

IL TRASPORTO AL MACELLO AUMENTA LA CARICA DI *SALMONELLA* NELLE FECI E MODIFICA IL MICROBIOTA DEI SUINI DA INGRASSO

TRANSPORT TO THE SLAUGHTERHOUSE AFFECTS THE LOAD OF *SALMONELLA* IN FAECES AND MODIFIES THE MICROBIOTA OF FINISHING PIGS

MASSACCI F.R.^{1,2,3,*}, MORELLI A.^{1,*}, CUCCO L.¹, ZICAVO A.¹, TOFANI S.^{1,4},
PEZZOTTI G.¹, ESTELLÉ J.³, PANICCIÀ M.¹, MAGISTRALI C.F.¹

¹Istituto Zooprofilattico Sperimentale dell'Umbria e delle Marche 'Togo Rosati', Perugia, Italy

²Department of Agricultural and Food Sciences, University of Bologna, Bologna, Italy

³GABI, INRA, AgroParisTech, Université Paris-Saclay, Jouy-en-Josas, France

⁴Istituto Zooprofilattico Sperimentale del Lazio e della Toscana 'M. Aleandri', Roma, Italy

*Questi autori hanno contribuito in egual modo al lavoro

Parole chiave: suino; infezione; *Salmonella*; microbiota intestinale

Keywords: swine; infection; *Salmonella*; gut microbiota

RIASSUNTO

La carne di maiale costituisce una fonte rilevante di *Salmonella* per l'uomo. La contaminazione delle carcasse si realizza al macello a partire dal contenuto intestinale ed è dipendente dalla carica di *Salmonella* in questa sede. La prevalenza di suini positivi per *Salmonella* aumenta significativamente quando il tempo del trasporto al macello è superiore alle 2 ore. L'ipotesi alla base di questo studio è che il trasporto al macello aumenti la carica di *Salmonella* nelle feci e determini una modificazione del microbiota fecale nei suini da ingrasso. Questo studio è stato condotto in un allevamento di suini positivi per *Salmonella* spp. in Italia centrale. I campioni di feci sono stati raccolti il giorno prima del trasporto e al macello dagli stessi animali. La carica di *Salmonella* nei campioni fecali è stata valutata con la tecnica del *most probable number* (MPN), secondo il protocollo ISO / TS 6579-2: 2012 / A1 (2012). Inoltre, la composizione batterica fecale è stata valutata sequenziando il gene 16S mediante tecnologia Illumina. Lo studio ha dimostrato che la carica di *Salmonella* aumenta dopo il trasporto (test di Wilcoxon sign rank test; $p = 0,013$), confermando che questa fase della catena di produzione è un punto critico per il controllo della contaminazione del patogeno. Una ricchezza microbica inferiore e una più elevata eterogeneità nel gruppo hanno caratterizzato il microbiota fecale degli animali positivi a *Salmonella*. Questo risultato è in accordo con studi già presenti in letteratura. Inoltre, in questa ultima fase di produzione, un'infezione naturale da *Salmonella* provoca una profonda modificazione del microbiota fecale simile a quella osservata nelle infezioni sperimentali.

ABSTRACT

Contaminated pork is a significant source of foodborne Salmonellosis. Pork is contaminated at the slaughterhouse and the intestinal content is predominant source of *Salmonella* for carcass contamination. The prevalence of *Salmonella*-positive pigs increases significantly when the time of transport to the slaughterhouse is longer than 2 hours. The hypothesis behind this study is that transport to the slaughterhouse increases the load of *Salmonella* in faeces and determines a shift of the faecal microbiota in finishing pigs. This study was carried out in a pig herd positive for *Salmonella* spp. in the Central Italy. Faecal samples were collected the day before the transport

and at arrival at the slaughterhouse from the same pigs. *Salmonella* loads in faecal samples were estimated by the most probable number (MPN) technique, according to the ISO/TS 6579-2:2012/A1 (2012) protocol. Moreover, the faecal bacteria composition was assessed by high-throughput sequencing of the 16S rRNA gene. Our study showed that the load of *Salmonella* increases after transport (Wilcoxon sign rank test; $p=0.013$), confirming that this phase of the production chain is a critical point for the control of *Salmonella* contamination. A lower richness and an increased heterogeneity within the group characterized the faecal microbiota of *Salmonella* positive animals, in accordance to the literature. In this stage, a natural *Salmonella* infection causes a disruption of the fecal microbiota that is similar to the one observed in challenge studies.

