

## PULOROSIS Y TIFOSIS AVIAR

---

### RESUMEN

**Descripción e importancia de la enfermedad:** La pulorosis de los pollos está causada por *Salmonella enterica subespecie enterica serovariedad Gallinarum biotipo Pullorum* (*Salmonella Pullorum*)<sup>1</sup>. En este momento la serovariedad se denomina *Gallinarum* en algunas partes del mundo y *Pullorum* en otras; en este capítulo la serovariedad se denominará *Gallinarum* o *Pullorum* según el biotipo que se discuta, porque desde el punto de vista clínico y epidemiológico tiene más sentido.

En su forma aguda, la pulorosis es una enfermedad septicémica prácticamente exclusiva de los polluelos. Sin embargo, el microorganismo también se puede asociar a la enfermedad en pavipollos y puede padecerse subclínicamente o puede originar la disminución de la producción de huevos en la incubación junto con varios signos atípicos en las aves adultas. La transmisión ovárica es la vía principal de propagación de este microorganismo. Las aves de caza y las de corral pueden actuar como reservorios de la infección, mientras que las aves salvajes pueden funcionar como vectores del microorganismo y, como tales, son importantes en la epidemiología de la enfermedad.

La tifosis aviar en pollos y pavos está causada por *S. Gallinarum*, biovariedad *Gallinarum*, y se observa con mayor frecuencia al final del período de crecimiento y en las parvadas de aves adultas. A menudo la enfermedad se caracteriza por una rápida propagación con morbilidad alta y mortalidad aguda o subaguda. Las garrapatas rojas pueden estar involucradas en la transmisión de la enfermedad y su persistencia en granjas de aves de corral.

Los signos clínicos en pollitos y pavipollos son anorexia, diarrea, deshidratación, debilidad y muerte. En aves adultas, la pulorosis es menos grave pero puede causar disminución de la producción de huevos, mala incubabilidad y cierto aumento de la mortalidad. La tifosis aviar es un trastorno septicémico más agudo que afecta principalmente a aves adultas y puede ser especialmente grave en parvadas de ponedoras comerciales.

**Identificación del agente:** Las muestras no se deben tomar a partir de aves o huevos que se hayan tratado recientemente con antimicrobianos. Para las pruebas de diagnóstico, deben utilizarse hisopos o muestras recogidas de forma aséptica a partir de los tejidos infectados o de los contenidos intestinales y cloacales. Otros materiales que se pueden utilizar como muestras son: huevos, embriones, excrementos y restos de la incubación, especialmente las pelusas, el polvo y las cáscaras rotas y los revestimientos protectores de las cajas de pollitos. Las muestras de tejidos tales como las amígdalas cecales, el hígado, la vesícula biliar y el bazo procedentes de las aves infectadas son preferibles a las muestras fecales y medioambientales. Se deben inocular las muestras de tejido en un caldo de enriquecimiento selectivo y no selectivo y en un agar selectivo, como el agar verde brillante, tan pronto como sea posible después de recoger las muestras. En el caso de que se produzca un retraso, las muestras se deben conservar a 4°C. Se pueden identificar las colonias típicas mediante pruebas serológicas y bioquímicas. Para identificar y diferenciar *S. Gallinarum* y *S. Pullorum* también pueden emplearse pruebas moleculares. La confirmación serológica definitiva de cepas sospechosas normalmente solo se lleva a cabo en un Laboratorio de Referencia para la tipificación de *Salmonella*.

---

1 Véase la nota en el capítulo 3.9.8 *Salmonelosis*, para conocer los principios seguidos concernientes a la nomenclatura de *Salmonella*.

**Pruebas serológicas:** Estas pruebas son adecuadas para identificar la presencia y estimar la prevalencia de la infección en una parvada. La prueba utilizada en el campo es la prueba rápida de aglutinación en placa de sangre entera. Esta prueba no es fiable en pavos ni patos dado que muchas aves no infectadas pueden dar reacciones positivas. En el laboratorio se emplea una prueba de aglutinación de suero, como prueba rápida en placa o como prueba en tubo. Se pueden aplicar como pruebas de macro- o microaglutinación, aunque es más probable que esta última pueda dar falsos positivos con los sueros de pavo. En cualquier animal que dé reacción positiva se debe confirmar la infección mediante un cultivo en un examen postmortem. Se han descrito técnicas de enzimoanálisis pero no comercializan.

La utilización de vacunas para controlar las infecciones por *S. Enteritidis* o *S. Gallinarum* en pollos puede causar problemas en la interpretación de los resultados serológicos.

