esta bacteria en animales salvajes puede estar influenciada por la contaminación ambiental derivada de la actividad ganadera o de los residuos humanos (Gaffuri & Holmes, 2012). Sin embargo, el papel de estas especies en la circulación de *Salmonella* entre los entornos salvaje y doméstico parece mucho más complejo que el simple hecho de actuar como fondo de saco epidemiológico (K. E. Jones et al., 2008; Simpson et al., 2018). El desarrollo de una salmonelosis leve o asintomática hace que muchos de los animales salvajes infectados se conviertan frecuentemente en portadores asintomáticos de la bacteria, contribuyendo a su diseminación y constituyendo un reservorio ambiental de *Salmonella*. Este hecho, unido a la amplia variedad de posibles especies hospedadoras, ha propiciado la presencia de esta bacteria en multitud de hábitats diferentes (Baudart et al., 2000; La Tela et al., 2021; Simpson et al., 2018). Entre los posibles hospedadores, hay tanto especies homeotermas como poiquilotermas, desde grandes herbívoros a pequeños roedores (Botti et al., 2013; Briones et al., 2004; La Tela et al., 2021; Simpson et al., 2018; Thomas et al., 2017; Zottola et al., 2013), lo que hace prácticamente imposible su erradicación y dificulta enormemente su control en las explotaciones ganaderas (Lapuz et al., 2012; C. J. Murray, 2000). En el ámbito silvestre, el jabalí es considerado un portador y reservorio relevante de varios patógenos zoonóticos, incluido *Salmonella* spp. (Sannö et al., 2018; Wacheck et al., 2010). Este hecho, unido al aumento de sus poblaciones en toda Europa, y al consumo cada vez más extendido de su carne, contribuyen a incrementar el riesgo de transmisión de *Salmonella* desde los jabalíes a la especie humana o a los animales domésticos. (Tack, 2018). En este contexto se pone de manifiesto la necesidad de profundizar en el conocimiento de los múltiples aspectos de la salmonelosis en el jabalí y, en particular, en aquellas características propias de la enfermedad en las poblaciones de este ungulado silvestre en la zona Suroeste de España, donde se concentran casi el 40% de sus capturas de todo el país (MITERD, 2019).

Son abundantes los estudios sobre prevalencia de salmonelosis en jabalíes en Europa, sin embargo, la información disponible en España es escasa y desactualizada, con los últimos estudios realizados en 2013, en la zona Noreste del país (Díaz-Sánchez et al., 2013; Mentaberre et al., 2013; N. Navarro-González, Casas-Díaz, et al., 2013; N. Navarro-González et al., 2012). Muchos de estos estudios se limitan a determinar la presencia de anticuerpos contra *Salmonella* en muestras de suero, lo que evidencia el contacto previo con este patógeno. Los estudios realizados en España con esta técnica arrojan niveles de seroprevalencia muy variables: en la zona Sureste oscilan entre el 1.7% y el 19.3% (Cano-Manuel et al., 2014; Ortega et al., 2020), en el centro-Sur el dato es del 4% (J. Vicente et al., 2002), mientras que en el Norte del país es del 11.3% (Closa-Sebastián et al., 2011). A pesar de su variabilidad, estos niveles de seroprevalencia son inferiores a los encontrados en la mayoría de estudios realizados en otros países europeos, donde oscilan entre el 17% y el 66.6% (Bassi et al., 2021; Fredriksson-Ahomaa et al., 2020; Montagnaro et al., 2010; Vengust et al., 2006; Zottola et al., 2013). A pesar de aportar una valiosa información acerca de la presencia de *Salmonella* en una determinada población, los datos de seroprevalencia no aportan ninguna información sobre las relaciones epidemiológicas o sobre los serotipos presentes en una zona determinada. Para ello es necesario el aislamiento de la bacteria, combinado con técnicas de biología molecular (Gaffuri & Holmes, 2012).

Los resultados obtenidos en nuestro estudio muestran una amplia presencia de *Salmonella* spp. en los jabalíes del suroeste español, lo que sugiere un alto porcentaje de individuos portadores asintomáticos de esta bacteria. La prevalencia de *Salmonella* en poblaciones salvajes suele ser un fiel reflejo del grado de circulación de esta bacteria en un determinado ecosistema. Sin embargo, se debe poner especial cuidado a la hora de interpretar este parámetro y comparar estudios entre sí, ya que la prevalencia de *Salmonella* en una determinada población varía en función de la especie estudiada, del área geográfica analizada, del origen de la muestra, del tipo de técnica de detección utilizada e incluso de la época del año en la que se obtienen las muestras (Ainslie-García et al., 2018; S. Bonardi et al., 2019; Mainar-Jaime et al., 2013). Multitud de estudios muestran esta gran variabilidad; si comenzamos analizando los datos de prevalencia en España, vemos que nuestro estudio presenta una prevalencia en animales del 27 %, muy superior al obtenido por otros autores (0.8%) en animales del centro-Sur de España (Díaz-Sánchez et al., 2013) pero similares a estudios realizados en el Noreste de España (30.8%-47.2%)

(Mentaberre et al., 2013; N. Navarro-Gonzalez et al., 2012), de igual manera, cabe destacar que los datos publicados en estudios realizados en Portugal presentan valores similares a los obtenidos en el presente trabajo (4.8% y 22.1%) (Dias et al., 2015; Madalena Vieira-Pinto et al., 2011). Esto puede deberse a la mayor proximidad geográfica entre las zonas muestreadas y el país vecino. Sin embargo, otro estudio realizado en el Noreste de España muestra una prevalencia del 5%, probablemente debida a un número más limitado de muestras, al tratarse de animales capturados en núcleo urbano (N. Navarro-Gonzalez, Casas-Díaz, et al., 2013). Si analizamos los datos de prevalencia en diferentes países europeos podemos constatar que también existen importantes variaciones, especialmente en Italia (4.18%-36.6%), donde el número de trabajos realizados es bastante elevado (Sanno et al., 2014; Sannö et al., 2018), o en otros países como Suecia (3.4%- 26.7%) (Plaza-Rodriguez et al., 2020) o Alemania (2.4%) (S. Bonardi et al., 2019; S. Bonardi et al., 2021; Chiari et al., 2013; Cilia et al., 2021; Giorda et al., 2014; Magnino et al., 2011; Piras et al., 2021; Stella et al., 2018; Zottola et al., 2013). Detrás de esta variabilidad asociada a la zona geográfica muestreada, suele subyacer la presencia de accidentes geográficos o elementos creados por el hombre que hacen que las condiciones de cada zona sean únicas y den lugar a prevalencias de *Salmonella* y distribuciones de serotipos totalmente diferentes (Gaffuri & Holmes, 2012; Magnino et al., 2011; N. Navarro-Gonzalez et al., 2012).

Los valores de prevalencia también oscilan en función del tipo de muestra analizada (S. Bonardi et al., 2019). En el primer estudio presentado en esta tesis se observó como la prevalencia de *Salmonella* spp. en jabalíes era mayor cuando se muestreaban las tonsilas (20.9%), que cuando la muestra procedía de los ganglios submandibulares (8.1%) o de las heces (1.3%) de un mismo animal. En base a estos resultados, se podría afirmar que el muestreo de heces puede dar como resultado una subestimación del valor de prevalencia de *Salmonella* spp. en esta especie. De hecho, considerando los valores obtenidos con este tipo de muestra, la prevalencia es comparable a la descrita en estudios que también muestrean *Salmonella* spp. en heces (0.3%-7%) (S. Bonardi et al., 2019; Cilia et al., 2021; Diaz-Sanchez et al., 2013; N. Navarro-Gonzalez, Casas-Díaz, et al., 2013; Plaza-Rodriguez et al., 2020; Sanno et al., 2014; Stella et al., 2018). De igual manera, aunque hay pocos estudios que analizan de forma paralela tonsilas, ganglios linfáticos (fundamentalmente mesentéricos) y heces, sus resultados son concordantes con los hallados en la presente tesis, puesto que en todos se concluye que las tonsilas son el

órgano donde se aíslan estas bacterias con mayor frecuencia, seguidos de los ganglios y las heces (S. Bonardi et al., 2019; Sanno et al., 2014; Sannö et al., 2018; Wacheck et al., 2010). Esta heterogénea distribución orgánica podría corresponderse con el hecho de que la ruta de penetración de *Salmonella* más común sea la vía respiratoria, especialmente en verano, vehiculada en partículas de polvo contaminadas (A. Baskerville & Dow, 1973; A. Baskerville, Dow, C., Curran, W. L., Hanna, J., 1973; S. Bonardi et al., 2019). En esta ruta, las salmonelas utilizan a las tonsilas y los macrófagos pulmonares como lugar de penetración (P.J. Fedorka-Cray et al., 1995), permaneciendo acantonadas y multiplicándose en ellas (P.J. Fedorka-Cray et al., 2000; Salles & Middleton, 2000). Debido a que el drenaje linfático de las tonsilas y de la cavidad oral en general, se lleva a cabo por los ganglios submandibulares (Wood et al., 1989), se planteó también en esta tesis muestrear estos órganos, obteniéndose en promedio un tercio de la prevalencia hallada en las tonsilas. Cabe destacar que, aunque el número de aislados fuera inferior en las muestras de ganglios submandibulares, todos los aislados obtenidos en esta localización presentaban el mismo genotipo que los obtenidos en las tonsilas de ese mismo jabalí. Esta concordancia entre aislados también ha sido descrita en cerdos (Madalena Vieira-Pinto et al., 2012). Este muestreo simultáneo de tonsilas y ganglios submandibulares sólo se ha llevado a cabo previamente en jabalíes en un estudio en Italia, en el que obtienen prevalencias muy similares entre ambos órganos (Sannö et al., 2018), de forma similar a lo encontrado en cerdos (Ainslie-Garcia et al., 2018). Con todos estos datos, la cavidad oral puede considerarse una localización orgánica preferente para el aislamiento de *Salmonella* spp., lo que habría de tenerse en cuenta para optimizar la representatividad de los escrutinios que se realicen (Van Damme et al., 2018). Ello implica, además, la importancia de la manipulación de estos tejidos durante el faenado, que debe hacerse con sumo cuidado a fin de evitar la contaminación de las canales (Ainslie-Garcia et al., 2018; Swanenburg et al., 2001; Van Damme et al., 2018; Madalena Vieira-Pinto et al., 2012).

Además de la variación de la prevalencia en función de variables geográficas y del tipo de muestra, también puede haber fluctuaciones en función de la cantidad de muestra analizada o del tipo de técnica utilizada (Eriksson & Aspan, 2007; Van Damme et al., 2018; M Vieira-Pinto et al., 2007). Como ya ha sido descrito previamente en cerdos (Funk et al., 2000), la cantidad de muestra fecal procesada condiciona sustancialmente la sensibilidad de la detección. Esta circunstancia puede explicar la escasa prevalencia de

Salmonella obtenido en nuestro estudio, al haber analizado una cantidad mínima obtenida mediante hisopo del contenido del colon. En cuanto a la técnica de detección, la diferencia de sensibilidad entre los diferentes métodos condiciona su capacidad de discriminar muestras positivas, por lo que también puede contribuir a la variabilidad observada en la prevalencia de *Salmonella* spp. Así lo demuestra un estudio en el que se compara la eficacia de diferentes medios de cultivo en el aislamiento de *Salmonella* (Gorski et al., 2011), u otros trabajos en los que se constata que la PCR llega a tener, en algunos casos, un 50% más de sensibilidad que el cultivo bacteriano (Castagna et al., 2005; Sanno et al., 2014; Wacheck et al., 2010). Sin embargo, aunque presenta una mayor sensibilidad, existe el riesgo de detectar falsos positivos debido a la presencia de bacterias no viables (Eriksson & Aspan, 2007). A pesar de ello, al igual que ocurre con la serología, su facilidad de procesado, y la posibilidad de realizar el análisis simultáneo de un gran número de muestras, hacen que ambas técnicas aporten datos muy valiosos sobre la prevalencia, quizá incluso más fieles a la realidad que los obtenidos mediante cultivo, aunque también éste último es fundamental cuando se necesita un estudio más exhaustivo sobre el tipo de *Salmonella* implicada en cada proceso, lo cual nos va a proporcionar datos necesarios para un análisis epidemiológico.

En el presente estudio hemos podido comprobar la alta variabilidad de serotipos de *Salmonella* existente en jabalíes (34 serotipos en 86 cepas), lo que concuerda con estudios previos (Chiari et al., 2013; Mentaberre et al., 2013; N. Navarro-Gonzalez et al., 2012; Razzuoli et al., 2021; Ward et al., 2013; Zottola et al., 2013). Tal diversidad es mayor que la encontrada en cerdos domésticos procedentes de granjas porcinas o mataderos (Héctor Arguello et al., 2012; García-Feliz et al., 2007; Gomez-Laguna et al., 2011; Sánchez-Rodríguez et al., 2018; Teng et al., 2020). Este hecho podría estar en relación con el carácter omnívoro de los jabalíes, lo que les hace estar expuestos a múltiples vías de contagio, tales como pequeños animales que incluyen en su dieta o cadáveres contaminados portadores de múltiples serotipos de *Salmonella* spp. (Gaffuri & Holmes, 2012; Millan et al., 2004). Esta circunstancia no se produce en cerdos en granjas intensivas, donde toda su alimentación está controlada y existen elevados niveles de bioseguridad.

Dentro de la variabilidad de serotipos de *Salmonella* hallada en jabalíes se observa que, en la mayoría de los trabajos revisados, predominan los pertenecientes a la subespecie *entérica*, (S. Bonardi et al., 2019; S. Bonardi et al., 2021; Chiari et al., 2013; Dias et al.,

2015; Magnino et al., 2011; Mentaberre et al., 2013; N. Navarro-Gonzalez, Casas-Díaz, et al., 2013; N. Navarro-Gonzalez et al., 2012; Piras et al., 2021; Plaza-Rodríguez et al., 2020; Ranucci et al., 2021; Razzuoli et al., 2021; Sanno et al., 2014; Stella et al., 2018; Madalena Vieira-Pinto et al., 2011). Este marcado predominio de la subespecie entérica no se observa en nuestro trabajo, al presentar valores similares a los constatados para la subespecie *diarizonae*, (40.7% y 39.5%, respectivamente). También es destacable el alto porcentaje de aislados pertenecientes a la subespecie *salamae* (18.6%) y el hecho de que también se hayan detectado aislados de la subespecie *houtenae*, aunque en menor proporción (1.2%). La detección de subespecies “no entéricas”, aunque en escasa cuantía, también ha sido corroborado por otros autores (Cilia et al., 2021; Giorda et al., 2014; Zottola et al., 2013). Dichas subespecies suelen encontrarse tanto en animales homeotermos y poiquilotermos, y su principal vía de transmisión a otros animales es el consumo de su carne, o por su uso como mascotas en el caso de los humanos (A. Lamas et al., 2018). Sin embargo, algunos serotipos de estas subespecies, especialmente *arizonae*, *diarizonae* y *salamae*, también se adaptan a animales homeotermos, ya sean mamíferos o aves, tanto silvestres como domésticos (Bonke et al., 2012; Botti et al., 2013; Evangelopoulou et al., 2014; A Lamas et al., 2016), lo que explica su presencia en los jabalíes muestreados en el presente trabajo.

Como hemos señalado anteriormente, la subespecie *enterica* es la predominante en la mayoría de las investigaciones, sin embargo, dentro de esta subespecie hay una gran variabilidad de serotipos, por lo que es difícil señalar cuál de ellos es más prevalente en jabalíes. En nuestro caso, Enteritidis 9,12:g,m:-, Newport 6,8:e,h: 1,2 y Choleraesuis, fueron los serotipos que aparecieron con mayor frecuencia (14%), aunque como se puede observar en los resultados del primer estudio derivado de esta tesis, tampoco distan mucho del resto de serotipos aislados. Resulta importante resaltar que la EFSA describe a *S. Enteritidis* como el serovar más frecuentemente identificado en casos de salmonelosis humana y *S. Newport* como el quinto (EFSA & ECDC, 2021a). En cuanto a *S. Choleraesuis*, es un serovar que puede generar cuadros septicémicos muy graves, llegando a causar aneurismas infecciosos, una infección endovascular devastadora en humanos (Cohen et al., 1987), así como colangitis y pancreatitis grave, muy difícil de tratar por su resistencia a múltiples antibióticos (Ferstl et al., 2017). Este serovar fue el predominante en cerdos de todo el mundo durante las décadas de los 50 y 60, (Mark P Stevens & Gray, 2013) y, aunque actualmente sigue manteniendo una alta prevalencia en América del

Norte y Asia (Ronald W. Griffith et al., 2019; Luk-In et al., 2018), en Europa su prevalencia es escasa (EFSA & ECDC, 2021a). A pesar de ello, en los últimos años se ha experimentado un repunte de casos en cerdos (Papic et al., 2021; Pedersen et al., 2015; Savic et al., 2021), y también en jabalíes, posiblemente debido a la expansión demográfica que está experimentando esta especie a nivel europeo (Conedera G. et al., 2014; Donazzolo C., 2017; Longo, Losasso, et al., 2019; Longo, Petrin, et al., 2019; Methner et al., 2010; Methner et al., 2018; Perez et al., 1999; Uelze et al., 2021). Respecto a los serotipos que con mayor frecuencia se encuentran en estudios de jabalíes, varios autores reflejan datos similares a los nuestros, siendo Enteritidis o Newport los más prevalentes (S. Bonardi et al., 2021; Cilia et al., 2021; Piras et al., 2021; Plaza-Rodriguez et al., 2020). También es consistente el aislamiento de *S. Typhimurium*, presentando en casos puntuales altas prevalencias (S. Bonardi et al., 2019; Chiari et al., 2013; Madalena Vieira-Pinto et al., 2011), pero caracterizado generalmente por presentar valores bajos de prevalencia muy constantes entre las diferentes poblaciones estudiadas (Mentaberre et al., 2013; N. Navarro-Gonzalez et al., 2012). A pesar de la diversidad de serotipos que encontramos en la bibliografía, son muy pocos los estudios que, a diferencia del nuestro, aíslan *S. Choleraesuis* de portadores asintomáticos (Chiari et al., 2013; Longo, Losasso, et al., 2019).

Además de la gran diversidad de serotipos encontrados, también observamos mediante *Pulsed Field Gel Electrophoresis* (PFGE), una amplia variabilidad genética entre los aislados obtenidos. Esta técnica, considerada en la actualidad como el *gold standard*, es fundamental para constatar las relaciones clonales existentes entre las cepas aisladas en un determinado momento y contexto, permitiéndonos por lo tanto determinar los vínculos epidemiológicos existentes en un determinado brote (Sharma-Kuinkel et al., 2016). En la mayoría de los casos de nuestro estudio, las cepas pertenecientes a un determinado serotipo presentaban el mismo pulsotipo, especialmente si tenían un mismo origen geográfico, si bien esta circunstancia no se producía cuando procedían de diferentes fincas, en las que era común detectar diferentes pulsotipos, lo que también se ha descrito en cerdos (Baloda et al., 2001; Berends et al., 1996; H Scott Hurd, McKEAN, et al., 2001; Letellier et al., 1999). Dentro de las cepas de una misma finca, también fue común el hallazgo de diferentes serotipos, hasta 11 en alguna de ellas, lo que contrasta con la mayoría de la literatura al respecto en cerdos, en la que se describen casos con uno o muy pocos serotipos en cada explotación (Andrzejewski & Jezierski, 1978; Casas-Díaz et

al., 2013). Este hecho probablemente se deba a la naturaleza libre del animal portador y a su hábito de desplazarse frecuentemente a largas distancias (Mentaberre et al., 2013). En relación con este fenómeno, el presente estudio también muestra la amplia propagación de clones de *Salmonella* spp. asociados con jabalíes, lo que aumenta el riesgo potencial de contaminación con clones virulentos y/o resistentes a los antimicrobianos y las posibilidades de contagio interespecíficos. La coexistencia de clones pertenecientes a los mismos grupos epidemiológicos en muestras de jabalíes y cerdos ibéricos descrito en la presente tesis (Gil-Molino et al., 2020), y en muestras de vacas y cerdos que cohabitan con jabalíes en una determinada zona (Mentaberre et al., 2013; Methner et al., 2010; Methner et al., 2018), incluso entre muestras de jabalíes y personas (Longo, Losasso, et al., 2019), demuestran esa posibilidad de contagio interespecífico y evidencian la utilidad de la PFGE para investigar estas relaciones entre aislados de *Salmonella*.

Los jabalíes son portadores de múltiples serotipos de *Salmonella* de especial virulencia para los seres humanos (Hilbert et al., 2012). En el ámbito de la Unión Europea, el género *Salmonella* es el segundo causante de zoonosis y el primero de brotes de infecciones alimentarias, siendo en estos casos *S. Enteritidis* y *S. Typhimurium* los serovares más frecuentemente aislados, con un 72.4 % y un 14 % de los casos, respectivamente. La tasa de mortalidad en Europa debida a esta enfermedad se cifra en un 0.22% (EFSA & ECDC, 2021a). Como se describe en el último informe "One Health 2019" de la EFSA (*European Food Safety Authority*) y el ECDC (*European Centre for Disease Prevention and Control*), la tasa de incidencia anual de salmonelosis en 2019 fue de 20.0 casos por 100.000 habitantes, identificándose los huevos y derivados como la principal vía de infección. Sin embargo, aunque la infección en humanos ocurre principalmente debido a la ingesta de esos alimentos, el aumento global del consumo de productos derivados de especies salvajes (mamíferos, pájaros, reptiles y anfibios) (Muehlenbein, 2016) puede suponer nuevas vías de contagio. Dentro de estos animales salvajes, el jabalí adquiere una gran relevancia, ya que el consumo de carne de dichos animales cada vez es mayor en la población (Mentaberre et al., 2013; Mirceta et al., 2017; Paulsen et al., 2012; Ranucci et al., 2021) y, por ende, el riesgo de contraer *Salmonella* a través de esta fuente (Mentaberre et al., 2013; Mirceta et al., 2017; Paulsen et al., 2012; Ranucci et al., 2021). El consumo de carne de jabalí está experimentando un crecimiento constante en los últimos años (Sales & Kotrba, 2013). El consumidor valora en este producto sus características organolépticas y también le otorga una especial importancia a su origen

natural (Hodgkinson et al., 2017; Rivero et al., 2019). Además del interés por su carne, el jabalí es también muy apreciado como trofeo de caza, por lo que cada vez son más las explotaciones que se dedican a la cría de este animal, aplicando para ello medidas de manejo como el cerramiento de fincas o la suplementación alimenticia (Antonio J. Carpio et al., 2020; Garrido-Martín, 2012). Estas medidas mejoran los índices reproductivos, amentando las poblaciones de jabalíes en las fincas donde se aplican (Antonio J. Carpio et al., 2020; Gamelon et al., 2013), pero también traen aparejadas una serie de inconvenientes relacionados con el estrés y la concentración de individuos que pueden tener consecuencias muy graves.

La aparición de brotes de *S. Choleraesuis* con una elevada mortalidad, como los descritos en la presente tesis (Gil-Molino et al., 2020; Gil-Molino et al., 2019), o el desarrollo de cuadros clínicos graves causados por agentes comunes en explotaciones porcinas, como *Erysipelothrix rhusiopathiae*, *Pasteurella multocida*, *Staphylococcus hyicus* o *Haemophilus parasuis* (Gerveno et al., 2013; D. Risco, P. Fernandez-Llario, J. M. Cuesta, et al., 2013; D. Risco, P. Fernandez-Llario, R. Velarde, et al., 2013; Risco et al., 2011), ponen de manifiesto el especial cuidado que se ha de prestar al manejo en las explotaciones de jabalí. Actuaciones de por sí estresantes, como el destete o la agrupación de individuos de orígenes diferentes, tienen un mayor impacto negativo en esta especie que en el cerdo, ya que se combina el efecto inmunosupresor del estrés (social, por manejo...), con la menor inmunidad natural del jabalí ante patógenos comunes en explotaciones porcinas. Así, los datos de mortalidad en jabalíes obtenidos en los brotes analizados en este estudio oscilan entre el 35 y el 100% (Gil-Molino et al., 2019), mientras que los valores obtenidos de granjas porcinas en Europa van desde el 5% (Savic et al., 2021) al 30% (Pedersen et al., 2015), considerándose este último un valor muy alto de mortalidad. En el único artículo en el que se describe con anterioridad un brote de *S. Choleraesuis* en jabalíes en fincas cerradas, se puede estimar una mortalidad alrededor del 30%, teniendo en cuenta las bajas y la división de los animales de la explotación en tres cercones (Perez et al., 1999). En este trabajo se especifica que el brote afectó a los jabalíes de una cerca, pero no se detalla si en la cerca los animales tenían la misma o edades diferentes. Este hecho es importante para hacer una comparación adecuada entre los estudios, ya que tanto los datos de granjas porcinas, como los obtenidos en la presente tesis, están calculados en base a una división por grupos animales de edades homogéneas, por lo que sería posible

que el dato de mortalidad en el estudio de Pérez de 1999 fuese aún mayor si estuviera referido tan solo a los animales de edades comprendidas entre los 2 y los 6 meses.

