

Detección de *Salmonella* en heces durante el engorde de broilers

C. MARÍN ^{1*} y M. LÁINEZ ¹

¹Centro de Tecnología Animal. Instituto Valenciano de Investigaciones Agrarias, Polígono la Esperanza N.100, 12400, Segorbe, Castellón, Spain

* e-mail: marin_cla@gva.es

RESUMEN

Uno de los aspectos más importantes en los programas de control de *Salmonella* llevados a cabo por los organismos oficiales, así como por parte de las empresas avícolas es conocer el tipo de muestra y el momento de muestreo óptimos para detectar el estatus del lote con la mayor sensibilidad. Los principales objetivos de este trabajo fueron: (i) evaluar la detección de *Salmonella* en heces durante todo el ciclo productivo, y (ii) conocer los principales serotipos de *Salmonella* relacionados con la avicultura de engorde a nivel de granja.

Durante este estudio fueron analizados un total de 65 lotes de broilers desde el primer día hasta la salida a matadero. Semanalmente se recogieron muestras de heces con 5 pares de calzas en cada una de las naves (CE, 2005). Todas las muestras fueron analizadas según la norma ISO 6579:2002 (Anexo D) y las cepas de *Salmonella* aisladas fueron serotipadas en el Laboratorio Central de Veterinaria del MARM (Algete, Madrid) según el esquema Kauffman-White-Le-Minor. Los resultados demuestran que independientemente de si los lotes llegan excretando la bacteria en heces o se infectan a nivel de granja, ambos grupos describen el mismo patrón de detección en heces, con máxima detección a los 14 días de vida (50,5% y 34,5%, respectivamente). Además, *S. Enteritidis* fue el serotipo más prevalente aislado durante el engorde (66,7%), seguido por *S. Virchow* (13,7%), *S. Hadar* (9,4%) y *S. Ohio* (2,8%).

Palabras clave: *Salmonella*; broilers; engorde; detección; serotipos

Detection of Salmonella in droppings of fattening broilers

SUMMARY

One of the most important aspects in Salmonella surveillance and monitoring programmes are the type of sample and the time of sampling to determine the flock status with the highest sensitivity. The main objectives of this study were (i) to assess Salmonella detection from faeces samples during rearing, and (ii) determine the main serotypes involved in broiler production system. During this study, 65 flocks were sampled at weekly intervals from first day of rearing until slaughter. Samples of faeces were taken from the litter using five pairs of cellulose sock swabs attached to boots and applied over the length of the house (EC, 2005). All samples were analyzed in accordance with ISO 6579:2002 (Annex D) and the strains isolated were serotyped by the Ministry of Environment and Rural and Marine Affairs Official Laboratory.

Results showed that regardless of whether broiler flocks arrived at the farm already shedding the bacteria in faeces, or were infected at farm level, both groups described the same detection pattern, with the highest detection in faeces at 14th day of rearing. Moreover, S. Enteritidis was the most prevalent serotype isolated during rearing (66.7%), followed by S. Virchow (13.7%), S. Hadar (9.4%) and S. Ohio (2.8%).

Keywords: *Salmonella*; broilers; fattening; detection; serotypes

INTRODUCCIÓN

El consumo de productos avícolas contaminados con *S. enterica* es una de las fuentes más comunes gastroenteritis en humana (EFSA, 2009). La contaminación de los broilers, puede suceder a lo largo de todo el ciclo productivo. Por lo tanto, es fundamental instaurar métodos de control de *Salmonella* eficaces a lo largo de la cadena productiva (Heyndrickx *et al.*, 2002).

La vacunación y las medidas de higiene han reducido considerablemente la transmisión de la infección desde los lotes parentales (Van Immerseel *et al.*, 2004). Sin embargo, en las granjas de engorde, dos de los mayores problemas son las naves que permanecen contaminadas con la bacteria tras la limpieza y desinfección y los lotes de pollitos de un día que llegan infectados a las explotaciones (Rose *et al.*, 2000; Davies and Breslin, 2003; Marin *et al.*, 2009).