**Requisitos para las vacunas:** En algunos países se dispone de vacunas vivas e inactivadas contra la tifosis aviar. La vacuna más utilizada es una vacuna viva comercial derivada de la cepa estable y rugosa de *S. Gallinarum* denominada "9R".

## A. INTRODUCCIÓN

La tifosis y pulorosis aviar, causadas por *Salmonella enterica*, subespecie *enterica*, serovariedad *Gallinarum* y biotipos *Gallinarum* y *Pullorum*, respectivamente, se encuentran distribuidas ampliamente por todo el mundo, sobre todo en países en vías de desarrollo (Barbour *et al.*, 2015) donde la creciente resistencia a los agentes antimicrobianos en estas cepas también se ha convertido en un problema (Parvej *et al.*, 2016). pero se han erradicado de las aves comerciales en muchos países desarrollados de Europa occidental, EE.UU., Canadá, Australia y Japón. En muchos países, el avance hacia una producción ecológica podría aumentar el riesgo de infección (Vielitz, 2016), pero muchos brotes afectan a gallinas ponedoras o poblaciones de reproductores alojados en sistemas intensivos. En los Estados Unidos y en el Reino Unido la serovariedad se denomina *Pullorum* (Hitchner, 2004); sin embargo, ahora las cepas se considera que son la misma serovariedad que la derivada de *S. Enteritidis* por delecciones génicas (Thomson *et al.*, 2008); en este capítulo se utilizarán los términos serovariedades *Gallinarum* y *Pullorum*, ya que así se distinguen mejor las dos biovariedades, que causan síndromes clínicos claramente diferenciados, y por tanto son epidemiológicamente distintas. En la primera década del siglo XXI, *S. Gallinarum* ha vuelto a aparecer en algunos países europeos (Ivanics *et al.*, 2008). *Salmonella Pullorum* sigue siendo un reservorio contante en aves salvajes y de caza (Barrow *et al.*, 2012; Shivaprasad *et al.*, 2013).

En el capítulo 3.9.8 de este *Manual Terrestre* se trata la salmonelosis causada por *Salmonella bongori* o por otras subespecies de *Salmonella enterica*.

Los signos clínicos de la tifosis aviar son los típicos de un trastorno septicémico de las aves de corral y supone el incremento de la mortalidad y la reducción de la calidad de los polluelos eclosionados a partir de los huevos infectados. Las aves mayores presentan signos de anemia, depresión, dificultad respiratoria y diarrea que causa adherencia de las heces en la cloaca. La mortalidad más alta por pulorosis tiene lugar en aves de 2–3 semanas de edad. La enfermedad en las aves mayores puede ser leve o inapreciable. En las parvadas de reproductores y de ponedoras, la susceptibilidad ha aumentado en el pico de puesta (Wigley *et al.*, 2005), pero la eclosión y reducción de la producción de huevos pueden ser los únicos signos de la pulorosis, mientras que la infección transovárica que provoca la infección de los huevos y de los pollitos o pavipollos eclosionados es una de las más importantes vías de transmisión de ambas enfermedades (Haider *et al.*, 2014).

Los signos postmortem de la pulorosis en los polluelos recién eclosionados son peritonitis que cursa con la congestión generalizada de los tejidos y la inflamación del saco vitelino no absorbido. Las infecciones más duraderas conducen generalmente a tiflitis con desarrollo de proyecciones cecales necróticas y pequeños focos necróticos en el hígado, los pulmones y otras vísceras. Las pequeñas lesiones en el hígado y en el bazo de aves infectadas por *Pullorum* pueden presentar un aspecto de "puntos blancos" que no se observan en las infectadas por *Gallinarum*; sin embargo, esta lesión no es patognomónica. Estas *Salmonella* tienen una escasa colonización y la supervivencia en el tracto intestinal a menudo es indicativa de los estadios posteriores de la enfermedad clínica. Las aves adultas pueden presentar ovarios deformados, con cambios de color y/o reducidos con folículos adheridos por tallos fibrosos pedunculados. Las cepas variantes de *S. Pullorum* generalmente no causan enfermedad clínica o pueden ocasionar signos leves no específicos, pero pueden ocasionar seroconversión.