INTRODUZIONE

La salmonellosi è una delle più importanti malattie di origine alimentare in UE (EFSA, 2019). Nel 2018 sono stati segnalati e confermati 91857 casi di salmonellosi nell'uomo e la carne di maiale è riconosciuta come una delle principali fonti (EFSA, 2019). *Salmonella* può infettare i suini in allevamento, nei mezzi di trasporto, nelle stalle di sosta ed infine può contaminare le carni durante il processo di macellazione. Il trasporto degli animali dall'allevamento al macello svolge un ruolo importante nella trasmissione di *Salmonella*, con conseguente aumento del rischio di contaminazione delle carcasse (Arguello *et al.*, 2013). La prevalenza dei suini positivi a *Salmonella* aumenta quando il tempo di trasporto al macello è >2 ore (Zou *et al.*, 2017). Secondo Berends *et al.*, (1997) un tempo di trasporto di 2-6 ore, insieme al ricovero in stalle da sosta potrebbero raddoppiare il numero di suini portatori di *Salmonella*. Inoltre, l'infezione da *Salmonella* può essere acquisita durante il trasporto attraverso il contatto con camion o pavimenti nelle stalle di sosta contaminati (Magistrali *et al.*, 2008). Durante la macellazione, il contenuto intestinale e le feci dei suini portatori sono fonte principale di *Salmonella* per la contaminazione della carcassa (Van Hoek *et al.*, 2012). In un precedente studio, abbiamo dimostrato che il rischio di contaminazione della carcassa è maggiore quando la carica intestinale di *Salmonella* nei suini al macello è ≥ 103 CFU/g (Pesciaroli *et al.*, 2017).

Studi presenti in letteratura hanno descritto una modificazione del microbiota intestinale suino come conseguenza dell'infezione da *Salmonella* (Argüello *et al.*, 2018; Bearson *et al.*, 2013; Drumo *et al.*, 2016). Tuttavia, la maggior parte di queste indagini è stata condotta in studi sperimentali che potrebbero non riflettere le condizioni che si verificano durante un'infezione naturale da *Salmonella*. Inoltre, non sono disponibili dati sulla modifica del microbiota fecale dopo il trasporto al macello, che rappresenta un punto di controllo critico per la contaminazione da *Salmonella* nella catena di produzione della carne suina.

L'ipotesi alla base di questo studio è che un trasporto di più di due ore al macello aumenti la carica di *Salmonella* nelle feci e determini una modificazione del microbiota fecale nei suini da ingrasso.

MATERIALI E METODI

Disegno animale

Questo studio ha coinvolto 50 maiali da ingrasso provenienti da un'azienda positiva per *Salmonella* situata in Italia centrale. Il tempo di trasporto al macello è stato di circa sei ore. Le feci sono state raccolte in allevamento il giorno prima del trasporto e al macello. I campioni sono stati conservati a $+4^{\circ}\text{C}$ e processati entro le 12 ore. Le aliquote per lo studio del microbiota intestinale sono state congelate in azoto liquido e poi conservate a -80°C fino al momento dell'analisi.

Esame colturale

La ricerca di *Salmonella* spp. è stata effettuata attraverso una tecnica miniaturizzata secondo la norma ISO/TS6579-2:2012/A1, che fornisce un metodo per la numerazione di *Salmonella* spp. mediante calcolo del *most probable number* (MPN) (Anonymous, 2012). Le colonie tipiche sono state confermate biochimicamente (Api Rapid 20E, bioMérieux) e sierologicamente

(*Salmonella* test sera omnivalent/polyvalent, Siemens). Il calcolo del MPN è stato calcolato utilizzando il calcolatore MPN, disponibile sul online <http://standard.iso.org/iso/ts/6579/-2>. La caratterizzazione sierologica dei ceppi di *Salmonella* spp. (*Salmonella* sera Statens Serum Institut) è stata eseguita secondo lo schema di White-Kauffman-Le Minor (WHO, 2007).

Estrazione del DNA e sequenziamento del gene 16S rRNA

Per l'estrazione del DNA da materiale fecale è stato utilizzato il Qiagen QIAamp DNA stool kit (Dore *et al.*, 2015). Il profilo microbico è stato ottenuto sequenziando le regioni ipervariabili V3-V4 del gene 16S rRNA, utilizzando lo strumento MiSeq Illumina e seguendo le specifiche del protocollo Illumina, avvalendosi dei seguenti oligonucleotidi: PCR1F_343 (5'-CTTCCCTACACGACGCTCTTCCGATCTACGGRAGGCAGCAG-3') e PCR1R_784 (5'-GGAGTTCAGACGTGTGCTCTTCCGATCTTACCAGGGTATCTAATCCT-3'). Le reads generate nel formato FastQ, sono state valutate qualitativamente con il FastQC software e successivamente analizzate utilizzando la pipeline QIIME v1.9.1 (Caporaso *et al.*, 2010), seguendo la strategia di *open-reference sub-sampled* OTU calling utilizzando il classificatore GreenGenes (Rideout *et al.*, 2014) e creando le *Operational Taxonomic Units* (OTUs) con un grado di similarità del 97%. Le OTU con un numero inferiore allo 0,005% del numero totale di sequenze sono state rimosse dal dataset (Bokulich *et al.*, 2012). Le sequenze chimeriche sono state rimosse ed i campioni con meno di 10000 reads sono stati eliminati dalla successiva analisi statistica.

