

# SALMONELLA

## MÉTODOS DE DETECCIÓN

**Douglas Waltman, PhD**

*Georgia Poultry Laboratory Network*



Las contaminaciones con salmonela pueden ser una seria amenaza tanto para las aves como para la salud pública en humanos.

Cualquiera que sea la estrategia de intervención para el control, reducción o erradicación, el esfuerzo debe comenzar siempre por la **detección de *Salmonella*** y por ello los métodos de detección deben ser **sensibles y confiables**.

## SALMONELLA PULLORUM (SP) & S. GALLINARUM (SG)

Las metodologías de detección varían dependiendo de la especie bacteriana que se desee detectar.

- ➔ Por ejemplo, se siguen **estrategias al menos un poco diferentes** para la detección de *S. gallinarum* (SG), *S. pullorum* (SP) y **Salmonellas móviles** (entre ellas, *S. enteritidis* (SE), *S. typhimurium* (ST), *S. hadar*, *S. heidelberg*, *S. virchow*, *S. infantis*, *S. kentucky* y otras.
- ➔ **El tipo de muestra también varía** dependiendo de la especie de bacteria a detectar.
- ➔ Es mejor buscar ciertas especies de bacterias en el **medio ambiente** (SE por ejemplo), en las **plantas de proceso** (*S. kentucky*) o en las aves mismas (SG y SP).

Estas dos especies son específicas de especie y son microorganismos patógenos para las aves. Ambas pueden ser devastadoras para la industria avícola, de manera que la detección de estos microorganismos es crítica.

El enfoque con ambos tipos de bacterias debe ser siempre la **búsqueda en las aves mismas, ya sea en los reproductores o en la progenie.**

Tanto SG como SP pueden causar infecciones sistémicas, de manera que las muestras para cultivo deben incluir:

- ➔ ÓRGANOS INTERNOS
- ➔ EL TRACTO REPRODUCTIVO
- ➔ EL TRACTO INTESTINAL

Es común que los órganos y tejidos que representan cada uno de estos sistemas sean agrupados para el cultivo en “pooles” de órganos por cada ave.

Antes de retirar los tejidos para preparar pooles de órganos por separado se debe **inocular directamente agar sangre** o algún **otro medio no selectivo** junto con agar MacConkey (MAC) a partir de cualquier órgano que muestre lesiones macroscópicas.

Se incuban entonces los cultivos a una temperatura de **37 °C por 24 horas**, observando el crecimiento bacteriano.

- ➔ Si al cabo de **24 horas no hay colonias sospechosas** debe incubarse la muestra durante **24 horas adicionales** antes de descartar la muestra.
- ➔ La mayoría de los protocolos para aislamiento requiere el enriquecimiento con **caldos tetracionato incubado a 37°C**.

SG y SP **no son tan tolerantes a altas temperaturas** como otras especies de salmonella. Por ello, no deben ser cultivadas a 42°C durante las primeras 24 horas antes de ser inculadas en placas de medio de cultivo ligeramente selectivo. En contraposición, en los cultivos de Salmonellas móviles, la incubación se realiza a 42°C en estas primeras 24 horas.



Al mismo tiempo se hacen **siembras directas sobre medios selectivos**, como verde brillante suplementado con novobiocina (BGN). **A este medio se le conoce comúnmente como BGN.**

Si además están buscando otras especies de salmonella como *S. enteritidis* (SE), en ese caso debe adicionarse cultivos en placas de agar XLT4 (Xilosa, Lisina, Tergitol).



Se incuban entonces las placas por **24 horas**

Se observan los cultivos para **detectar colonias de bacterias** sospechosas, considerando que estas bacterias crecen mucho más lentamente que otras especies de salmonela



Es importante **incubar las placas por 48 horas** antes de poder considerar los cultivos como negativos

**48h**



- ➔ Se **seleccionan** entonces colonias sospechosas y se **inoculan** en agar TSI/LIA, bien puede usarse alguna otra metodología para hacer una detección rápida de salmonela.

Debe recordarse que estos serotipos no reaccionan químicamente como cualquier otra salmonela.

Muy comúnmente estas bacterias son negativas en la producción de ácido sulfhídrico (H<sub>2</sub>S) en agar TSI, además de que no son móviles.