Frecuentemente se ha señalado como causa predisponente a la aparición de brotes de *S. Choleraesuis* la infección previa con algún virus de carácter inmunosupresor, principalmente el circovirus porcino (PCV-2) o el virus causante del síndrome reproductivo y respiratorio porcino (PRRS) (C. H. Chiu et al., 2004). Estos virus también se han relacionado con la aparición de otras enfermedades en jabalíes, como es el caso de la tuberculosis (Risco et al., 2014). Sin embargo, en los brotes estudiados en la presente tesis hemos observado que no es necesaria la presencia de estos virus inmunosupresores para que se desarrollen brotes de *S. Choleraesuis*. Es probable que el desencadenante del proceso septicémico en estos casos únicamente fuera el estrés causado por el destete, donde concurre la separación de la madre con la agrupación forzada en una nueva ubicación, todo ello en una edad en la que los niveles de anticuerpos aportados por la madre descienden significativamente (Tizard, 2009), si bien esta circunstancia deberíamos corroborarla en posteriores estudios. Este fenómeno, en el que *S. Choleraesuis* provoca elevadas mortalidades sin la intervención previa de ningún virus inmunosupresor, ha sido descrito tanto en jabalíes (Conedera G. et al., 2014; Longo, Losasso, et al., 2019) como en granjas intensivas de cerdos con elevados niveles de bioseguridad (Pedersen et al., 2015; Savic et al., 2021), siempre alrededor del periodo de destete.

S. Choleraesuis no desarrolla procesos patológicos exclusivamente en animales de granjas o explotados en condiciones semi-extensivas. En la última década se han detectado tres brotes importantes en poblaciones salvajes de jabalíes en Italia y en Alemania (Conedera G. et al., 2014; Donazzolo C., 2017; Longo, Losasso, et al., 2019; Methner et al., 2018). Algunos autores apuntan a la especial sensibilidad respecto a la peste porcina africana como un factor influyente en el aumento de casos detectados por cazadores y guardas de espacios naturales, dada la similitud clínica que puede darse entre esta enfermedad y los cuadros septicémicos causados por *S. Choleraesuis* (Donazzolo C., 2017; Methner et al., 2018). La presentación clínica observada en estos tres brotes fue similar: aparición de cadáveres de jabalíes en el campo y avistamientos de individuos delgados y enfermos por parte de cazadores y guardas, afectando con más frecuencia a los individuos más jóvenes. Del mismo modo, la variante Kunzendorf fue la predominante en los tres brotes, y las lesiones encontradas fueron las comunes en la presentación septicémica de *S.*

Choleraesuis: congestión difusa, neumonía, hepatomegalia con necrosis miliar no purulenta, esplenomegalia y, en un pequeño número de casos, enterocolitis, todo ello en concordancia con los hallazgos de los brotes descritos en la presente tesis (Gil-Molino et al., 2020; Gil-Molino et al., 2019).

En lo que respecta a las relaciones filogenéticas entre aislados de *Salmonella* de jabalíes y cerdos, en el caso del brote de Italia se observó que las cepas estaban íntimamente relacionadas entre sí y eran diferentes a las encontradas en cerdos muestreados en el mismo periodo en granjas de la zona (Longo, Losasso, et al., 2019). Por el contrario, los aislados en los brotes alemanes pertenecían a 5 grupos epidemiológicos, en el caso del brote de 2008 (Methner et al., 2010), o a 6 grupos, en el caso del brote de 2017 (Methner et al., 2018), y en ambos casos, jabalíes y cerdos compartían cepas pertenecientes a los mismos grupos epidemiológicos. Este fenómeno, con aislados de jabalíes y cerdos estrechamente relacionados, ha sido también identificado en nuestro trabajo (Gil-Molino et al., 2020). La diferente complejidad de las relaciones epidemiológicas entre los casos anteriores parece estar relacionada con la existencia de barreras antropológicas o naturales que aíslan unas poblaciones de jabalíes de otras (Methner et al., 2010; Methner et al., 2018). La distancia entre los diferentes puntos de origen de las muestras no puede explicar dicha diversidad ya que, aunque la zona del brote alemán de 2008 (Turingia: 16.171 km²) y la muestreada en el Sureste español para esta tesis (Extremadura, Toledo y Ciudad Real: ~76.000 km²) sean mucho más grandes que la analizada en el estudio italiano, (Friuli Venezia Giulia: 7924 km²), la zona del brote alemán de 2017 es muy parecida a la italiana (Arnsberg: 8002 km²) y tiene 6 grupos epidemiológicos. En los casos abordados en este trabajo se observa cómo los aislados procedentes de tres fincas muy próximas entre sí, ubicadas al sur del Sistema Central, se agrupaban en dos perfiles de PFGE estrechamente relacionados, mientras que el resto de los aislados presentando orígenes muy distantes entre sí pertenecían a un mismo grupo epidemiológico, distinto de los otros tres hallados en el estudio (Gil-Molino et al., 2019). En base a esta situación cabe pensar que debe existir un factor que explique la gran expansión territorial observada en algunos grupos epidemiológicos de *S. Choleraesuis* en el Suroeste español. Posiblemente, la prolongada persistencia en el tiempo de portadores asintomáticos, y/o la intervención del hombre a través de suministros a las explotaciones o del comercio de animales, puedan explicar esta dispersión.

La presencia de *S. Choleraesuis* en animales salvajes supone un gran riesgo para las granjas porcinas de la zona y también para las poblaciones humanas, dado el carácter zoonótico de la enfermedad y la cada vez más frecuente aparición de jabalíes en los alrededores y dentro de núcleos urbanos (Castillo-Contreras et al., 2021). Los datos de relación filogenética entre aislados obtenidos mediante PFGE constituyen una herramienta muy valiosa para conocer el posible origen de los brotes y la diseminación de cepas entre animales salvajes, humanos y animales de granja. Sin embargo, en la actualidad es cada vez más accesible el uso de otra herramienta que además nos aporta gran cantidad de información acerca de los genes de resistencia o la virulencia de una determinada bacteria, la secuenciación génica masiva (*Whole Genome Sequencing*, WGS, por sus siglas en inglés) (Uelze et al., 2021). Cada vez son más los estudios que combinan PFGE y WGS, o que, directamente tan sólo hacen secuenciación génica de sus aislados. Con esta técnica se pudo determinar que en el brote de *S. Choleraesuis* de Italia de 2013 los aislados procedentes de animales septicémicos estaban filogenéticamente más próximos entre sí que los obtenidos de jabalíes abatidos en acciones cinegéticas y, además, que los aislados de jabalíes estaban más relacionados con los procedentes de humanos que con los de cerdos. Al mismo tiempo se observó que ninguno de los aislados de jabalíes poseía genes de resistencia (Longo, Losasso, et al., 2019). También mediante WGS se ha constatado que, en un país tan grande como Brasil, las cepas de *S. Choleraesuis* aisladas de cerdos en granjas están estrechamente relacionadas, compartiendo incluso los mismos patrones de resistencia antimicrobiana (Papic et al., 2021; Pedersen et al., 2015; Savic et al., 2021). En la presente tesis se ha optado por una técnica más económica para analizar la relación filogenética entre aislados bacterianos, el PFGE, que ha permitido evidenciar la circulación de cepas de *S. Choleraesuis* entre cerdos ibéricos y jabalíes. La transmisión de bacterias entre jabalíes y cerdos ha sido descrita en multitud de estudios con anterioridad (Conedera G. et al., 2014; Donazzolo C., 2017; Longo, Losasso, et al., 2019), al igual que se ha observado relación entre aislados de personas y jabalíes (Methner et al., 2010; Methner et al., 2018; Uelze et al., 2021). Todos estos estudios resaltan el papel que los jabalíes desempeñan como reservorio natural en la epidemiología de la salmonelosis, pudiendo acarrear importantes problemas en explotaciones porcinas con escasas medidas de bioseguridad, como son las explotaciones semi extensivas donde se cría el cerdo ibérico (Uelze et al., 2021).

La circulación de cepas de *Salmonella* entre personas, animales de granja y animales salvajes supone un grave riesgo para la salud humana, la producción animal y el equilibrio de los ecosistemas, tanto por los procesos patológicos que pueden desencadenar como por las posibles resistencias antimicrobianas que pueden acarrear (Meneguzzi et al., 2021). Este último factor es cada vez más relevante. Las pérdidas económicas asociadas a las resistencias antimicrobianas en Europa se estiman en 1100 millones de euros y se calcula que al menos 670.000 infecciones al año son causadas por bacterias resistentes, de las cuales 33.000 provocan la muerte de las personas que las padecen (WHO, 2021). En el ámbito ganadero la situación es similar, aunque la disponibilidad de datos sobre su impacto económico es mucho menor que en el caso de la sanidad humana (OECD & WHO, 2020). Debido a la trascendencia de este fenómeno, su estudio en las cepas de *Salmonella* spp. aisladas de jabalíes ha supuesto uno de los ejes temáticos del presente trabajo. En esa línea se ha estudiado la posible influencia de ciertos sistemas de manejo sobre la adquisición y diseminación de resistencias antimicrobianas en esta especie cinegética. Las prácticas de manejo suelen ser comunes en regiones, sobre todo del centro-Sur de España, para el control de poblaciones y el mantenimiento de un adecuado estatus sanitario, además de para conseguir trofeos de calidad en las monterías (Cano-Terriza et al., 2018). En base a ello, en este trabajo hemos evaluado cuatro aspectos fundamentalmente: la densidad poblacional de los jabalíes en la zona de estudio, la cohabitación del ecosistema con ganado doméstico, el empleo de una alimentación suplementaria, y la existencia de vallados perimetrales que limiten la libre circulación de animales entre fincas. Además del estudio sobre brotes de *S. Choleraesuis* incluido en la presente tesis (Gil-Molino et al., 2019), tan solo existe otro estudio publicado en el que se analicen estos factores de manejo, el llevado a cabo por Navarro y cols. en España (N. Navarro-Gonzalez et al., 2012). En dicho estudio, los autores no observan ninguna evidencia de que la presencia del ganado vacuno que cohabita con el jabalí modifique las resistencias antimicrobianas encontradas en estos últimos. En nuestro caso observamos algo similar: la frecuencia de resistencias encontradas (*Phenotypic Resistance Index*, PRI o *Genetic Resistance Index*, GRI) no se vio aumentada por la presencia de ganado en la zona. Este hecho es llamativo, ya que se esperaba un incremento de este factor como se describe en algunos estudios en fauna salvaje (Hassell et al., 2019). La administración de antibióticos a animales domésticos incrementa la presencia de portadores de bacterias resistentes que pueden diseminarse al medio ambiente o transmitirse directamente a otros

animales de su alrededor. En todo caso, en el presente estudio no se muestreó al ganado doméstico que cohabitaba con los jabalíes en las diferentes zonas chequeadas, por lo que no existe certeza de que ese ganado doméstico presentara resistencias antimicrobianas ni fuera portador de salmonelas. En el anterior trabajo citado, resulta sorprendente que todas las cepas obtenidas en los animales domésticos fueron susceptibles, mientras que las de los jabalíes mostraron resistencias antimicrobianas (N. Navarro-Gonzalez et al., 2012). Este hecho sugiere que la transferencia de resistencias no se realizó desde los animales domésticos cercanos, sino que pudiera relacionarse con la captación de estas resistencias a partir de ambientes periurbanos, como basureros, en los que estas resistencias son mucho más frecuentes debido a la actividad humana (Botti et al., 2013; Furness et al., 2017; Radhouani et al., 2014; Schley & Roper, 2003). De hecho, son varios los estudios en los que se ha observado que los jabalíes que viven en áreas urbanas muestran mayores resistencias a los antimicrobianos que los que viven en áreas silvestres, debido a la posibilidad de contacto directo con bacterias resistentes y/o con sus agentes selectivos (N. Navarro-Gonzalez, Casas-Díaz, et al., 2013; Nora Navarro-Gonzalez et al., 2018; Radhouani et al., 2014). A diferencia de la coexistencia con el ganado, la suplementación alimentaria sí influyó en las resistencias antimicrobianas detectadas. Con esta práctica, llevada a cabo mayoritariamente en fincas con vallado perimetral, se favorece una agrupación temporal de los jabalíes, incrementando así las posibilidades de contacto con otros individuos de su especie y de otras especies diferentes, que también hacen uso de los comederos y bebederos. En esta misma línea, otros autores consideran que los comederos artificiales pueden actuar como puntos de infección, independientemente del número de animales en la finca o de la idoneidad del hábitat (N. Navarro-Gonzalez, Fernandez-Llario, et al., 2013). En este sentido, tampoco nosotros hemos detectado correlación entre la RAM de los aislados y la densidad de jabalíes en las fincas. Cabe destacar que la densidad de jabalíes tampoco se correlaciona con la prevalencia de *Salmonella* (Diaz-Sanchez et al., 2013; Mentaberre et al., 2013), salvo cuando se restringe el movimiento de los animales (Ortega et al., 2020). Teniendo en cuenta estas observaciones podría afirmarse que el manejo, especialmente la agrupación temporal causada por la suplementación alimenticia influye sobre las RAM de *Salmonella* spp. en jabalíes, aunque en menor medida que sobre la presentación clínica de la salmonelosis en esta especie cinegética.

El incremento en la frecuencia de presentación de RAM y la aparición de aislados multirresistentes en bacterias de carácter zoonótico es un problema de especial importancia (EFSA & ECDC, 2021b). En el último informe de la EFSA y el ECDC se identificó a la variante monofásica de *S. Typhimurium* como el serotipo con mayor porcentaje de aislados multirresistentes en humanos (73.8%), canales de cerdo (73.2%) y cerdos (79.6%), coincidiendo con lo descrito también en aislados procedentes de jabalíes (Razzuoli et al., 2021; Zottola et al., 2013). En la misma línea, los datos obtenidos en nuestro último trabajo muestran la variante monofásica de *S. Typhimurium* como el serotipo con una mayor RAM entre los aislados de jabalíes (100%), seguido de *S. Choleraesuis* (90.9%) (Gil-Molino et al., 2022 (En revisión)). En este estudio, donde se incluyen animales con clínica de salmonelosis, se observó un aumento del porcentaje de cepas pertenecientes a la subespecie *enterica* (57%) al compararlo con los datos obtenidos en el primer estudio, donde sólo se utilizaron jabalíes abatidos en monterías y esta subespecie supuso el 40.7% de los aislamientos de *Salmonella*. Como se ha mencionado anteriormente, *S. Choleraesuis* resultó el segundo serotipo con más aislados resistentes del estudio (90.9%), en consonancia con el otro trabajo de la presente tesis donde se describen los brotes causados por este serotipo en cerdos y jabalíes (95%) (Gil-Molino et al., 2020). Los datos de otros estudios muestran una importante variabilidad al respecto, desde valores del 100% de aislados presentando RAM (Donazzolo C., 2017; Methner et al., 2018) hasta porcentajes de cepas totalmente sensibles del 84-92% (Leekitcharoenphon et al., 2019; Uelze et al., 2021). En cuanto a los porcentajes de aislados de *S. Choleraesuis* con multirresistencia (MR), también resultaron similares en los tres estudios, obteniéndose un 30.3% en el cuarto trabajo y un 37.5 y 39.2% en los dos anteriores. En el segundo artículo se determina además que este porcentaje de aislados con MR se eleva hasta el 83.3% cuando se analizaron aislados de cerdos ibéricos que cohabitaban con los jabalíes, dato que está dentro del rango descrito (43%-93%) en anteriores estudios en cerdos (Leekitcharoenphon et al., 2019; Meneguzzi et al., 2021; Pedersen et al., 2015). Además de la RAM en serotipos de la subespecie *S. enterica* subsp. *enterica*, cabe señalar que se hallaron aislados con MR pertenecientes a las subespecies *salamae* y *houtenae*, hecho que ha sido recientemente descrito por otros autores (Razzuoli et al., 2021).

El último artículo presentado en esta tesis aporta una perspectiva más amplia sobre las RAM en aislados de *Salmonella* spp. procedentes de jabalíes. En él se describe una elevada

frecuencia de aparición de RAM en esta enterobacteria (75%), lo que está en línea con trabajos previos realizados con jabalíes de Portugal (Caleja et al., 2011; Pinto et al., 2010) o Italia (S. Bonardi et al., 2019; Cilia et al., 2021; Razzuoli et al., 2021; Zottola et al., 2013). Sorprendentemente, los datos de los estudios realizados hasta la fecha en España presentan porcentajes mucho menores, siendo prácticamente todos los aislados susceptibles (N. Navarro-Gonzalez, Casas-Díaz, et al., 2013; N. Navarro-Gonzalez et al., 2012). Esta ausencia casi total de RAM también se ha descrito en Alemania (Plaza-Rodriguez et al., 2020; Uelze et al., 2021), y en Italia (S. Bonardi et al., 2021; Piras et al., 2021). En cuanto al porcentaje de MR, el dato obtenido en esta tesis (15.7%) se ubica entre el descrito en Portugal (68.2%) (Caleja et al., 2011) y los valores de estudios italianos (5.5%-9.6%) (Cilia et al., 2021; Zottola et al., 2013). En conjunto, todos estos datos de RAM parecen indicar una situación similar a la planteada con la prevalencia de *Salmonella* spp. en jabalíes, ya que los datos obtenidos en el Suroeste de España se asemejan más a los de Portugal que a los de otras regiones de nuestro país. Como apuntábamos anteriormente, este fenómeno podría deberse a la proximidad geográfica con el país vecino y a la similitud de los ecosistemas muestreados, una hipótesis que podría confirmarse en un futuro realizando un estudio filogenético de ambas poblaciones. Analizando en detalle las familias de antimicrobianos que presentan mayores resistencias en los aislados de *Salmonella* spp. obtenidos en la presente tesis doctoral (sulfonamidas, estreptomicinas y tetraciclinas), se observa que son similares a los descritos por otros autores en cerdos de nuestro país (P. Antunes et al., 2011; Hector Arguello et al., 2013; Astorga et al., 2007; García-Feliz et al., 2008; Gomez-Laguna et al., 2011; Mejia et al., 2006) y en otros países (Bolton et al., 2013; Silvia Bonardi et al., 2013; Jonathan G Frye et al., 2011), debido posiblemente a su uso indiscriminado a lo largo del tiempo con fines terapéuticos o incluso como promotores del crecimiento (Aragaw et al., 2007; Threlfall et al., 2003). Los patrones de resistencia hallados con más frecuencia reflejan los datos mencionados anteriormente: SUL (22%), SUL-TRS (18.7%) y DOX-STR-SUL-TET (11%). No obstante, se observa una gran variedad de patrones, de forma similar a lo descrito por algunos autores en jabalíes (Cilia et al., 2021; Zottola et al., 2013), si bien lo más frecuente en esta especie es encontrar poca variedad de patrones de resistencia (S. Bonardi et al., 2019), especialmente en los aislados del serotipo *Choleraesuis* (Donazzolo C., 2017; Methner et al., 2018; Pedersen et al., 2015). Algunos de estos

autores sugieren que estas variaciones en los patrones podrían relacionarse con el grado de contacto de los jabalíes con las poblaciones humanas (Methner et al., 2018).

A diferencia de la mayoría de los estudios realizados en jabalíes, en el último trabajo de la presente tesis doctoral se investiga mediante PCR la presencia de diversos genes de resistencia frente a los antimicrobianos. Los resultados de este trabajo muestran que prácticamente la mitad de los aislados que presentan resistencias fenotípicas poseían al menos uno de los genes investigados (53.8%). Sin embargo, dicho porcentaje varió en función de la familia antimicrobiana estudiada; así, en el caso de los fenicoles, un 83.3% de los aislados resistentes a miembros de esta familia presentaban algún gen codificante, un 78.3% en el caso de las tetraciclinas, o un 75% en el de los β -lactámicos. En el otro extremo se encontraron las sulfonamidas, donde tan solo un 34.6% de los aislados con resistencia a estos antimicrobianos poseían alguno de los genes estudiados para este grupo. Este hecho pone de relieve la necesidad de futuras investigaciones en la búsqueda de más genes de resistencia para lograr una mejor cobertura del origen genético de las resistencias fenotípicas observadas, ya que no se logró detectar ningún gen de resistencia en el 46.2% de los aislados resistentes. Por otro lado, un grupo de 12 aislados presentaron genes de resistencia sin manifestar ninguna resistencia fenotípica en los antibiogramas. Este último hallazgo es relevante, puesto que estos determinantes crípticos podrían activarse bajo ciertas condiciones o factores estresantes y podrían constituir un reservorio potencial para la propagación de la RAM (Srikumar et al., 2015). Es posible que, si se hubieran secuenciado los aislados, en vez de optar por una búsqueda de genes determinados mediante diferentes PCRs, los resultados se hubieran ajustado más a lo fenotípicamente encontrado y se podría haber descubierto algún determinante críptico adicional.

La frecuencia de aparición de los diferentes determinantes genéticos estuvo en concordancia con los principales fenotipos detectados, ya que *sul1* apareció en un 24.2% de los aislados resistentes, seguido de *strA* (20.9%), *strB* (19.85%), *sul2* (18.7%) y *tetA* (15.4%). Por lo que respecta a los genes que confieren resistencia a sulfonamidas, los valores descritos en trabajos anteriores en aislados de *Salmonella* spp. procedentes de jabalíes, muestran que la prevalencia de los genes *sul* varía desde un 72% (Caleja et al., 2011) hasta no llegarse a detectar (Pinto et al., 2010). De forma similar a lo descrito en cerdo, *sul1* es encontrado con mayor frecuencia que los otros genes *sul* (Patrícia Antunes et al., 2005; Argüello et al., 2018) aunque, sin embargo, nosotros hemos observado

prevalencias similares a los de *sul2*. Recientemente, este determinante genético ha sido hallado también en jabalíes, aunque con una prevalencia muy baja (Leekitcharoenphon et al., 2019; Okubo et al., 2019; Pedersen et al., 2015), a diferencia de los valores descritos en aislados procedentes de cerdos (Leekitcharoenphon et al., 2019; Okubo et al., 2019; Pedersen et al., 2015). En lo relativo a *sul3*, los resultados del tercer y del cuarto trabajo de esta tesis constituyen las primeras descripciones de este gen en aislados de *Salmonella* spp. de jabalíes, en los que este gen aparece en varios serotipos de las subespecies *enterica* y *salamae*. Mientras *sul1* es parte de la región 3' conservada del integrón de clase 1, *sul2* aparece a menudo asociado con genes que confieren resistencia a estreptomicina (*strA* y *strB*) (B. Guerra et al., 2004), hecho que se constata en los aislados del presente trabajo. En cambio, la asociación de varios genes *sul* en un mismo aislado no es común, sobre todo si se trata de *sul1* y *sul3* (Argüello et al., 2018; B. Guerra et al., 2004). A pesar de ello, esta combinación se ha encontrado en 4 de los 6 aislados que presentaban el gen *sul3* en el último trabajo de esta tesis.

Como era de esperar en base a los estudios fenotípicos, los determinantes que confieren resistencia a estreptomicina fueron de los más frecuentes (sobre todo *strA* y *strB*). Este aminoglucósido siempre figura entre los antimicrobianos que presentan mayor porcentaje de resistencias en aislados de *Salmonella* spp. de jabalíes (S. Bonardi et al., 2019; Caleja et al., 2011; Cilia et al., 2021; Donazzolo C., 2017; Methner et al., 2010; Pinto et al., 2010; Zottola et al., 2013). Además, como se ha observado, existe una gran diferencia en la frecuencia de aparición de resistencias con respecto a los otros aminoglucósidos estudiados (gentamicina y neomicina), lo que concuerda también con otros estudios llevados a cabo tanto en jabalíes (Botti et al., 2013; Caleja et al., 2011; Zottola et al., 2013) como en cerdos (Aarestrup et al., 2003; Argüello et al., 2018; Gomez-Laguna et al., 2011; Pedersen et al., 2015). El hallazgo de determinantes de resistencias para la estreptomicina es frecuente en cerdos (Leekitcharoenphon et al., 2019; Pedersen et al., 2015), aunque en jabalíes, los pocos estudios al respecto solo han encontrado *aadA* (Leekitcharoenphon et al., 2019; Pedersen et al., 2015) a excepción de un estudio realizado con WGS en Alemania, en el que los autores describen además *aph(3'')-Ib* y *aph(6)-Id* (Uelze et al., 2021). En relación a los aminoglucósidos en general, es interesante mencionar la abundancia de resistencias intermedias encontradas, hecho que también ha sido descrito recientemente (Razuoli et al., 2021). A menudo, este es un paso que precede a la aparición de cepas totalmente resistentes, ya que podrían

seleccionarse y mantenerse de manera estable en ambientes con baja concentración de antibióticos al poseer un fenotipo con poca repercusión en la aptitud biológica de estas bacterias (Howden et al., 2014; Koch et al., 2014).

Además de la resistencia frente a las sulfonamidas y aminoglucósidos, la encontrada frente a las tetraciclinas ha estado entre las más frecuentes. En este grupo se encontró la mayor frecuencia de aislados con genes de resistencia de todo el estudio (78.3%, frente a 34.6% y 47.7% de sulfonamidas y aminoglucósidos, respectivamente). El uso generalizado de este antimicrobiano (J. R. E. d. Castillo, 2013), ha contribuido indudablemente al desarrollo de una resistencia generalizada en los aislados de *Salmonella* spp., tanto en animales domésticos (Astorga et al., 2007; Silvia Bonardi et al., 2013; García-Feliz et al., 2008; Gomez-Laguna et al., 2011; Huang et al., 2009; Okubo et al., 2019; Rabello et al., 2020) como salvajes (S. Bonardi et al., 2019; Botti et al., 2013; Caleja et al., 2011; Meneguzzi et al., 2021; Pinto et al., 2010). El gen encontrado con mayor frecuencia (*tetA*) concuerda con el obtenido en otros estudios en jabalíes (Caleja et al., 2011), cerdo (Argüello et al., 2018; Okubo et al., 2019), e incluso en otros animales o alimentos (Argüello et al., 2018; Okubo et al., 2019). Es de suma importancia recalcar que este gen de resistencia es altamente persistente en la naturaleza, incluso en ausencia de presión selectiva (Gargano et al., 2021; Tawyabur et al., 2020), y es capaz de una propagación más rápida que los otros genes que codifican resistencia frente a tetraciclinas (Yu et al., 2015).