Analisi statistiche

L'elaborazione è stata effettuata tramite programma R (v. 3.6.1) (TeamCore, 2018). È stata utilizzato come soglia di significatività $p < 0.05$. Sono state confrontate le percentuali di campioni fecali positive in allevamento e al macello mediante test χ^2 di Mc Nemar. Le cariche di *Salmonella* spp. in feci prelevate in allevamento e al mattatoio sono state analizzate tramite test di Wilcoxon per dati appaiati.

Per l'analisi del microbiota fecale, la nostra ipotesi è stata suddivisa in 3 diverse domande:

i) Lo stato di *Salmonella* è associato ad una diversa composizione di microbiota intestinale nei suini al macello? Abbiamo confrontato campioni fecali raccolti nel macello, da animali negativi per *Salmonella* (N = 20) e da suini positivi a *Salmonella* (N = 13) (Test 1);

ii) L'infezione da *Salmonella* durante il trasporto influenza il microbiota fecale dei suini? Abbiamo incluso gli animali che sono diventati positivi a *Salmonella* dopo il trasporto. Abbiamo confrontato campioni fecali raccolti dallo stesso animale in allevamento e al macello (N = 11) (Test 2);

iii) Il trasporto al macello influisce sul microbiota intestinale dei suini? In questo gruppo abbiamo incluso solo animali negativi alla *Salmonella*. Abbiamo confrontato campioni fecali raccolti dallo stesso maiale in allevamento ed al macello, (N = 16) (Test 3);

Brevemente, la tabella delle OTU è stata importata in R con il pacchetto Phyloseq (v.1.28) (McMurdie and Holmes, 2013) genetics, phylogenetics, multivariate statistics, visualization and testing. With the increased breadth of experimental designs now being pursued, project-specific statistical analyses are often needed, and these analyses are often difficult (or impossible). Utilizzando il pacchetto Vegan v2.5-6 (Oksanen, 2015) la diversità α , β e la ricchezza della composizione del microbiota sono state calcolate a livello di OTU. La diversità α è stata calcolata utilizzando l'indice di Shannon e la diversità β tramite l'indice di Whittaker. L'analisi della varianza (ANOVA) è stata calcolata, insieme al Tukey Honest Significant Differences per le diversità α e β . La distanza Bray-Curtis è stata utilizzata per l'analisi del *Non-Metric Multidimensional Scaling* (NMDS). Inoltre le ipotesi nulle di nessuna differenza all'interno dei gruppi sono state testate tramite la funzione "envfit" e la funzione "adonis" per l'analisi

multivariata, usando per entrambi i test la distanza di Bray-Curtis. L'analisi differenziale è stata effettuata a livello di OTU utilizzando il pacchetto metagenomeSeq e la funzione "fitZig" (Paulson *et al.*, 2013).

RISULTATI

Esame colturale

La percentuale di suini positivi per la *Salmonella* non è variata dopo il trasporto: cinque suini su 49 (10,2%, IC95%: 3,8% -23%) erano positivi per *Salmonella* spp. in allevamento, mentre 13/49 (26,5% IC95%: 15% -41,3%) al macello (test χ^2 di Mc Nemar; $p=0,12$). Complessivamente, ventotto suini (57,1% IC95%: 42,3% -70,9%) sono risultati positivi per la *Salmonella* in almeno un'occasione di campionamento. I sierotipi rilevati sia in allevamento che nel macello erano *Salmonella* Rissen e la variante monofasica di *Salmonella* Typhimurium (4.12: i :-). La carica batterica nelle feci variava da 2 \log_{10} MPN/g, a 6 \log_{10} MPN/g, che era il limite di rilevazione superiore del test. La carica di *Salmonella* nei campioni fecali è aumentata dopo il trasporto (Wilcoxon test; $p=0,013$). I risultati della cultura microbiologica sono mostrati nella tabella 1.

Tabella 1. Campioni fecali risultati positivi a *Salmonella* all'esame colturale collezionati in allevamento ed al macello. Sono indicati i valori di MPN/g ed il relativo sierotipo identificato.

Table 1. Animals resulted positive for *Salmonella* on the microbiological culture test carried out on the faecal samples collected on farm and at the slaughterhouse. The MPN/g and relative serotype identified are indicated.

ID	Allevamento			Macello		
	Feci	MPN/g	Sierotipi	Feci	MPN/g	Sierotipi
2	N	0		P	32	S. Rissen
12	N	0		P	78	S. 4,12:i:-
19	N	0		P	77	S. 4,12:i:-
21	N	0		P	74	S. 4,12:i:-
22	P	6	S. Rissen	N	0	
23	N	0		P	5900	S. Rissen
25	P	32	S. Rissen	P	4000	S. 4,12:i:-
26	N	0		P	120	S. 4,12:i:-
28	N	0		P	51	S. 4,12:i:-
36	N	0		P	33	S. Rissen
44	P	100	S. Rissen	N	0	
46	P	3100	S. 4,12:i:-	P	25000000	S. 4,12:i:-
47	P	420	S. 4,12:i:-	N	0	
48	N	0		P	160	S. 4,12:i:-
55	N	0		P	84	S. 4,12:i:-
57	N	0		P	1100	S. 4,12:i:-

N=negativo; P=positivo

Sequenziamento del microbiota fecale, identificazione e annotazione OTU

Dopo il controllo di qualità, una media di 19530,51 (S.D. = 4010,74) era disponibile per ogni campione. Le sequenze sono state raggruppate in 1237 OTU e solo l'1,29% delle OTU non è stato assegnato a un determinato phylum. I phyla *Firmicutes* (854/1237) e *Bacteroidetes* (248/1237) rappresentavano rispettivamente il 69% e il 20% delle OTU totali. All'interno del

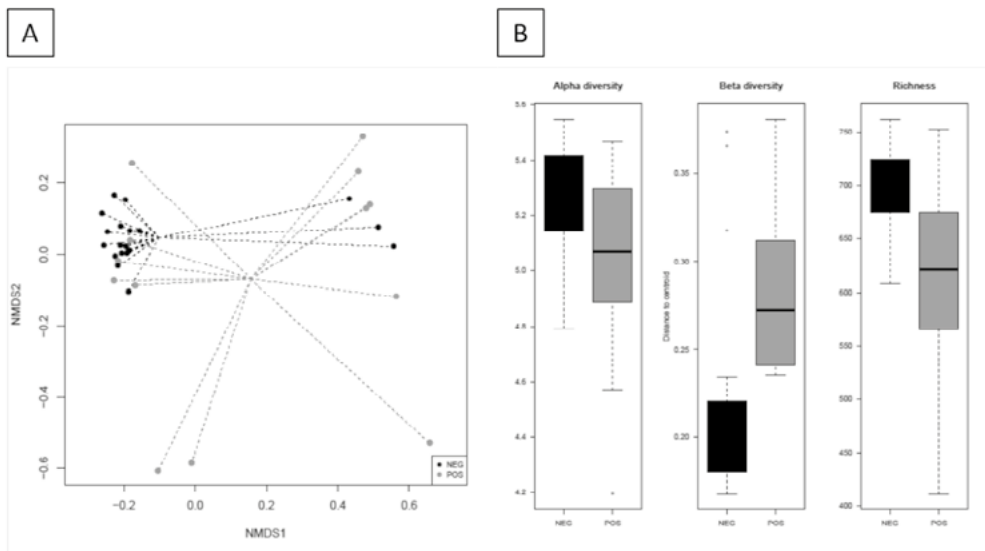
phylum *Firmicutes*, il 96% (823/854) delle OTU è stato assegnato all'ordine *Clostridiales*, il 46% (379/823) alla famiglia *Ruminococcaceae* e il 20% (161/823) alla famiglia *Lachnospiraceae*. All'interno del phylum *Bacteroidetes*, il 43% (107/248) è stato assegnato al genere *Prevotella*.

Composizione del microbiota fecale

Nel test 1, la composizione del microbiota fecale al macello era diversa tra animali negativi e positivi ($p=0,02$). La diversità β era diversa in base allo stato di *Salmonella* nei suini ($p=0,028$), mostrando eterogeneità tra i campioni negli animali positivi a *Salmonella*. Nel plot NMDS, i centroidi dei due gruppi apparivano separati in modo significativo ($p=0,001$; Figura 1). La diversità α e la ricchezza microbica osservata a livello di OTU hanno anche mostrato differenze tra gli animali *Salmonella* positivi e *Salmonella* negativi ($p=0,02$; $p=0,001$, rispettivamente). Gli animali positivi a *Salmonella* hanno mostrato una diversità α e ricchezza inferiori rispetto agli animali negativi. Lo stato di *Salmonella* nei suini è stato utilizzato nel modello dell'analisi differenziale a livello di OTU, descrivendo 12 OTU differentemente abbondanti (DA) al macello. I suini positivi a *Salmonella* avevano OTU DA appartenenti principalmente ai generi *Prevotella*, *Parabacteroides* e *Butyrlicimonas* rispetto ai suini negativi per *Salmonella*.

Figura 1. La figura include campioni fecali collezionati al macello, da animali negativi per *Salmonella* (N=20) e da suini positivi a *Salmonella* (N=13) (Test 1). **(A)** NMDS che rappresenta le differenze nella composizione del microbiota fecale degli animali. **(B)** Boxplots rappresentanti la diversità α (indice di Shannon), la diversità β (indice di Whittaker) e la ricchezza (numero totale di OTU presenti in ciascun campione) a livello di OTU. I campioni sono colorati in base allo status di *Salmonella*: NEG (animali negativi, nero) e POS (animali positivi; rosso).

Figure 1. Figure includes faecal samples collected at the slaughterhouse, from *Salmonella* negative animals (N=20) and from *Salmonella* positive pigs (N=13) (Test 1). **(A).** Dissimilarities in faecal microbiota composition represented by the non-metric multidimensional scaling (NMDS) ordination plot, with Bray-Curtis dissimilarity index calculated on unscaled OTU abundances. **(B)** Box plot graph representation of the α diversity (Shannon index), β diversity (Whittaker's index) and richness (total number of OTUs present in each sample) using the rarefied OTU table. Samples are colored by status of *Salmonella*: NEG (negative animals, black) and POS (positive animals; red).



Nel test 2, il microbiota fecale è stato influenzato dallo stato di *Salmonella* ($p=0,00001$). La diversità β differiva tra gli animali ($p=0,001$). Nel plot NMDS, i centroidi dei due gruppi sperimentali apparivano separati, risultando in un valore significativo ($p=0,0001$). La diversità α a livello di OTU e la ricchezza microbica osservata non differivano tra gli animali negativi e positivi ($p>0,05$). Le analisi differenziali hanno mostrato 326 OTU DA. Complessivamente, *Prevotella*, *Coprococcus* e *Parabacteroides* erano più abbondanti negli animali positivi, mentre il *Ruminococcus* in quelli negativi.

Nel test 3, la composizione del microbiota fecale non è stata influenzata dal trasporto ($p> 0,05$). La diversità β differiva tra i campioni fecali campionati in allevamento ed al macello ($p=0,005$). Nel plot NMDS, i centroidi dei campioni raccolti in allevamento e al macello apparivano separati, risultando in un valore significativo (test di envfit; $p=0,04$). La diversità α a livello di OTU non differiva ($p> 0,05$) mentre la ricchezza microbica osservata mostrava differenze tra i gruppi ($p=0,004$). Le analisi differenziali hanno descritto che le 21 OTU DA erano appartenenti principalmente al genere di *Butyricimonas* e *Bacteroides* e descritti come più abbondanti in allevamento.

DISCUSSIONE E CONCLUSIONI

Il presente studio ha come obiettivo quello di indagare l'effetto del trasporto dall'allevamento al macello sull'escrezione di *Salmonella* nei suini da ingrasso. Lo studio si è concentrato sulle interazioni tra il trasporto, la prevalenza e la carica di *Salmonella* e la composizione del microbiota fecale in entrambe le condizioni in allevamento e al macello.

L'impatto del trasporto dei suini dall'allevamento al macello sull'eliminazione di *Salmonella* è descritto in letteratura. Il trasporto è necessario nell'allevamento suino (Arguello *et al.*, 2013) ed è noto che un trasporto di durata superiore alle 2 ore dall'allevamento al macello possa stressare gli animali (Zou *et al.*, 2017). Questo stress è associato ad un aumento della carica di *Salmonella* dei suini portatori, determinando una diffusione di questo patogeno tra gli altri animali (Arguello *et al.*, 2013). Inoltre il trasporto comporta un rischio di infezione indiretta da superfici contaminate del camion o delle stalle di sosta (Magistrali *et al.*, 2008). Nel nostro studio, abbiamo osservato una prevalenza del 10,2% di animali positivi a *Salmonella* in allevamento e del 26,5% al macello, risultato coerente con i dati sulla prevalenza di *Salmonella* in Europa ed in Italia (EFSA, 2008). Gli isolati appartenevano alla *Salmonella* enterica 4,[5],12:i:- e *Salmonella* Rissen, che sono tra i sierotipi più frequentemente descritti in suini in Europa (Arguello *et al.*, 2012; Bonardi *et al.*, 2016; Pesciaroli *et al.*, 2017).

Per quanto riguarda la carica di *Salmonella* nelle feci, questa è aumentata dall'allevamento al macello all'interno del gruppo. Come descritto nel nostro studio precedente, la carica di *Salmonella* è correlato alla contaminazione delle carcasse: pertanto, i suini con un'alta concentrazione di *Salmonella* nelle loro feci rappresentano un rischio più elevato per il consumatore rispetto ai *low-shedder* (Pesciaroli *et al.*, 2017). Coerentemente, la riduzione della carica di *Salmonella* nell'intestino è stata proposta come una delle strategie più efficaci per limitare il rischio umano di infezione da *Salmonella* (Snary *et al.*, 2016). I suini *high-shedder* sono probabilmente suini portatori che presentano una recrudescenza di infezione e/o suini che sono stati infettati durante il trasporto attraverso il contatto con animali positivi a *Salmonella* spp. Infatti, durante i periodi di stress, i suini portatori possono avere una recrudescenza dell'infezione e la conta di *Salmonella* nell'intestino e nelle feci può aumentare (Pesciaroli *et al.*, 2017).

Nel nostro studio, abbiamo rilevato come infezione da *Salmonella* abbia causato una variazione della composizione del microbiota fecale in suini infetti risultato in accordo con gli studi esistenti (Argüello *et al.*, 2018; Drumo *et al.*, 2016). Questa modificazione si è realizzata in poche ore e questo risultato è stato descritto sia trasversalmente, confrontando

cioè suini positivi e negativi al macello, sia longitudinalmente, confrontando il microbiota degli stessi animali, negativi in allevamento e positivi al macello.

La composizione del microbiota fecale descritta in animali negativi o positivi a *Salmonella* è in accordo con quanto già descritto in letteratura (Borewicz *et al.*, 2015; Drumo *et al.*, 2016; Kim and Isaacson, 2017). Nel nostro studio, infatti, abbiamo descritto una maggiore abbondanza di *Prevotella*, *Coprococcus* e *Paraprevotella* negli animali positivi a *Salmonella* e questo risultato è in accordo con gli studi condotti in condizioni controllate, a seguito di infezione sperimentale con *Salmonella* (Borewicz *et al.*, 2015; Drumo *et al.*, 2016; Kim and Isaacson, 2017). Inoltre, il microbiota fecale dei suini negativi ha mostrato una maggiore abbondanza di *Ruminococcaceae* rispetto ai suini positivi a *Salmonella*, risultando in accordo con la letteratura (Argüello *et al.*, 2019, 2018; Drumo *et al.*, 2016). È interessante notare che i suini positivi a *Salmonella* presentavano una maggiore diversità β , e quindi un microbiota intestinale più eterogeneo, rispetto agli animali negativi. In generale, il nostro studio e gli studi citati dimostrano chiaramente che la *Salmonella* porta ad alterazioni nella composizione del microbiota intestinale del maiale in allevamento o in condizioni sperimentali (Argüello *et al.*, 2019, 2018; Drumo *et al.*, 2016). In assenza di infezione da *Salmonella*, il trasporto sembra esercitare un effetto limitato sul microbiota fecale, e non provoca una evidente modifica della composizione del microbiota.

In conclusione, il nostro studio ha dimostrato che la carica di *Salmonella* aumenta dopo il trasporto, confermando che questa fase della catena di produzione è un punto critico per il controllo della contaminazione da *Salmonella*. In questa fase, un'infezione naturale da *Salmonella* provoca un profondo cambiamento del microbiota fecale, simile a quello osservato in condizioni sperimentali.