En el caso de la tifosis aviar, además de signos generalizados de septicemia, se observa que el hígado está habitualmente agrandado, oscuro y fragmentado, con un peculiar brillo bronceado-cobrizo que sólo puede desarrollarse después de la exposición al aire. Frecuentemente, la médula ósea presenta también un color

marrón oscuro. Aunque los signos clínicos y los exámenes postmortem de la pulorosis y la tifosis aviar pueden ser muy sugerentes de ambos trastornos, no son lo bastante diferentes de otras causas de septicemia como para considerarlos patognomónicos. Por tanto, es necesario confirmar la enfermedad aislando los microorganismos. Se pueden establecer pruebas serológicas para determinar la presencia de las bacterias causantes de la enfermedad en una parvada.

## 1. Riesgo zoonótico y requisitos de bioseguridad

*Salmonella* Gallinarum y *S. Pullorum* son especies aviarias adaptadas al hospedador (Eswarappa *et al.*, 2009) y se considera que supone muy poco riesgo zoonótico (Shivaprasad, 2000). Aunque el genoma está adaptado a un entorno no intestinal y ha perdido los genes de los flagelos para ayudarse a evadir las respuestas inmunitarias del hospedador (Lopes *et al.*, 2016), está evolucionando continuamente, lo cual teóricamente podría ampliar la variedad de hospedadores en el futuro (Liu *et al.*, 2002). Las serovariedades de *Salmonella* no tifoideas deben manipularse aplicando procedimientos de bioseguridad y bioprotección adecuados, que vendrán determinados por un análisis del riesgo biológico (véase el Capítulo 1.1.4 *Bioseguridad y bioprotección: Norma para la gestión del riesgo biológico en el laboratorio veterinario y en las instalaciones de los animales*).

## B. TÉCNICAS DE DIAGNÓSTICO

**Tabla 1.** Métodos analíticos disponibles para el diagnóstico de la pulorosis y la tifosis aviar y su propósito

Método	Propósito					
	Demostrar ausencia de infección en la población	Demostrar ausencia de infección en animales individuales antes de los desplazamientos	Contribuir a las políticas de erradicación	Confirmar casos clínicos	Demostrar ausencia de infección en la población	Determinar el estado inmunitario en animales o poblaciones tras la vacunación
<b>Identificación del agente</b>						
<b>Aislamiento bacteriano</b>	+++	+++	+++	+++	+++	–
<b>Métodos alternativos rápidos, como la PCR</b>	+	+	+	+	+	–
<b>Detección de respuesta inmunitaria</b>						
<b>WBT</b>	++	–	+++	–	+	++
<b>RSA</b>	++	–	++	–	+	++
<b>SAT</b>	++	–	++	–	++	+++
<b>ELISA</b>	+	–	+	–	+	++

Clave: +++ = método recomendado para este propósito; ++ = método recomendado pero tiene limitaciones; + = método adecuado en muy pocas situaciones; – = no adecuado para este propósito.  
 PCR = pruebas basadas en la reacción en cadena de la polimerasa; WBT = aglutinación de sangre completa;  
 RSA = aglutinación rápida en porta; SAT = aglutinación sérica; ELISA = enzimoimmunoanálisis.

### 1. Identificación del agente

#### 1.1. Métodos de cultivo bacteriológico

En las fases agudas de la enfermedad, el agente causante de ambas enfermedades se puede recuperar a partir de casi todos los órganos, los tejidos y las heces. En las aves mayores que también llegan a ser portadoras, *S. Pullorum* se aísla sobre todo a partir de los óvulos y del oviducto; y sólo ocasionalmente de otros órganos y tejidos, incluido el tracto digestivo. En la fase aguda de la tifosis aviar el microorganismo se encuentra también ampliamente distribuido, pero en las aves portadoras,

está presente en mayor medida en el hígado, en el bazo, y en el tracto reproductor, y ocasionalmente en las amígdalas cecales.

*Salmonella Pullorum* y *S. Gallinarum* pertenecen al serogrupo D del esquema de White-Kauffmann–Le Minor, junto con *S. Enteritidis*, que está estrechamente relacionado (Grimont & Weill, 2007). Los organismos son bacilos gramnegativos no esporogénicos de 1,0–2,5 µm de longitud y 0,3–1,5 µm de anchura. Se consideran inmóviles en condiciones normales pero se ha demostrado que las proteínas flagelares se inducen y presentan movilidad en algunas cepas de *S. Pullorum* cuando crecen en un medio especial (Holt & Chaubal, 1997).

Para una recuperación óptima de los organismos, las aves de las cuales se han obtenido las muestras no se deben haber tratado con fármacos antimicrobianos durante aproximadamente las 2–3 semanas previas.

Se pueden obtener muestras a partir de las aves vivas, preferiblemente después de la identificación de las aves como fuertemente seropositivas. También se pueden utilizar canales frescas o recién refrigeradas, materiales del huevo, heces recientes, o cualquier material contaminado procedente de los albergues, incubadoras o cajas de transporte, pero las muestras fecales y ambientales a menudo no sirven para poner de manifiesto la presencia del microorganismo debido a que la excreción es inconstante y a una mala sensibilidad de los métodos de detección bacteriológicos<sup>2</sup>. Las muestras se pueden tomar con hisopo de la cloaca de las aves enfermas vivas, pero son preferibles los tejidos obtenidos post-mortem. Son preferibles las muestras procedentes de tejidos visiblemente anormales, pero también se pueden tomar muestras de forma aséptica a partir del bazo, el hígado, la vesícula biliar, los riñones, los pulmones, el corazón, los óvulos, los testículos, el tracto digestivo o las lesiones de las articulaciones. Los tejidos de elección para el estudio sistemático son el hígado, la unión íleo-cecal y los ovarios/oviducto. La superficie se quema con una espátula caliente y se obtiene una muestra insertando un hisopo de algodón estéril o un asa de cultivo estéril a través de la superficie esterilizada por calor. La demostración de la infección en aves sero-reativas de aspecto normal puede requerir en algunos casos el cultivo de volúmenes grandes de tejidos homogeneizados además de la toma directa de muestras con hisopo. Se pueden preparar conjuntos de tejidos a partir de los tejidos recogidos procedentes de varias aves, y, para las pruebas de rutina, pueden combinarse cinco muestras de la unión ileocecal. Pueden combinarse cantidades mayores de muestras no intestinales siempre que se hayan obtenido de forma aséptica, pero por el bien de la practicidad, a menudo se analizan muestras combinadas de hígado, bazo y ovario procedentes de cinco aves.

Cuando se analicen residuos del suelo, de material fecal o de la nacedora, como los revestimientos internos de las cestas de la nacedora, se debe recordar que *S. Pullorum* y *S. Gallinarum* en bajas cantidades asociadas a aves portadoras infectadas subclínicamente son más difíciles de aislar a partir de muestras fecales y medioambientales que otras salmonelas y siempre es preferible cultivar a partir de aves enfermas o recién muertas o de embriones “muertos dentro de la cáscara”. El piojo ojo característico de las aves de corral que están infectadas por *S. Gallinarum*, generalmente contiene el microorganismo después de la ingestión y pueden cultivarse. Estas muestras se deben cultivar mediante inoculación directa de un caldo de enriquecimiento selectivo, tal como selenito-cisteína o selenito F, seguida de la siembra en placa en medios selectivos, como el agar verde brillante (Parmar & Davies, 2007; Proux *et al.*, 2002).

Tanto *S. Pullorum* como *S. Gallinarum* crecen bien en cultivo puro o medios no selectivos, pero se han descrito medios selectivos y de enriquecimiento que contienen sustancias que inhiben el crecimiento de microorganismos extraños. *Salmonella Pullorum* puede crecer lentamente y producir colonias muy pequeñas en los medios selectivos, así que se recomienda la incubación en placas durante 48 horas. La eficacia de recuperación de *Salmonella* varía de acuerdo a las circunstancias y, además, la experiencia en el uso de un determinado medio es un factor importante pero no cuantificable. Algunos medios complejos pueden tener un efecto inhibidor en estos microorganismos; por este motivo, para el aislamiento a partir de tejidos se aconseja utilizar tanto los medios selectivos como los no selectivos. Se pueden emplear medios sólidos y caldos de cultivo. Como las propiedades tóxicas de los medios selectivos pueden variar, es preferible controlarlas comparando el crecimiento de cultivos control en ambos tipos de medio. En los medios inhibidores deben crecer al menos el 75% de las colonias que crecen en un medio no inhibidor (Ellis *et al.*, 1976; Mallinsen & Snoeyenbos, 1989).

Todos los medios indicados más adelante son ejemplos de los medios de uso común, pero existen muchos otros cuyo empleo puede ser igualmente satisfactorio y se recomienda que los productos más adecuados se validen a nivel local respecto a las cepas que estén circulando en una zona en particular.

---

2 A veces se recomienda aplicar varios métodos de identificación del agente a una misma muestra clínica.

Los medios no inhibidores incluyen agar nutritivo y agar sangre, en los que se observa que las colonias son suaves, traslúcidas, ligeramente elevadas y aproximadamente de unos 1–2 mm de diámetro. *Salmonella Gallinarum* crece más rápidamente que *S. