

Implicación de la limpieza y desinfección en la persistencia de *Salmonella* en avicultura de engorde

S. GONZÁLEZ^{1*} M. MATEOS² S. VEGA² Y C. MARÍN²

¹ Universidad CEU Cardenal Herrera-Universidad Politécnica de Valencia ² Universidad CEU Cardenal Herrera -Centro de Tecnología Animal.

*saragonzalezbodi@gmail.com

RESUMEN

La limpieza y desinfección se considera hoy en día como factor clave para la eliminación de *Salmonella* de las explotaciones avícolas. Existen numerosos estudios que estudian los diferentes factores que influyen en la eficacia de los desinfectantes utilizados en los planes de limpieza y desinfección, como puede ser la capacidad de producir biofilm por la bacteria, la dureza del agua, la incorrecta aplicación de los desinfectantes, etc. El objetivo de este trabajo es conocer las concentraciones más eficaces a la hora de aplicar los desinfectantes más comúnmente utilizados a nivel de campo y determinar la eficacia de estos frente a cepas con capacidad o no de producir biofilm de los principales serotipos de importancia para Salud Pública (*S. Enteritidis*, *S. Typhimurium*, *S. Hadar*, *S. Virchow* y *S. Infantis*). Para ello, se realizó una prueba in vitro donde se detectaron las concentraciones más efectivas de cada uno de los desinfectantes (Glutaraldehído, Formaldehído y Ácido Orgánico con Agentes Oxidantes) frente a cepas de *Salmonella* con o sin capacidad de producir biofilm de cada uno de los serotipos. A continuación, estas concentraciones se aplicaron en condiciones de campo donde nuevamente se enfrentaron a los diferentes serotipos de *Salmonella* según su capacidad de producir biofilm. Los resultados demostraron que la aplicación de los desinfectantes a las concentraciones testadas dieron lugar a una total eliminación de la bacteria de las superficies tras la prueba de campo.

Palabras clave: *Salmonella*; Limpieza y Desinfección; Desinfectantes; Aves de corral.

ABSTRACT

It is well known the importance of cleansing and disinfection (C&D) to remove Salmonella from poultry farms. Cleaning and disinfection is considered to be one of the main risk factors related with the persistence of the bacterium in the production system. There are several studies which investigate different factors involved in the effectiveness of disinfectants used in cleaning and disinfection protocols, such as hardness of water, water temperature, disinfectants concentration or biofilm development capacity of bacteria. The aim of this study was to test the most effective concentrations of disinfectants commonly used in poultry production against Salmonella biofilm and nonbiofilm strains of the five most important serotypes for Public Health (S. Enteritidis, S. Typhimurium, S. Hadar, S. Virchow and S. Infantis). Firstly, an in vitro test was carried out to detect the most effective concentrations of Glutaraldehyde, Formadehyde and Oxidizing Agents Organic Acid against biofilm and nonbiofilm Salmonella strains. Then, the most effective concentrations were applied against the biofilm and nonbiofilm strains under field conditions. The results demonstrate a complete elimination of Salmonella from surfaces when disinfectants were applied at concentrations tested.

Keywords: *Salmonella*; Cleansing and Disinfection; Disinfectants; Poultry.

INTRODUCCIÓN

La salmonelosis esta considerada como uno de los problemas más importantes de Salud Pública asociada al consumo de alimentos,(OMS 2006,EFSA 2011). La prevención de la contaminación por *Salmonella* de productos avícolas, requiere un conocimiento detallado de los principales factores de riesgo