BIBLIOGRAFIA

1. Anonymous, 2012. EN ISO 6579-2:2012/A1. Microbiology of Food and Animal Feeding Stuff – Horizontal Method for the Detection of *Salmonella* spp. – Amendment 1: Annex D: Detection of *Salmonella* spp. in Animal Feces and in Environmental Samples from the Primary Production St.
2. Argüello, H., Álvarez-Ordoñez, A., Carvajal, A., Rubio, P., Prieto, M., 2013. Role of slaughtering in *Salmonella* spreading and control in pork production. *J. Food Prot.* 76, 899–911. doi:10.4315/0362-028X.JFP-12-404
3. Argüello, 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 Res. Int.* 45, 905–912. doi:10.1016/j.foodres.2011.04.017
4. Argüello, H., Estellé, J., Leonard, F.C., Crispie, F., Cotter, P.D., O'Sullivan, O., Lynch, H., Walla, K., Duffy, G., Lawlor, P.G., Gardinerh, G.E., 2019. Influence of the Intestinal Microbiota on Colonization Resistance to *Salmonella* and the Shedding Pattern of Naturally Exposed Pigs. *mSystems* 4, 1–14.
5. Argüello, H., Estellé, J., Zaldívar-lópez, S., Jiménez-marín, Á., Carvajal, A., López-bascón, M.A., Crispie, F., Sullivan, O.O., Cotter, P.D., Priego-capote, F., Morera, L., Garrido, J.J., 2018. Early *Salmonella* Typhimurium infection in pigs disrupts Microbiome composition and functionality principally at the ileum mucosa. *Sci. Rep.* 8, 1–12. doi:10.1038/s41598-018-26083-3
6. Bearson, S.M.D., Allen, H.K., Bearson, B.L., Looft, T., Brunelle, B.W., Kich, J.D., Tuggle, C.K., Bayles, D.O., Alt, D., Levine, U.Y., Stanton, T.B., 2013. Profiling the gastrointestinal microbiota in response to *Salmonella*: Low versus high *Salmonella* shedding in the natural porcine host. *Infect. Genet. Evol.* 16, 330–340. doi:10.1016/j.meegid.2013.03.022
7. Berends, B.R., Van Knapen, F., Snijders, J.M.A., Mossel, D.A.A., 1997. Identification and quantification of risk factors regarding *Salmonella* spp. on pork carcasses. *Int. J. Food Microbiol.* 36, 199–206. doi:10.1016/S0168-1605(97)01267-1

8. Bokulich, N.A., Subramanian, S., Faith, J.J., Gevers, D., Gordon, J.I., Knight, R., Mills, D.A., Caporaso, J.G., 2012. Quality-filtering vastly improves diversity estimates from Illumina amplicon sequencing. *Nat. Methods* 10, 57–59. doi:10.1038/nmeth.2276
9. Bonardi, S., Bruini, I., Alpigiani, I., Vismarra, A., Barilli, E., Brindani, F., Morganti, M., Bellotti, P., Bolzoni, L., Pongolini, S., 2016. Influence of pigskin on salmonella contamination of pig carcasses and cutting lines in an italian slaughterhouse. *Ital. J. Food Saf.* 5, 65–68. doi:10.4081/ijfs.2016.5654
10. Borewicz, K.A., Kim, H.B., Singer, R.S., Gebhart, C.J., Sreevatsan, S., Johnson, T., Isaacson, R.E., 2015. Changes in the porcine intestinal microbiome in response to infection with *Salmonella enterica* and *Lawsonia intracellularis*. *PLoS One* 10, 1–16. doi:10.1371/journal.pone.0139106
11. Caporaso, J.G., Kuczynski, J., Stombaugh, J., Bittinger, K., Bushman, F.D., Costello, E.K., Fierer, N., Peña, A.G., Goodrich, J.K., Gordon, J.I., Huttley, G.A., Kelley, S.T., Knights, D., Koenig, J.E., Ley, R.E., Lozupone, C.A., McDonald, D., Muegge, B.D., Pirrung, M., Reeder, J., Sevinsky, J.R., Turnbaugh, P.J., Walters, W.A., Widmann, J., Yatsunencko, T., Zaneveld, J., Knight, R., 2010. QIIME allows analysis of high-throughput community sequencing data. *Nat. Methods* 7, 335–6. doi:10.1038/nmeth.f.303
12. Dore, J., Ehrlich, S.D., Levenez, F., Pelletier, E., Alberti, A., Bertrand, L., Bork, P., Costea, P.I., Sunagawa, S., Guarner, F., Manichanh, C., Santiago, A., Zhao, L., Shen, J., Zhang, C., Versalovic, J., Luna, R.A., Petrosino, J., Yang, H., Li, S., Wang, J., E., A., Gloor, G., Singh, B., IHMS, C., 2015. IHMS_SOP 06 VI: Standard operating procedure for fecal samples DNA extraction, Protocol Q. *Int. Hum. Microbiome Stand.*
13. Drumo, R., Pesciaroli, M., Ruggeri, J., Tarantino, M., Chirullo, B., Pistoia, C., Petrucci, P., Martinelli, N., Moscati, L., Manuali, E., Pavone, S., Picciolini, M., Ammendola, S., Gabai, G., Battistoni, A., Pezzotti, G., Alborali, G.L., Napolioni, V., Pasquali, P., Magistrali, C.F., 2016. *Salmonella enterica* Serovar Typhimurium Exploits Inflammation to Modify Swine Intestinal Microbiota. *Front. Cell. Infect. Microbiol.* 5, 1–13. doi:10.3389/fcimb.2015.00106
14. EFSA, 2019. Scientific report on the European Union One Health 2018 Zoonoses Report. *EFSA J.* 17. doi:10.2903/j.efsa.2019.5926
15. EFSA, 2008. Report of the Task Force on Zoonoses Data Collection on the Analysis of the baseline survey on the prevalence of *Salmonella* in slaughter pigs, in the EU, 2006–2007 - Part A: *Salmonella* prevalence estimates. *EFSA J.* 6, 135r. doi:10.2903/j.efsa.2008.135r
16. Kim, H.B., Isaacson, R.E., 2017. *Salmonella* in Swine: Microbiota Interactions. *Annu. Rev. Anim. Biosci.* 5, 43–63. doi:10.1146/annurev-animal-022516-022834
17. Magistrali, C., Dionisi, A.M., De Curtis, P., Cucco, L., Vischi, O., Scuota, S., Zicavo, A., Pezzotti, G., 2008. Contamination of *Salmonella* spp. in a pig finishing herd, from the arrival of the animals to the slaughterhouse. *Res. Vet. Sci.* 85, 204–207. doi:10.1016/j.rvsc.2007.12.002
18. McMurdie, P.J., Holmes, S., 2013. Phyloseq: An R Package for Reproducible Interactive Analysis and Graphics of Microbiome Census Data. *PLoS One* 8, e61217.
19. Oksanen, J., 2015. Multivariate analysis of ecological communities in R: vegan tutorial. *R Doc.* 1–43. doi:10.1016/0169-5347(88)90124-3
20. Paulson, J.N., Stine, O.C., Bravo, H.C., Pop, M., 2013. Differential abundance analysis for microbial marker-gene surveys. *Nat. Methods.*
21. Pesciaroli, M., Cucco, L., De Luca, S., Massacci, F.R., Maresca, C., Medici, L., Paniccià, M., Scoccia, E., Staffolani, M., Pezzotti, G., Magistrali, C.F., 2017. Association between pigs with high caecal *Salmonella* loads and carcass contamination. *Int. J. Food Microbiol.* 242, 82–86. doi:10.1016/j.ijfoodmicro.2016.11.021
22. Rideout, J.R., He, Y., Navas-Molina, J.A., Walters, W.A., Ursell, L.K., Gibbons, S.M., Chase,