En este contexto, dos de los aspectos más importantes en los estudios de monitorización y control de *Salmonella* son el tipo de muestra y el momento de muestreo para determinar el estatus del lote con la mayor sensibilidad (Heyndrickx *et al.*, 2002; Carrique-Mas and Davies, 2008). Ambos aspectos tienen que considerarse en los programas de control basados en el análisis de muestras fecales (Heyndrickx *et al.*, 2002; Buhr *et al.*, 2007). En diferentes estudios de investigación se han usado los hisopos cloacales para monitorizar el estatus de los pollos (Van Immerseel *et al.*, 2004). Sin embargo, la excreción de *Salmonella* es intermitente y hay que tener cuidado con esta técnica, porque pueden darse falsos negativos (Van Immerseel *et al.*, 2004). Scherer *et al.* (2008) usaron técnicas serológicas para detectar *Salmonella* en lotes de cerdos. Sin embargo, estos métodos indican exposición y no pueden diferenciar entre lotes que excretan *Salmonella* o aquellos expuestos a la bacteria (Lo Fo Wong *et al.*, 2003). Estudios previos demuestran que la recogida de heces directamente de la cama utilizando calzas de celulosa proporciona la mayor sensibilidad a la hora de determinar el estatus del lote para *Salmonella* durante el ciclo productivo (Buhr *et al.*, 2007).

Los objetivos de este estudio fueron (i) evaluar la detección de *Salmonella* en heces durante todo el ciclo productivo, y (ii) conocer los principales serotipos de *Salmonella* relacionados con la avicultura de engorde a nivel de granja.

MATERIAL Y MÉTODOS

Durante dos años se muestrearon un total de 65 lotes pertenecientes a 5 empresas avícolas de la Comunidad Valenciana.

Cada lote se muestreó semanalmente, desde la entrada de los pollitos de un día hasta su salida a matadero. Para determinar el estatus de los pollitos de un día se recogieron un total de 250-300 meconios y 10 fondos de caja por lote. Durante 6 semanas (día 7, 14, 21, 28, 35 y 42 de vida), se recogieron muestras de heces directamente de la cama con 5 pares de calzas (EC, 2005). Para la recogida de las heces, se dividió la nave en 5 partes iguales, y se caminó sobre cada una de estas secciones con un par de calzas diferentes. Posteriormente, cada par de calzas se analizaría como una muestra individual.

Todas las muestras recogidas fueron analizadas según la norma ISO 6579:2002 (Anexo D). En primer lugar, se realizó un preenriquecimiento de las muestras en agua de peptona tamponada (dilución 1:10 v/v) y se incubaron a $37^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$ durante $18 \pm 2\text{h}$. Posteriormente se transfirieron 0.1mL de la muestra preenriquecida, en tres gotas, a una placa de Rappaport Vassiliadis semisólido modificado, que se incubó a $41.5^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$ durante $24/48 \pm 2\text{h}$. En las placas sospechosas se observaron halos de aproximadamente 2cm en los puntos de inoculación de la muestra.

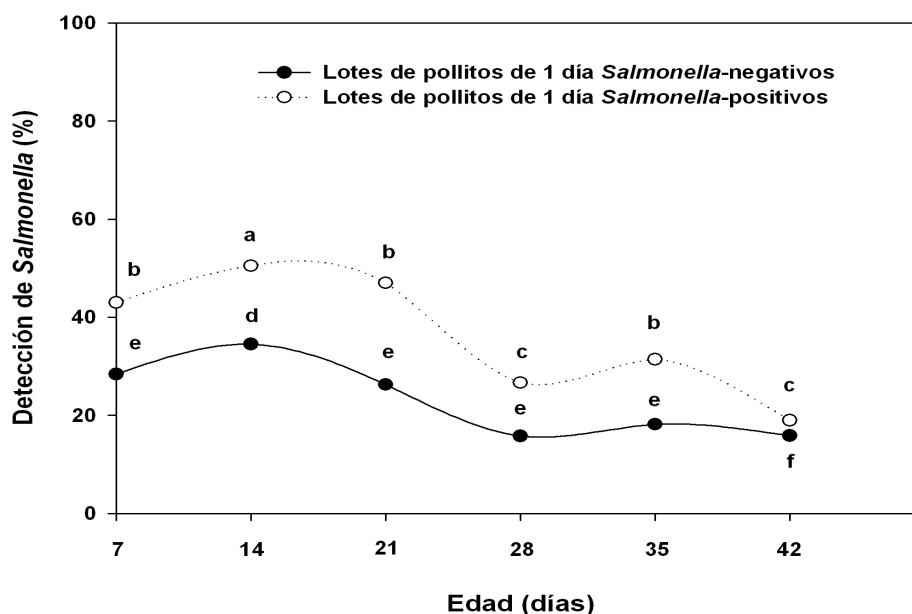
El cultivo obtenido se transfirió a dos medios diferentes, XLD (Xilose-lysine-desoxicolato) y XLT4 (Xylose-lysine-tergitol-4). Tras el periodo de incubación, se seleccionaron 5 colonias sospechosas, que se hicieron crecer en agar Nutritivo ($37^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$ durante $24/48 \pm 2\text{h}$), para su posterior confirmación bioquímica con el test API-20E. Todas las cepas aisladas de *Salmonella* se enviaron para serotipar al Laboratorio Central de Veterinaria del MARM (Algete, Madrid) según el esquema Kauffman-White-Le-Minor.