Con respecto a la resistencia frente a β -lactámicos, la ampicilina es claramente el compuesto que aparece con mayor frecuencia en los antibiogramas de las cepas analizadas, tanto de jabalíes como de cerdos. El porcentaje de resistencia frente a la ampicilina en jabalíes es cercano al 18%, muy diferente a la mayoría de los estudios encontrados en esta especie salvaje, donde prácticamente no se observa esta resistencia (S. Bonardi et al., 2019; Donazzolo C., 2017; Leekitcharoenphon et al., 2019; N. Navarro-Gonzalez, Casas-Díaz, et al., 2013; N. Navarro-Gonzalez et al., 2012; Zottola et al., 2013). Sin embargo, dos estudios hechos en jabalíes describen porcentajes de aislados resistentes mucho mayores (70-82%) (S. Bonardi et al., 2019; Donazzolo C., 2017; Leekitcharoenphon et al., 2019; N. Navarro-Gonzalez, Casas-Díaz, et al., 2013; N. Navarro-Gonzalez et al., 2012; Zottola et al., 2013). Esto podría deberse a que, en estos dos últimos estudios, prácticamente la totalidad de sus aislados eran *S. Typhimurium*, un serotipo con una elevada frecuencia de presentación de MR (EFSA & ECDC, 2021b). De hecho, si acotamos el análisis a los aislados de *S. Typhimurium* de nuestro estudio, el

porcentaje de resistencia observado es muy parecido al de estos dos últimos artículos (85.7%). En cerdos ocurre algo similar: un gran número de cepas aisladas en esta especie suelen pertenecer al serotipo Typhimurium, por lo que es frecuente encontrar altas resistencias a la ampicilina (Caleja et al., 2011; Pinto et al., 2010). Otro hecho a destacar en los resultados de este estudio es que la frecuencia de aislados resistentes a ampicilina y pertenecientes al serotipo Choleraesuis fue del 25% en jabalíes y del 100% en cerdos. En base a estos datos se podría inferir que, además de la influencia que pueda tener el serotipo implicado, un mayor uso de antibióticos en el ganado hace que serotipos propensos adquieran mayores resistencias. La resistencia contra las cefalosporinas ha sido muy rara entre los aislados de *Salmonella* spp. tanto de jabalíes como de cerdos obtenidos en el presente estudio. Esto concuerda con la mayoría de trabajos sobre ambas especies (Astorga et al., 2007; Silvia Bonardi et al., 2013; Caleja et al., 2011; C.-H. Chiu & Su, 2019; García-Feliz et al., 2008; Gomez-Laguna et al., 2011; Leekitcharoenphon et al., 2019; Rabello et al., 2020). Sin embargo, recientes estudios en animales salvajes han hallado gran diversidad de genes de resistencia a cefalosporinas en *Salmonella* (Darwich et al., 2019; Velhner et al., 2018). Según los datos del cuarto estudio de la presente tesis, el determinante de resistencia *bla*_{TEM} podría explicar las resistencias a la ampicilina en un 68.7% de los aislados y solamente un aislado portador del gen *bla*_{PSE-1} fue identificado en casetes génicos. Estos datos contrastan con lo descrito por Caleja y cols. en jabalíes, donde este último determinante fue el responsable de la resistencia a la ampicilina (Caleja et al., 2011). Sin embargo, nuestros resultados están acorde a la mayoría de la bibliografía encontrada al respecto, además de coincidir también en la nula o baja presencia de *bla*_{OXA} entre los aislados (P. Antunes et al., 2011; Argüello et al., 2018; Bolton et al., 2013; Leekitcharoenphon et al., 2019; Nguyen Thi et al., 2020; Okubo et al., 2019).

De forma similar a lo descrito para las resistencias contra la familia de las cefalosporinas, el número de aislados de *Salmonella* spp. en jabalíes que mostraron resistencias contra las quinolonas fue escaso. Aun así, la resistencia observada contra el ácido nalidíxico (6.6%) fue superior a la descrita previamente en estudios realizados en España e Italia. En el caso español, tan sólo se describió una cepa con estas características (Zottola et al., 2013), mientras que en Italia se observó un 1.8% de resistencia al ácido nalidíxico (Zottola et al., 2013), además de una tasa del 3.4% en aislados de *Salmonella* procedentes de otros animales salvajes (Botti et al., 2013). En la mayoría de los estudios publicados, es más frecuente observar resistencias a ácido nalidíxico que a enrofloxacin,

tanto en cerdos (Astorga et al., 2007; Caleja et al., 2011; Foti et al., 2018; Gomez-Laguna et al., 2011; Nguyen Thi et al., 2020) como en otras especies (P. Antunes et al., 2011; Morshed & Peighambari, 2010; Rad et al., 2012). Todos los aislados resistentes al ácido nalidíxico del presente estudio mostraron una sensibilidad intermedia a enrofloxacin, algo muy común en la mayoría de los estudios revisados (Levy et al., 2004; Palomo Guijarro, 2011; Rahmani et al., 2013). Algunos autores apuntan a que esta sensibilidad intermedia es debida a que la técnica de difusión en placa, recomendada por el CLSI, no es apropiada para evaluar la resistencia a fluoroquinolonas, y que ésta debe determinarse mediante microdilución (C.-H. Chiu & Su, 2019; Parry et al., 2010). Sin embargo, la secuenciación de los aislados que presentaron esta sensibilidad intermedia puso de manifiesto dos hechos que sustentan la afirmación de que la sensibilidad intermedia detectada fue real y no un artefacto provocado por una falta de sensibilidad en la técnica de detección aplicada. El primero de ellos fue la detección de una única mutación en el gen *gyrA* (D87Y o D87N) de todos los aislados con sensibilidad intermedia a la enrofloxacin. Estas mutaciones están estrechamente ligadas a la resistencia al ácido nalidíxico (Meneguzzi et al., 2021; Uelze et al., 2021), siendo necesarias dos o más mutaciones cromosómicas para generar resistencia completa a fluoroquinolonas (Meneguzzi et al., 2021; Uelze et al., 2021). El segundo hecho que apoya la hipótesis de una sensibilidad intermedia a la enrofloxacin es que no se detectaron mutaciones en el gen *gyrB*, cuya presencia se asocia muy comúnmente al desarrollo de resistencia a fluoroquinolonas (Hopkins et al., 2005). A pesar de que en la mayoría de los estudios sobre jabalíes se describe escasa resistencia frente a quinolonas entre sus aislados, cabe destacar un estudio reciente realizado en Alemania donde todas sus cepas resultaron ser resistentes a ciprofloxacino (Methner et al., 2018). Los autores no abordan esta cuestión en su discusión, por lo que no se conoce el posible origen de esta elevada resistencia, aunque es destacable que todos los aislados del citado estudio pertenecían al serotipo Choleraesuis.

En cuanto a las resistencias al cloranfenicol, un 6.6% de las cepas procedentes de jabalíes analizadas en el cuarto trabajo de esta tesis doctoral mostraron esta característica, frente al 41.6% de cepas procedentes de cerdos. Comparando estos datos con los aportados por la EFSA, observamos que los valores hallados en jabalíes se asemejan más a los descritos en humanos (6.5%) que a los de cerdos (14.6%) (EFSA & ECDC, 2020). Es posible que tanto humanos como jabalíes hayan estado menos expuestos a estos

antimicrobianos que los cerdos, sobre todo teniendo en cuenta el uso que tuvieron tiempo atrás en la producción porcina. Aunque el uso del cloranfenicol está prohibido en el ganado desde hace años en la UE (Commission, 1994), se observa una persistencia de dichas resistencias en las cepas de *Salmonella*. Este hecho podría estar asociado a la transmisión de elementos genéticos como el gen *floR*, que se encuentra frecuentemente en el integrón de clase I (*int1*) ubicado en la isla de patogenicidad de *Salmonella* 1 (SGI-1) (Carattoli, 2011; Jonathan G Frye et al., 2011). Los aislados del presente estudio mostraron una estrecha correlación (83.3%) entre la presencia de *int1* y la resistencia al cloranfenicol, tanto en jabalíes como en cerdos.

Un antimicrobiano calificado de importancia crítica por la OMS es la colistina, última línea de defensa para tratar algunas infecciones causadas por bacterias Gram-negativas (WHO, 2019). Solo uno de los aislados de *S. Choleraesuis* obtenido del cerdo en nuestro trabajo resultó resistente a la colistina y portador del gen *mcr-1*, mientras que ninguno de los aislados obtenidos de jabalíes mostró esta característica, similar a lo descrito en trabajos recientes en enterobacterias llevados a cabo en esta especie y en otros animales salvajes o el medio ambiente (Botti et al., 2013; Brisola et al., 2019; Darwich et al., 2019; Plaza-Rodriguez et al., 2020; Swift et al., 2019; Zottola et al., 2013). Por el contrario, en las investigaciones llevadas a cabo en cerdos y su entorno si es más frecuente la presencia de *mcr-1* (Fournier et al., 2020; Guenther et al., 2017; Kieffer et al., 2017; Quesada et al., 2016), considerándose al ganado como la principal fuente de genes *mcr* en todo el mundo (Guenther et al., 2017). La colistina se ha utilizado ampliamente para la profilaxis en la producción animal (Catry et al., 2015) pero, sin embargo, no fue hasta 2016 cuando se empezó a detectar globalmente un aumento en las resistencias contra este compuesto en bacterias Gram-negativas naturalmente sensibles. Dicho aumento se ha producido principalmente por la propagación de genes *mcr* (*Mobilized Colistin Resistance*) asociados a plásmidos (Darwich et al., 2019), lo que les confiere una gran capacidad de transferencia horizontal. A este respecto, *S. enterica* se considera una de las enterobacterias clínicamente más relevantes, puesto que son muchos los serovares de esta especie en los que se han detectado genes *mcr* (Lima et al., 2019), a lo que se suma la elevada probabilidad de que estos genes se movilicen junto con otros determinantes de resistencia en un mismo plásmido (Rhouma et al., 2016). El trabajo desarrollado para la presente tesis (Gil-Molino et al., 2020) describe la primera vez la

presencia de *mcr-1* en el serovar *Choleraesuis* en cerdos, aunque recientemente en Brasil se ha detectado en una infección en humanos (Santos et al., 2020).

Como se ha descrito previamente, las salmonelas procedentes de jabalíes albergan multitud de genes de resistencia. Este hecho adquiere todavía mayor importancia si consideramos la posibilidad de que puedan diseminarse a través de diferentes elementos genéticos móviles, principalmente en plásmidos y/o integrones, los cuales desempeñan un papel crucial en el desarrollo de la resistencia a los antibióticos y presentan además una distribución mundial en bacterias Gram-negativas (Fluit & Schmitz, 2004; J. G. Frye & Jackson, 2013). Los integrones de clase 1 (*int1*) se encuentran entre los elementos más importantes que contribuyen a la propagación de la resistencia a los antimicrobianos en *Salmonella* (Chen et al., 2004). Los resultados obtenidos en la presente tesis doctoral con respecto a la presencia de este elemento varían desde un 5.8% en jabalíes hasta un 41.6% en cerdos, con casetes génicos (CG) asociados en un 57.1% y 40% respectivamente. Al analizar la región variable del integrón de clase 1, se pudo determinar la composición de sus CG, mostrando, en el caso de los jabalíes, que dos cepas (*S. Typhimurium* y 48:i:z53) presentaban en un mismo integrón genes que confieren resistencia a trimetoprim y estreptomicina (*dfzA1-aadA1*), otra cepa (*S. Bredeney*) solamente portaba el gen *aadA1*, y en la cepa restante (*S. Typhimurium*) aparecían dos integrones a la vez, cada uno portando CG independientes *aadA1* y *bla_{PSE}*. En el caso de los cerdos, cada aislado presentó un CG portador de *aadA2* y *bla_{PSE}*. Estos resultados concuerdan con lo encontrado tanto en cepas de *S. Choleraesuis* de cerdos (Chang et al., 2005; Lee et al., 2009), como con la única referencia encontrada en jabalí, donde la composición de los CG fue muy similar a lo descrito anteriormente aunque el porcentaje de *int1* fue superior a lo encontrado en nuestro estudio (72.7%), quizás por ser la mayoría de sus cepas *S. Typhimurium* (Caleja et al., 2011). Estos determinantes móviles de resistencia a múltiples fármacos tienen el potencial de transferirse horizontalmente a otras salmonelas y podrían adquirir e integrar nuevos CG en la estructura de su genoma (Levings et al., 2005; Toleman et al., 2006).

Además de los integrones, los plásmidos son los otros elementos genéticos móviles más determinantes en la resistencia bacteriana frente a los antimicrobianos (McMillan et al., 2020). El alto porcentaje de plásmidos encontrados en los estudios llevados a cabo en la presente tesis apunta también en este sentido. De hecho entre los aislados de *S. Choleraesuis* obtenidos aparecen plásmidos en un 85% (Gil-Molino et al., 2020), de los

cuales, la mayoría presentan un tamaño de aproximadamente 50 kb, mientras que, considerando el total de aislados de *Salmonella* spp., el 38.8% presentaban algún tipo de replicón plasmídico, siendo los más frecuentes IncHI1 (72%) y IncFIIA (32%). Diversos estudios en *Salmonella* han observado que algunos tipos específicos de replicones plasmídicos se encuentran asociados con la resistencia, el origen geográfico y el hospedador (Carattoli, 2009; J. G. Frye & Jackson, 2013; Jonathan G Frye et al., 2011; Lindsey et al., 2009). De hecho, en el último artículo de esta tesis, se observa una asociación entre el replicón IncFIIA y la RAM. Aunque realmente no se ha podido confirmar una asociación inequívoca entre replicones y genes de resistencia frente a los antimicrobianos, más del 40% de los aislados con *strA*, *strB* o *tetA* presentan también plásmidos HI1 o FIIA. Sin embargo, no se ha detectado ninguna asociación entre replicones, subespecies o serotipos particulares. El replicón IncFIIA ha sido reconocido como el principal replicón asociado a virulencia en *Salmonella* (Carattoli et al., 2005). De igual manera, también es el que se aparece con más frecuencia en los casos de salmonelosis clínica en el ganado (Abraham et al., 2014; Leekitcharoenphon et al., 2019). Esta relación entre la aparición de dicho replicón y salmonelosis clínica la observamos también en nuestro estudio, íntimamente ligado a procesos septicémicos provocados por *Choleraesuis* (Gil-Molino et al., 2019). Además, hemos podido comprobar que el gen *mcr-1* es transportado por un plásmido de alto peso molecular (>240 kb). Curiosamente este gen solo había sido detectado en un caso humano de *S. Choleraesuis* (Santos et al., 2020), presente en el plásmido IncX4 con un tamaño de alrededor de 35 kb. Puesto que en *S. entérica* el megaplásmido IncHI2, de más de 200 kb y portador de múltiples genes de resistencia incluyendo *mcr-1*, es el determinante plasmídico más prevalente en distintos serovares de esta especie (Lima et al., 2019), este podría ser el caso del aislado de *S. Choleraesuis* detectado en el cerdo ibéricos en el trabajo presentado en esta tesis doctoral. Podría concluirse que las salmonelas presentes en los jabalíes, además de su potencial patógeno, pueden contribuir a la propagación de resistencia antimicrobiana al acumular y diseminar sus determinantes a través de diferentes elementos genéticos móviles. Debido a esta plasticidad, los determinantes de RAM en *Salmonella* pueden transferirse de manera horizontal a otras cepas o incluso especies bacterianas, o verticalmente mediante la propagación de determinados clones persistentes, pudiendo representar una amenaza para la salud tanto de los humanos como de los animales domésticos. En base a ello, los programas de vigilancia en animales salvajes cumplen una labor fundamental para mejorar

nuestra comprensión de la epidemiología de *Salmonella* y aportar un enfoque multidisciplinar que permita abordar desde varios frentes un problema tan complejo como es la circulación de bacterias zoonóticas y de resistencias antimicrobianas entre los entornos salvaje y doméstico.

VIII. CONCLUSIONES

- La prevalencia de *Salmonella* spp. en los jabalíes abatidos en monterías en la zona suroeste de España durante el periodo estudiado ha sido muy significativa (27%), siendo las tonsilas la ubicación orgánica donde se aislaron con mayor frecuencia.
- Los aislados de *Salmonella* spp. obtenidos pertenecían mayoritariamente a las subespecies *enterica* y *diarizonae*, observándose porcentajes de aislados similares en ambas, mientras que los serotipos predominantes fueron 38:z10:z53, perteneciente a la subespecie *salamae*; y Enteritidis y Newport, pertenecientes ambos a la subespecie *enterica*.
- *S. enterica* subsp. *enterica* serovar Choleraesuis fue el agente etiológico causante de los brotes septicémicos de salmonelosis detectados en los jabalíes, caracterizados por neumonía, hepato/esplenomegalia, linfadenitis mesentérica y congestión generalizada. El cuadro cursó con elevada morbilidad y mortalidad, y se desarrolló en individuos en fases juveniles de su desarrollo (entre 2.5 y 6 meses de edad).
- En nuestro estudio hemos constatado la circulación de clones de *S. Choleraesuis* idénticos o muy similares dentro de cada finca, entre fincas adyacentes, o incluso, ocasionalmente, en fincas muy separadas geográficamente, relacionándose esta circunstancia con factores no bien determinados en este estudio.
- La mayoría de las cepas de *Salmonella* caracterizadas en este estudio presentaban alguna resistencia antimicrobiana (75.2%), mientras que un porcentaje significativo (15.7%) mostraron multirresistencia, siendo las sulfonamidas y la estreptomycinina los compuestos menos efectivos y los genes *sul1* y *strA* los determinantes de resistencia más prevalentes.
- La frecuente presencia de elementos genéticos móviles como *int1* y diferentes plásmidos, en los serotipos Typhimurium y Choleraesuis, podría facilitar la transferencia de genes de resistencia asociados, como *mcr-1*, entre especies simpátricas y explicar así la dispersión de los determinantes de resistencia frente a los antimicrobianos.

- La presencia de comederos en fincas con vallado perimetral, que facilitan el agrupamiento transitorio de animales, es un factor de manejo asociado al incremento de las resistencias antimicrobianas estudiadas.

IX. BIBLIOGRAFÍA

- Aarestrup, F. M., Lertworapreecha, M., Evans, M. C., Bangtrakulnonth, A., Chalermchaikit, T., Hendriksen, R. S., & Wegener, H. C. (2003). Antimicrobial susceptibility and occurrence of resistance genes among *Salmonella enterica* serovar Weltevreden from different countries. *The Journal of antimicrobial chemotherapy*, *52*(4), 715-718.
- Abraham, S., Groves, M. D., Trott, D. J., Chapman, T. A., Turner, B., Hornitzky, M., & Jordan, D. (2014). *Salmonella enterica* isolated from infections in Australian livestock remain susceptible to critical antimicrobials. *International Journal of Antimicrobial Agents*, *43*(2), 126-130. doi:<http://dx.doi.org/10.1016/j.ijantimicag.2013.10.014>
- Achouri, S., Wright, J. A., Evans, L., Macleod, C., Fraser, G., Cicuta, P., & Bryant, C. E. (2015). The frequency and duration of *Salmonella*-macrophage adhesion events determines infection efficiency. *Philosophical Transactions of the Royal Society of London B: Biological Sciences*, *370*(1661), 20140033.
- AEMPS. (2019). *Plan nacional frente a la resistencia a los antibióticos 2019-2021*. (733-19-002-6). Madrid: Ministerio de sanidad, consumo y bienestar social Retrieved from www.resistenciaantibioticos.es
- Ainslie-Garcia, M. H., Farzan, A., Newman, J. E., Friendship, R. M., & Lillie, B. N. (2018). *Salmonella* fecal shedding in pigs from birth to market and its association with the presence of *Salmonella* in palatine tonsils and submandibular lymph nodes at slaughter. *Canadian Journal of Veterinary Research*, *82*(4), 249-255.
- Alcaine, S. D., Warnick, L. D., & Wiedmann, M. (2007). Antimicrobial resistance in nontyphoidal *Salmonella*. *J Food Prot*, *70*(3), 780-790.
- Allen, H. K., Donato, J., Wang, H. H., Cloud-Hansen, K. A., Davies, J., & Handelsman, J. (2010). Call of the wild: antibiotic resistance genes in natural environments. *Nat Rev Microbiol*, *8*(4), 251-259. doi:10.1038/nrmicro2312
- Allen, H. K., Moe, L. A., Rodbumrer, J., Gaarder, A., & Handelsman, J. (2009). Functional metagenomics reveals diverse beta-lactamases in a remote Alaskan soil. *ISME J*, *3*(2), 243-251. doi:10.1038/ismej.2008.86
- Álvarez-Hernández, D. A., Garza-Mayén, G. S., & Vazquez-Lopez, R. (2015). Quinolones. Nowadays perspectives and mechanisms of resistance. *Revista chilena de infectología: organo oficial de la Sociedad Chilena de Infectología*, *32*(5), 499-504.
- Aminov, R. I. (2009). The role of antibiotics and antibiotic resistance in nature. *Environ Microbiol*, *11*(12), 2970-2988. doi:10.1111/j.1462-2920.2009.01972.x
- Andrzejewski, R., & Jezierski, W. (1978). Management of a wild boar population and its effects on commercial land. *Acta Theriologica*, *23*(19), 309-339.
- Andueza, A., Lambarri, M., Urda, V., Prieto, I., Villanueva, L. F., & Sánchez-García, C. (2018). *Evaluación del impacto económico y social de la caza en España*. Retrieved from Ciudad Real:
- Antunes, P., Machado, J., & Peixe, L. (2007). Dissemination of sul3-containing elements linked to class 1 integrons with an unusual 3' conserved sequence region among *Salmonella* isolates. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, *51*(4), 1545-1548.

- Antunes, P., Machado, J., Sousa, J. C., & Peixe, L. (2005). Dissemination of sulfonamide resistance genes (sul1, sul2, and sul3) in Portuguese Salmonella enterica strains and relation with integrons. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 49(2), 836-839.
- Antunes, P., Mourao, J., Pestana, N., & Peixe, L. (2011). Leakage of emerging clinically relevant multidrug-resistant Salmonella clones from pig farms. *J Antimicrob Chemother*, 66(9), 2028-2032. doi:10.1093/jac/dkr228
- Aragaw, K., Molla, B., Muckle, A., Cole, L., Wilkie, E., Poppe, C., . . . Hildebrandt, G. (2007). The characterization of Salmonella serovars isolated from apparently healthy slaughtered pigs at Addis Ababa abattoir, Ethiopia. *Prev Vet Med*, 82(3-4), 252-261. doi:10.1016/j.prevetmed.2007.05.022
- Arguello, H., Carvajal, A., Collazos, J. A., García-Feliz, C., & Rubio, P. (2012). Prevalence and serovars of Salmonella enterica on pig carcasses, slaughtered pigs and the environment of four Spanish slaughterhouses. *Food Research International*, 45(2), 905-912. doi:http://dx.doi.org/10.1016/j.foodres.2011.04.017
- Argüello, H., Guerra, B., Rodríguez, I., Rubio, P., & Carvajal, A. (2018). Characterization of antimicrobial resistance determinants and class 1 and class 2 integrons in Salmonella enterica spp., multidrug-resistant isolates from pigs. *Genes*, 9(5), 256.
- Arguello, H., Sørensen, G., Carvajal, A., Baggesen, D. L., Rubio, P., & Pedersen, K. (2013). Prevalence, serotypes and resistance patterns of Salmonella in Danish pig production. *Res Vet Sci*, 95(2), 334-342. doi:http://dx.doi.org/10.1016/j.rvsc.2013.04.001
- Arroyo, B., Delibes-Mateos, M., Caro, J., Estrada, A., Mougeot, F., Diaz-Fernández, S., . . . Viñuela, J. (2013). Efecto de la gestión para las especies de caza menor sobre la fauna no cinegética. *Revista Ecosistemas*, 22(2), 27-32.
- Aserkoff, B., & Bennett, J. V. (1969). Effect of antibiotic therapy in acute salmonellosis on the fecal excretion of salmonellae. *The New England journal of medicine*, 281(12), 636-640. doi:10.1056/NEJM196909182811202
- Astorga, R. J., Salaberria, A. E., Garcia, A. M., Jimenez, S. V., Martinez, A. C., Garcia, A. A., & Casas, A. A. (2007). Surveillance and antimicrobial resistance of Salmonella strains isolated from slaughtered pigs in Spain. *J Food Prot*, 70(6), 1502-1506.
- Bahnson, P. B., Fedorka-Cray, P. J., Ladely, S. R., & Mateus-Pinilla, N. E. (2006). Herd-level risk factors for Salmonella enterica subsp. enterica in U.S. market pigs. *Preventive Veterinary Medicine*, 76(3-4), 249-262.
- Baloda, S. B., Christensen, L., & Trajcevska, S. (2001). Persistence of a Salmonella entericaserovar typhimurium DT12 clone in a piggery and in agricultural soil amended with Salmonella-contaminated slurry. *Applied and Environmental Microbiology*, 67(6), 2859-2862.
- Bañares A., Blanca G., Güemes J., Moreno J.C., & S., O. (2004). Atlas y Libro Rojo de la Flora Vasculare Amenazada de España. *Ministerio de Medio Ambiente. Dirección General de Conservación de la Naturaleza, Madrid. Entradi, E.*
- Barrow, P. A. (1999). Virulence of Salmonella enterica serovar Enteritidis. In S. A.M. (Ed.), *Salmonella enterica serovar Enteritidis in humans and animals* (pp. 173-181). Iowa State University Press, Ames, USA,.