- J., McDonald, D., Gonzalez, A., Robbins-Pianka, A., Clemente, J.C., Gilbert, J.A., Huse, S.M., Zhou, H.-W., Knight, R., Caporaso, J.G., 2014. Subsampled open-reference clustering creates consistent, comprehensive OTU definitions and scales to billions of sequences. *PeerJ* 2, e545. doi:10.7717/peerj.545
23. Snary, E.L., Swart, A.N., Simons, R.R.L., Domingues, A.R.C., Vigre, H., Evers, E.G., Hald, T., Hill, A.A., 2016. A Quantitative Microbiological Risk Assessment for Salmonella in Pigs for the European Union. *Risk Anal.* 36, 437–449. doi:10.1111/risa.12586
 24. TeamCore, 2018. R: A language and environment for statistical computing. R Found. Stat. Comput. Vienna, Austria.
 25. Van Hoek, A.H.A.M., de Jonge, R., van Overbeek, W.M., Bouw, E., Pielaat, A., Smid, J.H., Malorny, B., Junker, E., Löfström, C., Pedersen, K., Aarts, H.J.M., Heres, L., 2012. A quantitative approach towards a better understanding of the dynamics of Salmonella spp. in a pork slaughter-line. *Int. J. Food Microbiol.* 153, 45–52. doi:10.1016/j.ijfoodmicro.2011.10.013
 26. WHO, 2007. White-Kauffman-Le Minor Scheme “Antigenic formulae of the Salmonella serovars- WHO Collaborating Centre for Reference and Research on Salmonella,” 9th editio. ed.
 27. Zou, Y., Hu, X.M., Zhang, T., Wei, H.K., Zhou, Y.F., Zhou, Z.X., Peng, J., 2017. Effects of dietary oregano essential oil and vitamin E supplementation on meat quality, stress response and intestinal morphology in pigs following transport stress. *J. Vet. Med. Sci.* 79, 328–335. doi:10.1292/jvms.16-0576