

Salmonella sp. en cama de aves

Dante J. Bueno^a, Mario A. Soria^a, Guillermo Genta^b, Francisco Procura^{ac}, Francisco I. Rodríguez^{ac}

^a INTA Estación Experimental Agropecuaria Concepción del Uruguay

^b Actividad privada

^c Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Técnicas (CONICET), Argentina

Resumen

La cama es uno de los principales residuos generados en la producción intensiva de aves. Aunque el mismo ha sido aplicado durante siglos a las tierras para aumentar la producción de cultivos, la aplicación de cama directamente en el campo puede dar lugar a potenciales problemas de salud ambiental y humana como fuentes de residuos químicos (productos farmacéuticos veterinarios), y microbiológicos (parásitos, virus y bacterias). *Salmonella* sp. es un género de bacterias distribuido en la naturaleza, que es responsable de una variedad de enfermedades agudas y crónicas en las aves, causando significativas pérdidas económicas en diferentes países. Además, constituye una de las causas más importantes de enfermedades de transmisión alimentaria (ETAs) al humano a nivel mundial, debido su ubiquidad y habilidad de adaptación sobre cualquier huésped. La cama es un reservorio de *Salmonella* sp., cuyo origen pueden ser las mismas aves o los vectores que permanecen en la instalación durante el período de vacío sanitario. La población de *Salmonella* sp. en la cama está correlacionada positivamente con la población de esta bacteria en heces de aves, lo que demuestra que el muestreo de la cama es un buen indicador del estado microbiológico de las heces. La prevalencia de *Salmonella* sp. en la cama es variable, dependiendo de diversos factores, pero los datos existentes en Argentina en pollos parrilleros indican una prevalencia cercana al 45%. Se pueden tomar dos tipos de muestras para evaluar la presencia de *Salmonella* sp. en cama de aves, ya sea material de cama directamente, o bien un hisopado de la misma. Ambos tipos de muestreos pueden ser realizados durante el alojamiento de las aves o al tiempo del vacío sanitario, previo a decidir sobre su reutilización. El éxito en la detección de *Salmonella* sp. en el laboratorio depende de la elección de un procedimiento de muestreo representativo y del método de detección utilizado. Existen diversos métodos para la detección de *Salmonella* sp. en la cama, los métodos rápidos (por ej. ELISA, separación inmunomagnética o reacción en cadena de la polimerasa –PCR–) y los de aislamiento tradicionales. Aunque estos últimos métodos son los más utilizados, para el aislamiento de este género bacteriano en estudios de monitoreos se requieren 5 etapas. Las serovariedades de *Salmonella* sp. comprometidas en la cama tienen variaciones en la frecuencia de presentación de un país a otro, con importancia en áreas que no han alcanzado las condiciones de saneamiento e higiene adecuados y no cuentan con medidas de salud pública óptimas. Aunque la serotipificación representa un componente importante de salud pública para caracterizar la *salmonelosis*, esta técnica tiene limitaciones en muchos países. Algunos informan un número limitado de serovariedades, siendo muy poco frecuente la caracterización y serotipificación definitiva de las cepas aisladas.

Introducción

La producción de aves de corral genera, entre otros, residuos derivados de la incubación, el guano (excrementos de aves), la cama (materiales como aserrín, virutas de madera, paja y cáscara de arroz) y la mortalidad en las granjas, siendo la cama y el guano los principales residuos generados. La cama, como otros residuos, pueden proporcionar nutrientes orgánicos e inorgánicos de valor si se gestionan y reciclan correctamente. Además, se ha aplicado durante siglos a las tierras para aumentar la producción de cultivos. Sin embargo, la cama puede también dar lugar a potenciales problemas de salud ambiental y humana (Williams et al, 1999, Silva, 2013) como fuente de residuos químicos (productos farmacéuticos veterinarios), y microbiológicos (parásitos, virus y bacterias como *Salmonella* sp.). El animal enfermo, la materia fecal de los roedores, el alimento, el huevo o el agua pueden contener *Salmonella* sp. y contaminar la cama (Gast, 2013). Por otro lado, la implicancia sanitaria de la reutilización de la cama es una preocupación para la avicultura mundial, pues las camas contaminadas pueden actuar como reservorios de patógenos aviares y zoonóticos (Williams et al, 1999), relacionada con la seguridad alimentaria (cuando las aves contaminadas entran en la planta de procesamiento), así como con la seguridad ambiental (cuando la cama se utiliza como fertilizante).

Salmonella es un género de bacterias distribuido en la naturaleza. Éstas se encuentran tanto como comensales o patógenos del tracto gastrointestinal de mamíferos domésticos y salvajes, aves, reptiles e insectos, causando enfermedades en sus hospedadores (Organización Mundial de Sanidad Animal, 2008). Actualmente, existen dos especies de *Salmonella*, *S. enterica* y *S. bongori*. *S. enterica* tiene seis subespecies (a veces presentadas como subgrupos bajo numeración romana). Cada subespecie a su vez, se conforma de diversos serotipos o serovariedades, habiéndose identificado hasta la fecha 2659. La más importante y numerosa es *S. enterica* subsp. *enterica* (o subgrupo I), que comprende 1586 serotipos divididos en cinco serogrupos (según la antigua designación de antígenos poli somáticos): A, B, C, D y E (Grimont y Well, 2007, Issenhuth-Jeanjean et al, 2014). Las infecciones con bacterias del género *Salmonella* sp. son responsables de una variedad de enfermedades agudas y crónicas en las aves y causan significativas pérdidas económicas en diferentes países. Existen serovariedades que infectan a las aves y son especie específica (Salmonelas inmóviles). Por otro lado, los productores avícolas están preocupados por las crecientes presiones de las autoridades sanitarias, debido a la implicancia de estas bacterias en salud pública (Salmonelas móviles), demandando instaurar medidas de contralor para proteger al consumidor de las enfermedades transmitidas por los alimentos de origen avícola (Gast, 2013).

La enfermedad producida por *Salmonella* sp., conocida comúnmente como Salmonelosis, constituye una de las causas más importantes de ETAs a nivel mundial, debido su ubiquidad y habilidad de adaptación sobre cualquier huésped (Schlundt et al, 2004, Batz et al, 2011). Los lotes de aves infectadas son importantes reservorios de *Salmonella* sp., transmitiendo dicho patógeno al ser humano a través de la cadena alimentaria. El control de *Salmonellas* sp. en la producción de pollos, gallinas y pavos es primordial debido a su importancia como zoonosis y su relevancia en planes de salud pública. Se ha descrito a los productos de origen avícola como una de las fuentes animales más implicadas en casos de salmonelosis en humanos (Betancor et al., 2010; Foley et al., 2011). Esto se debe a una asociación entre la prevalencia de infecciones por *Salmonella* sp. en aves de corral y a un aumento del consumo de productos de origen avícola en todo el mundo (Gast, 2013).

Por ello, en este capítulo se abordarán distintos aspectos relacionados a la contaminación con *Salmonella* sp. en la cama de aves, las técnicas de detección de esta bacteria en cama y los serotipos comúnmente encontrados.

La cama como actor principal en la contaminación de *Salmonella* sp. en aves

La contaminación de la carne, ya sea de la carcasa, trozados y subproductos puede tener base en la planta faenadora-procesadora, por contaminación cruzada a través del agua, operarios, roedores, envases, moscas, entre otros posibles vectores y reservorios. La transmisión se produce con frecuencia a través de la contaminación fecal de alimentos, agua, equipo, medio ambiente y el

polvo en el que la bacteria puede sobrevivir por un periodo prolongado de tiempo (Hafez, 2013). Otra posible fuente de contaminación puede llegar a ser la granja de origen, donde podemos identificar a la cama y el alimento como posibles vías de entrada del microorganismo al ave. En este caso en particular hablaremos sobre la cama como actor principal de la contaminación en producción primaria.

La cama es un material que se distribuye sobre el piso de los galpones con el fin de evitar el contacto directo del ave con el suelo, brindar confort y un desarrollo adecuado de las aves. La cama debe ayudar a absorber el agua que se derrama de los bebederos, también a diluir las materias fecales, servir como aislante del frío proveniente del piso de los galpones y generar calor por acción de la desintegración de los componentes orgánicos dentro de la cama. Otras características de la cama son el tamaño, textura y color del material a usar. Si estos son similares al alimento y contienen sustancias nocivas, el resultado es dañino para la salud y la productividad de las aves. De esta manera, la calidad de la cama afecta la expresión del potencial genético de las aves, debido a su continuo y estrecho contacto (Tabler, 2000; Lacy, 2002, Luyo Flores, 2014).

El manejo de la cama debería ser tan importante como la ventilación, la nutrición, el programa de luz, la calidad del agua y la eficiencia del programa sanitario. En la industria avícola, el manejo de la cama en las granjas es vital para proteger a las aves y otorgarles las mejores condiciones sanitarias y de bioseguridad. Por lo cual, el material de la cama avícola debe estar libre de cualquier contaminante, como productos químicos y organismos que causen enfermedades y puedan dañar a las aves (Noll, 1992; Bland y Ghazikhanian, 1998).

En general, el material de la cama debe ser muy absorbente, éste es probablemente un buen criterio para materiales orgánicos siendo en algunas áreas escaso, no obstante, es imposible usar materiales inorgánicos tales como el poliestireno, arena o arcilla. Los materiales de la cama más usados son derivados de la madera, como viruta, aserrín, madera picada, etc. En las regiones que carecen de producción maderera, se utilizan cortezas de árboles, paja (trigo, cebada, arroz) y hojas de árboles de la región. También existe el uso de subproductos del procesamiento industrial como por ejemplo cáscara de café, maní, girasol, etc. La utilización de estos materiales es aceptable, pero ellos son susceptibles a la contaminación con hongos. Almacenados adecuadamente, la humedad natural de estos productos se reduce a menos del 10%. La desventaja reside en el hecho de que pueden producir mucho polvo (Noll, 1992; Ritz et al., 2014).

La cama proporciona una condición especial para el crecimiento bacteriano adecuado con valores de pH entre 8 y 9 en camas reutilizadas y actividad de agua entre 0,90 y 0,92 (Dai Prá et al, 2010). Adicionalmente, las temperaturas en el galpón oscilan normalmente entre 20 y 32 °C dependiendo de la semana de cría, completando un hábitat óptimo para las bacterias, especialmente aeróbicas mesófilas o microaerofílicas (Luyo Flores, 2014). La contaminación de la cama durante el almacenamiento puede ser una fuente importante de *Salmonella* sp. Por ello, se deben tomar precauciones especialmente con los materiales que constituirán la cama, ya que estos pueden estar contaminados desde su origen (Gazdzinski, 2004). También, la cama es un reservorio de *Salmonella* sp. cuyo origen pueden ser las mismas aves o los vectores que permanecen en la instalación durante el período de vacío sanitario. La población de *Salmonella* sp. en la cama está correlacionada positivamente con la esta bacteria en heces de aves (Santos et al., 2005), lo que demuestra que el muestreo de la cama es un buen indicador del estado microbiológico de las heces. En Argentina, la presencia de *Salmonella* sp. fue mayor en la cama de las aves que en el alimento, 40,5-46 % y 5,1-21 % respectivamente, indicando que el hisopado de cama es mejor muestra que el alimento para aislar este patógeno en un galpón (Genta 2013; Procura et al., 2015).

La presencia de cama húmeda o con costras puede causar elevaciones del nivel de amoníaco, aumenta la incidencia de pododermatitis e incrementa el número de agentes patogénicos, incluyendo bacterias, virus, coccidios, helmintos intestinales y hongos. La humedad de la cama está directamente relacionada con la contaminación por *Salmonella* sp., ya que propicia las condiciones para la multiplicación de la bacteria. Se ha encontrado que la humedad superficial bajo la cama puede conducir a contaminación por *Salmonella* sp. en su superficie (Gazdzinski, 2004). Después de haber sido introducida la bacteria a un plantel esta puede multiplicarse y persistir en el ambiente (Davis y

Wales, 2010). Si bien el medio ambiente no es normalmente un sitio primario de multiplicación para *Salmonella* sp., la capacidad de sobrevivencia de la bacteria hace que ésta pueda mantenerse por largos periodos de tiempo en ambientes que sean propicios para su crecimiento y multiplicación. Por ejemplo, se ha descrito que *Salmonella* sp. puede sobrevivir en la cama de pavos hasta 9 meses después que se haya retirado un lote infectado (Hoover et al, 1997).

En un estudio sobre prevalencia y distribución de *Salmonella* sp. en granjas de pollos de engorde, se observó una prevalencia de 38,8% en muestras de cama de pollo en granjas convencionales (Alali et al., 2010). Por su parte, Rojas et al. (2002) encontraron que el 7,3%, de 357 muestras de cama de cáscara de arroz analizadas en Cuba, presentó contaminación por *Salmonella* sp. Por otro lado, Marin et al. (2011), en un estudio sobre las fuentes de contaminación de *Salmonella* sp. durante la producción de pollos de engorde en el este de España, observaron que la prevalencia en muestras de cama de pollo fue del 28,6 % al inicio de la producción incrementando hacia el final de la misma hasta un 33,9 %. Ibrahim et al. (2013) en un estudio seroepidemiológico sobre salmonelosis en aves de corral y su importancia en la salud pública observaron un 53,3% de muestras de cama en pollos de engorde positivas a *Salmonella* móvil.

Por otra parte, Muniz et al. (2013) estudiaron la presencia de *Salmonella* sp. en camas de pollos de engorde reutilizadas y observaron que la presencia de este patógeno disminuyó de 3,4% a 0,86% cuando la cama era reutilizada. Resultados similares fueron obtenidos por Roll et al. (2011) en un estudio sobre presencia de *Salmonella* sp. en camas de pollos de engorde reutilizadas hasta un máximo de 14 crianzas en granjas ubicadas al sur de Brasil. Por otro lado, Pieskus et al. (2008) evaluaron la incidencia de *Salmonella* sp. en granjas de pollo de engorde orgánicas y convencionales, localizadas en diferentes áreas de Italia, Lituania, Alemania y en los Países bajos, tomando muestras de cama, polvo, agua y contenido del ciego. Estos autores obtuvieron una incidencia del 29%, 20% y 11% para Lituania, Italia y en los Países bajos, mientras que esta bacteria no fue detectada en Alemania.

En nuestro país, durante el año 2009 a 2011, se realizó una investigación desde el Servicio Nacional de Sanidad y Calidad Agroalimentaria (SENASA), a fin de determinar la prevalencia de salmonelas patógenas (móviles) en granjas avícolas de pollos de engorde. El método de muestreo seleccionado fue de cama de galpón a través de calzas estériles. El muestreo abarcó granjas de empresas en las provincias de Buenos Aires, Entre Ríos y Córdoba. Se observó que el 45% (335/737) de las muestras fueron positivas a salmonelas móviles (Servicio Nacional de Sanidad y Calidad Agroalimentaria, 2012). Resultados similares fueron encontrados por Genta (2013) en muestras de calzas estériles en 65 granjas de pollos de engorde la provincia de Entre Ríos y por Procura et al. (2015) en 77 granjas ubicadas en granjas de pollos parrilleros de las zonas de mayor concentración avícola de la misma provincia. Además, estos últimos, estudiando la concordancia de aislamiento de *Salmonella* sp. en muestras de cama entre dos galpones ubicados en una misma granja, encontraron un 16% (11/69) de positivos a *Salmonella* sp. en ambos galpones y negativos a ambos en un 49 % (34/69), teniendo una concordancia pobre entre los galpones. Por otra parte, pero también en Entre Ríos, Rodríguez et al. (2015) estudiaron la tasa de aislamiento de *Salmonella* sp. a partir de 148 muestras de hisopado de cama (2 pares de calzas estériles), encontrando que entre el 32,4% a 33,8% de las muestras resultaron positivas a esta bacteria.

Toma de muestra para la detección de *Salmonella* sp. en cama de ave

En las últimas décadas, el seguimiento y control de *Salmonella* sp. en aves de producción ha sido una prioridad en diferentes países de América y la Unión Europea, dada la relación existente entre brotes de *Salmonella* sp. en humanos con el consumo de huevos y productos avícolas (Gast et al, 2011; Delmas et al, 2006). La creación y el seguimiento de programas de vigilancia y control en la producción primaria de las aves son primordiales para disminuir la incidencia de los serotipos de carácter zoonótico en granjas, frigoríficos, canales, huevos y productos derivados. Estos planes de control (Mueller-Doblies et al, 2009; Carrique-Mas y Davies, 2008a) requieren armonización entre el muestreo (tipo de muestras) y la vigilancia de toda la cadena avícola general (abuelas, reproductoras, incubadoras, etc.).