Para realizar el análisis estadístico, los lotes se dividieron en dos grupos, según si llegaban a la explotación infectados con la bacteria o no. La detección de *Salmonella* de acuerdo con el momento de muestreo se comparó utilizando un test Chi-cuadrado para cada uno de los dos grupos (Infectados o libres a día 1), (Statgraphics Plus, Version 5.1, STSC Inc., Rockville, MD, USA).

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

El primer día del ciclo productivo 20 lotes de pollitos de un día llegaron positivos a la explotación y 45 negativos. La detección de *Salmonella* de acuerdo con el estatus de los lotes de un día (infectados o libres) y el momento de recogida de la muestra (día 7, 14, 21, 28, 35 y 42) fue estadísticamente significativo ($P \leq 0,05$). Independientemente de si los lotes llegaban infectados desde la incubadora o se infectaban en la explotación, no se encontraron diferencias significativas en la detección de la bacteria. Como se puede observar en la **Figura 1**, en ambos grupos, la detección de *Salmonella* aumenta durante las tres primeras semanas de vida, con un máximo el día 14. Posteriormente disminuye a partir del día 28. Al final del ciclo productivo el porcentaje de detección fue similar, alrededor del 17,4%.

Figura 1. Porcentaje de muestras de heces positivas a *Salmonella* en cada lote positivo durante el ciclo productivo.



^{a-c} Superíndices diferentes en la curva para lotes de pollitos de un día positivos a *Salmonella* indican diferencias significativas ($P \leq 0,05$)

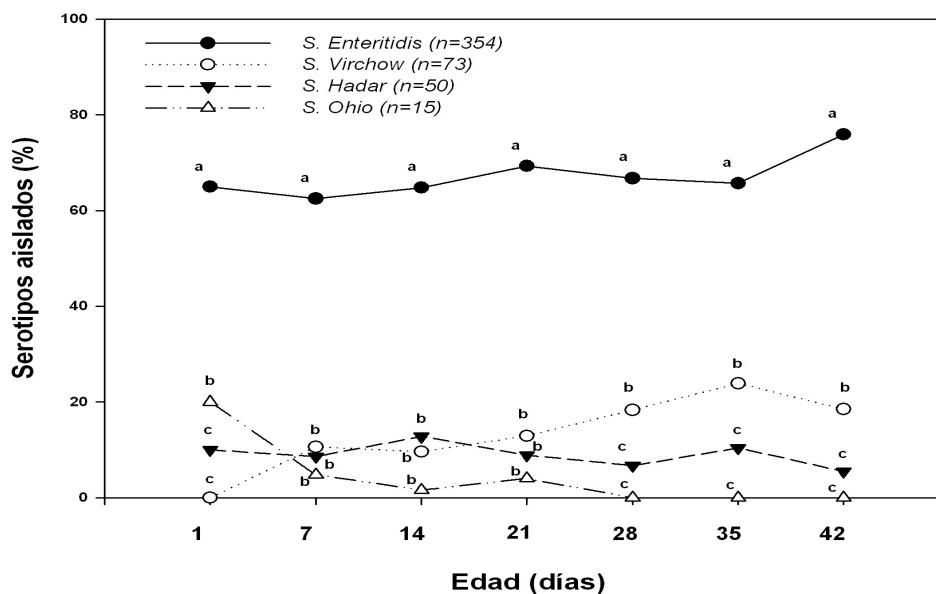
^{d-f} Superíndices diferentes en la curva para lotes de pollitos de un día negativos a *Salmonella* indican diferencias significativas ($P \leq 0,05$).