- Baskerville, A., & Dow, C. (1973). Pathology of experimental pneumonia in pigs produced by *Salmonella cholerae-suis*. *Journal of comparative pathology*, 83(2), 207-215.
- Baskerville, A., Dow, C., Curran, W. L., Hanna, J. (1973). Further studies on experimental bacterial pneumonia: ultrastructural changes produced in the lungs by *Salmonella cholerae-suis*. *British journal of experimental pathology*, 54(1), 90-98.
- Bassi, A. M. G., Steiner, J. C., Stephan, R., & Nuesch-Inderbinen, M. (2021). Seroprevalence of *Toxoplasma gondii* and *Salmonella* in Hunted Wild Boars from Two Different Regions in Switzerland. *Animals (Basel)*, 11(8). doi:10.3390/ani11082227
- Baudart, J., Lemarchand, K., Brisabois, A., & Lebaron, P. (2000). Diversity of *Salmonella* strains isolated from the aquatic environment as determined by serotyping and amplification of the ribosomal DNA spacer regions. *Appl Environ Microbiol*, 66(4), 1544-1552. doi:10.1128/AEM.66.4.1544-1552.2000
- Baumberg, S., Young, J. P. W., Wellington, E. M. H., & Saunders, J. R. (1995). The spread of drug resistance. In S. Baumberg, J. P. W. Young, E. M. H. Wellington, & J. R. Saunders (Eds.), *Population genetics in bacteria* (pp. 317-344). Cambridge: University press.
- Beloeil, P., Chauvin, C., Proux, K., Rose, N., Queguiner, S., Eveno, E., . . . Madec, F. (2003). Longitudinal serological responses to *Salmonella enterica* of growing pigs in a subclinically infected herd. *Preventive Veterinary Medicine*, 60(3), 207-226.
- Bennett, P. (2008). Plasmid encoded antibiotic resistance: acquisition and transfer of antibiotic resistance genes in bacteria. *British journal of pharmacology*, 153(S1), S347-S357.
- Berends, B. R., Urlings, H. A. P., Snijders, J. M. A., & Van Knapen, 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.
- Bertelli, C., & Brinkman, F. S. (2018). Improved genomic island predictions with IslandPath-DIMOB. *Bioinformatics*, 34(13), 2161-2167.
- Biondi, M., Zannino, L.G. (1997). Psychological stress, neuroimmunomodulation, and susceptibility to infectious diseases in animals and man: a review. *Psychotherapy and psychosomatics*, 66(1), 3-26.
- Blondeau, J. M. (2004). Fluoroquinolones: mechanism of action, classification, and development of resistance. *Surv Ophthalmol*, 49 Suppl 2, S73-78. doi:10.1016/j.survophthal.2004.01.005
- Boitani, L., Mattei, L., Nonis, D., & Corsi, F. (1994). Spatial and activity patterns of wild boar in Tuscany, Italy. *Journal of Mammalogy*, 75(3), 600-612. doi:10.2307/1382507
- Bolton, D. J., Ivory, C., & McDowell, D. (2013). A study of *Salmonella* in pigs from birth to carcass: serotypes, genotypes, antibiotic resistance and virulence profiles. *Int J Food Microbiol*, 160(3), 298-303. doi:10.1016/j.ijfoodmicro.2012.11.001
- Bonardi, S., Bassi, L., Brindani, F., D'Incau, M., Barco, L., Carra, E., & Pongolini, S. (2013). Prevalence, characterization and antimicrobial susceptibility of *Salmonella enterica* and *Yersinia enterocolitica* in pigs at slaughter in Italy.

- International Journal of Food Microbiology*, 163(2–3), 248-257. doi:<http://dx.doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2013.02.012>
- Bonardi, S., Bolzoni, L., Zanoni, R. G., Morganti, M., Corradi, M., Gilioli, S., & Pongolini, S. (2019). Limited Exchange of Salmonella Among Domestic Pigs and Wild Boars in Italy. *EcoHealth*, 1-9.
- Bonardi, S., Tansini, C., Cacchioli, A., Soliani, L., Poli, L., Lamperti, L., . . . Gilioli, S. (2021). Enterobacteriaceae and Salmonella contamination of wild boar (*Sus scrofa*) carcasses: comparison between different sampling strategies. *Eur J Wildl Res*, 67(5), 88. doi:10.1007/s10344-021-01531-0
- Bonke, R., Wacheck, S., Bumann, C., Thum, C., Stüber, E., König, M., . . . Fredriksson-Ahomaa, M. (2012). High prevalence of Salmonella enterica subsp. diarizonae in tonsils of sheep at slaughter. *Food Research International*, 45(2), 880-884. doi:<https://doi.org/10.1016/j.foodres.2011.01.050>
- Boto, L., & Martinez, J. L. (2011). Ecological and temporal constraints in the evolution of bacterial genomes. *Genes (Basel)*, 2(4), 804-828. doi:10.3390/genes2040804
- Botti, V., Navillod, F. V., Domenis, L., Orusa, R., Pepe, E., Robetto, S., & Guidetti, C. (2013). Salmonella spp. and antibiotic-resistant strains in wild mammals and birds in north-western Italy from 2002 to 2010. *Vet Ital*, 49(2), 195-202.
- Boyd, D., Peters, G. A., Cloeckert, A., Boumedine, K. S., Chaslus-Dancla, E., Imberechts, H., & Mulvey, M. R. (2001). Complete nucleotide sequence of a 43-kilobase genomic island associated with the multidrug resistance region of Salmonella enterica serovar Typhimurium DT104 and its identification in phage type DT120 and serovar Agona. *Journal of Bacteriology*, 183(19), 5725-5732.
- Brenner, F., Villar, R., Angulo, F., Tauxe, R., & Swaminathan, B. (2000). Salmonella nomenclature. *Journal of Clinical Microbiology*, 38(7), 2465-2467.
- Briones, V., Téllez, S., Goyache, J., Ballesteros, C., Del Pilar Lanzarot, M., Domínguez, L., & Fernández-Garayzábal, J. F. (2004). Salmonella diversity associated with wild reptiles and amphibians in Spain. *Environ Microbiol*, 6(8), 868-871.
- Brisola, M. C., Crecencio, R. B., Bitner, D. S., Frigo, A., Rampazzo, L., Stefani, L. M., & Faria, G. A. (2019). Escherichia coli used as a biomarker of antimicrobial resistance in pig farms of Southern Brazil. *Science of the Total Environment*, 647, 362-368. doi:<https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2018.07.438>
- Bryan, A., Shapir, N., & Sadowsky, M. J. (2004). Frequency and Distribution of Tetracycline Resistance Genes in Genetically Diverse, Nonselected, and Nonclinical *Escherichia coli* Strains Isolated from Diverse Human and Animal Sources. *Applied and Environmental Microbiology*, 70(4), 2503-2507. doi:10.1128/AEM.70.4.2503-2507.2004
- Bush, K. (2009). The Importance of β -Lactamases to the Development of New β -Lactams. In *Antimicrobial Drug Resistance* (pp. 135-144).
- Bush, K., & Jacoby, G. A. (2010). Updated functional classification of β -lactamases. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 54(3), 969-976.
- Bush, K., Jacoby, G. A., & Medeiros, A. A. (1995). A functional classification scheme for beta-lactamases and its correlation with molecular structure. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 39(6), 1211-1233.
- Caleja, C., de Toro, M., Gonçalves, A., Themudo, P., Vieira-Pinto, M., Monteiro, D., . . . Igrejas, G. (2011). Antimicrobial resistance and class I integrons in Salmonella enterica isolates from wild boars and Bísaro pigs. *Int Microbiol*, 14(1), 19-24.

- Calero-Bernal, R., Gómez-Gordo, L., Saugar, J. M., Frontera, E., Pérez-Martín, J. E., Reina, D., . . . Fuentes, I. (2013). Congenital toxoplasmosis in wild boar (*Sus scrofa*) and identification of the *Toxoplasma gondii* types involved. *J Wildl Dis*, *49*(4), 1019-1023.
- Callaway, T. R., Morrow, J. L., Edrington, T. S., Genovese, K. J., Dowd, S., Carroll, J., . . . Nisbet, D. J. (2006). Social stress increases fecal shedding of *Salmonella typhimurium* by early weaned piglets. *Curr Issues Intest Microbiol*, *7*(2), 65-71.
- Cano-Manuel, F. J., López-Olvera, J., Fandos, P., Soriguer, R. C., Pérez, J. M., & Granados, J. E. (2014). Long-term monitoring of 10 selected pathogens in wild boar (*Sus scrofa*) in Sierra Nevada National Park, southern Spain. *Vet Microbiol*, *174*(1-2), 148-154. doi:http://dx.doi.org/10.1016/j.vetmic.2014.06.017
- Cano-Terriza, D., Riscalde, M. A., Jimenez-Ruiz, S., Vicente, J., Isla, J., Paniagua, J., . . . Garcia-Bocanegra, I. (2018). Management of hunting waste as control measure for tuberculosis in wild ungulates in south-central Spain. *Transbound Emerg Dis*, *65*(5), 1190-1196. doi:10.1111/tbed.12857
- Carattoli, A. (2001). Importance of integrons in the diffusion of resistance. *Vet Res*, *32*(3-4), 243-259.
- Carattoli, A. (2009). Resistance plasmid families in Enterobacteriaceae. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, *53*(6), 2227-2238.
- Carattoli, A. (2011). Plasmids in Gram negatives: Molecular typing of resistance plasmids. *International Journal of Medical Microbiology*, *301*(8), 654-658. doi:http://dx.doi.org/10.1016/j.ijmm.2011.09.003
- Carattoli, A., Bertini, A., Villa, L., Falbo, V., Hopkins, K. L., & Threlfall, E. J. (2005). Identification of plasmids by PCR-based replicon typing. *Journal of Microbiological Methods*, *63*(3), 219-228.
- Carlson, A., Barnhill, A. E., & Griffith, R. W. (2012). Salmonellosis. In J. J. Zimmerman (Ed.), *Diseases of Swine* (Vol. 1, pp. 821-833). West Sussex, UK: John Wiley and Sons Ltd.
- Caro, J., Delibes-Mateos, M., & Arroyo, B. (2014). La gestión cinegética y la conservación de especies. *Ambienta*, 68-79.
- Carpio, A. J., Apollonio, M., & Acevedo, P. (2020). Wild ungulate overabundance in Europe: contexts, causes, monitoring and management recommendations. *Mammal Review*, *51*(1), 95-108. doi:10.1111/mam.12221
- Carpio, A. J., Guerrero-Casado, J., Tortosa, F. S., & Vicente, J. (2014). Predation of simulated red-legged partridge nests in big game estates from South Central Spain. *European Journal of Wildlife Research*, *60*(2), 391-394.
- Carranza, J. (1999). Aplicaciones de la Etología al manejo de las poblaciones de ciervo en el suroeste de la Península Ibérica: producción y conservación. *Etologia*, *7*, 5-18.
- Carroll, D., Wang, J., Fanning, S., & McMahon, B. J. (2015). Antimicrobial Resistance in Wildlife: Implications for Public Health. *Zoonoses Public Health*, *62*(7), 534-542. doi:10.1111/zph.12182
- Carroll, L. M., Gaballa, A., Guldemann, C., Sullivan, G., Henderson, L. O., & Wiedmann, M. (2019). Identification of novel mobilized colistin resistance gene *mcr-9* in a multidrug-resistant, colistin-susceptible *Salmonella enterica* serotype Typhimurium isolate. *MBio*, *10*(3), e00853-00819.

- Casas-Díaz, E., Closa-Sebastià, F., Peris, A., Miño, A., Torrentó, J., Casanovas, R., . . . Serrano, E. (2013). Recorded dispersal of wild boar (*Sus scrofa*) in Northeast Spain: Implications for disease-monitoring programs. *Wildlife Biology in Practice*, 9(3), 19-26. doi:10.2461/wbp.2013.ibeun.3
- Castagna, S. M. F., Muller, M., Macagnan, M., Rodenbusch, C. R., Canal, C. W., & Cardoso, M. (2005). Detection of *Salmonella* sp. from porcine origin: a comparison between a PCR method and standard microbiological techniques. *Brazilian Journal of Microbiology*, 36(4), 373-377.
- Castillo-Contreras, R., Mentaberre, G., Fernandez Aguilar, X., Conejero, C., Colom-Cadena, A., Raez-Bravo, A., . . . Lopez-Olvera, J. R. (2021). Wild boar in the city: Phenotypic responses to urbanisation. *Sci Total Environ*, 773, 145593. doi:10.1016/j.scitotenv.2021.145593
- Castillo, J. R. E. d. (2013). Tetracyclines. In I. John Wiley & Sons (Ed.), *Antimicrobial Therapy in Veterinary Medicine* (pp. 257-268). Ames, Iowa.
- Castillo, L., Fernández-Llario, P., Mateos, C., Carranza, J., Benítez-Medina, J., García-Jiménez, W., . . . de Mendoza, J. H. (2011). Management practices and their association with *Mycobacterium tuberculosis* complex prevalence in red deer populations in Southwestern Spain. *Preventive Veterinary Medicine*, 98(1), 58-63.
- Catry, B., Cavaleri, M., Baptiste, K., Grave, K., Grein, K., Holm, A., . . . Mackay, D. (2015). Use of colistin-containing products within the European Union and European Economic Area (EU/EEA): development of resistance in animals and possible impact on human and animal health. *International Journal of Antimicrobial Agents*, 46(3), 297-306.
- Cavalli, L. L., Lederberg, J., & Lederberg, E. M. (1953). An infective factor controlling sex compatibility in *Bacterium coli*. *J Gen Microbiol*, 8(1), 89-103. doi:10.1099/00221287-8-1-89
- CDC. (2019). Centers for Disease Control and Prevention. Advice to Clinicians—Multistate Outbreak of *Salmonella* Infections Linked to Raw Chicken Products, October 2018.
- Chang, C.-C., Lin, Y.-H., Chang, C.-F., Yeh, K.-S., Chiu, C.-H., Chu, C., . . . Chiou, C.-S. (2005). Epidemiologic relationship between fluoroquinolone-resistant *Salmonella enterica* serovar Choleraesuis strains isolated from humans and pigs in Taiwan (1997 to 2002). *Journal of Clinical Microbiology*, 43(6), 2798-2804.
- Chattaway, M. A., Langridge, G. C., & Wain, J. (2021). *Salmonella* nomenclature in the genomic era: a time for change. *Sci Rep*, 11(1), 7494. doi:10.1038/s41598-021-86243-w
- Chen, S., Zhao, S., White, D. G., Schroeder, C. M., Lu, R., Yang, H., . . . Meng, J. (2004). Characterization of multiple-antimicrobial-resistant *Salmonella* serovars isolated from retail meats. *Applied and Environmental Microbiology*, 70(1), 1-7.
- Cherubin, C. (1980). Epidemiologic assessment of antibiotic resistance in salmonella. In D. J. Steele (Ed.), *CRC Handbook Series in Zoonosis* (Vol. I Sect, pp. 173–200). Boca Raton, Florida: CRC Press.
- Chiari, M., Zanoni, M., Tagliabue, S., Lavazza, A., & Alborali, L. G. (2013). *Salmonella* serotypes in wild boars (*Sus scrofa*) hunted in northern Italy. *Acta Vet Scand*, 55(42), 42. doi:10.1186/1751-0147-55-42

- Chiu, C.-H., & Su, L.-H. (2019). Salmonella, Non-Typhoidal Species (S. Choleraesuis, S. Enteritidis, S. Hadar, S. Typhimurium). *Dostupno na <http://www.antimicrobe.org/b258.asp>. Zadnji pristup, 21.*
- Chiu, C. H., Su, L. H., & Chu, C. (2004). Salmonella enterica Serotype Choleraesuis: Epidemiology, Pathogenesis, Clinical Disease, and Treatment. *Clin Microbiol Rev*, 17(2), 311-322.
- Cilia, G., Turchi, B., Fratini, F., Bilei, S., Bossù, T., De Marchis, M. L., . . . Bertelloni, F. (2021). Prevalence, Virulence and Antimicrobial Susceptibility of Salmonella spp., Yersinia enterocolitica and Listeria monocytogenes in European Wild Boar (Sus scrofa) Hunted in Tuscany (Central Italy). *Pathogens*, 10(2), 93.
- Clemmer, D. I., Hickey, J. L., Bridges, J. F., Schliessmann, D. J., & Shaffer, M. F. (1960). Bacteriologic studies of experimental air-borne salmonellosis in chicks. *Journal of Infectious Diseases*, 106, 197-210.
- Closa-Sebastián, F., Casas-Díaz, E., Cuenca, R., Lavín, S., Mentaberre, G., & Marco, I. (2011). Antibodies to selected pathogens in wild boar (Sus scrofa) from Catalonia (NE Spain). *European Journal of Wildlife Research*, 1-5.
- Cohen, J. I., Bartlett, J. A., & Corey, G. R. (1987). Extra-intestinal manifestations of salmonella infections. *Medicine*, 66(5), 349-388.
- Colomer, J., Rosell, C., Rodriguez-Teijeiro, J. D., & Massei, G. (2021). 'Reserve effect': An opportunity to mitigate human-wild boar conflicts. *Sci Total Environ*, 795, 148721. doi:10.1016/j.scitotenv.2021.148721
- Commission Regulation (EC) No 1430/94 of 22 June 1994 amending Annexes I, II, III and IV of Council Regulation (EEC) No 2377/90 laying down a Community procedure for the establishment of maximum residue limits of veterinary medicinal products in foodstuffs of animal origin, 1430/94 C.F.R. (1994).
- Committee on Salmonella. (1969). *An evaluation of the salmonella problem*. Wash, CD: Natl Acad Sci.
- Conedera G., Ustulin M., Barco L., Bregoli M., Re E., & D., V. (2014). Outbreak of atypical Salmonella Choleraesuis in wild boar in North Eastern Italy. In P. Paulsen, Bauer A., & S. F.J.M. (Eds.), *Trens in game meat hygiene* (pp. 151-159). Wageningen: Academic Publishers.
- Crofts, T. S., Gasparrini, A. J., & Dantas, G. (2017). Next-generation approaches to understand and combat the antibiotic resistome. *Nature Reviews Microbiology*, 15(7), 422-434.
- Crump, J. A., Medalla, F. M., Joyce, K. W., Krueger, A. L., Hoekstra, R. M., Whichard, J. M., . . . Group, E. I. P. N. W. (2011). Antimicrobial resistance among invasive nontyphoidal Salmonella enterica isolates in the United States: National Antimicrobial Resistance Monitoring System, 1996 to 2007. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 55(3), 1148-1154.
- Darwich, L., Vidal, A., Seminati, C., Albamonte, A., Casado, A., López, F., . . . Migura-García, L. (2019). High prevalence and diversity of Extended-Spectrum β -Lactamase and emergence of Carbapenemase producing Enterobacteriaceae spp in wildlife in Catalonia. *bioRxiv*, 510123. doi:10.1101/510123
- DeGeeter, M. J., Stahl, G. L., & Geng, S. (1976). Effect of lincomycin on prevalence, duration, and quantity of Salmonella typhimurium excreted by swine. *American Journal of Veterinary Research*, 37(5), 525-529.
- Di Conza, J., & Gutkind, G. (2010). Integrones: los coleccionistas de genes. *Revista argentina de microbiología*, 42(1), 63-78.

- Dias, D., Torres, R. T., Kronvall, G., Fonseca, C., Mendo, S., & Caetano, T. (2015). Assessment of antibiotic resistance of *Escherichia coli* isolates and screening of *Salmonella* spp. in wild ungulates from Portugal. *Res Microbiol*, *166*(7), 584-593. doi:<https://doi.org/10.1016/j.resmic.2015.03.006>
- Diaz-Sanchez, S., Sanchez, S., Herrera-Leon, S., Porrero, C., Blanco, J., Dahbi, G., . . . Vidal, D. (2013). Prevalence of Shiga toxin-producing *Escherichia coli*, *Salmonella* spp. and *Campylobacter* spp. in large game animals intended for consumption: relationship with management practices and livestock influence. *Vet Microbiol*, *163*(3-4), 274-281. doi:10.1016/j.vetmic.2012.12.026
- Dixon, J. M. (1965). Effect of antibiotic treatment on duration of excretion of *Salmonella typhimurium* by children. *British medical journal*, *2*(5474), 1343-1345.
- Donazzolo C., T. S., Ustulin M. Citterio C, Conedera G., Vio D., Deotto S., Digiusto T., Cocchi M. (2017). Antimicrobial susceptibility of *Salmonella enterica* subsp. *enterica* serovar *Choleraesuis* strains from wild boar (*Sus scrofa*) in Italy. In B. A. Paulsen P., Smulders F.J.M. (Ed.), *Game meat hygiene* (pp. 307). The Netherlands: Wageningen Academic Publishers.
- Ecco, R., Guedes, R. M. C., Tury, E., Santos Jr, H. L., & Perecmanis, S. (2006). Outbreak of enterocolitic salmonellosis on a wild pig farm. *Veterinary Record*, *158*, 242-243.
- EFSA, & ECDC. (2019). The European Union One Health 2018 Zoonoses Report. *EFSA J*, *17*(12), e05926. doi:10.2903/j.efsa.2019.5926
- EFSA, & ECDC. (2020). *The European Union Summary Report on Antimicrobial Resistance in zoonotic and indicator bacteria from humans, animals and food in 2017/2018* (1831-4732 (Electronic) 1831-4732 (Linking)). Retrieved from <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/32874244>
- EFSA, & ECDC. (2021a). The European Union One Health 2019 Zoonoses Report. *EFSA J*, *19*(2), e06406. doi:10.2903/j.efsa.2021.6406
- EFSA, & ECDC. (2021b). The European Union Summary Report on Antimicrobial Resistance in zoonotic and indicator bacteria from humans, animals and food in 2018/2019. *EFSA J*, *19*(4), e06490. doi:10.2903/j.efsa.2021.6490
- EMA/AMEG. (2016). *Updated advice on the use of colistin products in animals within the European Union: development of resistance and possible impact on human and animal health (EMA/CVMP/CHMP/231573/2016)*.
- Eriksson, E., & Aspan, A. (2007). Comparison of culture, ELISA and PCR techniques for salmonella detection in faecal samples for cattle, pig and poultry. *BMC Vet Res*, *3*, 21. doi:10.1186/1746-6148-3-21
- Étienne, P. (2004). *El jabali*. (Omega Ed.): Omega.
- COMMISSION IMPLEMENTING DECISION of 12 November 2013 on the monitoring and reporting of antimicrobial resistance in zoonotic and commensal bacteria, C(2013) 7145 C.F.R.
- COMMISSION IMPLEMENTING DECISION (EU) 2020/1729 of 17 November 2020 on the monitoring and reporting of antimicrobial resistance in zoonotic and commensal bacteria and repealing Implementing Decision 2013/652/EU, C(2020) 7894 C.F.R.
- Evangelopoulou, G., Kritas, S., Govaris, A., & Burriel, A. R. (2014). Pork Meat as a Potential Source of *Salmonella enterica* subsp. *arizonae* Infection in Humans. *Journal of Clinical Microbiology*, *52*(3), 741-744. doi:10.1128/jcm.02933-13

- Fabrega, A., Du Merle, L., Le Bouguenec, C., Jiménez de Anta, M. T., & Vila, J. (2009). Repression of invasion genes and decreased invasion in a high-level fluoroquinolone-resistant *Salmonella typhimurium* mutant. *PLoS One*, *4*(11), e8029.
- Falagas, M. E., Rafailidis, P. I., & Matthaiou, D. K. (2010). Resistance to polymyxins: mechanisms, frequency and treatment options. *Drug resistance updates*, *13*(4-5), 132-138.
- Fedoraka-Cray, P. J., Gray, J. T., & Wray, C. (2000). *Salmonella* infections in pigs. In C. Wray & A. Wray (Eds.), *Salmonella in domestic animals* (pp. 191-207). London: CABI.
- Fedoraka-Cray, P. J., Kelley, L. C., Stabel, T. J., Gray, J. T., & Laufer, J. A. (1995). Alternate routes of invasion may affect pathogenesis of *Salmonella typhimurium* in swine. *Infect Immun*, *63*(7), 2658-2664.
- Fedoraka-Cray, P. J., Whipp, S. C., Isaacson, R. E., Nord, N., & Lager, K. (1994). Transmission of *Salmonella typhimurium* to swine. *Vet Microbiol*, *41*(4), 333-344.
- Fernandez-Aguilar, X., Gottschalk, M., Aragon, V., Camara, J., Ardanuy, C., Velarde, R., . . . Cabezon, O. (2018). Urban Wild Boars and Risk for Zoonotic *Streptococcus suis*, Spain. *Emerg Infect Dis*, *24*(6), 1083-1086. doi:10.3201/eid2406.171271
- Fernández-Llario, P. (2006). Jabalí–*Sus scrofa* Linnaeus, 1758. *Enciclopedia Virtual de los Vertebrados Españoles Carrascal, LM, Salvador, A.(Eds.), Museo Nacional de Ciencias Naturales, Madrid. <http://www.vertebradosibericos.org>*.
- Fernandez-Llario, P., & Mateos-Quesada, P. (1998). Body size and reproductive parameters in the wild boar *Sus scrofa*. *Acta Theriologica*, *43*, 439-444.
- Fernandez-Llario, P., Mateos-Quesada, Patricio. (2003). Population structure of the wild boar (*Sus scrofa*) in two Mediterranean habitats in the western Iberian Peninsula. *FOLIA ZOOLOGICA-PRAHA-*, *52*(2), 143-148.
- Ferstl, P. G., Reinheimer, C., Jozsa, K., Zeuzem, S., Kempf, V. A., Waidmann, O., & Grammatikos, G. (2017). Severe infection with multidrug-resistant *Salmonella choleraesuis* in a young patient with primary sclerosing cholangitis. *World journal of gastroenterology*, *23*(11), 2086.
- Figueiredo, A. M., Valente, A. M., Barros, T., Carvalho, J., Silva, D. A. M., Fonseca, C., . . . Torres, R. T. (2020). What does the wolf eat? Assessing the diet of the endangered Iberian wolf (*Canis lupus signatus*) in northeast Portugal. *PLoS One*, *15*(3), e0230433. doi:10.1371/journal.pone.0230433
- Finlayson, M., & Barnum, D. A. (1973). The effect of chlortetracycline feed additive on experimental salmonella infection of swine and antibiotic resistance transfer. *Canadian journal of comparative medicine. Revue canadienne de medecine comparee*, *37*(2), 139-146.
- Flores Castro, R. (2014). La salmonelosis porcina y su importancia en la cadena de producción. *suis*, *111*, 16-26.
- Fluit, A., & Schmitz, F. J. (2004). Resistance integrons and super-integrons. *Clinical Microbiology and Infection*, *10*(4), 272-288.
- Foti, M., Siclari, A., Mascetti, A., & Fisichella, V. (2018). Study of the spread of antimicrobial-resistant Enterobacteriaceae from wild mammals in the National Park of Aspromonte (Calabria, Italy). *Environmental Toxicology and Pharmacology*, *63*, 69-73. doi:https://doi.org/10.1016/j.etap.2018.08.016