implicados en su presencia en el sector primario, (Marín *et al.*, 2009). Numerosos estudios epidemiológicos ponen de manifiesto la importancia de la limpieza y desinfección (L&D) en la persistencia de *Salmonella* en avicultura. Rose *et al.* (2000, Francia), observaron unos niveles de contaminación por *Salmonella* del 69,8% y 38,4% en muestras ambientales, antes y después de la L&D, respectivamente. Resultados similares fueron obtenidos por Marín *et al.* (2011, España) con 41,3% y 20,0%, antes y después de la L&D, respectivamente. Existen diferentes hipótesis de por qué la bacteria permanece en el ambiente después de realizar la L&D, como un uso incorrecto de los desinfectantes, la dureza y temperatura incorrectas del agua de limpieza o la capacidad de las cepas de producir biofilm, (Carrique *et al.*, 2009). Los objetivos de este estudio fueron (i) Evaluar *in Vitro* tres desinfectantes basados en diferentes principios activos, (Glutaraldehído, Formaldehído y Ácidos orgánicos con Agentes Oxidantes) frente a los 5 serotipos de *Salmonella* de mayor importancia en Salud Pública, con y sin capacidad de formar biofilm. ii) Analizar a nivel de campo los tres desinfectantes frente a los 5 serotipos con y sin capacidad de formar biofilm.

MATERIAL Y MÉTODOS

Experimento 1, Evaluación *in vitro* de los desinfectantes

Desinfectantes

Para la realización de este experimento se utilizaron diferentes concentraciones de los principios activos más empleados en los desinfectantes avícolas, (Glutaraldehído, Formaldehído y Ácidos Orgánicos con Agentes Oxidantes).

Para realizar los controles y las diluciones de los desinfectantes se utilizó agua milli-Q estéril. Las soluciones desinfectantes se prepararon a diferentes concentraciones del principio activo (0,5%, 1.0%, 2.0%, 3.0% y 4.0%). Todas las soluciones desinfectantes fueron preparadas el día de su uso.

Cepas bacterianas

Las cepas que se utilizaron en este experimento fueron los principales serotipos de importancia en Salud Pública que previamente habían sido aisladas a nivel de campo. Los serotipos utilizados se clasificaron de acuerdo con su capacidad o no formar biofilm. (*S. Enteritidis*, *S. Typhimurium*, *S. Hadar*, *S. Virchow* y *S. Infantis*). Se obtuvieron por tanto 20 grupos de cepas diferentes.

Análisis de la viabilidad *in vitro*

Cada uno de los serotipos, indicados anteriormente, fueron cultivados en 25 mL de Caldo LB (Luria-Bertoni) a 37°C durante 24h hasta alcanzar una concentración de 10⁸ UFC/ml, determinada mediante el recuento celular en cámara de cuenta glóbulos de Thoma-Zeis, Marienfeld, Alemania. Posteriormente, 5mL del cultivo bacteriano de cada uno de los serotipos con o sin capacidad de biofilm, fueron expuestos a las diferentes concentraciones de desinfectantes (0.5%, 1%, 2%,3%,4%) durante 60 minutos a temperatura ambiente. Transcurrido el tiempo, las muestras fueron incubadas con yoduro de propidio (Sigma, Aldrich, Espiral y SyBr-14) durante 10 minutos en oscuridad. Posteriormente las muestras fueron montadas sobre un portaobjetos y evaluadas bajo microscopía de fluorescencia (Nicho, Eclipse). Aparecieron *Salmonellas* de color rojo que fueron catalogadas como no viables y *Salmonellas* de color verde como viables, (Imagen.1.). Un mínimo de 100 *Salmonellas* para cada muestra fueron evaluadas. Se realizaron 3 repeticiones por serotipo y concentración del principio activo.

Experimento 2, Análisis de los principios activos *in vivo*

Basándose en los resultados del experimento anterior se ensayaron las concentraciones del 2% de Glutaraldehído, 2% de Formaldehído y 0.5% de Ácidos Orgánicos y Agentes Oxidantes. Para la infección, se utilizaron las mismas cepas del experimento 1, pero en este caso, se hicieron dos pools de 10 cepas de cada serotipo. Para cada serotipo el primer pool estaba formado por serotipos con capacidad de producir biofilm y el segundo, por serotipos sin capacidad de producir biofilm. Las cepas fueron obtenidas acorde con lo descrito

en el experimento 1. Este experimento se desarrolló en la granja experimental del Centro de Tecnología Animal (Instituto Valenciano de Investigaciones Agrarias, Segorbe, España). Antes de la realización del experimento la nave fue analizada y determinada como libre de *Salmonella* de acuerdo con la ISO6579:2002 (anexo D).

La superficie seleccionada para llevar a cabo la prueba fue el suelo de cemento, ya que se ha demostrado que *Salmonella* tiene una tendencia muy elevada a resistir la desinfección en el suelo (Davies y Wray, 1995; Davies y Breslin, 2001). Cada desinfectante se testó en círculos de 10cm. de diámetro. De cada área se tomaron muestras para descartar contaminación de *Salmonella* previa a la inoculación. Posteriormente, se inoculó y dispersó 1 ml del cultivo de *Salmonella* en cada uno de los círculos con la ayuda un paño estéril. Tras la contaminación, las bacterias se dejaron durante tres días para favorecer su crecimiento. Pasados los tres días y antes de aplicar los desinfectantes a las concentraciones seleccionadas, se tomó muestra de control para asegurarse de la presencia de la bacteria. Finalmente, los desinfectantes se aplicaron con atomizadores dejando actuar durante 60 minutos. Pasado el tiempo indicado, se tomó una muestra de cada una de las superficies estudiadas así como de los controles (positivos y negativos) con paños estériles empapados en neutralizante.

Aislamiento de *Salmonella*

Todas las muestras fueron recogidas directamente de las duquesas estériles y analizadas de acuerdo con la Norma ISO6579:2002 (Anexo D). Para ello, se realizó un preenriquecimiento de las muestras en 1:10 vol./vol. de Agua de Peptona Tamponada (BPW, Scharlau®, Barcelona, España) y se incubaron a 37 ± 1 °C durante 18 ± 2 h. Posteriormente se transfirieron 0.1 mL de la muestra preenriquecida, en tres gotas, a una placa de Rappaport Vassiliadis semisólido modificado (MSRV, Difco®, Valencia, España), que se incubó a 41.5 ± 1 °C durante $24/48 \pm 2$ h. El cultivo obtenido se transfirió a dos medios diferentes, XLD, Xylose-lysine-desoxicolato, (Liofilchem®, Valencia, España) y Xylose-lysine-tergitol-4 (XLT4, Diagnóstico Biokar®, Patin Cedex, Francia) y se incubaron a 37 ± 1 °C durante 24 a 28 horas.

Tras el periodo de incubación, se seleccionaron 5 colonias sospechosas, que se hicieron crecer en agar Nutritivo (Scharlab®, Barcelona, Spain) 37 ± 1 °C durante 24 ± 3 h. Por último, se realiza una confirmación bioquímica con el test API (API-20, bioMeieux®, Madrid, España) donde se confirmó *Salmonella* spp. Para cada tratamiento (capacidad de formar biofilm × serotipo × desinfectante × concentración) se realizaron tres repeticiones en tres sesiones diferentes.

Análisis estadístico

Las diferencias entre las concentraciones de los desinfectantes y su efectividad, se analizaron con un Test Chi-cuadrado (Statgraphics Plus, Versión 5.1, STSC Inc., Rockville, MD).

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Experimento 1, Evaluación in vitro de los Desinfectantes

Cuando el Formaldehído fue evaluado, concentraciones a partir del 2% eran las que producían la no viabilidad de todos los serotipos. Resultados similares fueron obtenidos con el Glutaraldehído. En cuanto al Ácido Orgánico y los Agentes Oxidantes, concentraciones a partir del 0.5 % presentaban el 100% de los serotipos no viables.

Experimento 2, Análisis de los principios activos

La aplicación en campo de los tres desinfectantes, confirmaron que todos los serotipos tanto aquellos capaces de producir biofilm como aquellos que no, son totalmente eliminados.



Imagen 1. *Salmonellas* viables y no viables tras haber sido aplicado un desinfectante. Fotografía de microscopio de fluorescencia.

En la imagen1., se observa una mezcla de *Salmonellas*. Con coloración rojiza, se encuentran las bacterias extintas tras aplicar el desinfectante y que ya no son capaces de multiplicarse. Con coloración verdosa, *Salmonellas* vivas que tras la desinfección serían capaces de multiplicarse y mantener la contaminación dentro de la explotación.

El principal problema que se encuentra el sector avícola para el control de *Salmonella* a nivel de campo, es que cada vez las exigencias del mercado hacen que los vacíos sanitarios sean más cortos y que por tanto, las naves tengan que estar limpias y desinfectadas en el menor tiempo posible (Wales *et al.*, 2006; Carrique Mas *et al.*, 2009). Durante el vacío sanitario se deben arreglar desperfectos de la nave producidos durante el engorde anterior, limpiar, desinfectar, desinsectar y desratizar, (Gradel *et al.*, 2004). Estas acciones no siempre es posible que se realicen de forma exhaustiva lo que conlleva a una pobre Limpieza y Desinfección de la granja (L&D). Los resultados obtenidos en este estudio ponen de manifiesto que cuando la L&D se lleva a cabo de forma exhaustiva y siguiendo las indicaciones de los productos utilizados de forma minuciosa, los resultados son muy favorables para la eliminación de la *Salmonella*. Por lo tanto, cuando los ganaderos utilizan estos productos y no son capaces de eliminar la bacteria, la eficacia del desinfectante podría estar supeditada a la correcta aplicación del mismo de acuerdo con relatado por otros autores como (Davies y Breslin, 2003).

Una de los principales factores de riesgo a la hora desinfectar la nave de forma eficaz, es la limpieza previa a esta desinfección. Realizar una incorrecta limpieza de la nave, produce una disminución de la eficacia del desinfectante (Rose *et al.*, 1999). La limpieza previa puede llegar a reducir la concentración del desinfectante a aplicar, con el ahorro económico que ello conlleva, (Marín *et al.*, 2009). Además, no debemos olvidar que en presencia de materia orgánica los desinfectantes pierden su efectividad (Gradel *et al.*, 2004).

La correcta concentración del desinfectante durante la aplicación también es un punto de importancia, ya que en prácticas de limpieza con nebulización y pulverización aparecen incorrectas diluciones que llevarán consigo un fallo en los programas de L&D (Huneau-Salaün *et al.*, 2010).

Además de la importancia de que se cumplan estrictamente los protocolos de L&D, existen otras medidas de importancia como, desmontar el equipo móvil de la granja para facilitar su desinfección (Davies and Wray 1996; Bouquin *et al.*, 2010), acceder a los lugares de difícil acceso (Mueller *et al.*, 2009), eliminar posibles vectores como son los ratones que a través de sus heces son un importante foco de contaminación entre lotes sucesivos (Carrique-Mas *et al.*, 2009a) y adoptar medidas de bioseguridad que impidan la recontaminación de la granja durante el siguiente ciclo productivo (Davies y Breslin, 2003; Wales *et al.*, 2006). Todas estas medidas facilitan y aseguran una óptima L&D. Por otro lado, existen otros factores como la temperatura de aplicación del desinfectante (Russell *et al.*, 2004), la presencia de restos de materia orgánica (Gradel *et al.*, 2004), el tiempo de aplicación del producto y la dureza del agua que pueden influir en la eficacia del desinfectante (Taylor y Holah, 1996; Gradel *et al.*, 2004; Lapidot *et al.*, 2006).

Además de estos factores la elección de un correcto desinfectante de acuerdo con las características de la granja y el grado de contaminación (Mueller *et al.* 2009) es de vital importancia para la total eliminación de la bacteria. A pesar de la importancia de otras medidas preventivas para el control de *Salmonella* a nivel de campo como vacunación, administración de probióticos, prebióticos, acidificación del pienso,... La limpieza y desinfección sigue considerándose como uno de los principales factores de riesgo en avicultura (Marín *et al.*, 2011). Por ello es importante tener en cuenta los factores

involucrados en su eficacia y aplicar correctamente los programas de L&D, para poder disminuir la prevalencia de *Salmonella* en las explotaciones de forma progresiva hasta llegar a erradicarla a nivel de campo.