La detección de *Salmonella* sp. en la producción primaria de aves implica en primer lugar la recolección de material del medio ambiente en los galpones (heces, cama, polvo), así como la recolección de muestras obtenidas directamente de las aves (sangre, hisopos cloacales, muestras post mortem del ciego, intestino delgado e hígado). En la toma de muestras hay que tener en cuenta que existe una baja prevalencia de la infección en aves individuales, los organismos excretados son relativamente bajos y la excreción es de tipo intermitente en aves infectadas. Además, la cantidad de heces obtenidas en los hisopos es limitada (Bichler et al, 1996). Este tipo de muestra también puede verse afectada por tratamientos antibióticos previos y posible contaminación del hisopo en el momento de la obtención de la muestra (Carrique-Mas y Davies, 2008a; European Food Safety Authority, 2007). Las muestras ambientales son ampliamente utilizadas para establecer el estado sanitario en galpones. En general, estos tipos de muestras se consideran más sensibles que el muestreo de un gran número de aves individuales, ya que se identifican no solamente infecciones activas, sino infecciones previas de la granja (Mueller-Doblies et al, 2009; Davies y Wray, 1996). Además, es considerado más beneficioso en términos de costos (Carrique-Mas y Davies, 2008a; Aho, 1992).

Se pueden tomar dos tipos de muestras para evaluar la presencia de *Salmonella* sp. en cama de aves, ya sea material de cama directamente, o bien un hisopado de la misma. Ambos tipos de muestreos pueden ser realizados durante el alojamiento de las aves o al tiempo del vacío sanitario, previo a decidir sobre su reutilización. Las muestras deben ser remitidas al laboratorio el mismo día de haberlas tomado. Si por algún motivo no pueden enviarse de inmediato, las mismas deben ser refrigeradas a 4 °C (Barrios, 2009).

En referencia a la toma de material de la cama, se puede utilizar cualquier muestreo usado para muestrear un galpón, como el método de la canaleta o el método zigzag (Figura 1). El primero se realiza utilizando una pala angosta, previamente desinfectada con alcohol 70 %, y situados en el centro del galpón "cavando" una canaleta a lo ancho del galpón hasta alcanzar las paredes. La canaleta debe ser del ancho y profundidad de la pala utilizada. De existir "costra" (también llamada "champa") sobre la cama, se la debe recoger también. Se debe depositar todo el material recolectado de la canaleta sobre una lona o tela previamente esterilizada, revolverlo utilizando un rastrillo u otra herramienta útil a tal efecto, previamente desinfectada o esterilizada. Luego se divide el material en cuatro partes iguales, se toman dos cuartos al azar y se vuelven a mezclarlos uniformemente. Se repite el cuarteo hasta obtener un cuarto al azar de aproximadamente 100 g, que se coloca en una bolsa plástica estéril con cierre sellado. Todo el material sobrante se ubica dentro de la canaleta, esparciéndolo uniformemente (Maissonave et al., 2015).

Por otro lado, para el método zigzag o muestreo lineal oscilante el galpón se divide, de modo longitudinal e imaginariamente, en dos a tres áreas. Se comienza en una esquina y se camina el galpón en forma zigzagueante llevando una pala pequeña o lata grande, previamente desinfectada o esterilizada, junto a un balde de 20 litros (desinfectado con alcohol 70 %). Se toma entre 12 y 20 sub-muestras de toda la profundidad de la cama, siendo precavidos de no recoger o raspar la superficie del suelo original. Se colocan las sub-muestras en el balde. Al finalizar de recorrer el galpón se agita el contenido del balde para uniformar la muestra y se llena una bolsa plástica estéril (Barrios, 2009; Maissonave et al, 2015).

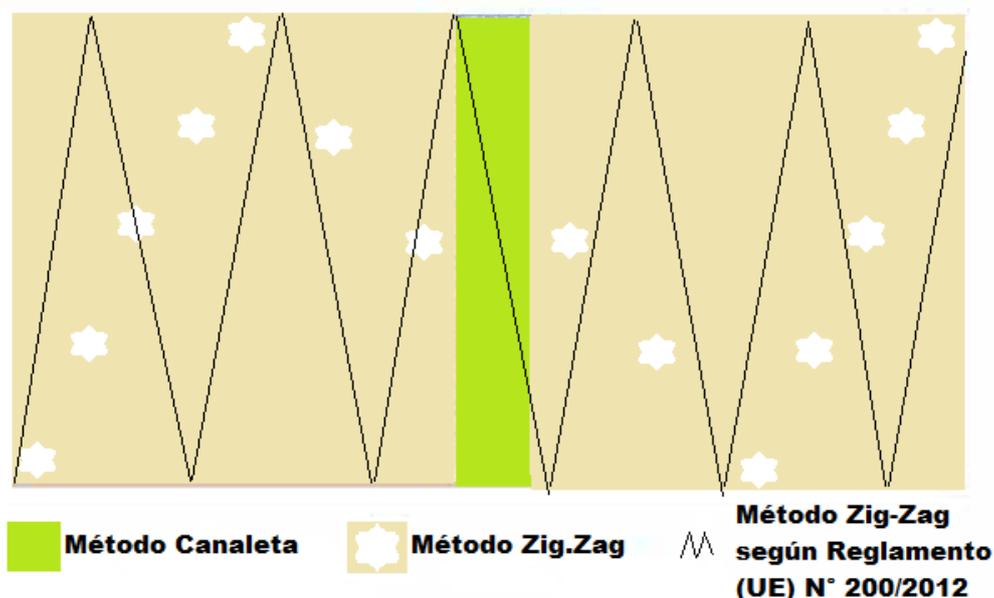


Figura 1. Tipos de muestreos de cama para la detección de *Salmonella* spp.

En referencia al hisopado de cama, el muestreo puede realizarse con gamuza o con calzas. En el primer caso, se pasa una gamuza humedecida por el piso del gallinero. Para el muestreo con calzas (Figura 1), las muestras se toman caminando por el galpón con material absorbente colocado sobre el calzado (Organización Mundial de Sanidad Animal, 2010). La Unión Europea, según el Reglamento (UE) N° 200/2012 para parrilleros (Barroso, 2012) y 1168/2006 para ponedoras (en el caso de a piso, Kyprianou, 2006), utiliza como mínimo dos pares de calzas/galpón. Antes de ponerse las calzas estériles, se humedece su superficie con diluyentes tales como soluciones al 0,8 % de cloruro sódico y 0,1 % de peptona en agua desionizada estéril; agua estéril; o cualquier otro diluyente aprobado por los laboratorios nacionales de referencia. Para humedecer las mismas se vierte el líquido en su interior antes de ponérselas o se agitan en un recipiente de diluyente. Las calzas estériles se ubican sobre las botas (Figura 2) y se toman las muestras andando sobre la cama por el galpón. Un par de calzas cubre la mitad del galpón y el otro par la otra mitad. Debe garantizarse que todas las secciones de un galpón queden representadas proporcionalmente en el muestreo. Cuando se termina el muestreo, se retiran cuidadosamente las calzas para que no se desprenda el material adherido. Se puede dar la vuelta a las calzas para retener el material en su interior. Luego los pares de calzas se colocan en una misma bolsa estéril o recipiente estéril por galpón y se etiquetan adecuadamente (Figura 3). La autoridad competente puede decidir aumentar el número mínimo de muestras a fin de garantizar un muestreo representativo en las evaluaciones caso por caso de los parámetros epidemiológicos, como las condiciones de bioseguridad, la distribución o el tamaño de la manada. A su vez, la autoridad competente puede decidir la sustitución de un par de calzas por una muestra de polvo de 100 g tomada de superficies repartidas por todo el galpón en las que la presencia de polvo sea visible. Para la Unión Europea, si no se detecta la presencia de *Salmonella Enteritidis* (SE) y *Salmonella Typhimurium* (ST), pero sí de agentes antimicrobianos o de un efecto inhibitorio de la proliferación bacteriana, la manada de pollos de engorde o de ponedoras se considerará infectada. En todos los casos las muestras se enviarán sin retraso injustificado, por correo urgente o servicio de mensajería, a los laboratorios autorizados. Durante el transporte las muestras no deben ser expuestas a una temperatura superior a 25 °C ni a la luz del sol. Si las muestras no se envían en las 24 horas posteriores a la recogida, deben mantenerse refrigeradas.

Para ponedoras a piso (Kyprianou, 2006), la Unión Europea determina que el muestreo a iniciativa del operador se efectuará al menos cada quince semanas. El primer muestreo se efectúa a la edad de 24 ± 2 semanas. En cambio, el muestreo por la autoridad competente tendrá lugar al menos:

- a) en una manada cada año por explotación que comprenda al menos 1000 aves;
- b) a la edad de 24 ± 2 semanas en las manadas ponedoras alojadas en naves en las que se detectara *Salmonella* sp. en la manada anterior;
- c) en cualquier caso de sospecha de infección por SE o ST, como resultado de la investigación epidemiológica de los brotes de enfermedades transmitidas por los alimentos de conformidad con el artículo 8 de la Directiva 2003/99/CE del Parlamento Europeo y del Consejo;
- d) en todas las demás manadas ponedoras de la explotación en caso de que se detecte SE o ST en una manada ponedora de la explotación;
- e) en los casos en que la autoridad competente lo considere apropiado.

Además, un muestreo realizado por la autoridad competente puede sustituir a otro realizado a iniciativa del operador.

Para pollos parrilleros, la Unión Europea determina que las manadas de pollos de engorde deben ser sometidas a muestreo a iniciativa del explotador de empresa alimentaria en las tres semanas previas al sacrificio (Barroso, 2012). Sin perjuicio de la obligación de muestreo establecida anteriormente, la autoridad competente puede disponer que los operadores de empresas alimentarias sometan a muestreo, como mínimo, a una manada de pollos de engorde por tanda en las explotaciones que cuenten con varias manadas si:

- a) se utiliza un sistema que garantice la entrada y salida de todas las aves en todas las manadas de la explotación;
- b) todas las manadas se gestionan de igual manera;
- c) el suministro de pienso y agua es común a todas las manadas;
- d) durante al menos las seis últimas tandas, la autoridad competente ha sometido a todas las manadas de la explotación a pruebas de detección de la *Salmonella* sp. conforme al programa de muestreo establecido anteriormente y ha tomado muestras de todas las manadas de, como mínimo, una tanda;
- e) todos los resultados de las pruebas de detección de SE o ST previstas han sido negativos.

Sin perjuicio de las obligaciones de muestreo contempladas en este punto, la autoridad competente puede autorizar el muestreo en las seis semanas previas a la fecha de sacrificio en caso de que los pollos de engorde sean mantenidos más de 81 días o criados con arreglo a una producción ecológica, de conformidad con el Reglamento (CE) N° 889/2008 de la Comisión Europea. Por su parte, el muestreo de la autoridad competente incluye cada año, como mínimo, una manada de pollos de engorde en el 10 % de las explotaciones que cuenten con más de 5.000 aves. El muestreo puede realizarse en función del riesgo y cada vez que la autoridad competente lo estime necesario. Este muestreo realizado por la autoridad competente puede sustituir al realizado por el explotador de empresa alimentaria.



Figura 2. Calzas colocadas sobre las botas para realizar el muestreo (Genta, 2013).



Figura 3. Calzas en bolsa estéril luego de haber tomado la muestra.

En Argentina, recientemente, el Ministerio de Agroindustria a través del SENASA, mediante Resolución 86/2016, aprobó el “Programa de vigilancia y control de la contaminación por *Salmonella* spp. en granjas avícolas comerciales”, como parte integrante del Plan Nacional de Sanidad Avícola que detalla la frecuencia y método de muestreo en las granjas de pollos parrilleros y gallinas de postura (Servicio Nacional de Sanidad y Calidad Agroalimentaria, 2016a). En este último caso, se indica que dos veces por año se debe realizar una toma de muestra de todas las granjas con aves en producción, pero no da indicaciones sobre muestreos en galpones de ponedoras a piso. En el caso de granjas de pollos parrilleros, se debe realizar la toma de muestras de cama una vez por año, teniendo en cuenta las siguientes consideraciones, de manera similar a lo propuesto por la Comunidad Europea:

- Las aves deben ser muestreadas tres semanas previas a la faena.
- Las muestras se obtienen por “caminata de galpón” con la utilización de calzas/medias estériles.
- La muestra debe estar conformada, como mínimo, por dos pares de calzas/medias de un mismo galpón seleccionado aleatoriamente.
- En el muestreo deben quedar representadas proporcionalmente todas las secciones de un galpón.

- Cada par debería abarcar aproximadamente el 50 % del área del galpón.
- Cuando la granja disponga de más de cinco galpones, deben extraerse muestras de dos galpones y en las granjas de menos de cinco galpones, la muestra debe tomarse de un galpón.

Por otra parte, en las aves reproductoras de Argentina, el Plan Nacional de Sanidad Avícola (Servicio Nacional de Sanidad y Calidad Agroalimentaria, 2016b) utiliza el hisopo de arrastre de cama de galpón (10 muestras por núcleo de recría, plantel o lote) o bien, calzas estériles (2 pares de muestras por galpón) sólo en las granjas de recría, como muestreo válido para *Salmonella* sp. En cambio, en las granjas de reproductores determina el uso de hisopos de cloaca, 20 hisopos por núcleo de reproducción, plantel o lote.

Por otra parte, un estudio realizado en Dinamarca comparó cuatro métodos de muestreo potencialmente aplicables a la detección de *Salmonella* sp. en cama de un galpón de pollos de engorde (Skov et al, 1999):

- recolección de muestras fecales (300 muestras fecales frescas al azar del suelo dentro del gallinero; 60 pooles de 5 muestras fecales);
- exposición de hojas de papel y recolección de las mismas después de 8 -10 h de exposición;
- cinco pares de calcetines, cada par consistió en dos tubos de algodón elástico de aproximadamente 20 cm de largo, las muestras se tomaron colocando el tubo de algodón sobre el calzado y girando los calcetines al caminar alrededor del galpón para que todas las piezas fueran expuestas;
- muestreo mediante el uso de sólo un par de calcetines.

Se encontró que los métodos de 5 pares de calcetines, 5 hojas de papel y 60 pooles de 5 muestras fecales detectaron el mismo número de lotes positivos para *Salmonella* sp. si la prevalencia fue de al menos 5,6 %. En lotes con una prevalencia de *Salmonella* sp. de 1,4 %, los métodos de 5 pares de calcetines, y 60 pooles de muestras fecales fueron los dos métodos que detectaron la mayoría de los lotes como *Salmonella* sp. positivo y que dieron los más altos valores predictivos positivos y negativos.

Otro estudio se realizó desafiando pollos por vía oral con una suspensión de *Salmonella* sp. resistente a ácido nalidíxico, y tomando muestras en diferentes tiempos. La cama fue muestreada usando 4 métodos: excrementos fecales, cama, hisopos de arrastre, y calcetín. Además, se hicieron comparaciones con hisopos de arrastre que fueron pisados durante el muestreo. En general, la incidencia de recuperación de *Salmonella* sp. fue significativamente mayor para el calcetín e hisopos de arrastre que fueron pisados durante el muestreo que para estos últimos que no fueron pisados. Estos resultados indican que hay mayor probabilidad de detectar *Salmonella* sp. cuando el material de muestreo se presenta en mayor contacto con la materia fecal pisando el material de la muestra (calcetines o hisopos de barrido). Al pisar hisopos de barrido puede mejorar la detección de *Salmonella* sp. sin un aumento en el costo y tiempo (Buhr et al, 2007).

Metodología para la detección de *Salmonella* sp. en la cama de aves

El éxito en la detección de *Salmonella* sp. depende de la elección de un procedimiento de muestreo representativo y del método de detección utilizado (Chacana y Terzolo, 2003; Carrique-Mas y Davies, 2008b). Existen diversos métodos para la detección de *Salmonella* sp. en la cama, los métodos rápidos (por ej. ELISA, Separación Inmunomagnética o reacción en cadena de la polimerasa –PCR-) y los de cultivo. Aunque estos últimos métodos son los más utilizados, para el aislamiento de este género bacteriano se requieren 5 etapas (Servicio Nacional de Sanidad y Calidad Agroalimentaria, 2002).

La primera etapa en el aislamiento de *Salmonella* sp. es la de preenriquecimiento, colocando la cama (en general, 25 g) o el hisopado de la misma en relación 1/10 peso: volumen en un medio líquido general (agua de peptona tamponada, caldo tripteína de soja con o sin hierro, o caldo lactosado, entre otros) para permitir que un escaso número de salmonelas se multipliquen sin que mueran por los efectos tóxicos de los medios de enriquecimiento selectivo, y/o ayudar a la recuperación de las células que presentan daños subletales, ocasionados por procesos como la congelación, el calentamiento, la exposición a sustancias microbicidas o a la desecación

(Organización Mundial de Sanidad Animal, 2008). Luego de una incubación de 6-24 h a 37 °C, las muestras se siembran en medio de enriquecimiento selectivo líquido (diferentes tipos de caldos tetrationsatos, caldos selenitos, caldo Rappaport-Vassiliadis) y/o semisólido (medio semisólido Rappaport-Vassiliadis modificado-MSRV-), donde se incuban a 37° o 41,5-42 °C, según el caso con o sin el agregado de antibióticos, como la novobiocina, para inhibir bacterias como *Proteus* sp. Este paso disminuye la concentración de los microorganismos competidores y aumenta o mantiene estable la población de la bacteria de interés (Entis, 2002). Para el caso, del medio semisólido (Figura 4), las bacterias móviles crecen radialmente y forman un halo de crecimiento. Si las salmonelas móviles están presentes en la muestra, serán dominantes en el extremo del halo (Busse, 1995) desde donde pueden ser selectivamente aisladas. Luego de la incubación, se siembran en estrías por agotamiento en 2 a 3 placas de Petri con medios de cultivos sólidos selectivos-diferenciales (agar Verde Brillante; agar Mac Conkey, agar EF-18, agar xilosa lisina desoxicolato-XLD-, agar entérico Hektoen, agar *Salmonella-Shigella*, agar Rambach y/o agar sulfito de bismuto, entre otros), que se incuban a 37 °C durante 24-48 h. Estos medios contienen nutrientes, agentes selectivos y uno o más sistemas de reacciones diferenciales para distinguir las colonias de interés del resto de los microorganismos (Entis, 2002), debido a las altas concentraciones de bacterias distintas de *Salmonella* sp. en las muestras ambientales. Luego de la incubación, por el color de la colonia bacteriana, de cada placa se toman 2-3 colonias sospechosas de *Salmonella* sp. para su caracterización bioquímica. En ausencia de colonias típicas o sospechosas de *Salmonella* sp., igualmente, se toman 2-3 colonias de la placa a fin de descartar este género bacteriano (Andrews y col., 2015). Entre las pruebas bioquímicas que se pueden realizar se destacan (Figura 5, Tabla 1): agar hierro dos o tres azúcares (agar Kligler o del inglés agar TSI, respectivamente), agar lisina hierro (del inglés LIA), O.N.P.G. (orto-nitrofenilgalactopiranosido), agar fenilalanina, agar urea, medio SIM (sulfuro indol movilidad), citrato de Simmons, test de rojo metilo y Voges-Proskauer. Con la cepa aislada y compatible con *Salmonella* sp., se realiza la tipificación serológica o fenotípica (quinta etapa, pruebas de aglutinación). Esta última tiene un alto poder discriminatorio y provee información con significado epidemiológico, desde el punto de vista de la vigilancia basada en el laboratorio. La disponibilidad y el costo de antisueros de alta calidad es un problema en algunos países y regiones (Caffer y col., 2014). La tipificación es útil para determinar la fórmula antigénica completa de aislamientos de *Salmonella* spp. (Montville y Mathews, 2008). La serotipificación basada en la determinación de los antígenos somáticos (Ag O), flagelares (Ag H) y capsular (Ag Vi), si está presente, de acuerdo al Esquema de White-Kauffmann- Le Minor, permite determinar las serovariedades reconocidas por el Centro “Colaborador de la Organización Mundial de la Salud de Referencia e Investigación de *Salmonella*”, del Instituto Pasteur de París, Francia (Grimont y Well, 2007, Montville y Mathews, 2008; Caffer y col., 2014).

Rodriguez et al. (2015) estudiaron la capacidad discriminatoria de cuatro medios de cultivo sólidos selectivos-diferenciales en el aislamiento de *Salmonella* sp. a partir de 148 muestras de hisopado de cama (2 pares de cofias estériles). Los 4 medios utilizados fueron agar EF-18, agar entérico Hektoen y 2 marcas comerciales de agar XLD. No se observaron diferencias significativas en los parámetros estudiados en los distintos medios de cultivo selectivos-diferenciales utilizados, con una concordancia muy buena a excelente entre ellos.

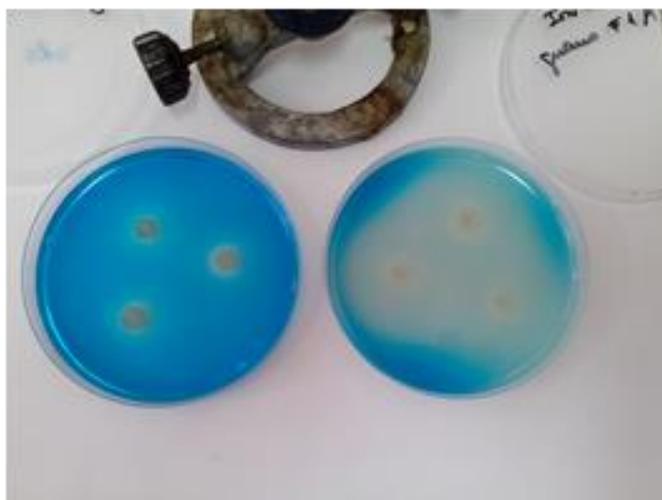


Figura 4. Medio semisólido Rappaport- Vassiliadis modificado sembrado con una cepa inmóvil (A) y otra móvil de Salmonella (B).

La Unión Europea, según el Reglamento (UE) N° 200/2012 para parrilleros (Barroso, 2012) y 1168/2006 para ponedoras (Kyprianou, 2006) establecen la detección de *Salmonella* sp. según el anexo D (Detección de *Salmonella* spp. en heces de animales y en muestras ambientales en la etapa de producción primaria) de la norma EN/ISO 6579 “Microbiología de los alimentos de consumo humano y alimentación animal (International Organization for Standardization, 2002). Método horizontal para la detección de *Salmonella* spp.”. Este método utiliza agua de peptona tamponada y MSR/V suplementado con 1ml/L de solución de novobiocina al 2 % como medios de preenriquecimiento y enriquecimiento selectivo, respectivamente. Como medios sólidos selectivos-diferenciales es obligatorio el uso de agar XLD y otro a elección. El serotipado se realiza de al menos una cepa aislada de cada muestra positiva recogida por la autoridad competente, utilizando el Esquema de Kauffmann-White-Le Minor.

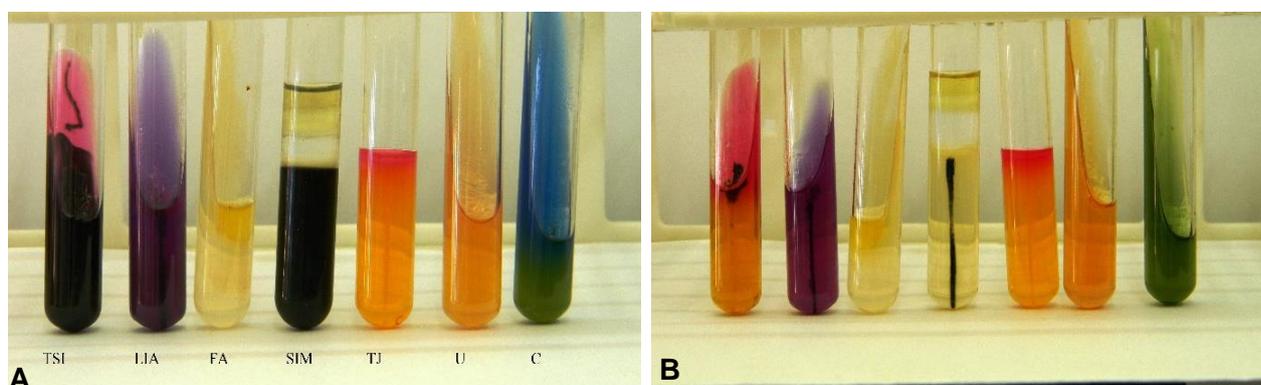


Figura 5. De izquierda a derecha; pruebas bioquímicas compatibles con una cepa de Salmonella spp. móvil (A) e inmóvil (B). TSI= agar Hierro Tres Azúcares; LIA= Agar Lisina Hierro; FA= agar fenilalanina; SIM= medio sulfuro-indol-movilidad, TJ= agar tartrato de Jordan, U= agar urea; y C= agar citrato de Simmons.

En la Resolución 86/2016 del SENASA (2016a) se indica que los laboratorios de diagnóstico, ya sean privados o pertenecientes a instituciones públicas, deben utilizar, para las muestras de hisopado de cama de pollos parrilleros, el método descrito en el Anexo D de la Norma ISO 6579 (2002), de igual manera que la Unión Europea. Sin embargo, destaca que como métodos alternativos se pueden utilizar las pruebas moleculares para identificación de genotipos. Cada laboratorio debe hacer la tipificación serológica utilizando los sueros polivalentes somáticos A (OS-A) y B (OS-B).

Todos aquellos aislamientos OS-A positivos se deben remitir a la Dirección del Laboratorio Animal (DILAB) de la Dirección General de Laboratorios y Control Técnico del mencionado Servicio Nacional, para su serotipificación, ya que los serovares *Enteritidis*, *Typhimurium* y *Heidelberg* pertenecen a este serogrupo. Cuando los laboratorios que participen del Programa no estén en condiciones de realizar las pruebas de tipificación por técnicas moleculares, deben remitir las cepas aisladas de *Salmonella* sp. a la DILAB, para su tipificación serológica. Para el caso del hisopado de cama de las granjas de cría de reproductores, el Plan Nacional de Sanidad Avícola (PNSA) de Argentina indica que se tiene que seguir el procedimiento de aislamiento de *Salmonella* sp. de 5 etapas (Servicio Nacional de Sanidad y Calidad Agroalimentaria, 2002). Además, el manual de procedimientos operativos del Programa de Control de las Micoplasmosis y Salmonelosis en Aves Reproductoras y Planta de Incubación de Argentina (Servicio Nacional de Sanidad y Calidad Agroalimentaria, 2016b) informa que, cuando se aisle una *Salmonella* tipo móvil en uno de los laboratorios adheridos, deberán remitir la cepa aislada y previamente caracterizada por pruebas bioquímicas y serológicas a la DILAB del SENASA para su tipificación serológica definitiva. El programa acepta la genotipificación por métodos moleculares utilizados por algunos laboratorios para el cumplimiento del PNSA.

La Organización Mundial de Sanidad Animal (2008) recomienda en muestras fecales y ambientales el uso de un enriquecimiento no selectivo en agua de peptona tamponada, seguido de enriquecimiento selectivo en MSR y caldo tetracionato, con la posterior incubación a $41,5 \pm 1$ y 37 ± 1 °C, respectivamente, durante 48 h. Luego de 24 y 48 h, para ambos medios de enriquecimiento selectivo, se siembran en agar Rambach o Verde Brillante y agar XLD con el agregado de novobiocina, con la posterior incubación a 37 ± 1 °C 24 hs. Luego, se examinan 5 colonias sospechosas de *Salmonella* sp., utilizando antiseros somáticos (poli "O") y flagelares (poli "H", fase 1 y fase 2) o medios bioquímicos compuestos. Se subcultivan las colonias sospechosas que no aglutinen con antiseros poli H en medios no selectivos y se repiten las pruebas. Si se obtiene una aglutinación fuerte con poli O y poli H, esto es suficiente para una confirmación preliminar. Tales aislamientos se pueden luego seroagrupar.

Tabla 1. Reacciones bioquímicas de *Salmonella* sp.

Prueba o sustrato	Resultados		Reacción en especies de <i>Salmonella</i> ^(a)
	Positivo	Negativo	
Glucosa (TSI)	Fondo amarillo	Fondo rojo	+
Lisina decarboxilasa (LIA)	Fondo violeta	Fondo amarillo	+
H ₂ S (TSI, LIA y SIM)	Ennegrecimiento	no ennegrecimiento	+
Agar urea	Color rosado	Sin cambios de color	-
Prueba de Indol (SIM)	Color rosado en superficie	Color amarillo en superficie	-
Prueba de Voges-Proskauer	Color rojo a rosado	Sin cambios de color	-
Prueba de rojo metilo	Color rojo difuso	Color amarillo difuso	+
Citrato de Simmons	Crecimiento, color azul	Sin crecimiento, sin cambio de color	v
Agar fenilalanina	Sin cambios de color	Color verde	-
O.N.P.G.	Sin cambios de color	Color amarillo	-

^a +: 90% o más positivos en 1 o 2 días; -: 90% o más negativos en 1 o 2 días; v: variable (Salmonelas móviles positivo, salmonelas inmóviles negativo).

Serovariedades de salmonelas en cama de aves

Las serovariedades de *Salmonella* sp. comprometidas en la cama tienen variaciones en la frecuencia de presentación de un país a otro, con importancia en áreas que no han alcanzado las condiciones de saneamiento e higiene adecuados y no cuentan con medidas de salud pública óptimas (Gutiérrez Cogco et al., 2000). Aunque la serotipificación representa un componente importante de salud pública para caracterizar la salmonelosis, esta técnica tiene limitaciones en

muchos países. Algunos informan un número limitado de serovariedades probablemente por un número limitado de reactivos (Uribe y Suárez, 2006). En relación a este punto, Terrera (2012) observó, sobre casos confirmados de salmonelosis con pruebas de laboratorio obtenidos de 10 laboratorios oficiales y privados de patología aviar de Argentina (años 2008 y 2009), que fue muy poco frecuente la caracterización y serotipificación definitiva de las cepas aisladas de salmonelas móviles. Esto último impidió conocer cuáles fueron realmente las serovariedades de los aislamientos obtenidos. Por ello, las salmonelas de este tipo siguen siendo un problema para los laboratorios.

Alali et al. (2010) observaron que la mayoría de los aislamientos (65/70) de *Salmonella* sp. en la cama pertenecían al serogrupo C (que incluye los factores somáticos 6,7,8) y los 5 aislamientos restantes pertenecieron al serogrupo B (que incluye el factor somático 4). Por su parte, Rojas et al. (2002) aislaron los serogrupos B, C, D, y E de *Salmonella* sp. a partir de cama de cáscara de arroz, siendo los B y E los más frecuentemente encontrados. Por otro lado, Marin et al. (2011), de un total de 259 aislamientos de *Salmonella* sp. en la producción de pollos de engorde (incluidas muestras de cama), encontraron 21 serovariedades diferentes, donde las más prevalentes fueron SE (52,9 %), S. Hadar (17,8 %), S. Virchow (8,9 %) y S. Ohio (5,4 %).

Por otro lado, Ibrahim et al., (2013) en las muestras de cama positivas a *Salmonella* sp. sólo encontraron una sola serovariedad (S. Kentucky). Sin embargo, Roll et al. (2011), durante los 3 períodos del estudio, obtuvieron 10 serovariedades diferentes, siendo las más prevalentes SE, S. Bredeney y S. Agona. Por su parte, Pieskus et al. (2008) determinaron la incidencia de *Salmonella* sp. en granjas orgánicas y convencionales de pollo parrilleros, analizando muestras de cama, entre otras. Las serovariedades aisladas correspondieron a SE, ST, S. Hadar, S. Heidelberg, S. Infantis y S. Java para Lituania, Italia y Países bajos, respectivamente.

Con respecto a nuestro país, en el trabajo realizado por SENASA (2012) en cama de pollos parrilleros, sobre el total de los aislamientos positivos a *Salmonella* sp. que fueron serotipificados (n=275) los más frecuente fueron S. Heidelberg (26,6 %), S. Thompson (16,7 %), S. Schwarzengrund (13,4 %), S. Senftenberg (6,6 %), S. Mbandaka (5,1 %), S. Livingstone (3,6 %) y S. Anatum (3,3 %), mientras que tanto ST, S. Derby como SE estuvieron presentes en un 2,6% (Servicio Nacional de Sanidad y Calidad Agroalimentaria, 2012). Por otro lado, en un relevamiento realizado por nuestro grupo de trabajo (Genta et al., datos no publicados), se serotipificaron 83 (sobre un total de 129) cepas de *Salmonella* sp. aisladas de cama de pollo proveniente de galpones de Entre Ríos, obteniéndose 16 serovariedades diferentes. Las más prevalentes fueron S. Heidelberg (30,1 %), SE (16,9 %), S. Livingstone (13,2 %), S. Agona (6,0 %), S. Derby (4,8 %) y S. Montevideo (4,8 %).

Consideraciones finales

Aunque la cama tiene funciones muy importantes para la crianza de las aves utilizadas para consumo humano, la presencia de *Salmonella* sp. en este material indica los niveles de contaminación bacteriana presente en el medio en el que se crían las mismas. Dado los altos valores y los serotipos encontrados, resulta necesario que se adopten medidas para disminuir la prevalencia de esta bacteria en la cama a fin de dar una mayor garantía de la calidad higiénica de los alimentos que se obtienen de esta producción, tanto en Argentina como en el mundo. Por ello, es recomendable no eliminar la cama al campo, con fines de fertilizante, sin un tratamiento previo para disminuir la carga de microorganismos y así el riesgo de probables complicaciones, en especial, con *Salmonella* sp.

Agradecimientos

Este trabajo se realizó con el aporte de los siguientes proyectos del INTA:

- PE 1115056. Enfermedades infecciosas de las aves.
- ERIOS 1263203. Fortalecer la diversidad socio productiva del centro sureste de la provincia de Entre Ríos de manera sustentable.

Bibliografía

- Aho, M. 1992. Problems of Salmonella sampling. *Int. J. Food Microbiol.* 15: 225-235.
- Alali, W.Q., Thakur, S., Berghaus, R.D., Martin, M.P., y Gebreyes, W.A. 2010. Prevalence and distribution of Salmonella in organic and conventional broiler poultry farms. *Foodborne Pathog Dis.* 7:1363-1371.
- Andrews, W.H., Jacobson, A., y Hammack, T. 2015. Salmonella. *Bacteriological Analytical Manual*. Disponible en: <http://www.fda.gov/Food/FoodScienceResearch/LaboratoryMethods/ucm070149.htm>
- Barrios, M. A. 2009. Manejo de la cama en galpones avícolas. Descuidos que cuestan caros. Disponible en: <http://www.avesyporcinos.com.ar/nota.php?id=41>
- Barroso, J.M. 2012. Reglamento (UE) No 200/2012 de la Comisión de 8 de marzo de 2012. *Diario Oficial de la Unión Europea* L71/31-36.
- Batz, M., Hoffmann, S., y Morris J. 2011. Ranking the risks: the 10 pathogen–food combinations with the greatest burden on public health. *Emerging Pathogen Institute, University of Florida.* 70 p.
- Betancor, L., Pereira, M., Martinez, A., Giossa, G., Fookes, M., Flores, K., Barrios, P., Repiso, V., Vignoli, R., Cordeiro, N., Algorta, G., Thomson, N., Maskell, D., Schelotto, F., y Chabalgoity, J. 2010. Prevalence of Salmonella enterica in poultry and eggs in Uruguay during an epidemic due to Salmonella enterica serovar Enteritidis. *J. Clin. Microbiol.* 48: 2413–2423.
- Bichler, L. A., Nagaraja, K. V., y Halvorson, D. A. 1996. Salmonella enteritidis in eggs, cloacal swab specimens, and internal organs of experimentally infected white leghorn chickens. *Am. J. Vet. Res.* 57: 489-495.
- Bland, M., y Ghazikhanian, Y. 1998. Litter management and poultry health. *Nebraska Department of Veterinary and Biomedical Sciences Extension Newsletters, USA.* 8 p
- Buhr, R.J., Richardson, L.J., Cason, J.A., Cox, N.A., y Fairchild, B.D. 2007. Comparison of four sampling methods for the detection of Salmonella in broiler litter. *Poult. Sci.* 86: 21-25.
- Busse, M. 1995. Media for Salmonella. *Int. J. Food Microbiol.* 26:117-131.
- Caffer, M.I., Pichel, M., y Viñas, M.R. 2014. Género Salmonella. Páginas 15-26. In-----ed. *Enterobacterias: Actualización diagnóstica.* Servicio de Enterobacterias. Departamento de Bacteriología. INEI-ANLIS “Dr. Carlos G. Malbrán”. Buenos Aires, Argentina.
- Carrique-Mas, J.J. y Davies, R.H. 2008a. Salmonella Enteritidis in commercial layer flocks in Europe: Legislative background, on-farm sampling and main challenges. *Braz. J. Poult. Sci.* 10: 1-9.
- Carrique-Mas, J.J. y Davies, R.H. 2008b. Sampling and bacteriological detection of Salmonella in poultry and poultry premises: a review. *Rev. Sci. Tech.* 27:665-677.
- Chacana, P. y Terzolo, H. 2003. Revisión sobre Pullorosis y Tifosis aviar. *Rev. Med. Vet.* 84:14-20.
- Dai Prá, M., Kunde Corrêa, E., Buttow Roll, V.F., Goncalves Xavier, E., Nichelle Lopes, D.C., Fernandes Lourenço, F., Teixeira Zanusso, J., y Piccini Roll, P. 2010. Quicklime reduces Salmonella and Clostridium spp counts in used broiler litter. *WPSA J.* 66 S: 555.
- Davies, R. H., y Wray, C. 1996. Persistence of Salmonella enteritidis in poultry units and poultry food. *Brit. Poult. Sci.* 37: 589-596.
- Davies, R. y Wales, A. 2010. Investigations into Salmonella contamination in poultry feedmills in the United Kingdom. *J. Appl. Microbiol.* 109 (4):1430-1440.
- Delmas, G., Gallay, A., Espie, E., Haeghebaert, S., Pihier, N., Weill, F.X., De Valk, H., Vaillant, V. y Desenclos, J. 2006. Foodborne-diseases outbreaks in France between 1996 and 2005. *BEH.* 51; 418-422.
- Entis, P. 2002. *Food Microbiology-The Laboratory.* Food Processors Institute, Washington DC, U.S.A. 288 p.
- European Food Safety Authority. 2007. Report of the task force on zoonoses data collection on the analysis of the base line study on the prevalence of Salmonella in holdings of laying hen flocks of Gallus. *EFSA J.* 97: 1-84
- Foley, S., Nayak, R., Hanning, I., Johnson, T., Han, J., y Ricke, S. 2011. Population dynamics of Salmonella enterica serotypes in commercial egg and poultry production. *Appl. Environ. Microb.* 77: 4273–4279.

- Gast, R.K, Guraya R., Guard, J., y Holt, P. 2011. The relationship between the numbers of Salmonella Enteritidis, Salmonella Heidelberg, or Salmonella Hadar colonizing reproductive tissues of experimentally infected laying hens and deposition inside eggs. *Avian Dis.* 55; 243-247.
- Gast, R.K. 2013. Paratyphoid Infections. Páginas 693-713, 718-733. En *Diseases of Poultry*. D. E. Swayne, (Ed.), Wiley-Blackwell Publishing, Ames, Iowa, USA.
- Gazdzinski, P. 2004 Salmonella control in turkeys at farm level. 57–63. In Hafez, H. ed. *Proceedings of the 5th international symposium on turkey diseases*, Berlin. DVGService-GmbH, Giessen.
- Genta, G. 2013. Presencia de Salmonella en granjas de pollos parrilleros de la provincia de Entre Ríos. Tesis de veterinario. Universidad Juan Agustín Maza Facultad de Ciencias Veterinarias y Ambientales. Mendoza, Argentina.
- Grimont, P.A.D. y Weill, F.X. 2007. *Antigenic formulae of the Salmonella serovars 9th edition*. Institut Pasteur, 28 rue du Dr. Roux, 75724 Paris Cedex 15, France.
- Gutiérrez Cogco, L., Montiel Vázquez, E., Aguilera Pérez, P., y González Andrade, M.C. 2000. Serotipos de Salmonella identificados en los servicios de salud de México. *Salud Pública Mex.* 42:490-495.
- Hafez, H. 2013. Salmonella infections in turkeys. Páginas 193- 220. En Barrow, P., Methner, U. (Eds.). *Salmonella in Domestic Animals*. CABI North American.
- Hoover, N., Kenney, P., Amick, J., y Hypes, W. 1997. Preharvest sources of Salmonella colonization in turkey production. *Poult Sci.* 76:1232–1238.
- Ibrahim, M.A., Emeash, H.H., Ghoneim, N.H., y Abdel-Halim, M.A. 2013. Seroepidemiological studies on poultry salmonellosis and its public health importance. *J. World's Poult. Res.* 3:18-23.
- International Organization for Standardization. 2002. ISO 6579:2002 Annex D. Detection of Salmonella spp. in animal faeces and in environmental samples from the primary production stage. International Organization for Standardization, Geneva, Switzerland. http://www.iso.org/iso/iso_catalogue/catalogue_ics/catalogue_detail_ics.htm?csnumber=42109&ics1=07&ics2=100&ics3=30.
- Issenhuth-Jeanjean, S.; Roggentin, P.; Mikoleit, M.; Guibourdenche, M.; De Pinna, E.; Nair, S.; Fields, P.I., y Weill, F.X. 2014. Supplement 2008-2010 (no. 48) to the White-Kauffmann-Le Minor scheme. *Res Microbiol.* 165(7): 526-530.
- Kyprianou, M. 2006. Reglamento (CE) N° 1168/2006 de la Comisión de 31 de julio de 2006. *Diario Oficial de la Unión Europea L211/4-8*.
- Lacy, M. 2002. Litter quality and broiler performance. Cooperative Extension Service. The University of Georgia College of Agricultural of Environmental Sciences. pp 1-4.
- Luyo Flores, J.H. 2014. Evaluación sanitaria en pollos de engorde (Ross 308), criados en cama nueva vs. cama reciclada (7 reusos/flameado) en granjas comerciales. Tesis de Médico Veterinario. Universidad Nacional Mayor de San Marcos. Facultad de Medicina Veterinaria E.A.P. de Medicina Veterinaria. Lima, Perú.
- Maisonave, R., Lamelas, K., y Mair, G. 2015. Buenas prácticas de manejo y utilización de cama de pollo y guano. Secretaría de Agricultura, Ganadería y Pesca del Ministerio de Agroindustria. Subsecretaría de Ganadería Dirección Nacional de Producción Ganadera. 44p. Disponible en: http://www.minagri.gob.ar/site/ganaderia/aves/02-informes/_archivos/000004-Otros%20informes/151216_Buenas%20Practicas%20de%20Manejo%20y%20Utilizacion%20de%20Cama%20de%20Pollo%20y%20Guano%20de%20Gallina.pdf
- Marin, C., Balasch, S., Vegab, S., y Laineza, M. 2011. Sources of Salmonella contamination during broiler production in Eastern Spain. *Prev. Vet. Med.* 98: 39–45.
- Montville, T.J. y Mathews, K.R. 2008. *Food microbiology: An introduction*. ASM Press, Washington D.C., U.S.A.
- Mueller-Doblies, D., Sayers, A.R., Carrique-Mas, J.J., y Davies, R.H. 2009. Comparison of sampling methods to detect Salmonella infection of turkey flocks. *J. Appl. Microbiol.* 107: 635-645.
- Muniz, E., Mesa, D., Cuaspa, R., Souza, A.M., y Santin, E. 2013. Presence of Salmonella spp. in reused broiler litter. *Rev. Colomb. Cienc. Pecu.* 27:12-17.
- Noll, S.L. 1992. Interacciones entre el manejo de la cama y la salud de la parvada. *Avic. Prof.* 10(1): 42-43.
- Organización Mundial de Sanidad Animal. 2008. *Salmonellosis. Manual de la OIE sobre animales terrestres*. Disponible en:

- http://web.oie.int/esp/normes/mmanual/pdf_es_2008/2.09.09.%20Salmonelosis.pdf. Acceso junio 2016.
- Organización Mundial de Sanidad Animal. 2010. Prevención, detección y control de las infecciones de aves de corral por Salmonella. Código Sanitario para los Animales Terrestres. Páginas 1-8 Disponible en: http://web.oie.int/esp/normes/mcode/es_chapitre_1.6.5.pdf Acceso Agosto 2016.
- Pieskus, J., Franciosini, M.P., Casagrande Proietti, P., Reich, F., Kazeniauskas, E., Butrimaite-Ambrozeviciene, C., Mauricas, M. y Bolder, N. 2008. Preliminary investigations on Salmonella spp. incidence in meat chicken farms in Italy, Germany, Lithuania and the Netherlands. *Int. J. Poult. Sci.* 7:813-817.
- Procura, F., Rodríguez, F.I., y Bueno, D.J. 2015. Presencia de Salmonella spp. en las zonas de mayor concentración de granjas de pollos parrilleros de la provincia de Entre Ríos. In Asociación Argentina de Microbiología y el Colegio de Bioquímicos de Santa Fe-1era Circunscripción ed., Libro de resúmenes de XVI Jornadas Argentinas de Microbiología y III Congreso Bioquímico del Litoral, Santa Fe, Argentina, Agosto 5-7.
- Ritz, C.W., Fairchild, B.D., y Lacy, M.P. 2014. Litter Quality and Broiler Performance. *UGA Extension Bulletin* 1267.
- Rodríguez, F.I., F. Procura, F., y Bueno, D.J. 2015. Comparación de medios sólidos selectivos-diferenciales en el aislamiento de Salmonella spp. de muestras de cama provenientes de granjas avícolas. In Asociación Argentina de Microbiología y el Colegio de Bioquímicos de Santa Fe-1era Circunscripción ed., Libro de resúmenes de XVI Jornadas Argentinas de Microbiología y III Congreso Bioquímico del Litoral, Santa Fe, Argentina, Agosto 5-7.
- Rojas, M.J., García, M., y Masdeu, V. 2002. Resultados del análisis microbiológico de yasijas de paja de arroz utilizadas en la avicultura. *Rev. Cubana de Ciencias Avícolas* 26: 121-123.
- Roll, V.F.B., Dai Prá, M.A. y Roll, A.P. 2011. Research on Salmonella in broiler litter reused for up to 14 consecutive flocks. *Poult Sci.* 90:2257–2262.
- Santos, F.B.O., Li, X., Payne, J.B., y Sheldon, B.W. 2005. Estimation of Most Probable Number Salmonella Populations on Commercial North Carolina Turkey Farms *J. Appl. Poult. Res.* 14:700– 708.
- Schlundt, J., Toyofuku, H., Jansen, J., y Herbst, S. 2004. Emerging foodborne zoonoses. *Rev. Sci. Tech.* 2004 23(2):513-533.
- Servicio Nacional de Sanidad y Calidad Agroalimentaria. 2002. Programa de Control de las Micoplasmosis y Salmonelosis de las Aves y Prevención y Vigilancia de Enfermedades Exóticas y de Alto Riesgo en plantales de reproducción. Disponible en: http://www.senasa.gov.ar/sites/default/files/normativas/archivos/resolucion-882_2002.pdf. Consultado Agosto 2016.
- Servicio Nacional de Sanidad y Calidad Agroalimentaria. 2012. Anexo Programa de Control de Salmonella spp. en granjas avícolas de pollos de engorde en la República Argentina. Proyecto borrador.
- Servicio Nacional de Sanidad y Calidad Agroalimentaria. 2016a. Resolución 86/2016. Programa de vigilancia y control de la contaminación por Salmonella spp. en granjas avícolas comerciales. Disponible en: http://www.cira.org.ar/index.php?option=com_content&view=article&id=6600:resolucion-86-2016&catid=112&Itemid=500
- Servicio Nacional de Sanidad y Calidad Agroalimentaria. 2016b. Plan Nacional de Sanidad Avícola. Manual de Procedimientos operativos. 15 p.
- Silva, V.S. 2013. Técnicas de fermentación de camas, aspectos sanitarios. Memorias X Seminario de Actualización avícola de AMEVEA Entre Ríos, Colón, Entre Ríos, Argentina.
- Skov, M. N., Carstensen, B., Tornøe, N. y Madsen, M. 1999. Evaluation of sampling methods for the detection of Salmonella in broiler flocks. *J. Appl. Microbiol.* 86: 695–700.
- Tabler, T. 2000. Importance of Litter Quality to Broiler Producers. *Avian Advice*. Winter. Georgia - EEUU. Vol 2. N° 2. pp 3-5.
- Terrera, M.V. 2012. Situación sanitaria de la avicultura comercial en la Argentina (2007-2009). P.83-84 Disponible en: <https://viejaweb.senasa.gov.ar/Archivos/File/File3747-final.pdf>. Acceso Agosto de 2016.

- Uribe, C., y Suárez, M.C. 2006. Salmonelosis no tifoidea y su transmisión a través de alimentos de origen aviar. *Colombia Médica* 37(2): 151-158.
- Williams, M., Barker, J., y Sims, J. 1999. Management and utilization of poultry wastes. *Rev. Environ. Contam. Toxicol.* 162: 105–157.