- Fournier, C., Aires-de-Sousa, M., Nordmann, P., & Poirel, L. (2020). Occurrence of CTX-M-15- and MCR-1-producing Enterobacterales in pigs in Portugal: Evidence of direct links with antibiotic selective pressure. *Int J Antimicrob Agents*, *55*(2), 105802. doi:10.1016/j.ijantimicag.2019.09.006
- Fredriksson-Ahomaa, M., London, L., Skrzypczak, T., Kantala, T., Laamanen, I., Bistrom, M., . . . Gadd, T. (2020). Foodborne Zoonoses Common in Hunted Wild Boars. *EcoHealth*, *17*(4), 512-522. doi:10.1007/s10393-020-01509-5
- Freestone, P. P., Sandrini, S. M., Haigh, R. D., & Lyte, M. (2008). Microbial endocrinology: how stress influences susceptibility to infection. *Trends in microbiology*, *16*(2), 55-64. doi:10.1016/j.tim.2007.11.005
- Fruzinski, B. (1995). Situation of wild boar populations in western Poland. *Journal of Mountain Ecology*, *3*, 186-187.
- Frye, J. G., & Jackson, C. R. (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. doi:10.3389/fmicb.2013.00135
- Frye, J. G., Lindsey, R. L., Meinersmann, R. J., Berrang, M. E., Jackson, C. R., Englen, M. D., . . . Fedorka-Cray, P. J. (2011). Related antimicrobial resistance genes detected in different bacterial species co-isolated from swine fecal samples. *Foodborne Pathog Dis*, *8*(6), 663-679.
- Funk, J. A., Davies, P. R., & Nichols, M. A. (2000). The effect of fecal sample weight on detection of *Salmonella enterica* in swine feces. *J Vet Diagn Invest*, *12*(5), 412-418. doi:10.1177/104063870001200504
- Furness, L. E., Campbell, A., Zhang, L., Gaze, W. H., & McDonald, R. A. (2017). Wild small mammals as sentinels for the environmental transmission of antimicrobial resistance. *Environmental Research*, *154*, 28-34. doi:https://doi.org/10.1016/j.envres.2016.12.014
- Gaffuri, A., & Holmes, J. P. (2012). *Salmonella* infections. In Dolores Gavier-Widén, J. P. Duff, & A. Meredith (Eds.), *Infectious Diseases of Wild Mammals and Bird in Europe*. (pp. 398-407). UK: Wiley-Blackwell.
- Gamelon, M., Douhard, M., Baubet, E., Gimenez, O., Brandt, S., & Gaillard, J. M. (2013). Fluctuating food resources influence developmental plasticity in wild boar. *Biol Lett*, *9*(5), 20130419. doi:10.1098/rsbl.2013.0419
- Gamito-Santos, J., Gómez, L., Calero-Bernal, R., Rol-Díaz, J., González-Ruibal, L., Gómez-Blázquez, M., & Pérez-Martín, J. (2009). Histopathology of trichinellosis in wild boar. *Veterinary Parasitology*, *165*(1), 165-169.
- Garau, G., Di Guilmi, A. M., & Hall, B. G. (2005). Structure-based phylogeny of the metallo-beta-lactamases. *Antimicrob Agents Chemother*, *49*(7), 2778-2784. doi:10.1128/AAC.49.7.2778-2784.2005
- García-Feliz, C., Carvajal, A., Collazos, J. Á., & Rubio, P. (2009). Herd-level risk factors for faecal shedding of *Salmonella enterica* in Spanish fattening pigs. *Preventive Veterinary Medicine*, *91*(2-4), 130-136. doi:http://dx.doi.org/10.1016/j.prevetmed.2009.05.011
- García-Fernández, A., Chiaretto, G., Bertini, A., Villa, L., Fortini, D., Ricci, A., & Carattoli, A. (2008). Multilocus sequence typing of Inc11 plasmids carrying extended-spectrum β -lactamases in *Escherichia coli* and *Salmonella* of human and animal origin. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, *61*(6), 1229-1233.
- García-Jiménez, W. L., Fernández-Llario, P., Benítez-Medina, J. M., Cerrato, R., Cuesta, J., García-Sánchez, A., . . . Hermoso-de-Mendoza, J. (2013). Reducing

- Eurasian wild boar (*Sus scrofa*) population density as a measure for bovine tuberculosis control: Effects in wild boar and a sympatric fallow deer (*Dama dama*) population in Central Spain. *Preventive Veterinary Medicine*, 110(3–4), 435–446. doi:http://dx.doi.org/10.1016/j.prevetmed.2013.02.017
- García-Feliz, C., Collazos, J., Carvajal, A., Herrera, S., Echeita, M., & Rubio, P. (2008). Antimicrobial resistance of *Salmonella enterica* isolates from apparently healthy and clinically ill finishing pigs in Spain. *Zoonoses Public Health*, 55(4), 195–205.
- García-Feliz, C., Collazos, J., Carvajal, A., Vidal, A., Aladuena, A., Ramiro, R., . . . Rubio, P. (2007). *Salmonella enterica* infections in Spanish swine fattening units. *Zoonoses Public Health*, 54(8), 294–300.
- Gargano, V., Sciortino, S., Gambino, D., Costa, A., Agozzino, V., Reale, S., . . . Vicari, D. (2021). Antibiotic Susceptibility Profile and Tetracycline Resistance Genes Detection in *Salmonella* spp. Strains Isolated from Animals and Food. *Antibiotics*, 10(7), 809.
- Garrido-Martín, J. L. (2012). *La Caza. Sector económico*. Paper presented at the Foro RFEC "La responsabilidad de los accidentes de tráfico con fauna silvestre", Madrid.
- Garrido, J. (2012). La caza. Sector económico. Valoración por subsectores. In: FEDENCA-EEC, Madrid, España.
- Gerveno, J. M. C., Pérez, D. R., Blanco, P. G., Jiménez, W. L. G., Molino, M. G., Fernandez-Llario, P., . . . Gordo, L. J. G. (2013). Fatal infection due to *Haemophilus parasuis* in a young wild boar (*Sus scrofa*). *Journal of Veterinary Diagnostic Investigation*, 25(2), 297–300.
- Gil-Molino, M., Garcia, A., Zurita, S. G., Martín-Cano, F. E., Garcia-Jimenez, W., Risco, D., . . . Quesada, A. (2020). Spread of Antimicrobial Resistance by *Salmonella enterica* Serovar Choleraesuis between Close Domestic and Wild Environments. *Antibiotics (Basel)*, 9(11). doi:10.3390/antibiotics9110750
- Gil-Molino, M., Goncalves Blanco, P., Risco Perez, D., Martin Cano, F. E., Garcia Sanchez, A., Rey Perez, J., . . . Quesada Molina, A. (2022 (En revisión)). Dissemination of antimicrobial resistant isolates of *Salmonella* spp. in wild boars and its relationship with management practices. *Transbound Emerg Dis*.
- Gil-Molino, M., Risco Perez, D., Goncalves Blanco, P., Fernandez Llario, P., Quesada Molina, A., Garcia Sanchez, A., . . . Rey Perez, J. (2019). Outbreaks of antimicrobial resistant *Salmonella Choleraesuis* in wild boars piglets from central-western Spain. *Transbound Emerg Dis*, 66(1), 225–233. doi:10.1111/tbed.13003
- Giorda, F., Zoppi, S., Mignone, W., Grattarola, C., Dondo, A., & Tittarelli, C. (2014). *Salmonella* infections in wild animals in Western Liguria. In *Trends in game meat hygiene: From forest to fork* (pp. 161–168): Wageningen Academic Publishers.
- Gomez-Laguna, J., Hernandez, M., Creus, E., Echeita, A., Otal, J., Herrera-Leon, S., & Astorga, R. J. (2011). Prevalence and antimicrobial susceptibility of *Salmonella* infections in free-range pigs. *Vet J*, 190(1), 176–178. doi:10.1016/j.tvjl.2010.09.009
- Gonçalves Blanco, P. (2017). *Indicadores biológicos para la gestión del jabalí en ecosistemas mediterráneos*. Universidad de Extremadura,
- Gorski, L., Parker, C. T., Liang, A., Cooley, M. B., Jay-Russell, M. T., Gordus, A. G., . . . Mandrell, R. E. (2011). Prevalence, Distribution, and Diversity of

- Salmonella enterica in a Major Produce Region of California. *Applied and Environmental Microbiology*, 77(8), 2734-2748. doi:10.1128/AEM.02321-10
- Gortázar, C., Acevedo, P., Ruiz-Fons, F., & Vicente, J. (2006). Disease risks and overabundance of game species. *European Journal of Wildlife Research*, 52(2), 81-87. doi:10.1007/s10344-005-0022-2
- Gortázar, C., Ferroglio, E., Höfle, U., Frölich, K., & Vicente, J. (2007). Diseases shared between wildlife and livestock: a European perspective. *European Journal of Wildlife Research*, 53(4), 241-256. doi:10.1007/s10344-007-0098-y
- Gothwal, R., & Shashidhar, T. (2015). Antibiotic Pollution in the Environment: A Review. *CLEAN - Soil, Air, Water*, 43(4), 479-489. doi:10.1002/clen.201300989
- Gray, J., Stabel, T., & Fedorka-Cray, P. (1996). Effect of dose on the immune response and persistence of Salmonella choleraesuis infection in swine. *American Journal of Veterinary Research*, 57(3), 313-319.
- Gray, J. T., Fedorka-Cray, P. J., Stabel, T. J., & Ackermann, M. R. (1995). Influence of inoculation route on the carrier state of Salmonella choleraesuis in swine. *Vet Microbiol*, 47(1-2), 43-59. doi:http://dx.doi.org/10.1016/0378-1135(95)00060-N
- Gray, J. T., Fedorka-Cray, P. J., Stabel, T. J., & Kramer, T. T. (1996). Natural transmission of Salmonella choleraesuis in swine. *Applied and Environmental Microbiology*, 62(1), 141-146.
- Griffith, R. W., Carlson, S. A., & Krull, A. C. (2019). Salmonellosis. In *Diseases of Swine* (pp. 912-925).
- Griffith, R. W., Schwartz, K. J., & Meyerholz, D. K. (2006). Salmonella. In B. E. Straw, J. J. Zimmerman, S. D'Allaire, & D. Taylor (Eds.), *Diseases of swine* (9 th ed., pp. 739-754): Blackwell Publishing.
- Grimont, P. A. D., & Weill, F.-X. (2007). Antigenic Formulae Of The Salmonella Serovars. In *Book Antigenic Formulae of the Salmonella Serovars*. Institut Pasteur: WHO Collaborating Centre for Reference and Research on Salmonella.
- Gruger, T., Nitiss, J. L., Maxwell, A., Zechiedrich, E. L., Heisig, P., Seeber, S., . . . Strumberg, D. (2004). A mutation in Escherichia coli DNA gyrase conferring quinolone resistance results in sensitivity to drugs targeting eukaryotic topoisomerase II. *Antimicrob Agents Chemother*, 48(12), 4495-4504. doi:10.1128/AAC.48.12.4495-4504.2004
- Guenther, S., Falgenhauer, L., Semmler, T., Imirzalioglu, C., Chakraborty, T., Roesler, U., & Roschanski, N. (2017). Environmental emission of multiresistant Escherichia coli carrying the colistin resistance gene mcr-1 from German swine farms. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 72(5), 1289-1292.
- Guerra, B., Junker, E., & Helmuth, R. (2004). Incidence of the recently described sulfonamide resistance gene sul3 among German Salmonella enterica strains isolated from livestock and food. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 48(7), 2712-2715.
- Guerra, J. L. (2021, 10/07/2021). Una empresa regulará la sobrepoblación de jabalíes. *El Periódico Extremadura*, p. 1.
- Guijarro, G. P. (2011). *Resistencia a los antimicrobianos en cepas de salmonella entérica de origen animal*. Universidad de Extremadura,

- Gutierrez, A. (2020). Los accidentes de tráfico por jabalíes crecen un 47%. *Tráfico y Seguridad Vial*.
- Gutzmann, F., Layton, H., Simkins, K., & Jarolmen, H. (1976). Influence of antibiotic-supplemented feed on occurrence and persistence of *Salmonella typhimurium* in experimentally infected swine. *American Journal of Veterinary Research*, 37(6), 649-655.
- Gyles, C., & Boerlin, P. (2014). Horizontally transferred genetic elements and their role in pathogenesis of bacterial disease. *Vet Pathol*, 51(2), 328-340. doi:10.1177/0300985813511131
- 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(3-4), 255-268.
- Hall, R. M. (2010). *Salmonella* genomic islands and antibiotic resistance in *Salmonella enterica*. *Future Microbiol*, 5(10), 1525-1538. doi:10.2217/fmb.10.122
- Halli, O., Ala-Kurikka, E., Nokireki, T., Skrzypczak, T., Raunio-Saarnisto, M., Peltoniemi, O. A., & Heinonen, M. (2012). Prevalence of and risk factors associated with viral and bacterial pathogens in farmed European wild boar. *Vet J*, 194(1), 98-101. doi:10.1016/j.tvjl.2012.03.008
- Hassan, J., & Kassem, I. I. (2020). Audacious hitchhikers: the role of travel and the international food trade in the global dissemination of mobile colistin-resistance (*mcr*) genes. *Antibiotics*, 9(7), 370.
- Hassell, J. M., Ward, M. J., Muloi, D., Bettridge, J. M., Robinson, T. P., Kariuki, S., . . . Kang'ethe, E. K. (2019). Clinically relevant antimicrobial resistance at the wildlife–livestock–human interface in Nairobi: an epidemiological study. *The Lancet Planetary Health*, 3(6), e259-e269.
- Hayes, F. (2003). Toxins-antitoxins: plasmid maintenance, programmed cell death, and cell cycle arrest. *Science*, 301(5639), 1496-1499. doi:10.1126/science.1088157
- Hilbert, F., Smulders, F. J. M., Chopra-Dewasthaly, R., & Paulsen, P. (2012). *Salmonella* in the wildlife-human interface. *Food Research International*, 45(2), 603-608. doi:10.1016/j.foodres.2011.08.015
- Hodgkinson, S. M., Polanco, C., Aceiton, L., & Lopez, I. F. (2017). Pasture intake and grazing behaviour of growing European wild boar (*Sus scrofa*L.) and domestic pigs (*Sus scrofa domesticus*, Landrace×Large White) in a semi-extensive production system. *The Journal of Agricultural Science*, 155(10), 1659-1668. doi:10.1017/s002185961700065x
- Hopkins, K. L., Davies, R. H., & Threlfall, E. J. (2005). Mechanisms of quinolone resistance in *Escherichia coli* and *Salmonella*: recent developments. *International Journal of Antimicrobial Agents*, 25(5), 358-373.
- Howden, B. P., Peleg, A. Y., & Stinear, T. P. (2014). The evolution of vancomycin intermediate *Staphylococcus aureus* (VISA) and heterogenous-VISA. *Infect Genet Evol*, 21, 575-582. doi:10.1016/j.meegid.2013.03.047
- Huang, T. M., Lin, T., & Wu, C. (2009). Serovar distribution and antimicrobial susceptibility of swine *Salmonella* isolates from clinically ill pigs in diagnostic submissions from Indiana in the United States. *Letters in applied microbiology*, 48(3), 331-336.
- Hume, P. J., Singh, V., Davidson, A. C., & Koronakis, V. (2017). Swiss Army Pathogen: The *Salmonella* Entry Toolkit. *Front Cell Infect Microbiol*, 7, 348. doi:10.3389/fcimb.2017.00348

- Hurd, H. S., Gailey, J. K., McKean, J. D., & Rostagno, M. H. (2001). Experimental rapid infection in market swine following exposure to a Salmonella contaminated environment.
- Hurd, H. S., McKean, J. D., Griffith, R. W., Wesley, I. V., & Rostagno, M. H. (2002). Salmonella enterica infections in market swine with and without transport and holding. *Applied and Environmental Microbiology*, 68(5), 2376-2381.
- Hurd, H. S., McKEAN, J. D., Wesley, I. V., & Karriker, L. A. (2001). The effect of lairage on Salmonella isolation from market swine. *Journal of food protection*, 64(7), 939-944.
- Isaacson, R. E., Firkins, L. D., Weigel, R. M., Zuckermann, F. A., & DiPietro, J. A. (1999). Effect of transportation and feed withdrawal on shedding of Salmonella typhimurium among experimentally infected pigs. *American Journal of Veterinary Research*, 60(9), 1155-1158.
- Issenhuth-Jeanjean, S., Roggentin, P., Mikoleit, M., Guibourdenche, M., de Pinna, E., Nair, S., . . . Weill, F. X. (2014). Supplement 2008-2010 (no. 48) to the White-Kauffmann-Le Minor scheme. *Res Microbiol*, 165(7), 526-530. doi:10.1016/j.resmic.2014.07.004
- Jacks, T. M., Welter, C. J., Fitzgerald, G. R., & Miller, B. M. (1981). Cephamycin C treatment of induced swine salmonellosis. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 19(4), 562-566.
- Jajere, S. M. (2019). A review of Salmonella enterica with particular focus on the pathogenicity and virulence factors, host specificity and antimicrobial resistance including multidrug resistance. *Veterinary world*, 12(4), 504.
- Janeau, G., Dardaillon, M., & Spitz, F. (1988). Influence de la mortalité précoce des femelles sur l'organisation sociale du sanglier (*Sus scrofa*). *Cahiers d'Ethologie Appliquée*, 8, 429-436.
- Jepson, M. A., & Clark, M. A. (2001). The role of M cells in Salmonella infection. *Microbes Infect*, 3(14-15), 1183-1190. doi:10.1016/s1286-4579(01)01478-2
- Johann, F., Handschuh, M., Linderoth, P., Dormann, C. F., & Arnold, J. (2020). Adaptation of wild boar (*Sus scrofa*) activity in a human-dominated landscape. *BMC Ecol*, 20(1), 4. doi:10.1186/s12898-019-0271-7
- Johnsborg, O., Eldholm, V., & Havarstein, L. S. (2007). Natural genetic transformation: prevalence, mechanisms and function. *Res Microbiol*, 158(10), 767-778. doi:10.1016/j.resmic.2007.09.004
- Jones, K. E., Patel, N. G., Levy, M. A., Storeygard, A., Balk, D., Gittleman, J. L., & Daszak, P. (2008). Global trends in emerging infectious diseases. *Nature*, 451(7181), 990-993. doi:10.1038/nature06536
- Jones, P. H., Roe, J. M., & Miller, B. G. (2001). Effects of stressors on immune parameters and on the faecal shedding of enterotoxigenic *Escherichia coli* in piglets following experimental inoculation. *Res Vet Sci*, 70(1), 9-17. doi:10.1053/rvsc.2000.0436
- Juhas, M., Van Der Meer, J. R., Gaillard, M., Harding, R. M., Hood, D. W., & Crook, D. W. (2009). Genomic islands: tools of bacterial horizontal gene transfer and evolution. *FEMS Microbiology Reviews*, 33(2), 376-393.
- Kaba, M., Davoust, B., Marié, J.-L., & Colson, P. (2010). Detection of hepatitis E virus in wild boar (*Sus scrofa*) livers. *The Veterinary Journal*, 186(2), 259-261. doi:http://dx.doi.org/10.1016/j.tvjl.2009.08.008

- Kieffer, N., Aires-de-Sousa, M., Nordmann, P., & Poirel, L. (2017). High rate of MCR-1-producing *Escherichia coli* and *Klebsiella pneumoniae* among pigs, Portugal. *Emerg Infect Dis*, *23*(12), 2023.
- Kingsley, R. A., & Bäumlner, A. J. (2000). Host adaptation and the emergence of infectious disease: the *Salmonella* paradigm. *Molecular Microbiology*, *36*(5), 1006-1014.
- Klose, V., Bayer, K., Kern, C., Goelß, F., Fibi, S., & Wegl, G. (2014). Antibiotic resistances of intestinal lactobacilli isolated from wild boars. *Vet Microbiol*, *168*(1), 240-244. doi:http://dx.doi.org/10.1016/j.vetmic.2013.11.014
- Koch, G., Yepes, A., Forstner, K. U., Wermser, C., Stengel, S. T., Modamio, J., . . . Lopez, D. (2014). Evolution of resistance to a last-resort antibiotic in *Staphylococcus aureus* via bacterial competition. *Cell*, *158*(5), 1060-1071. doi:10.1016/j.cell.2014.06.046
- Koo, H.-J., & Woo, G.-J. (2011). Distribution and transferability of tetracycline resistance determinants in *Escherichia coli* isolated from meat and meat products. *International Journal of Food Microbiology*, *145*(2-3), 407-413. doi:10.1016/j.ijfoodmicro.2011.01.003
- Krauland, M. G., Marsh, J. W., Paterson, D. L., & Harrison, L. H. (2009). Integron-mediated multidrug resistance in a global collection of nontyphoidal *Salmonella enterica* isolates. *Emerg Infect Dis*, *15*(3), 388.
- Kreizinger, Z., Foster, J. T., Rónai, Z., Sulyok, K. M., Wehmann, E., Jánosi, S., & Gyuranecz, M. (2014). Genetic relatedness of *Brucella suis* biovar 2 isolates from hares, wild boars and domestic pigs. *Vet Microbiol*, *172*(3-4), 492-498. doi:http://dx.doi.org/10.1016/j.vetmic.2014.05.031
- La Tela, I., Peruzzy, M. F., D'Alessio, N., Di Nocera, F., Casalnuovo, F., Carullo, M. R., . . . Capuano, F. (2021). Serotyping and Evaluation of Antimicrobial Resistance of *Salmonella* Strains Detected in Wildlife and Natural Environments in Southern Italy. *Antibiotics (Basel)*, *10*(4). doi:10.3390/antibiotics10040353
- Laguna, E., Barasona, J. A., Vicente, J., Keuling, O., & Acevedo, P. (2021). Differences in wild boar spatial behaviour among land uses and management scenarios in Mediterranean ecosystems. *Sci Total Environ*, *796*, 148966. doi:10.1016/j.scitotenv.2021.148966
- Lamas, A., Fernandez-No, I., Miranda, J., Vázquez, B., Cepeda, A., & Franco, C. (2016). Prevalence, molecular characterization and antimicrobial resistance of *Salmonella* serovars isolated from northwestern Spanish broiler flocks (2011–2015). *Poultry science*, *95*(9), 2097-2105.
- Lamas, A., Miranda, J. M., Regal, P., Vazquez, B., Franco, C. M., & Cepeda, A. (2018). A comprehensive review of non-enterica subspecies of *Salmonella enterica*. *Microbiol Res*, *206*, 60-73. doi:10.1016/j.micres.2017.09.010
- Laponogov, I., Sohi, M. K., Veselkov, D. A., Pan, X. S., Sawhney, R., Thompson, A. W., . . . Sanderson, M. R. (2009). Structural insight into the quinolone-DNA cleavage complex of type IIA topoisomerases. *Nat Struct Mol Biol*, *16*(6), 667-669. doi:10.1038/nsmb.1604
- Lapuz, R. R. S. P., Umali, D. V., Suzuki, T., Shirota, K., & Katoh, H. (2012). Comparison of the prevalence of *Salmonella* infection in layer hens from commercial layer farms with high and low rodent densities. *Avian Diseases*, *56*(1), 29-34. doi:10.1637/9704-030711-Reg.1

- Larsson, D. G. J., & Flach, C. F. (2021). Antibiotic resistance in the environment. *Nat Rev Microbiol*. doi:10.1038/s41579-021-00649-x
- Lawson, G., & Dow, C. (1966). Porcine salmonellosis: a study of the field disease. *Journal of comparative pathology*, 76(4), 363-371.
- Le Minor, L., & Popoff, M. Y. (1987). Designation of *Salmonella enterica* sp. nov., nom. rev., as the Type and Only Species of the Genus *Salmonella*: Request for an Opinion. *International Journal of Systematic Bacteriology*, 37(4), 465-468.
- Lee, M.-F., Chen, Y.-H., & Peng, C.-F. (2009). Molecular characterisation of class 1 integrons in *Salmonella enterica* serovar Choleraesuis isolates from southern Taiwan. *International Journal of Antimicrobial Agents*, 33(3), 216-222.
- Leekitcharoenphon, P., Sørensen, G., Löfström, C., Battisti, A., Szabo, I., Wasyl, D., . . . Hendriksen, R. S. (2019). Cross-Border Transmission of *Salmonella Choleraesuis* var. Kunzendorf in European Pigs and Wild Boar: Infection, Genetics, and Evolution. *Front Microbiol*, 10(179). doi:10.3389/fmicb.2019.00179
- Leranoz, I., Castien, E. (1996). Evolución de la población de jabalí (*Sus scrofa*) en Navarra. *Miscellanea Zoologica*, 19, 133-139.
- Letellier, A., Messier, S., Pare, J., Menard, J., & Quessy, S. (1999). Distribution of *Salmonella* in swine herds in Quebec. *Vet Microbiol*, 67(4), 299-306.
- Levings, R. S., Lightfoot, D., Partridge, S. R., Hall, R. M., & Djordjevic, S. P. (2005). The genomic island SGI1, containing the multiple antibiotic resistance region of *Salmonella enterica* serovar Typhimurium DT104 or variants of it, is widely distributed in other *S. enterica* serovars. *Journal of Bacteriology*, 187(13), 4401-4409.
- Levy, D. D., Sharma, B., & Cebula, T. A. (2004). Single-nucleotide polymorphism mutation spectra and resistance to quinolones in *Salmonella enterica* serovar Enteritidis with a mutator phenotype. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 48(7), 2355-2363.
- Lima-Bittencourt, C. I., Cursino, L., Goncalves-Dornelas, H., Pontes, D. S., Nardi, R. M., Callisto, M., . . . Nascimento, A. M. (2007). Multiple antimicrobial resistance in Enterobacteriaceae isolates from pristine freshwater. *Genet Mol Res*, 6(3), 510-521.
- Lima, T., Domingues, S., & Da Silva, G. J. (2019). Plasmid-mediated colistin resistance in *Salmonella enterica*: a review. *Microorganisms*, 7(2), 55.
- Lindsey, R. L., Fedorka-Cray, P. J., Frye, J. G., & Meinersmann, R. J. (2009). Inc A/C plasmids are prevalent in multidrug-resistant *Salmonella enterica* isolates. *Applied and Environmental Microbiology*, 75(7), 1908-1915.
- Lipowski, A. (2003). European wild boar (*Sus scrofa* L.) as a reservoir of infectious diseases for domestic pigs. *Medycyna Weterynaryjna*, 59(10), 861-863.
- Liu, Y.-Y., Wang, Y., Walsh, T. R., Yi, L.-X., Zhang, R., Spencer, J., . . . Huang, X. (2016). Emergence of plasmid-mediated colistin resistance mechanism MCR-1 in animals and human beings in China: a microbiological and molecular biological study. *The Lancet infectious diseases*, 16(2), 161-168.
- Longo, A., Losasso, C., Vitulano, F., Mastroilli, E., Turchetto, S., Petrin, S., . . . Conedera, G. (2019). Insight into an outbreak of *Salmonella Choleraesuis* var. Kunzendorf in wild boars. *Vet Microbiol*, 238, 108423.
- Longo, A., Petrin, S., Mastroilli, E., Tiengo, A., Lettini, A. A., Barco, L., . . . Cibir, V. (2019). Characterizing *Salmonella enterica* serovar Choleraesuis, var. Kunzendorf: a comparative case study. *Frontiers in Veterinary Science*, 6, 316.