## OTROS SEROTIPOS

En términos generales cualquier otro serotipo de Salmonella que no sea ni SG ni SP generalmente **no será patogénico para aves comerciales.**



Habrán circunstancias en las que un lote de aves pueda estar inmunodeprimido o también puede haber algún aislado de salmonella móvil que sea demasiado virulento y que esté afectando a las aves; sin embargo esto no es la norma pues **muy escasas veces producirán enfermedad en aves las Salmonellas móviles, a excepción de SE**, que puede causar alta mortalidad con septicemia en pollitos recién nacidos.

**La determinación del serogrupo es un paso crítico en la evaluación preliminar de las colonias sospechosas.**

Una bacteria que pertenezca al serogrupo D1 y que no sea móvil debe ser motivo de gran preocupación y debe ser identificada rápidamente utilizando pruebas bioquímicas y serológicas para confirmar o descartar la posibilidad de que se trate de SG o SP.

Existen algunos protocolos para el **pre-enriquecimiento utilizando agua peptonada amortiguada (bufferada) (BPW)** pero también puede utilizarse algún otro tipo de caldo no selectivo.

En nuestro laboratorio hemos hecho estudios de efectividad utilizando un aislado de SP y dos aislados derivados de aves del traspatio.

**En estos casos no reconocimos ninguna ventaja en la utilización del medio de enriquecimiento en caldo tetrionato.**

**Con la salmonelas móviles el enfoque debe ser la preocupación por la salud pública.**

El propósito en este caso es **monitorear y detectar** salmonella de manera que puedan aplicarse medidas de intervención y otros controles para reducir los niveles de salmonella que ulteriormente podrán reducir la carga de salmonella y el riesgo para salud pública, disminuyendo así la incidencia de infecciones gastrointestinales causadas por Salmonella.

Dado que estos serotipos móviles de salmonella **colonizan más frecuentemente el tracto intestinal** y generalmente **no causan infecciones sistémicas**, por ser invasivas para el tracto intestinal tienden a ser **diseminadas** en el medio ambiente **con facilidad.**

Es factible detectar Salmonellas móviles en el medio ambiente utilizando como muestras gasas aplicadas directamente a las botas, o bien muestras de polvo de los galpones

## MUESTRAS DE GRANJAS Y DE INCUBADORAS

Un buen programa de monitoreo incluye el muestreo en la granja como en la incubadora (plumón, residuo de incubación, papel de las cajas de pollitos, etc.).

Estas muestras son un **poco desafiantes técnicamente** puesto que contienen una gran cantidad de

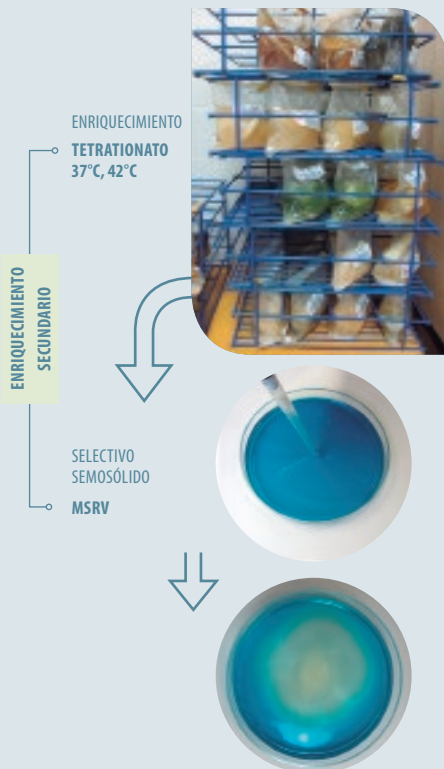
material orgánico y muchas otras bacterias que dificultan el cultivo y detección de Salmonella.

Los **protocolos de aislamiento** para Salmonella a partir de estos tipos de muestras se manejan bajo dos diferentes formatos.

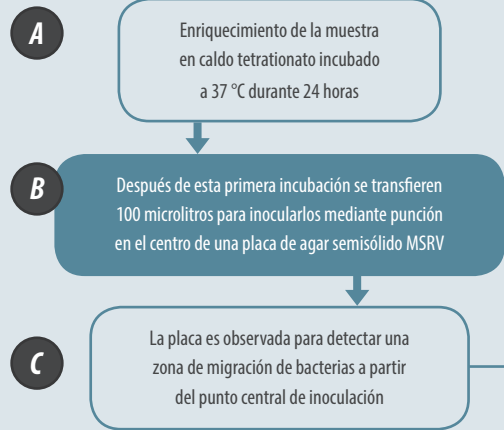
1

### Enriquecimiento en tetracionato, seguido de enriquecimiento en MSRV (Modified Semisolid Rapaport Vassiliadis)

<http://www.poultryimprovement.org/documents/ProgramStandardsAugust2014.pdf>



El método aprobado actualmente por parte del Programa Nacional de Mejoramiento Avícola (NPIP) consiste en:

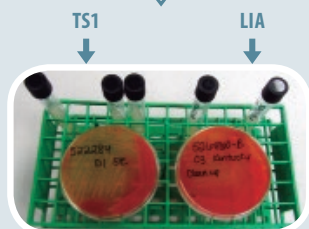
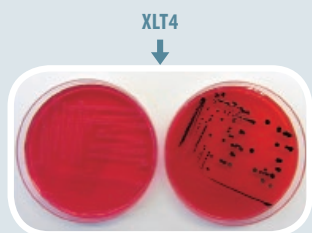


**Figura 1.** Cultivo de enriquecimiento en caldo tetracionato y transferencia a medio selectivo semisólido MSRV.

Se inocula el agar semisólido mediante punción en el centro de la placa y se incuba el cultivo esperando que se produzca un halo de crecimiento alrededor de la zona de inoculación.

Se obtiene una muestra con un asa bacteriológica a partir del perímetro del aló de crecimiento para inocular con ella otros medios de cultivo (TSI/LIA, XLT4 y BGN), como se observa en la Figura 2.

- ➔ Si llega a observarse un halo de crecimiento (en el agar semisólido) alrededor del punto de inoculación entonces se inserta un asa bacteriológica en la periferia de esta zona de crecimiento para luego inocularla sobre agares BGN y XLT4 (ver Figura 2)
- ➔ Si por el contrario no se observa una zona de crecimiento a las 24 horas de incubación entonces la placa es incubada nuevamente durante 24 horas más también a 42 °C ➔



SEROGRUPACIÓN

**D**

Después de 48 horas de incubación, si acaso existe una zona de migración, se inserta un asa bacteriológica en la periferia de la zona de crecimiento en el agar MSRVR para luego inocular con el asa agares BGN y XLT4

**E**

Estos dos agares son incubados a 37°C durante 24 horas

**F**

Las placas son observadas buscando detectar colonias sospechosas de Salmonella

**G**

Se seleccionan entonces de tres a cinco colonias sospechosas para ser examinadas y determinar si se trata de Salmonella

Típicamente esto requiere la inoculación de muestras de estas colonias en medios TSI y LIA.

Después de la incubación por 24 horas a 37 °C se determina si los cultivos presentan reacciones típicas o atípicas y la identidad se confirma utilizando pruebas serológicas y bioquímicas.

Se pueden utilizar otras placas de agar selectivo siempre y cuando sean equivalentes a las descritas o aún mejores. Hay otras maneras de examinar los cultivos además de los medios TSI/LIA, siempre y cuando los métodos alternativos no comprometan la sensibilidad del sistema.

**Figura 2.** Crecimiento de Salmonella en agar XLT4 (observar las colonias negras debido a la producción de H<sub>2</sub>S).

Los aislados son inoculados en TSI/LIA para la confirmación de Salmonella y de ahí se inocula un medio neutro no selectivo (fotografía inferior derecha) para entonces hacer pruebas serológicas y determinar el serogrupo de Salmonella.

SG, SP y SE pertenecen al serogrupo D. ST pertenece al serogrupo B.

### Pre-enriquecimiento en agua peptonada, seguido de enriquecimiento en caldo tetrionato (TT), Rapaport Vassiliadis (RV) y/o en MSRV

Otro método común involucra el pre-enriquecimiento de la muestra en agua peptonada incubada a 37 °C durante 24 horas para después transferir la muestra a uno o más medios de enriquecimiento selectivos.

Puede transferirse 1 ml del cultivo enriquecido hacia tetrionato (TT) y/o 100 µl transferidos a RV o MSRV.