En lo que respecta a los desinfectantes testados en este estudio, su aplicación a nivel de campo a las concentraciones adecuadas ha resultado eficaz en los tres casos en las que se ha realizado la prueba, independientemente del principio activo (Glutaraldehído, Formaldehído o Ácidos Orgánicos y Agentes Oxidantes) utilizado y la capacidad o no de desarrollar biofilm.

Algunos autores como Wales *et al.*, 2006; Carrique-Mas *et al.*, 2009b, defiende que productos con base Formaldehído son los más efectivos para eliminar *Salmonella* incluso en presencia de materia orgánica, aunque presenta algunos inconvenientes como su alto coste económico y las propiedades cancerígenas de sus componentes que dificultan la aplicación (Rose *et al.*, 1999; Davis and Wray 1995c, 1996b; Rusell *et al.*, 2004; Mueller *et al.*, 2009). Otros autores relatan la ineficiencia de los ácidos orgánicos para eliminar *Salmonella*, ya que en presencia de materia orgánica se inactivan rápidamente (Rusell y Chopra, 1996; Gradel *et al.*, 2004).

Otra de las ideas que se defiende para justificar la ineficacia del desinfectante, es la capacidad de la bacteria de desarrollar biofilm, ya que este le confiere protección de las condiciones adversas del entorno haciendo a la bacteria hasta 1000 veces más resistente a las agresiones externas como son los desinfectantes (Alvarez *et al.*, 1997; Solano *et al.*, 2002; Moretro *et al.*, 2009).

En conclusión, independientemente del principio activo utilizado y la capacidad o no de crear biofilm por la bacteria, los resultados demuestran que realizando unas buenas prácticas de L&D se obtiene una total eliminación de la bacteria.

REFERENCIAS

ALVAREZ, M., SOLANO, C., SESMA, B. and GAMAZO, C. (1997) Biofilm produced in starvation from virulent strains of *Salmonella enterica* Enteritidis. Proceedings of the International Symposium of *Salmonella* and Salmonellosis, Ploufragan, France, May 20 to 22 p441.

CARRIQUE-MAS, J.J., BRESLIN, M., SNOW, L., MCLAREN, I., SAYERS, A.R. and DAVIES, R.H. (2009a) Persistence and clearance of different *Salmonella* serovars in buildings housing laying hens. *Epidemiology and Infection* 137:837-846.

CARRIQUE-MAS, J., MARIN, C., BRESLIN, M., MCLAREN, I. and DAVIES, R.H. (2009b) A comparison of the efficacy of cleaning and disinfection methods in eliminating *Salmonella* spp. from commercial egg laying houses. *Avian Pathology* 38:419-424.

DAVIES, R.H. and WRAY, C. (1995) Observations on disinfection regimens used on *Salmonella enteritidis* infected poultry units. *Poultry Science* 74: 638-647.

DAVIES, R.H. and WRAY, C. (1996b) Studies of contamination of three broiler breeder houses with *Salmonella enteritidis* before and after cleansing and disinfection. *Avian Diseases* 40:626-633.

DAVIES, R. H. and M. BRESLIN. (2001) Environmental contamination and detection of *Salmonella enterica* serovar Enteritidis in laying flocks. *The Veterinary record* 146 :699-704.

DAVIES, R. H. and BRESLIN, M. (2003) Observations on *Salmonella* contamination of commercial laying farms before and after cleaning and disinfection. *The Veterinary record* 152: 283-287.

DAVIES, R. H. and WRAY, C. (1995) Observations on disinfection regimens used on *Salmonella Enteritidis* infected poultry units. *Poultry Science* 74:638-647.

DAVIES, R. H. and WRAY, C. (1996). Persistence of *Salmonella Enteritidis* in poultry units and poultry food. *Br. Poultry Science* 37:589-596.

EFSA (European Food Safety Authority). (2009) The community summary report on trends y sources of zoonoses y zoonotic agents in the European Union in 2007. *The EFSA Journal*. 223: 1-217.

EFSA (European Food Safety Authority) (2011) Analysis of the baseline survey on the prevalence of *Campylobacter* in broiler batches and of *Campylobacter* and *Salmonella* on broiler carcasses, in the EU in 2008. *The EFSA Journal* 2011;9(2):2017

GRADEL, K. O., CHR. JORGENSEN, J., ANDERSEN, J.S., and CORRY J.E.L. (2004) Monitoring the efficacy of steam and formaldehyde treatment of naturally *Salmonella*-infected layer houses. *Journal of Applied Microbiology* 96:613-622.

HUNEAU-SALAÛN, A., MICHEL, V., BALAINE, L., PETETIN, I., EONO, F., ECOBICHON, F. and BOUQUIN, S.L.E (2010) Evaluation of common cleaning and disinfection programmes in battery cage and on-floor layer houses in France', *British Poultry Science* 51:2, 204 - 212

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, Geneva, Switzerland.

LAPIDOT, A., ROMLING, U. and YARON, S. (2006) Biofilm formation and the survival of *Salmonella* Typhimurium on parsley. *International Journal of Food Microbiology* 109:229–233.

LE BOUQUIN, S., ALLAIN, V., ROUXEL, S., PETETIN, I., PICHEROT, M., MICHEL, V. and CHEMALY, M. (2010). Prevalence and risk factors for *Salmonella* spp. contamination in French broiler-chicken flocks at the end of the rearing period. *Preventive Veterinary Medicine* 97: 245-251.

MARIN, C., HERNANDIZ, A. and LAINEZ, M. (2009) Biofilm development capacity of *Salmonella* strains isolated in poultry risk factors and their resistance against disinfectants *Poultry Science*. 88:424-431.

MORETRO, T., VESTBY, L.K., NESSE, L.L., HANNEVIK, S., KOTLARZ, K. and LANGSRUD, S. (2009). Evaluation of efficiency of disinfectants against *Salmonella* from the feed industry. *Journal of Applied Microbiology* 106:1005-1012.

MUELLER-DOBLIES, D., SAYERS, A.R., CARRIQUE-MAS, J.J. and DAVIES, R.H., (2009) Comparison of sampling methods to detect *Salmonella* infection of turkey flocks. *Journal of Applied Microbiology* 107: 635-645.

FAO-OMS. (2001) Consulta Mixta FAO/OMS de Expertos sobre la evaluación de riesgos asociados a los peligros microbiológicos en los alimentos. <http://www.fao.org/docrep/008/y1332s/y1332s00.htm>. Accessed Sep. 2005.

ROSE, N., BEAUDEAU, F., DROUIN, P., TOUX, J.Y., ROSE, V. and COLIN, P. (1999). Risk factors for *Salmonella enterica* subsp. *enterica* contamination in French broiler-chicken flocks at the end of the rearing period. *Preventive Veterinary Medicine* 39:265-277.

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

RUSSELL, A., and CHOPRA, I. (1996). Antiseptics, disinfectants and preservatives: Their properties, mechanisms of action and uptake into bacteria. Pages 96–149 in *Understanding Antibacterial Action and Resistance*, 2nd ed. A. D. Russell and I. Chopra, ed. Ellis Horwood, London, UK.

RUSSELL, A.D. (2004) Factors influencing the efficacy of antimicrobial agents. In Russell, Hugo and Ayliffe's *Principles and Practice of Disinfection, Preservation and Sterilization* ed. Fraiese, A.P., Lambert, P.A. and Maillard, J.-Y. pp. 98–127. Victoria, Australia: *Blackwell Publishing*.

TAYLOR, J. H. and HOLAH, J.T. (1996) A comparative evaluation with respect to the bacterial cleanability of a range of wall and floor surface materials used in the food industry. *Journal Applied Bacteriology* 81:262-266.

WALES, A., BRESLIN, M. and DAVIES, R. (2006) Assessment of cleaning and disinfection in *Salmonella*-contaminated poultry layer houses using qualitative and semiquantitative culture techniques. *Veterinary Microbiology* 116:283-293.