- Loynachan, A., & Harris, D. (2005). Dose determination for acute Salmonella infection in pigs. *Applied and Environmental Microbiology*, 71(5), 2753-2755.
- Luk-In, S., Chatsuwat, T., Pulsrikarn, C., Bangtrakulnonth, A., Rirerm, U., & Kulwichit, W. (2018). High prevalence of ceftriaxone resistance among invasive Salmonella enterica serotype Choleraesuis isolates in Thailand: The emergence and increase of CTX-M-55 in ciprofloxacin-resistant S. Choleraesuis isolates. *Int J Med Microbiol*, 308(4), 447-453. doi:10.1016/j.ijmm.2018.03.008
- Lunn, A. D., Fàbrega, A., Sánchez-Céspedes, J., & Vila, J. (2010). Prevalence of mechanisms decreasing quinolone-susceptibility among Salmonella spp. clinical isolates. *Int Microbiol*, 13(1), 15-20.
- Magnet, S., & Blanchard, J. S. (2005). Molecular insights into aminoglycoside action and resistance. *Chemical reviews*, 105(2), 477-498.
- Magnino, S., Frasnelli, M., Fabbi, M., Bianchi, A., Zanoni, M. G., Merialdi, G., . . . Gaffuri, A. (2011). The monitoring of selected zoonotic diseases of wildlife in Lombardy and Emilia-Romagna, northern Italy. In B. A. Paulsen P., Vodnansky M., Winkelmayr R. and Smulders F.J.M. (Ed.), *Game meat hygiene in focus: Microbiology, epidemiology, risk analysis and quality assurance* (pp. 223-244). Wageningen: Wageningen Academic Publishers.
- Mahillon, J., & Chandler, M. (1998). Insertion sequences. *Microbiol Mol Biol Rev*, 62(3), 725-774. doi:10.1128/MMBR.62.3.725-774.1998
- Mainar-Jaime, R. C., Andres, S., Vico, J. P., San Roman, B., Garrido, V., & Grillo, M. J. (2013). Sensitivity of the ISO 6579:2002/Amd 1:2007 standard method for detection of Salmonella spp. on mesenteric lymph nodes from slaughter pigs. *Journal of Clinical Microbiology*, 51(1), 89-94.
- Marín, M., & Gudiol, F. (2003). beta-Lactam antibiotics. *Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica*, 21(1), 42-55.
- Markey, B. K., Leonard, F. C., Archambault, M., Cullinane, A., & Maguire, D. (2013). Enterobacteriaceae. In B. K. Markley (Ed.), *Clinical Veterinary Microbiology* (pp. 239-274): ELSEVIER.
- Martínez-Martínez, L., Pascual, A., & Jacoby, G. A. (1998). Quinolone resistance from a transferable plasmid. *The Lancet*, 351(9105), 797-799.
- Martínez-Miro, S., Tecles, F., Ramon, M., Escribano, D., Hernández, F., Madrid, J., . . . Ceron, J. J. (2016). Causes, consequences and biomarkers of stress in swine: an update. *BMC Vet Res*, 12(1), 171. doi:10.1186/s12917-016-0791-8
- Martínez, J. L. (2014). General principles of antibiotic resistance in bacteria. *Drug Discov Today Technol*, 11, 33-39. doi:10.1016/j.ddtec.2014.02.001
- Martínez, J. L., & Baquero, F. (2000). Mutation frequencies and antibiotic resistance. *Antimicrob Agents Chemother*, 44(7), 1771-1777. doi:10.1128/AAC.44.7.1771-1777.2000
- Martins, R. P., Collado-Romero, M., Arce, C., Lucena, C., Carvajal, A., & Garrido, J. J. (2013). Exploring the immune response of porcine mesenteric lymph nodes to Salmonella enterica serovar Typhimurium: an analysis of transcriptional changes, morphological alterations and pathogen burden. *Comp Immunol Microbiol Infect Dis*, 36(2), 149-160. doi:10.1016/j.cimid.2012.11.003
- Martins, R. P., Collado-Romero, M., Martínez-Gomáriz, M., Carvajal, A., Gil, C., Lucena, C., . . . Garrido, J. J. (2012). Proteomic analysis of porcine mesenteric lymph-nodes after Salmonella typhimurium infection. *Journal of Proteomics*, 75(14), 4457-4470.

- Mascaretti, O. A. (2003). *Bacteria versus antibacterial agents: an integrated approach*: American Society for Microbiology (ASM).
- Massei, G., Kindberg, J., Licoppe, A., Gacic, D., Sprem, N., Kamler, J., . . . Nahlik, A. (2015). Wild boar populations up, numbers of hunters down? A review of trends and implications for Europe. *Pest Manag Sci*, *71*(4), 492-500. doi:10.1002/ps.3965
- Mastroeni, P., Grant, A., Restif, O., & Maskell, D. (2009). A dynamic view of the spread and intracellular distribution of *Salmonella enterica*. *Nat Rev Microbiol*, *7*(1), 73-80. doi:10.1038/nrmicro2034
- McManus, M. C. (1997). Mechanisms of bacterial resistance to antimicrobial agents. *Am J Health Syst Pharm*, *54*(12), 1420-1433; quiz 1444-1426. doi:10.1093/ajhp/54.12.1420
- McManus, P. S., Stockwell, V. O., Sundin, G. W., & Jones, A. L. (2002). Antibiotic use in plant agriculture. *Annu Rev Phytopathol*, *40*, 443-465. doi:10.1146/annurev.phyto.40.120301.093927
- McMillan, E. A., Jackson, C. R., & Frye, J. G. (2020). Transferable Plasmids of *Salmonella enterica* Associated With Antibiotic Resistance Genes. *Front Microbiol*, *11*, 562181. doi:10.3389/fmicb.2020.562181
- Mejia, W., Casal, J., Zapata, D., Sanchez, G. J., Martin, M., & Mateu, E. (2006). Epidemiology of salmonella infections in pig units and antimicrobial susceptibility profiles of the strains of *Salmonella* species isolated. *Vet Rec*, *159*(9), 271-276. doi:10.1136/vr.159.9.271
- Meneguzzi, M., Pissetti, C., Rebelatto, R., Trachsel, J., Kuchiishi, S. S., Reis, A. T., . . . Kich, J. D. (2021). Re-Emergence of Salmonellosis in Hog Farms: Outbreak and Bacteriological Characterization. *Microorganisms*, *9*(5). doi:10.3390/microorganisms9050947
- Meng, X., Lindsay, D., & Sriranganathan, N. (2009). Wild boars as sources for infectious diseases in livestock and humans. *Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences*, *364*(1530), 2697-2707.
- Mentaberre, G., Porrero, M. C., Navarro-Gonzalez, N., Serrano, E., Dominguez, L., & Lavin, S. (2013). Cattle drive *Salmonella* infection in the wildlife-livestock interface. *Zoonoses Public Health*, *60*(7), 510-518. doi:10.1111/zph.12028
- Methner, U., Heller, M., & Bocklisch, H. (2010). *Salmonella enterica* subspecies *enterica* serovar *Choleraesuis* in a wild boar population in Germany. *European Journal of Wildlife Research*, *56*, 493-502.
- Methner, U., Merbach, S., & Peters, M. (2018). *Salmonella enterica* subspecies *enterica* serovar *Choleraesuis* in a German wild boar population: occurrence and characterisation. *Acta Vet Scand*, *60*(1), 65. doi:10.1186/s13028-018-0422-4
- Millan, J., Aduriz, G., Moreno, B., Juste, R. A., & Barral, M. (2004). *Salmonella* isolates from wild birds and mammals in the Basque Country (Spain). *Rev Sci Tech*, *23*(3), 905-911.
- Mirceta, J., Petrovic, J., Malesevic, M., Blagojevic, B., & Antic, D. (2017). Assessment of microbial carcass contamination of hunted wild boars. *European Journal of Wildlife Research*, *63*(2). doi:10.1007/s10344-017-1096-3
- MITERD. (2019). *Anuario de Estadística Forestal*. Retrieved from Madrid:
- Montagnaro, S., Sasso, S., De Martino, L., Longo, M., Lovane, V., Ghurmino, G., . . . Pagninl, U. (2010). Prevalence of antibodies to selected viral and bacterial pathogens in wild boar (*Sus scrofa*) in Campania Region, Italy. *J Wildl Dis*, *46*(1), 316-319.

- Morgan, K. N., & Tromborg, C. T. (2007). Sources of stress in captivity. *Applied Animal Behaviour Science*, *102*(3-4), 262-302. doi:10.1016/j.applanim.2006.05.032
- Morrow-Tesch, J. L., McGlone, J. J., & Salak-Johnson, J. L. (1994). Heat and social stress effects on pig immune measures. *J Anim Sci*, *72*(10), 2599-2609.
- Morshed, R., & Peighambari, S. M. (2010). Drug resistance, plasmid profile and random amplified polymorphic DNA analysis of Iranian isolates of *Salmonella enteritidis*. *New Microbiol*, *33*(1), 47-56.
- Muehlenbein, M. P. (2016). Disease and Human/Animal Interactions. *Annual Review of Anthropology*, *45*(1), 395-416. doi:10.1146/annurev-anthro-102215-100003
- Murray, C. J. (2000). Environmental aspects of *Salmonella*. In C. W. A. Wray (Ed.), *Salmonella in Domestic Animals*. (pp. 265-284). Wallingford, Oxford: CAB International.
- Murray, M. H., Becker, D. J., Hall, R. J., & Hernandez, S. M. (2016). Wildlife health and supplemental feeding: A review and management recommendations. *Biological Conservation*, *204*(Part B), 163-174. doi:https://doi.org/10.1016/j.biocon.2016.10.034
- Navarro-Gonzalez, N., Casas-Díaz, E., Porrero, C. M., Mateos, A., Domínguez, L., Lavín, S., & Serrano, E. (2013). Food-borne zoonotic pathogens and antimicrobial resistance of indicator bacteria in urban wild boars in Barcelona, Spain. *Vet Microbiol*, *167*(3-4), 686-689. doi:http://dx.doi.org/10.1016/j.vetmic.2013.07.037
- Navarro-Gonzalez, N., Castillo-Contreras, R., Casas-Díaz, E., Morellet, N., Porrero, M. C., Molina-Vacas, G., . . . Domínguez, L. (2018). Carriage of antibiotic-resistant bacteria in urban versus rural wild boars. *European Journal of Wildlife Research*, *64*(5), 60.
- Navarro-Gonzalez, N., Fernandez-Llario, P., Perez-Martin, J. E., Mentaberre, G., Lopez-Martin, J. M., Lavin, S., & Serrano, E. (2013). Supplemental feeding drives endoparasite infection in wild boar in Western Spain. *Veterinary Parasitology*, *196*(1), 114-123. doi:10.1016/j.vetpar.2013.02.019
- Navarro-Gonzalez, N., Mentaberre, G., Porrero, C. M., Serrano, E., Mateos, A., Lopez-Martin, J. M., . . . Dominguez, L. (2012). Effect of cattle on *Salmonella* carriage, diversity and antimicrobial resistance in free-ranging wild boar (*Sus scrofa*) in northeastern Spain. *PLoS One*, *7*(12), e51614. doi:10.1371/journal.pone.0051614
- Nguyen, F., Starosta, A. L., Arenz, S., Sohmen, D., Dönhöfer, A., & Wilson, D. N. (2014). Tetracycline antibiotics and resistance mechanisms. *Biological chemistry*, *395*(5), 559-575.
- Nguyen Thi, H., Pham, T. T., Turchi, B., Fratini, F., Ebani, V. V., Cerri, D., & Bertelloni, F. (2020). Characterization of *Salmonella* spp. Isolates from Swine: Virulence and Antimicrobial Resistance. *Animals (Basel)*, *10*(12). doi:10.3390/ani10122418
- O'Regan, E., Quinn, T., Frye, J. G., Pagès, J.-M., Porwollik, S., Fedorka-Cray, P. J., . . . Fanning, S. (2010). Fitness costs and stability of a high-level ciprofloxacin resistance phenotype in *Salmonella enterica* serotype enteritidis: reduced infectivity associated with decreased expression of *Salmonella* pathogenicity island 1 genes. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, *54*(1), 367-374.
- Ochman, H., Lawrence, J. G., & Groisman, E. A. (2000). Lateral gene transfer and the nature of bacterial innovation. *Nature*, *405*(6784), 299-304. doi:10.1038/35012500

- OECD, & WHO. (2020). *Challenges to Tackling Antimicrobial Resistance*.
- Okubo, T., Yossapol, M., Maruyama, F., Wampande, E. M., Kakooza, S., Ohya, K., . . . Ushida, K. (2019). Phenotypic and genotypic analyses of antimicrobial resistant bacteria in livestock in Uganda. *Transbound Emerg Dis*, 66(1), 317-326. doi:doi:10.1111/tbed.13024
- Olaitan, A. O., Morand, S., & Rolain, J.-M. (2014). Mechanisms of polymyxin resistance: acquired and intrinsic resistance in bacteria. *Front Microbiol*, 5, 643.
- Ortega, N., Fanelli, A., Serrano, A., Martínez-Carrasco, C., Escribano, F., Tizzani, P., & Candela, M. G. (2020). Salmonella seroprevalence in wild boar from Southeast Spain depends on host population density. *Res Vet Sci*, 132, 400-403. doi:10.1016/j.rvsc.2020.07.026
- Palomo, G., Campos, M. J., Ugarte, M., Porrero, M. C., Alonso, J. M., Borge, C., . . . Píriz, S. (2013). Dissemination of antimicrobial-resistant clones of Salmonella enterica among domestic animals, wild animals, and humans. *Foodborne Pathog Dis*, 10(2), 171-176.
- Palomo Guijarro, G. (2011). *Resistencia a los antimicrobianos en cepas de Salmonella enterica de origen animal*. (PhD). Universidad de Extremadura,
- Papic, B., Kusar, D., Micunovic, J., Vidrih, S., Pirs, M., Ocepek, M., & Avbersek, J. (2021). Genomic insights into Salmonella Choleraesuis var. Kunzendorf outbreak reveal possible interspecies transmission. *Vet Microbiol*, 263, 109282. doi:10.1016/j.vetmic.2021.109282
- Parisi, A., Crump, J. A., Glass, K., Howden, B. P., Furuya-Kanamori, L., Vilkins, S., . . . Kirk, M. D. (2018). Health Outcomes from Multidrug-Resistant Salmonella Infections in High-Income Countries: A Systematic Review and Meta-Analysis. *Foodborne Pathog Dis*, 15(7), 428-436. doi:10.1089/fpd.2017.2403
- Parry, C. M., Thuy, C. T., Dongol, S., Karkey, A., Vinh, H., Chinh, N. T., . . . Hoang, N. V. M. (2010). Suitable disk antimicrobial susceptibility breakpoints defining Salmonella enterica serovar Typhi isolates with reduced susceptibility to fluoroquinolones. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 54(12), 5201-5208.
- Pastor-Sánchez, R. (2006). Ecological niche altering: bacterial resistance to antibiotics. *Gaceta sanitaria*, 20, 175-181.
- Paterson, D. L., & Bonomo, R. A. (2005). Extended-spectrum β -lactamases: a clinical update. *Clin Microbiol Rev*, 18(4), 657-686.
- Patterson, J. E. (2003). *Extended-spectrum beta-lactamases*. Paper presented at the Seminars in respiratory and critical care medicine.
- Paulsen, P., Smulders, F. J. M., & Hilbert, F. (2012). Salmonella in meat from hunted game: A Central European perspective. *Food Research International*, 45(2), 609-616. doi:https://doi.org/10.1016/j.foodres.2011.06.055
- Pedersen, K., Sorensen, G., Lofstrom, C., Leekitcharoenphon, P., Nielsen, B., Wingstrand, A., . . . Baggesen, D. L. (2015). Reappearance of Salmonella serovar Choleraesuis var. Kunzendorf in Danish pig herds. *Vet Microbiol*, 176(3-4), 282-291. doi:10.1016/j.vetmic.2015.01.004
- Pennisi, E. (2007). Evolution. Jumping genes hop into the evolutionary limelight. *Science*, 317(5840), 894-895. doi:10.1126/science.317.5840.894
- Perea, R. (2014). El papel de la caza mayor en la gestión y conservación de los hábitats. *Ambienta: La revista del Ministerio de Medio Ambiente*, 108.

- Perea, R., Girardello, M., & San Miguel, A. (2014). Big game or big loss? High deer densities are threatening woody plant diversity and vegetation dynamics. *Biodiversity and Conservation*, 23(5), 1303-1318.
- Perez, J., Astorga, R., Carrasco, L., Mendez, A., Perea, A., & Sierra, M. (1999). Outbreak of salmonellosis in farmed European wild boars (*Sus scrofa ferus*). *Veterinary Record*, 145(16), 464-465.
- Pinkney, M., Diaz, R., Lanka, E., & Thomas, C. M. (1988). Replication of mini RK2 plasmid in extracts of *Escherichia coli* requires plasmid-encoded protein TrfA and host-encoded proteins DnaA, B, G DNA gyrase and DNA polymerase III. *J Mol Biol*, 203(4), 927-938. doi:10.1016/0022-2836(88)90118-0
- Pinto, L., Poeta, P., Vieira, S., Caleja, C., Radhouani, H., Carvalho, C., . . . Igrejas, G. (2010). Genomic and proteomic evaluation of antibiotic resistance in *Salmonella* strains. *Journal of Proteomics*, 73(8), 1535-1541. doi:10.1016/j.jprot.2010.03.009
- Piras, F., Spanu, V., Siddi, G., Gymoese, P., Spanu, C., Cibin, V., . . . Scarano, C. (2021). Whole-genome sequencing analysis of highly prevalent *Salmonella* serovars in wild boars from a national park in Sardinia. *Food Control*, 130, 108247. doi:10.1016/j.foodcont.2021.108247
- Plackett, B. (2020). Why big pharma has abandoned antibiotics. *Nature*, 586(7830), S50-S52. doi:10.1038/d41586-020-02884-3
- Plaza-Rodriguez, C., Alt, K., Grobbel, M., Hammerl, J. A., Irrgang, A., Szabo, I., . . . Tenhagen, B. A. (2020). Wildlife as Sentinels of Antimicrobial Resistance in Germany? *Front Vet Sci*, 7, 627821. doi:10.3389/fvets.2020.627821
- Poeta, P., Costa, D., Igrejas, G., Rodrigues, J., & Torres, C. (2007). Phenotypic and genotypic characterization of antimicrobial resistance in faecal enterococci from wild boars (*Sus scrofa*). *Vet Microbiol*, 125(3-4), 368-374. doi:http://dx.doi.org/10.1016/j.vetmic.2007.06.003
- Poeta, P., Radhouani, H., Pinto, L., Martinho, A., Rego, V., Rodrigues, R., . . . Torres, C. (2009). Wild boars as reservoirs of extended-spectrum beta-lactamase (ESBL) producing *Escherichia coli* of different phylogenetic groups. *Journal of basic microbiology*, 49(6), 584-588.
- Poirel, L., Jayol, A., & Nordmann, P. (2017). Polymyxins: antibacterial activity, susceptibility testing, and resistance mechanisms encoded by plasmids or chromosomes. *Clin Microbiol Rev*, 30(2), 557-596.
- Popoff, M., & Le Minor, L. (2001). Antigenic formulas of the *Salmonella* serovars, WHO Collaborating Centre for Reference and Research on *Salmonella*. *World Health Organ*.
- Popoff, M., & Le Minor, L. (2005). *Salmonella*. In D. J. Brenner, Kreig, N.R. and Staley, J.T. (Ed.), *Bergey's manual of systematic bacteriology* (Vol. 2, pp. 764-799). New York, NY: Springer Science-Business Media.
- Pui, C., Wong, W., Chai, L., Tunung, R., Jeyaletchumi, P., Hidayah, N., . . . Son, R. (2011). *Salmonella*: A foodborne pathogen. *International Food Research Journal*, 18(2).
- Pullinger, G. D., Carnell, S. C., Sharaff, F. F., van Diemen, P. M., Dziva, F., Morgan, E., . . . Stevens, M. P. (2010). Norepinephrine augments *Salmonella enterica*-induced enteritis in a manner associated with increased net replication but independent of the putative adrenergic sensor kinases QseC and QseE. *Infect Immun*, 78(1), 372-380. doi:10.1128/IAI.01203-09

- Quesada, A., Ugarte-Ruiz, M., Iglesias, M. R., Porrero, M. C., Martínez, R., Florez-Cuadrado, D., . . . Dominguez, L. (2016). Detection of plasmid mediated colistin resistance (MCR-1) in *Escherichia coli* and *Salmonella enterica* isolated from poultry and swine in Spain. *Res Vet Sci*, *105*, 134-135. doi:10.1016/j.rvsc.2016.02.003
- Quinn, T., O'Mahony, R., Baird, A. W., Drudy, D., Whyte, P., & Fanning, S. (2006). Multi-drug resistance in *Salmonella enterica*: efflux mechanisms and their relationships with the development of chromosomal resistance gene clusters. *Curr Drug Targets*, *7*(7), 849-860. doi:10.2174/138945006777709548
- Rabello, R. F., Bonelli, R. R., Penna, B. A., Albuquerque, J. P., Souza, R. M., & Cerqueira, A. M. (2020). Antimicrobial Resistance in Farm Animals in Brazil: An Update Overview. *Animals*, *10*(4), 552.
- Rad, M., Kooshan, M., & Mesgarani, H. (2012). Quinolone resistance among *Salmonella enterica* and *Escherichia coli* of animal origin. *Comparative Clinical Pathology*, *21*(2), 161-165.
- Radhouani, H., Silva, N., Poeta, P., Torres, C., Correia, S., & Igrejas, G. (2014). Potential impact of antimicrobial resistance in wildlife, environment and human health. *Front Microbiol*, *5*, 23.
- Rahmani, M., Peighambari, S. M., Svendsen, C. A., Cavaco, L. M., Agersø, Y., & Hendriksen, R. S. (2013). Molecular clonality and antimicrobial resistance in *Salmonella enterica* serovars Enteritidis and Infantis from broilers in three Northern regions of Iran. *BMC Vet Res*, *9*(1), 66.
- Ranucci, D., Roila, R., Onofri, A., Cambiotti, F., Primavilla, S., Miraglia, D., . . . Branciarri, R. (2021). Improving Hunted Wild Boar Carcass Hygiene: Roles of Different Factors Involved in the Harvest Phase. *Foods*, *10*(7). doi:10.3390/foods10071548
- Razzuoli, E., Listorti, V., Martini, I., Migone, L., Decastelli, L., Mignone, W., . . . Serracca, L. (2021). Prevalence and Antimicrobial Resistances of *Salmonella* spp. Isolated from Wild Boars in Liguria Region, Italy. *Pathogens*, *10*(5), 568.
- Recchia, G. D., & Hall, R. M. (1995). Gene cassettes: a new class of mobile element. *Microbiology*, *141*(12), 3015-3027.
- Reid, C. A., Henderson, K., & Hillman, K. (1996). Fermentation of native and processed starches by the porcine caecal anaerobe *Clostridium butyricum*. *Journal of Applied Microbiology*(68), 191-198.
- Rhouma, M., Beaudry, F., Thériault, W., & Letellier, A. (2016). Colistin in Pig Production: Chemistry, Mechanism of Antibacterial Action, Microbial Resistance Emergence, and One Health Perspectives. *Front Microbiol*, *7*(1789). doi:10.3389/fmicb.2016.01789
- Risco, D., Fernandez-Llario, P., Cuesta, J. M., Garcia-Jimenez, W. L., Gil, M., Goncalves, P., . . . Hermoso de Mendoza, J. H. (2013). Fatal outbreak of systemic pasteurellosis in a wild boar (*Sus scrofa*) population from southwest Spain. *J Vet Diagn Invest*, *25*(6), 791-794. doi:10.1177/1040638713504411
- Risco, D., Fernandez-Llario, P., Velarde, R., Cuesta, J. M., Garcia, W. L., Goncalves, P., . . . Hermoso de Mendoza, J. H. (2013). A case of exudative epidermitis in a young wild boar from a Spanish game estate. *Journal of Swine Health and Production*, *21*(6), 4.
- Risco, D., Fernandez-Llario, P., Velarde, R., Garcia, W. L., Benitez, J. M., Garcia, A., . . . Gomez, L. (2011). Outbreak of swine erysipelas in a semi-intensive wild

- boar farm in Spain. *Transbound Emerg Dis*, 58(5), 445-450. doi:10.1111/j.1865-1682.2011.01234.x
- Risco, D., Fernández-Llario, P., García-Jiménez, W., Gonçalves, P., Cuesta, J., Martínez, R., . . . Carranza, J. (2013). Influence of porcine circovirus type 2 infections on bovine tuberculosis in wild boar populations. *Transbound Emerg Dis*, 60(s1), 121-127.
- Risco, D., Serrano, E., Fernandez-Llario, P., Cuesta, J. M., Goncalves, P., Garcia-Jimenez, W. L., . . . Hermoso de Mendoza, J. (2014). Severity of bovine tuberculosis is associated with co-infection with common pathogens in wild boar. *PLoS One*, 9(10), e110123. doi:10.1371/journal.pone.0110123
- Rivero, M. J., Rodriguez-Estevez, V., Pietrosemoli, S., Carballo, C., Cooke, A. S., & Kongsted, A. G. (2019). Forage Consumption and Its Effects on the Performance of Growing Swine-Discussed in Relation to European Wild Boar (*Sus scrofa* L.) in Semi-Extensive Systems: A Review. *Animals (Basel)*, 9(7). doi:10.3390/ani9070457
- Roberts, M. C., & Schwarz, S. (2009). Tetracycline and Chloramphenicol Resistance Mechanisms. In D. L. Mayers (Ed.), *Antimicrobial Drug Resistance. Mechanisms of Drug Resistance* (Vol. Volume 1, pp. 183-194). New York: Humana Press.
- Robicsek, A., Strahilevitz, J., Jacoby, G. A., Macielag, M., Abbanat, D., Park, C. H., . . . Hooper, D. C. (2006). Fluoroquinolone-modifying enzyme: a new adaptation of a common aminoglycoside acetyltransferase. *Nature medicine*, 12(1), 83-88.
- Rosell, C., Fernández-Llario, P. Herrero, J. (2001). El jabalí (*Sus scrofa* LINNAEUS, 1758). *Galemys*, 13(2), 1-25.
- Rowe-Magnus, D. A., & Mazel, D. (2002). The role of integrons in antibiotic resistance gene capture. *International Journal of Medical Microbiology*, 292(2), 115-125.
- Roy, P. H., & Partridge, S. R. (2017). Genetic Mechanisms of Transfer of Drug Resistance. In *Antimicrobial Drug Resistance* (pp. 61-76).
- Ruiz-Fons, F., Vicente, J., Vidal, D., Hofle, U., Villanua, D., Gauss, C., . . . Gortazar, C. (2006). Seroprevalence of six reproductive pathogens in European wild boar (*Sus scrofa*) from Spain: the effect on wild boar female reproductive performance. *Theriogenology*, 65(4), 731-743. doi:10.1016/j.theriogenology.2005.07.001
- Ryan, M. P., O'Dwyer, J., & Adley, C. C. (2017). Evaluation of the Complex Nomenclature of the Clinically and Veterinary Significant Pathogen Salmonella. *Biomed Res Int*, 2017, 3782182. doi:10.1155/2017/3782182
- Sales, J., & Kotrba, R. (2013). Meat from wild boar (*Sus scrofa* L.): a review. *Meat Sci*, 94(2), 187-201. doi:10.1016/j.meatsci.2013.01.012
- Salles, M., & Middleton, D. (2000). Lymphocyte subsets in porcine tonsillar crypt epithelium. *Vet Immunol Immunopathol*, 77(1-2), 133-144.
- Sánchez-Rodríguez, J. A., Navas, L., Vinuesa, F. M., Castells, C., Martínez, M. A., López, A., . . . Cabrera-Vique, C. (2018). New insights on the risk factors associated with the presence of Salmonella on pig carcasses. Lessons from small slaughterhouses. *Food Control*, 87, 46-52. doi:https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2017.12.016
- Sandrini, S. M., Shergill, R., Woodward, J., Muralikuttan, R., Haigh, R. D., Lyte, M., & Freestone, P. P. (2010). Elucidation of the mechanism by which catecholamine stress hormones liberate iron from the innate immune defense

- proteins transferrin and lactoferrin. *Journal of bacteriology*, 192(2), 587-594. doi:10.1128/JB.01028-09
- Sanno, A., Aspan, A., Hestvik, G., & Jacobson, M. (2014). Presence of Salmonella spp., Yersinia enterocolitica, Yersinia pseudotuberculosis and Escherichia coli O157:H7 in wild boars. *Epidemiol Infect*, 142(12), 2542-2547. doi:10.1017/S0950268814000119
- Sannö, A., Rosendal, T., Aspán, A., Backhans, A., & Jacobson, M. (2018). Distribution of enteropathogenic Yersinia spp. and Salmonella spp. in the Swedish wild boar population, and assessment of risk factors that may affect their prevalence. *Acta Vet Scand*, 60(1), 40. doi:10.1186/s13028-018-0395-3
- Santos, C. A. d., Cunha, M. P. V., Bertani, A. M. d. J., de Almeida, E. A., Gonçalves, C. R., Sacchi, C. T., . . . Tiba-Casas, M. R. (2020). Detection of multidrug-and colistin-resistant Salmonella Choleraesuis causing bloodstream infection. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*.
- Sarasa, M., Sarasa, Juan-Antonio. (2013). Intensive monitoring suggests population oscillations and migration in wild boar Sus scrofa in the Pyrenees. *Animal Biodiversity and Conservation*, 36(1), 79-88.
- Savic, B., Zdravkovic, N., Radanovic, O., Jezdimirovic, N., Kureljusic, B., & Stevancevic, O. (2021). A Salmonella enterica subspecies enterica serovar Choleraesuis outbreak in weaned piglets in Serbia: clinical signs, pathologic changes, and microbiologic features. *J Vet Diagn Invest*, 33(5), 993-996. doi:10.1177/10406387211025507
- Schley, L., & Roper, T. J. (2003). Diet of wild boar Sus scrofa in Western Europe, with particular reference to consumption of agricultural crops. 33(1), 43-56. doi:https://doi.org/10.1046/j.1365-2907.2003.00010.x
- Schwartz, K. J. (1991). Salmonellosis in swine. *Compend Contin Educ Pract Vet*, 13, 139-146.
- Schwartz, K. J. (1999). Salmonellosis. In Straw BE, Mengeling WL, Taylor DJ, & S. D'Allaire (Eds.), *Diseases of Swine* (8th ed., pp. 534-551). Ames, Iowa: Blackwell Publishing.
- Schwarz, S., Kehrenberg, C., Doublet, B., & Cloeckert, A. (2004). Molecular basis of bacterial resistance to chloramphenicol and florfenicol. *FEMS Microbiology Reviews*, 28(5), 519-542.
- Sekizuka, T., Yamamoto, A., Komiya, T., Kenri, T., Takeuchi, F., Shibayama, K., . . . Iwaki, M. (2012). Corynebacterium ulcerans 0102 carries the gene encoding diphtheria toxin on a prophage different from the C. diphtheriae NCTC 13129 prophage. *BMC Microbiology*, 12(1), 72. doi:10.1186/1471-2180-12-72
- Sharma-Kuinkel, B. K., Rude, T. H., & Fowler, V. G., Jr. (2016). Pulse Field Gel Electrophoresis. *Methods Mol Biol*, 1373, 117-130. doi:10.1007/7651_2014_191
- Shiner, E. K., Rumbaugh, K. P., & Williams, S. C. (2005). Inter-kingdom signaling: deciphering the language of acyl homoserine lactones. *FEMS Microbiol Rev*, 29(5), 935-947. doi:10.1016/j.femsre.2005.03.001
- Silvi, S., Rumney, C. J., Cresci, A., & Rowland, I. R. (1999). Resistant starch modifies gut microflora and microbial metabolism in human flora-associated rats inoculated with faeces from Italian and UK donors. *Journal of Applied Microbiology*, 86(3), 521-530.

- Simpson, K. M., Hill-Cawthorne, G. A., Ward, M. P., & Mor, S. M. (2018). Diversity of Salmonella serotypes from humans, food, domestic animals and wildlife in New South Wales, Australia. *BMC infectious diseases*, *18*(1), 1-11.
- Sin, M., Yoon, S., Kim, Y., Noh, E., Seo, K., & Lee, Y. (2020). Molecular characteristics of antimicrobial resistance determinants and integrons in Salmonella isolated from chicken meat in Korea. *Journal of Applied Poultry Research*, *29*(2), 502-514.
- Smillie, C., Garcillan-Barcia, M. P., Francia, M. V., Rocha, E. P., & de la Cruz, F. (2010). Mobility of plasmids. *Microbiol Mol Biol Rev*, *74*(3), 434-452. doi:10.1128/MMBR.00020-10
- Smith, H. W., & Jones, J. E. (1967). Observations on experimental oral infection with Salmonella dublin in calves and Salmonella choleraesuis in pigs. *The Journal of pathology and bacteriology*, *93*(1), 141-156. doi:10.1002/path.1700930114
- Sommer, M. O., Munck, C., Toft-Kehler, R. V., & Andersson, D. I. (2017). Prediction of antibiotic resistance: time for a new preclinical paradigm? *Nature Reviews Microbiology*, *15*(11), 689-696.
- Song, J. S., Jeon, J. H., Lee, J. H., Jeong, S. H., Jeong, B. C., Kim, S. J., . . . Lee, S. H. (2005). Molecular characterization of TEM-type beta-lactamases identified in cold-seep sediments of Edison Seamount (south of Lihir Island, Papua New Guinea). *J Microbiol*, *43*(2), 172-178.
- Srikumar, S., Kroger, C., Hebrard, M., Colgan, A., Owen, S. V., Sivasankaran, S. K., . . . Hinton, J. C. (2015). RNA-seq Brings New Insights to the Intra-Macrophage Transcriptome of Salmonella Typhimurium. *PLoS Pathog*, *11*(11), e1005262. doi:10.1371/journal.ppat.1005262
- Stella, S., Tirloni, E., Castelli, E., Colombo, F., & Bernardi, C. (2018). Microbiological Evaluation of Carcasses of Wild Boar Hunted in a Hill Area of Northern Italy. *J Food Prot*, *81*(9), 1519-1525. doi:10.4315/0362-028X.JFP-18-077
- Stevens, M. P. (2010). Modulation of the interaction of enteric bacteria with intestinal mucosa by stress-related catecholamines. In M. Lyte & P. P. Freestone (Eds.), *Microbial endocrinology* (pp. 111-134). London.
- Stevens, M. P., & Gray, J. T. (2013). Salmonella Infections in Pigs. In P. A. Barrow & U. Methner (Eds.), *Salmonella in domestic animals* (pp. 263-294). Wallingford, UK: CABI.
- Suárez, C., & Gudiol, F. (2009). Antibióticos betalactámicos. *Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica*, *27*(2), 116-129.
- Sunde, M., & Norström, M. (2005). The genetic background for streptomycin resistance in Escherichia coli influences the distribution of MICs. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, *56*(1), 87-90.
- Sundin, G., & Bender, C. (1996). Dissemination of the strA-strB streptomycin-resistance genes among commensal and pathogenic bacteria from humans, animals, and plants. *Molecular ecology*, *5*(1), 133-143.
- Swanenburg, M., Van der Wolf, P., Urlings, H., Snijders, J., & Van Knapen, F. (2001). Salmonella in slaughter pigs: the effect of logistic slaughter procedures of pigs on the prevalence of Salmonella in pork. *International Journal of Food Microbiology*, *70*(3), 231-242.
- Swift, B. M., Bennett, M., Waller, K., Dodd, C., Murray, A., Gomes, R. L., . . . Whitlock, S. E. (2019). Anthropogenic environmental drivers of antimicrobial resistance in wildlife. *Science of the Total Environment*, *649*, 12-20.

- Sykes, R., & Matthew, M. (1976). The β -lactamases of gram-negative bacteria and their role in resistance to β -lactam antibiotics. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 2(2), 115-157.
- Tack, J. (2018). Wild Boar (*Sus scrofa*) populations in Europe: a scientific review of population trends and implications for management. *European Landowners' Organization, Brussels*, 56.
- Tawyabur, M., Islam, M. S., Sobur, M. A., Hossain, M. J., Mahmud, M. M., Paul, S., . . . Rahman, M. T. (2020). Isolation and Characterization of Multidrug-Resistant *Escherichia coli* and *Salmonella* spp. from Healthy and Diseased Turkeys. *Antibiotics (Basel)*, 9(11). doi:10.3390/antibiotics9110770
- Teng, K. T.-y., Martínez Avilés, M., Ugarte-Ruiz, M., Barcena, C., de la Torre, A., Lopez, G., . . . Alvarez, J. (2020). Spatial Trends in *Salmonella* Infection in Pigs in Spain. *Frontiers in Veterinary Science*, 7(345). doi:10.3389/fvets.2020.00345
- Tenover, F. C. (2006). Mechanisms of antimicrobial resistance in bacteria. *Am J Med*, 119(6 Suppl 1), S3-10; discussion S62-70. doi:10.1016/j.amjmed.2006.03.011
- Thakur, S., Tadesse, D. A., Morrow, M., & Gebreyes, W. A. (2007). Occurrence of multidrug resistant *Salmonella* in antimicrobial-free (ABF) swine production systems. *Vet Microbiol*, 125(3-4), 362-367.
- Thomas, M., Fenske, G. J., Antony, L., Ghimire, S., Welsh, R., Ramachandran, A., & Scaria, J. (2017). Whole genome sequencing-based detection of antimicrobial resistance and virulence in non-typhoidal *Salmonella enterica* isolated from wildlife. *Gut Pathog*, 9, 66. doi:10.1186/s13099-017-0213-x
- Threlfall, E., Teale, C., Davies, R., Ward, L., Skinner, J., Graham, A., . . . Speed, K. (2003). A comparison of antimicrobial susceptibilities in nontyphoidal salmonellas from humans and food animals in England and Wales in 2000. *Microbial Drug Resistance*, 9(2), 183-189.
- Tizard, I. R. (2009). Immunity in the fetus and newborn. In I. R. Tizard (Ed.), *Vet Immunol Immunopathol* (8th ed., pp. 223-238). Philadelphia: Elsevier.
- Toleman, M. A., Bennett, P. M., & Walsh, T. R. (2006). ISCR elements: novel gene-capturing systems of the 21st century? *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 70(2), 296-316.
- Türck, N. (2008). *Sensory and microbiological examinations for an evaluation of game meat*. Thesis. Hannover: University of Veterinary Medicine (in German),
- Uelze, L., Bloch, A., Borowiak, M., Grobbel, M., Deneke, C., Fischer, M., . . . Fischer, J. (2021). What WGS Reveals about *Salmonella enterica* subsp. *enterica* in Wildlife in Germany. *Microorganisms*, 9(9). doi:10.3390/microorganisms9091911
- Vadillo Machota, S., Mateos Yanes, E. M., & Píriz Durán, S. (2002). *Manual de microbiología veterinaria*.
- Vakulenko, S. B., & Mobashery, S. (2003). Versatility of aminoglycosides and prospects for their future. *Clin Microbiol Rev*, 16(3), 430-450.
- Van Campen, H., & Rhyan, J. (2010). The Role of Wildlife in Diseases of Cattle. *Veterinary clinics of North America: Food animal practice*, 26(1), 147-161. doi:http://dx.doi.org/10.1016/j.cvfa.2009.10.008
- Van Damme, I., Mattheus, W., Bertrand, S., & De Zutter, L. (2018). Quantification of hygiene indicators and *Salmonella* in the tonsils, oral cavity and rectal content samples of pigs during slaughter. *Food Microbiology*, 71, 120-128. doi:https://doi.org/10.1016/j.fm.2017.03.012

- Van der Waaij, D. (1992). History of recognition and measurement of colonization resistance of the digestive tract as an introduction to selective gastro-intestinal decontamination. *Epidemiol Infect*(109), 315-326.
- Van Winsen, R. L. (2001). Mechanism of salmonella enterica serovar reduction in fermented pig feed. *Journal of Science Food Agriculture*(83), 342-346.
- Velhner, M., Todorovic, D., Grego, E., Jovcic, B., Prunic, B., Stojanov, I., & Kehrenberg, C. (2018). Fluoroquinolone-resistant and extended-spectrum beta-lactamase producing *Escherichia coli* isolates from free-living wild animals. *Vet Microbiol*, 223, 168-172.
- Velickovic, N., Ferreira, E., Djan, M., Ernst, M., Obreht Vidakovic, D., Monaco, A., & Fonseca, C. (2016). Demographic history, current expansion and future management challenges of wild boar populations in the Balkans and Europe. *Heredity (Edinb)*, 117(5), 348-357. doi:10.1038/hdy.2016.53
- Velkov, T., Thompson, P. E., Nation, R. L., & Li, J. (2010). Structure– activity relationships of polymyxin antibiotics. *Journal of medicinal chemistry*, 53(5), 1898-1916.
- Vengust, G., Valencak, Z., & Bidovec, A. (2006). A serological survey of selected pathogens in wild boar in Slovenia. *Journal of Veterinary Medicine Series B: Infectious Diseases and Veterinary Public Health*, 53(1), 24-27.
- Vicente, J., Höfle, U., Garrido, J. M., Acevedo, P., Juste, R., Barral, M., & Gortazar, C. (2007). Risk factors associated with the prevalence of tuberculosis-like lesions in fenced wild boar and red deer in south central Spain. *Vet Res*, 38(3), 451-464.
- Vicente, J., Leon-Vizcaino, L., Gortazar, C., Jose Cubero, M., Gonzalez, M., & Martin-Atance, P. (2002). Antibodies to selected viral and bacterial pathogens in European wild boars from southcentral Spain. *J Wildl Dis*, 38(3), 649-652. doi:10.7589/0090-3558-38.3.649
- Vicente, J., Ruiz-Fons, F., Vidal, D., Hofle, U., Acevedo, P., Villanua, D., . . . Gortazar, C. (2005). Serosurvey of Aujeszky's disease virus infection in European wild boar in Spain. *Vet Rec*, 156(13), 408-412. doi:10.1136/vr.156.13.408
- Vicente, J., Segalés, J., Höfle, U., Balasch, M., Plana-Durán, J., Domingo, M., & Gortázar, C. (2004). Epidemiological study on porcine circovirus type 2 (PCV2) infection in the European wild boar (*Sus scrofa*). *Vet Res*, 35(2), 243-253.
- Vieira-Pinto, M., Morais, L., Caleja, C., Themudo, P., Aranha, J., Torres, C., . . . Martins, C. (2011). Salmonella spp. in wild boar (*Sus scrofa*): a public and animal health concern. In P. P., B. A., V. M., W. R., & F. J. M. Smulders (Eds.), *Game meat hygiene in focus* (pp. 131-136). The Netherlands: Wageningen Academic Publishers.
- Vieira-Pinto, M., Morais, L., Caleja, C., Themudo, P., Torres, C., Igrejas, G., . . . Martins, C. (2011). Salmonella sp. in game (*Sus scrofa* and *Oryctolagus cuniculus*). *Foodborne Pathog Dis*, 8(6), 739-740. doi:10.1089/fpd.2010.0742
- Vieira-Pinto, M., Oliveira, M., Bernardo, F., & Martins, C. (2007). Rapid detection of Salmonella sp. in pork samples using fluorescent in situ hybridization: a comparison with VIDAS®-SLM system and ISO 6579 cultural method. *Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia*, 59(6), 1388-1393.
- Vieira-Pinto, M., Tenreiro, R., Aranha, J., & Martins, C. (2012). Relationship between tonsils and mandibular lymph nodes concerning Salmonella sp. infection. *Food Research International*, 45(2), 863-866. doi:10.1016/j.foodres.2010.09.023

- Vo, A. T., Van Duijkeren, E., Fluit, A. C., Wannet, W. J., Verbruggen, A. J., Maas, H. M., & Gaastra, W. (2006). Antibiotic resistance, integrons and Salmonella genomic island 1 among non-typhoidal Salmonella serovars in The Netherlands. *International Journal of Antimicrobial Agents*, 28(3), 172-179.
- Wacheck, S., Fredriksson-Ahomaa, M., Konig, M., Stolle, A., & Stephan, R. (2010). Wild boars as an important reservoir for foodborne pathogens. *Foodborne Pathog Dis*, 7(3), 307-312. doi:10.1089/fpd.2009.0367
- Wahlstrom, H., Tysen, E., Olsson Engvall, E., Brandstrom, B., Eriksson, E., Morner, T., & Vagsholm, I. (2003). Survey of Campylobacter species, VTEC O157 and Salmonella species in Swedish wildlife. *Vet Rec*, 153(3), 74-80.
- Waldor, M. K., & Mekalanos, J. J. (1996). Lysogenic conversion by a filamentous phage encoding cholera toxin. *Science*, 272(5270), 1910-1914. doi:10.1126/science.272.5270.1910
- Wang, C., Feng, Y., Liu, L., Wei, L., Kang, M., & Zong, Z. (2020). Identification of novel mobile colistin resistance gene mcr-10. *Emerging microbes & infections*, 9(1), 508-516.
- Wang, R., van Dorp, L., Shaw, L. P., Bradley, P., Wang, Q., Wang, X., . . . Rieux, A. (2018). The global distribution and spread of the mobilized colistin resistance gene mcr-1. *Nature communications*, 9(1), 1179.
- Wang, X., Biswas, S., Paudyal, N., Pan, H., Li, X., Fang, W., & Yue, M. (2019). Antibiotic resistance in Salmonella Typhimurium isolates recovered from the food chain through national antimicrobial resistance monitoring system between 1996 and 2016. *Front Microbiol*, 10, 985.
- Ward, M. P., Cowled, B. D., Galea, F., Garner, M. G., Laffan, S. W., Marsh, I., . . . Woolnough, A. P. (2013). Salmonella infection in a remote, isolated wild pig population. *Vet Microbiol*, 162(2-4), 921-929. doi:10.1016/j.vetmic.2012.11.036
- Wells, C. L. (1990). Relationship between intestinal microecology and the translocation of intestinal bacteria. *Antonie van Leeuwenhoek*, 58(2), 87-93.
- WHO. (2014). *World Health Organization. Antimicrobial resistance global report on surveillance.*
- WHO. (2017). *Prioritization of pathogens to guide discovery, research and development of new antibiotics for drug-resistant bacterial infections, including tuberculosis.* In. Geneva, Switzerland: World Health Organization.
- WHO. (2019). *Critically important antimicrobials for human medicine, 6th revision:* WHO.
- WHO. (2021). *Surveillance of antimicrobial resistance in Europe, 2020 data.* (978-92-9498-556-9). Retrieved from Copenhagen:
- Wilcock, B. (1979). *Serotypes-associated virulence factors in porcine salmonellosis.* Paper presented at the Conf Res Workers., Ottawa, Canada.
- Wilcock, B., & Olander, H. (1978). Influence of oral antibiotic feeding on the duration and severity of clinical disease, growth performance, and pattern of shedding in swine inoculated with Salmonella typhimurium. *J Am Vet Med Assoc*, 172(4), 472-477.
- Wong, M. H. Y., & Chen, S. (2013). First detection of oqxAB in Salmonella spp. isolated from food. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 57(1), 658-660.
- Wood, R. L., Pospischil, A., & Rose, R. (1989). Distribution of persistent Salmonella typhimurium infection in internal organs of swine. *American Journal of Veterinary Research*, 50(7), 1015-1021.

- Wozniak, R. A., & Waldor, M. K. (2010). Integrative and conjugative elements: mosaic mobile genetic elements enabling dynamic lateral gene flow. *Nat Rev Microbiol*, 8(8), 552-563. doi:10.1038/nrmicro2382
- Yu, J., Liu, D., & Li, K. (2015). Influence of tetracycline on tetracycline-resistant heterotrophs and tet genes in activated sludge process. *Current microbiology*, 70(3), 415-422.
- Zottola, T., Montagnaro, S., Magnapera, C., Sasso, S., De Martino, L., Bragagnolo, A., . . . Pagnini, U. (2013). Prevalence and antimicrobial susceptibility of salmonella in European wild boar (*Sus scrofa*); Latium Region - Italy. *Comp Immunol Microbiol Infect Dis*, 36(2), 161-168. doi:10.1016/j.cimid.2012.11.004

X. ANEXOS

1. Copyright del artículo número 1.

JOHN WILEY AND SONS LICENSE
TERMS AND CONDITIONS

Jan 04, 2022

This Agreement between Maria Gil-Molino ("You") and John Wiley and Sons ("John Wiley and Sons") consists of your license details and the terms and conditions provided by John Wiley and Sons and Copyright Clearance Center.

License Number	5221850388407
License date	Jan 04, 2022
Licensed Content Publisher	John Wiley and Sons
Licensed Content Publication	Transboundary and Emerging Diseases
Licensed Content Title	Prevalence of Salmonella spp. in tonsils, mandibular lymph nodes and faeces of wild boar from Spain and genetic relationship between isolates
Licensed Content Author	Pedro Fernández Llarío, Javier Hermoso-de-Mendoza Salcedo, Rosario Cerrato Horrillo, et al
Licensed Content Date	Mar 18, 2019
Licensed Content Volume	66
Licensed Content Issue	3
Licensed Content Pages	9
Type of use	Dissertation/Thesis
Requestor type	Author of this Wiley article
Format	Print and electronic
Portion	Full article

Will you be translating?	No
Title	Salmonella spp. en jabalies en el suroeste de España: caracterización de los brotes producidos, estudio etiológico y perfil de resistencia antimicrobiana de los aislados obtenidos
Institution name	Universidad de Extremadura
Expected presentation date	Mar 2022
Order reference number	a2
Requestor Location	María Gil-Molino Facultad de Veterinaria Departamento de Sanidad Animal. Enfermedades Infecciosas Cáceres, CÁCERES 10004 Spain Attn: María Gil-Molino
Publisher Tax ID	EU826007151
Total	0.00 EUR
Terms and Conditions	

TERMS AND CONDITIONS

This copyrighted material is owned by or exclusively licensed to John Wiley & Sons, Inc. or one of its group companies (each a "Wiley Company") or handled on behalf of a society with which a Wiley Company has exclusive publishing rights in relation to a particular work (collectively "WILEY"). By clicking "accept" in connection with completing this licensing transaction, you agree that the following terms and conditions apply to this transaction (along with the billing and payment terms and conditions established by the Copyright Clearance Center Inc., ("CCC's Billing and Payment terms and conditions"), at the time that you opened your RightsLink account (these are available at any time at <http://myaccount.copyright.com>).

Terms and Conditions

- The materials you have requested permission to reproduce or reuse (the "Wiley Materials") are protected by copyright.
- You are hereby granted a personal, non-exclusive, non-sub licensable (on a stand-alone basis), non-transferable, worldwide, limited license to reproduce the Wiley Materials for the purpose specified in the licensing process. This license, **and any CONTENT (PDF or image file) purchased as part of your order**, is for a one-time use only and limited to any maximum distribution number specified in the license. The first instance of republication or reuse granted by this license must be completed within two years of the date of the grant of this license (although copies prepared before the end date may be distributed thereafter). The Wiley Materials shall not be used in any other manner or for any other purpose, beyond what is granted in the

license. Permission is granted subject to an appropriate acknowledgement given to the author, title of the material/book/journal and the publisher. You shall also duplicate the copyright notice that appears in the Wiley publication in your use of the Wiley Material. Permission is also granted on the understanding that nowhere in the text is a previously published source acknowledged for all or part of this Wiley Material. Any third party content is expressly excluded from this permission.

- With respect to the Wiley Materials, all rights are reserved. Except as expressly granted by the terms of the license, no part of the Wiley Materials may be copied, modified, adapted (except for minor reformatting required by the new Publication), translated, reproduced, transferred or distributed, in any form or by any means, and no derivative works may be made based on the Wiley Materials without the prior permission of the respective copyright owner. **For STM Signatory Publishers clearing permission under the terms of the [STM Permissions Guidelines](#) only, the terms of the license are extended to include subsequent editions and for editions in other languages, provided such editions are for the work as a whole in situ and does not involve the separate exploitation of the permitted figures or extracts,** You may not alter, remove or suppress in any manner any copyright, trademark or other notices displayed by the Wiley Materials. You may not license, rent, sell, loan, lease, pledge, offer as security, transfer or assign the Wiley Materials on a stand-alone basis, or any of the rights granted to you hereunder to any other person.
- The Wiley Materials and all of the intellectual property rights therein shall at all times remain the exclusive property of John Wiley & Sons Inc, the Wiley Companies, or their respective licensors, and your interest therein is only that of having possession of and the right to reproduce the Wiley Materials pursuant to Section 2 herein during the continuance of this Agreement. You agree that you own no right, title or interest in or to the Wiley Materials or any of the intellectual property rights therein. You shall have no rights hereunder other than the license as provided for above in Section 2. No right, license or interest to any trademark, trade name, service mark or other branding ("Marks") of WILEY or its licensors is granted hereunder, and you agree that you shall not assert any such right, license or interest with respect thereto
- NEITHER WILEY NOR ITS LICENSORS MAKES ANY WARRANTY OR REPRESENTATION OF ANY KIND TO YOU OR ANY THIRD PARTY, EXPRESS, IMPLIED OR STATUTORY, WITH RESPECT TO THE MATERIALS OR THE ACCURACY OF ANY INFORMATION CONTAINED IN THE MATERIALS, INCLUDING, WITHOUT LIMITATION, ANY IMPLIED WARRANTY OF MERCHANTABILITY, ACCURACY, SATISFACTORY QUALITY, FITNESS FOR A PARTICULAR PURPOSE, USABILITY, INTEGRATION OR NON-INFRINGEMENT AND ALL SUCH WARRANTIES ARE HEREBY EXCLUDED BY WILEY AND ITS LICENSORS AND WAIVED BY YOU.
- WILEY shall have the right to terminate this Agreement immediately upon breach of this Agreement by you.
- You shall indemnify, defend and hold harmless WILEY, its Licensors and their respective directors, officers, agents and employees, from and against any actual or threatened claims, demands, causes of action or proceedings arising from any breach of this Agreement by you.
- IN NO EVENT SHALL WILEY OR ITS LICENSORS BE LIABLE TO YOU OR ANY OTHER PARTY OR ANY OTHER PERSON OR ENTITY FOR ANY SPECIAL, CONSEQUENTIAL, INCIDENTAL, INDIRECT, EXEMPLARY OR PUNITIVE DAMAGES, HOWEVER CAUSED, ARISING OUT OF OR IN CONNECTION WITH THE DOWNLOADING, PROVISIONING, VIEWING OR USE OF THE MATERIALS REGARDLESS OF THE FORM OF ACTION, WHETHER FOR BREACH OF CONTRACT, BREACH OF WARRANTY, TORT, NEGLIGENCE, INFRINGEMENT OR OTHERWISE (INCLUDING, WITHOUT LIMITATION, DAMAGES BASED ON LOSS OF PROFITS, DATA, FILES, USE, BUSINESS OPPORTUNITY OR CLAIMS OF THIRD PARTIES), AND WHETHER OR NOT THE PARTY HAS BEEN ADVISED OF THE POSSIBILITY OF SUCH DAMAGES. THIS LIMITATION SHALL APPLY NOTWITHSTANDING ANY FAILURE OF ESSENTIAL PURPOSE OF ANY LIMITED REMEDY PROVIDED

HEREIN.

- Should any provision of this Agreement be held by a court of competent jurisdiction to be illegal, invalid, or unenforceable, that provision shall be deemed amended to achieve as nearly as possible the same economic effect as the original provision, and the legality, validity and enforceability of the remaining provisions of this Agreement shall not be affected or impaired thereby.
- The failure of either party to enforce any term or condition of this Agreement shall not constitute a waiver of either party's right to enforce each and every term and condition of this Agreement. No breach under this agreement shall be deemed waived or excused by either party unless such waiver or consent is in writing signed by the party granting such waiver or consent. The waiver by or consent of a party to a breach of any provision of this Agreement shall not operate or be construed as a waiver of or consent to any other or subsequent breach by such other party.
- This Agreement may not be assigned (including by operation of law or otherwise) by you without WILEY's prior written consent.
- Any fee required for this permission shall be non-refundable after thirty (30) days from receipt by the CCC.
- These terms and conditions together with CCC's Billing and Payment terms and conditions (which are incorporated herein) form the entire agreement between you and WILEY concerning this licensing transaction and (in the absence of fraud) supersedes all prior agreements and representations of the parties, oral or written. This Agreement may not be amended except in writing signed by both parties. This Agreement shall be binding upon and inure to the benefit of the parties' successors, legal representatives, and authorized assigns.
- In the event of any conflict between your obligations established by these terms and conditions and those established by CCC's Billing and Payment terms and conditions, these terms and conditions shall prevail.
- WILEY expressly reserves all rights not specifically granted in the combination of (i) the license details provided by you and accepted in the course of this licensing transaction, (ii) these terms and conditions and (iii) CCC's Billing and Payment terms and conditions.
- This Agreement will be void if the Type of Use, Format, Circulation, or Requestor Type was misrepresented during the licensing process.
- This Agreement shall be governed by and construed in accordance with the laws of the State of New York, USA, without regards to such state's conflict of law rules. Any legal action, suit or proceeding arising out of or relating to these Terms and Conditions or the breach thereof shall be instituted in a court of competent jurisdiction in New York County in the State of New York in the United States of America and each party hereby consents and submits to the personal jurisdiction of such court, waives any objection to venue in such court and consents to service of process by registered or certified mail, return receipt requested, at the last known address of such party.

WILEY OPEN ACCESS TERMS AND CONDITIONS

Wiley Publishes Open Access Articles in fully Open Access Journals and in Subscription journals offering Online Open. Although most of the fully Open Access journals publish open access articles under the terms of the Creative Commons Attribution (CC BY) License only, the subscription journals and a few of the Open Access Journals offer a choice of Creative Commons Licenses. The license type is clearly identified on the article.

The Creative Commons Attribution License

The [Creative Commons Attribution License \(CC-BY\)](#) allows users to copy, distribute and transmit an article, adapt the article and make commercial use of the article. The CC-BY license permits commercial and non-

Creative Commons Attribution Non-Commercial License

The [Creative Commons Attribution Non-Commercial \(CC-BY-NC\) License](#) permits use, distribution and reproduction in any medium, provided the original work is properly cited and is not used for commercial purposes. (see below)

Creative Commons Attribution-Non-Commercial-NoDerivs License

The [Creative Commons Attribution Non-Commercial-NoDerivs License \(CC-BY-NC-ND\)](#) permits use, distribution and reproduction in any medium, provided the original work is properly cited, is not used for commercial purposes and no modifications or adaptations are made. (see below)

Use by commercial "for-profit" organizations

Use of Wiley Open Access articles for commercial, promotional, or marketing purposes requires further explicit permission from Wiley and will be subject to a fee.

Further details can be found on Wiley Online Library <http://olabout.wiley.com/WileyCDA/Section/id-410895.html>

Other Terms and Conditions:

v1.10 Last updated September 2015

Questions? customercare@copyright.com or +1-855-239-3415 (toll free in the US) or +1-978-646-2777.

2 Copyright del artículo número 2.

JOHN WILEY AND SONS LICENSE TERMS AND CONDITIONS

Jan 04, 2022

This Agreement between María Gil-Molino ("You") and John Wiley and Sons ("John Wiley and Sons") consists of your license details and the terms and conditions provided by John Wiley and Sons and Copyright Clearance Center.

License Number	5221850051722
License date	Jan 04, 2022
Licensed Content Publisher	John Wiley and Sons
Licensed Content Publication	Transboundary and Emerging Diseases
Licensed Content Title	Outbreaks of antimicrobial resistant Salmonella Choleraesuis in wild boars piglets from central-western Spain
Licensed Content Author	Joaquín Rey Pérez, Elisa Varela Fernández, Remigio Pérez Martínez, et al
Licensed Content Date	Sep 10, 2018
Licensed Content Volume	66
Licensed Content Issue	1
Licensed Content Pages	9
Type of use	Dissertation/Thesis
Requestor type	Author of this Wiley article
Format	Print and electronic
Portion	Full article

Will you be translating? No

Title Salmonella spp. en jabalies en el suroeste de España: caracterización de los brotes producidos, estudio etiológico y perfil de resistencia antimicrobiana de los aislados obtenidos

Institution name Universidad de Extremadura

Expected presentation date Mar 2022

Order reference number a1

Requestor Location
 María Gil-Molino
 Facultad de Veterinaria
 Departamento de Sanidad Animal.
 Enfermedades Infecciosas
 Cáceres, CÁ CERES 10004
 Spain
 Attn: María Gil-Molino

Publisher Tax ID EU826007151

Billing Type Invoice

Billing Address
 María Gil-Molino
 Facultad de Veterinaria
 Departamento de Sanidad Animal.
 Enfermedades Infecciosas
 Cáceres, Spain 10004
 Attn: María Gil-Molino

Total 0.00 EUR

Terms and Conditions

TERMS AND CONDITIONS

This copyrighted material is owned by or exclusively licensed to John Wiley & Sons, Inc. or one of its group companies (each a "Wiley Company") or handled on behalf of a society with which a Wiley Company has exclusive publishing rights in relation to a particular work (collectively "WILEY"). By clicking "accept" in connection with completing this licensing transaction, you agree that the following terms and conditions apply to this transaction (along with the billing and payment terms and conditions established by the Copyright Clearance Center Inc., ("CCC's Billing and Payment terms and conditions"), at the time that you opened your RightsLink account (these are available at any time at <http://myaccount.copyright.com>).

Terms and Conditions

- The materials you have requested permission to reproduce or reuse (the "Wiley

Materials") are protected by copyright.

- You are hereby granted a personal, non-exclusive, non-sub licensable (on a stand-alone basis), non-transferable, worldwide, limited license to reproduce the Wiley Materials for the purpose specified in the licensing process. This license, **and any CONTENT (PDF or image file) purchased as part of your order**, is for a one-time use only and limited to any maximum distribution number specified in the license. The first instance of republication or reuse granted by this license must be completed within two years of the date of the grant of this license (although copies prepared before the end date may be distributed thereafter). The Wiley Materials shall not be used in any other manner or for any other purpose, beyond what is granted in the license. Permission is granted subject to an appropriate acknowledgement given to the author, title of the material/book/journal and the publisher. You shall also duplicate the copyright notice that appears in the Wiley publication in your use of the Wiley Material. Permission is also granted on the understanding that nowhere in the text is a previously published source acknowledged for all or part of this Wiley Material. Any third party content is expressly excluded from this permission.
- With respect to the Wiley Materials, all rights are reserved. Except as expressly granted by the terms of the license, no part of the Wiley Materials may be copied, modified, adapted (except for minor reformatting required by the new Publication), translated, reproduced, transferred or distributed, in any form or by any means, and no derivative works may be made based on the Wiley Materials without the prior permission of the respective copyright owner. **For STM Signatory Publishers clearing permission under the terms of the [STM Permissions Guidelines](#) only, the terms of the license are extended to include subsequent editions and for editions in other languages, provided such editions are for the work as a whole in situ and does not involve the separate exploitation of the permitted figures or extracts**, You may not alter, remove or suppress in any manner any copyright, trademark or other notices displayed by the Wiley Materials. You may not license, rent, sell, loan, lease, pledge, offer as security, transfer or assign the Wiley Materials on a stand-alone basis, or any of the rights granted to you hereunder to any other person.
- The Wiley Materials and all of the intellectual property rights therein shall at all times remain the exclusive property of John Wiley & Sons Inc, the Wiley Companies, or their respective licensors, and your interest therein is only that of having possession of and the right to reproduce the Wiley Materials pursuant to Section 2 herein during the continuance of this Agreement. You agree that you own no right, title or interest in or to the Wiley Materials or any of the intellectual property rights therein. You shall have no rights hereunder other than the license as provided for above in Section 2. No right, license or interest to any trademark, trade name, service mark or other branding ("Marks") of WILEY or its licensors is granted hereunder, and you agree that you shall not assert any such right, license or interest with respect thereto
- NEITHER WILEY NOR ITS LICENSORS MAKES ANY WARRANTY OR REPRESENTATION OF ANY KIND TO YOU OR ANY THIRD PARTY, EXPRESS, IMPLIED OR STATUTORY, WITH RESPECT TO THE MATERIALS OR THE ACCURACY OF ANY INFORMATION CONTAINED IN THE MATERIALS, INCLUDING, WITHOUT LIMITATION, ANY IMPLIED WARRANTY OF MERCHANTABILITY, ACCURACY, SATISFACTORY QUALITY, FITNESS FOR A PARTICULAR PURPOSE, USABILITY, INTEGRATION OR NON-INFRINGEMENT AND ALL SUCH WARRANTIES ARE HEREBY EXCLUDED BY WILEY AND ITS LICENSORS AND WAIVED BY YOU.
- WILEY shall have the right to terminate this Agreement immediately upon breach of this Agreement by you.
- You shall indemnify, defend and hold harmless WILEY, its Licensors and their respective directors, officers, agents and employees, from and against any actual or threatened claims, demands, causes of action or proceedings arising from any breach of this Agreement by you.
- IN NO EVENT SHALL WILEY OR ITS LICENSORS BE LIABLE TO YOU OR ANY OTHER PARTY OR ANY OTHER PERSON OR ENTITY FOR ANY

SPECIAL, CONSEQUENTIAL, INCIDENTAL, INDIRECT, EXEMPLARY OR PUNITIVE DAMAGES, HOWEVER CAUSED, ARISING OUT OF OR IN CONNECTION WITH THE DOWNLOADING, PROVISIONING, VIEWING OR USE OF THE MATERIALS REGARDLESS OF THE FORM OF ACTION, WHETHER FOR BREACH OF CONTRACT, BREACH OF WARRANTY, TORT, NEGLIGENCE, INFRINGEMENT OR OTHERWISE (INCLUDING, WITHOUT LIMITATION, DAMAGES BASED ON LOSS OF PROFITS, DATA, FILES, USE, BUSINESS OPPORTUNITY OR CLAIMS OF THIRD PARTIES), AND WHETHER OR NOT THE PARTY HAS BEEN ADVISED OF THE POSSIBILITY OF SUCH DAMAGES. THIS LIMITATION SHALL APPLY NOTWITHSTANDING ANY FAILURE OF ESSENTIAL PURPOSE OF ANY LIMITED REMEDY PROVIDED HEREIN.

- Should any provision of this Agreement be held by a court of competent jurisdiction to be illegal, invalid, or unenforceable, that provision shall be deemed amended to achieve as nearly as possible the same economic effect as the original provision, and the legality, validity and enforceability of the remaining provisions of this Agreement shall not be affected or impaired thereby.
- The failure of either party to enforce any term or condition of this Agreement shall not constitute a waiver of either party's right to enforce each and every term and condition of this Agreement. No breach under this agreement shall be deemed waived or excused by either party unless such waiver or consent is in writing signed by the party granting such waiver or consent. The waiver by or consent of a party to a breach of any provision of this Agreement shall not operate or be construed as a waiver of or consent to any other or subsequent breach by such other party.
- This Agreement may not be assigned (including by operation of law or otherwise) by you without WILEY's prior written consent.
- Any fee required for this permission shall be non-refundable after thirty (30) days from receipt by the CCC.
- These terms and conditions together with CCC's Billing and Payment terms and conditions (which are incorporated herein) form the entire agreement between you and WILEY concerning this licensing transaction and (in the absence of fraud) supersedes all prior agreements and representations of the parties, oral or written. This Agreement may not be amended except in writing signed by both parties. This Agreement shall be binding upon and inure to the benefit of the parties' successors, legal representatives, and authorized assigns.
- In the event of any conflict between your obligations established by these terms and conditions and those established by CCC's Billing and Payment terms and conditions, these terms and conditions shall prevail.
- WILEY expressly reserves all rights not specifically granted in the combination of (i) the license details provided by you and accepted in the course of this licensing transaction, (ii) these terms and conditions and (iii) CCC's Billing and Payment terms and conditions.
- This Agreement will be void if the Type of Use, Format, Circulation, or Requestor Type was misrepresented during the licensing process.
- This Agreement shall be governed by and construed in accordance with the laws of the State of New York, USA, without regards to such state's conflict of law rules. Any legal action, suit or proceeding arising out of or relating to these Terms and Conditions or the breach thereof shall be instituted in a court of competent jurisdiction in New York County in the State of New York in the United States of America and each party hereby consents and submits to the personal jurisdiction of such court, waives any objection to venue in such court and consents to service of process by registered or certified mail, return receipt requested, at the last known address of such party.

WILEY OPEN ACCESS TERMS AND CONDITIONS

Wiley Publishes Open Access Articles in fully Open Access Journals and in Subscription journals offering Online Open. Although most of the fully Open Access journals publish open access articles under the terms of the Creative Commons Attribution (CC BY) License only, the subscription journals and a few of the Open Access Journals offer a choice of Creative Commons Licenses. The license type is clearly identified on the article.

The Creative Commons Attribution License

The [Creative Commons Attribution License \(CC-BY\)](#) allows users to copy, distribute and transmit an article, adapt the article and make commercial use of the article. The CC-BY license permits commercial and non-

Creative Commons Attribution Non-Commercial License

The [Creative Commons Attribution Non-Commercial \(CC-BY-NC\) License](#) permits use, distribution and reproduction in any medium, provided the original work is properly cited and is not used for commercial purposes.(see below)

Creative Commons Attribution-Non-Commercial-NoDerivs License

The [Creative Commons Attribution Non-Commercial-NoDerivs License \(CC-BY-NC-ND\)](#) permits use, distribution and reproduction in any medium, provided the original work is properly cited, is not used for commercial purposes and no modifications or adaptations are made. (see below)

Use by commercial "for-profit" organizations

Use of Wiley Open Access articles for commercial, promotional, or marketing purposes requires further explicit permission from Wiley and will be subject to a fee.

Further details can be found on Wiley Online Library <http://olabout.wiley.com/WileyCDA/Section/id-410895.html>

Other Terms and Conditions:

v1.10 Last updated September 2015

Questions? customercare@copyright.com or +1-855-239-3415 (toll free in the US) or +1-978-646-2777.

3. Copyright del artículo número 3.



Open Access Article

Spread of Antimicrobial Resistance by *Salmonella enterica* Serovar Choleraesuis between Close Domestic and Wild Environments

by María Gil Molino ^{1,*} , Alfredo García ² , Sofia Gabriela Zurita ¹ ,
 Francisco Eduardo Martín-Cano ³ , Waldo García-Jiménez ⁴ , David Risco ^{4,5} , Joaquín Rey ¹ ,
 Pedro Fernández-Llario ⁴ and Alberto Quesada ^{6,7}

© This is an open access article distributed under the [Creative Commons Attribution License](#) which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original work is properly cited

Reconocimiento 4.0 Internacional (CC BY 4.0)

This is a human-readable summary of (and not a substitute for) the [license](#). [Advertencia](#).

Usted es libre de:

- Compartir** — copiar y redistribuir el material en cualquier medio o formato
- Adaptar** — remezclar, transformar y crear a partir del material para cualquier finalidad, incluso comercial.

El licenciadador no puede revocar estas libertades mientras cumpla con los términos de la licencia.

Bajo las condiciones siguientes:



Reconocimiento — Debe [reconocer adecuadamente](#) la autoría, proporcionar un enlace a la licencia e [indicar si se han realizado cambios](#). Puede hacerlo de cualquier manera razonable, pero no de una manera que sugiera que tiene el apoyo del licenciador o lo recibe por el uso que hace.

No hay restricciones adicionales — No puede aplicar términos legales o [medidas tecnológicas](#) que legalmente restrinjan realizar aquello que la licencia permite.

Avisos:

No tiene que cumplir con la licencia para aquellos elementos del material en el dominio público o cuando su utilización esté permitida por la aplicación de [una excepción o un límite](#).

No se dan garantías. La licencia puede no ofrecer todos los permisos necesarios para la utilización prevista. Por ejemplo, otros derechos como los de [publicidad, privacidad, o los derechos morales](#) pueden limitar el uso del material.

4. Estado de la revision del artículo número 4.

Wiley Authors | Submission

My Submissions

Original Article

Dissemination of antimicrobial resistant isolates of *Salmonella* spp . in wild boars and its relationship with management practices

In revision, due 19 March 2022

Last Modified 23 November 2021 by María Gil-Molino
Submitted

In Revision 18 December 2021 by María Gil-Molino

Revision 2

🕒 Due by 19 March 2022
[Request an extension](#)

▼ [Hide versions](#)

Revision 2 (this version)

[Revision 1](#)
Revised on 23 November 2021

[Initial Submission](#)
Submitted on 21 June 2021

In order to submit your revision:

1. [Review the decision letter](#) for requested revisions, if you have not done so already
2. Upload any new or revised manuscript files and your Author Response
3. Respond to any newly required questions under *Additional Information*

✉ [Review decision letter](#)