Este patrón de detección puede explicarse porque la máxima excreción de *Salmonella* en heces ocurre alrededor de las dos semanas de vida, coincidiendo con un sistema inmune inmaduro del ave (Bernd *et al.*, 2004; Van Immerseel *et al.*, 2004). Sin embargo en los lotes que entran positivos en la explotación podemos observar que existe un pico de detección de *Salmonella* a día 35. Varias hipótesis explicarían este hecho. Por un lado, la retirada de coccidiostáticos de los piensos alrededor del día 35, produciría una disbiosis intestinal en el pollo capaz de inducir un incremento en la excreción de *Salmonella* en heces. Por otro lado, dicho incremento también podría venir explicado por el estrés sufrido por las aves durante la práctica de clareo. Según Mulder, (1995) y Corry *et al.* (2002), el clareo induce a los lotes portadores a excretar la bacteria a elevadas concentraciones, incrementando así la detección de *Salmonella*. Sin embargo, no podemos confirmar esta hipótesis ya que el 90% de las explotaciones estudiadas realizaron clareo y no es posible realizar una comparación estadística. Por todas estas razones, evaluar el estatus del lote las tres últimas semanas antes del sacrificio puede infravalorar la prevalencia de *Salmonella* en avicultura de engorde. Probablemente, alrededor de las dos semanas de vida, sería el momento óptimo para detectar si el lote está infectado con *Salmonella*. Además, cuando más pronto se detecte la positividad del lote, menores serán los gastos económicos derivados de la aplicación de las medidas de control y erradicación de *Salmonella*, como por ejemplo el sacrificio de lotes positivos.

Durante el ciclo productivo, se aislaron un total de 531 cepas de *Salmonella*, correspondientes a 15 serotipos diferentes. Los serotipos más prevalentes (92,6% de las muestras positivas) fueron en orden decreciente: *S. Enteritidis* (66,7%), *S. Virchow* (13,7%), *S. Hadar* (9,4%) y *S. Ohio* (2,8%). Como se puede observar en la **Figura 2**, la detección de *S. Enteritidis* en heces se mantuvo constante durante todo el engorde de los animales y a un porcentaje muy elevado. La detección de *S. Hadar* también fue constante durante todo el ciclo productivo, aunque en porcentaje menor. En el caso de *S. Virchow*, es un serotipo que no se aisló de los pollitos de un día, sin embargo, posteriormente su aislamiento fue aumentando progresivamente hasta ser el segundo serotipo más prevalente al final del ciclo productivo. Por otro lado, *S. Ohio*, que al principio del ciclo productivo fue el segundo serotipo más prevalente, fue disminuyendo hasta detenerse su detección a partir del día 28.

Figura 2. Porcentaje de cepas de *Salmonella* aisladas a partir de muestras de heces durante el ciclo productivo

^{a-c} Superíndices diferentes indican diferencias significativas ($P \leq 0,05$)



Como se puede observar, el patrón de aparición de serotipos a lo largo del ciclo productivo es muy variable y existe un gran desconocimiento relacionado con la identidad y movimientos de determinados serotipos durante el ciclo productivo (Bailey *et al.*, 2002). Sin embargo, la reciente adquisición de factores de virulencia, en combinación con los existentes mecanismos de invasión y patogenicidad, pueden contribuir al desarrollo de la infección sistémica con *S. Enteritidis* y su consecuente prevalencia en producción avícola (Carramiñana *et al.*, 1997).

En conclusión, independientemente de si los lotes llegan a la explotación positivos a *Salmonella* o se contaminan durante el ciclo productivo, la máxima detección en heces se produce el día 14 de vida. Los serotipos más prevalentes relacionados con avicultura de engorde son *S. Enteritidis*, *S. Virchow*, *S. Hadar* y *S. Ohio*.