Existen varios protocolos con base en el siguiente esquema:

NPIP	BPW	TT & RV o MSRV
<a href="http://www.poultryimprovement.org/documents/ProgramStandardsAugust2014.pdf">http://www.poultryimprovement.org/documents/ProgramStandardsAugust2014.pdf</a>		
ISO 6579:2002	BPW	TT & RV
ISO 6579:2002 (Annex D)	BPW	MSRV
NMKL-71	BPW	RV
FDA	BPW	TT & RV
<a href="http://www.fda.gov/Food/FoodScienceResearch/LaboratoryMethods/ucm114716.htm">http://www.fda.gov/Food/FoodScienceResearch/LaboratoryMethods/ucm114716.htm</a>		
USDA/FSIS	BPW	TT & RV
<a href="http://www.fsis.usda.gov/wps/portal/fsis/topics/science/laboratories-and-procedures/guidebooks-and-methods/microbiology-laboratory-guidebook/microbiology-laboratory-guidebook">http://www.fsis.usda.gov/wps/portal/fsis/topics/science/laboratories-and-procedures/guidebooks-and-methods/microbiology-laboratory-guidebook/microbiology-laboratory-guidebook</a>		

Investigaciones hechas en nuestro laboratorio utilizando el método de transferencia de agua peptonada a TT y RV han revelado que hay una merma en la sensibilidad con este método, mientras que el subcultivo de agua peptonada a MSRV es apenas ligeramente menos sensible que el método en el que se transfiere de TT a MSRV

*El Dr. Waltman es Director Técnico del Departamento de Bacteriología de la Red de Laboratorios Avícolas del Estado de Georgia (GPLN); Gerente de Apoyo Técnico y Logístico de GPLN; y Representante Regional de NPIP (Programa Nacional de Mejoramiento Avícola).*

## MUESTREOS EN LAS PLANTAS DE PROCESO

En los Estados Unidos se utiliza actualmente un método de cultivo a partir de **enuagues de carcasas de pollo completas**. Muy recientemente se ha introducido metodología que requiere la inclusión de **partes de pollo molidas**.

El método del Departamento de Agricultura de los Estados Unidos (USDA) a través del Servicio de Inspección e Inocuidad de Alimentos (FSIS) consiste en **pre-enriquecer la muestra en agua peptonada seguido de enriquecimiento en caldo TT y RV**.

## MUESTREOS DE HUEVOS

En los Estados Unidos la FDA ha establecido requerimientos para pollas en crecimiento y para ponedoras comerciales. El **medio ambiente de los galpones** debe ser muestreado a las **16 semanas y después entre las 40 y 45 semanas** de edad para buscar específicamente *Salmonella enteritidis*.

Si esta **bacteria llega a detectarse** deberán ser enviados al laboratorio **1000 huevos para ser sometidos a pruebas bacteriológicas** con el objeto de buscar *Salmonella enteritidis*.

Un número equivalente de huevos es muestreado cada dos semanas en cuatro ocasiones diferentes.

Si los huevos resultaran **negativos** durante los cuatro muestreos entonces el lote de aves vuelve a incluirse bajo la categoría de "**Libre de Salmonella**".

Si alguno de los grupos de huevos resultara **positivo a *Salmonella enteritidis***, entonces existen **dos alternativas**:

- A** El lote puede ser destruido
- B** Los huevos tendrán que ser redirigidos a la planta de pasteurización para venta como huevo pasteurizado en forma líquida o deshidratada, pero ya no podrán ser vendidos como huevos en cáscara

*La FDA ha establecido metodologías como ésta pero también ha otorgado equivalencia a otras metodologías similares.*

# el auténtico

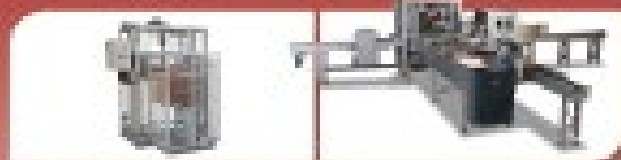


## Automatización para incubadora

También tenemos embaladoras  
de huevos fértiles y de consumo



Controlador huevos M45  
20/300/1 hora  
Tipo Anagradeo con 2  
ensaladoras, Drogas  
y célula de pesaje con  
cargador automático o  
directamente de grapa



Cargador de correa de  
entrada M45/30/425/30

Traspaso de huevos de 30 hacia cada  
una de 40 incubadoras de incubación

**PC&T & V - Luis Prinzen**  
Representante productos P&H ZEIN  
Control y Sudamérica

✉ [luisc@prinzen.com](mailto:luisc@prinzen.com)  
☎ +51-011 455-258 267  
[www.prinzen.com](http://www.prinzen.com)

**Prinzen**

**PC&T**  
Representantes de Sales S.A.

Edificio 17  
Calle 14 de Agosto - San Bernardino