REFERENCIAS

- BAILEY, J., STERN, N., FEDORKA-CRAY, P., CRAVEN, S., COX, N., COSBY, D., LADELY S., and MUSGROVE, M. (2001).** Sources and movement of *Salmonella* through integrated poultry operations: A multistate epidemiological investigation. *J. Food Prot.* 64: 1690-1697.
- BERNDT, A. and METHNER, U. (2004).** B cell and macrophage response in chicks after oral administration of *Salmonella typhimurium* strains. *Comp. Immunol. Microbiol. Infect. Dis.* 27:235-246.
- BUHR, R., RICHARDSON, L., CASON, J., COX, N. and FAIRCHILD, B. (2007).** Comparison of four sampling methods for the detection of *Salmonella* in broiler litter. *Poult. Sci.* 86:21-25.
- CARRAMIÑANA, J., YANGÜELA, J., BLANCO, D., ROTA, C., AGUSTIN, A., ARIÑO, A. and HERRERA, A. (1997).** *Salmonella* incidence and distribution of serotypes throughout processing in a Spanish poultry slaughterhouse. *J. Food Prot.* 60:1312-1317.
- CARRIQUE-MAS, J.J. and DAVIES, R.H. (2008).** Sampling and bacteriological detection of *Salmonella* in poultry and poultry premises: a review.
- CE (European Commission).** 2005. Baseline Survey on the Prevalence of *Salmonella* in Broiler Flocks of *Gallus gallus* in the EU. Technical specifications. Rev.1. Working document (15/07/05). http://ec.europa.eu/food/food/biosafety/Salmonella/impl_reg_en.print.htm. Accessed Aug. 2005.
- CORRY, J., ALLEN, V., HUDSON, W., BRESLIN, M. and DAVIES, R.H. (2002).** Sources of *Salmonella* on broiler carcasses during transportation and processing: modes of contamination and methods of control. *J. Appl. Microbiol.* 92:424-432.
- DAVIES, R. H., and BRESLIN, M. (2003).** Observations on *Salmonella* contamination of commercial laying farms before and after cleaning and disinfection. *Vet. Rec.* 152:283-287.
- EFSA (European Food Safety Authority) (2009).** The community summary report on trends and sources of zoonoses and zoonotic agents in the European Union in 2007. *The EFSA Journal.* 223.
- HEYNDRIKX, M., VANDEKERCHOVE, D., HERMAN, L., ROLLIER, I., GRIJSPEERDT, K. and ZUTTER, L. (2002).** Routes for *Salmonella* contamination of poultry meat: epidemiological study from hatchery to slaughterhouse. *Epidemiol. Infect.* 129:253-265.
- ISO 6579:2002 (Annex D) 2002.** Microbiology of food and animal feeding stuffs. Horizontal method for the detection of *Salmonella* spp. International Organization for Standardization, Genève, Switzerland.
- LO FO WONG, D., DAHL, J., VAN DER WOLF, P., WINGSTRAND, A., LEONTIDES L. and VON ALTROCK, A. (2003).** Recovery of *Salmonella enterica* from seropositive finishing pig herds. *Vet. Microbiol.* 97:201-214.
- MARIN, C., HERNANDIZ, A. and LAINEZ, M. (2009).** Biofilm development capacity of *Salmonella* strains isolated in poultry risk factors and their resistance against disinfectants. *Poult. Sci.* 88 :424-431.
- MULDER, R.W.A.W. (1995).** Impact of transport and related stresses on the incidence and extent of human pathogens in pigmeat and poultry. *J. Food. Safety.* 15:239-246.

ROSE, N., BEAUDEAU, F., DROUIN, P., TOUX, J. Y., ROSE, V. and COLIN, P. (2000). Risk factors for *Salmonella* persistence after cleansing and disinfection in French broiler-chicken houses. *Prev. Vet. Med.* 44:9-20.

SCHERER, K., SZABO, I., ROSLER, U., APPEL, B., HENSEL, A. and NOCKLER, K. (2008). Time course of infection with *Salmonella* Typhimurium and its influence on fecal shedding, distribution in inner organs, and antibody response in fattening pigs. *J. Food Prot.* 71: 699-705.

VAN IMMERSEEL, F., MEULEMANS, G., DE BUCK, J., PASMANS, F., CELGE, P., BOTTREAU, E., HAESEBROUCK, F. and DUCATELLE, R. (2004). Bacteria host interactions of *Salmonella* Paratyphi B dT+ in poultry. *Epidemiol. Infect.* 132:239-243.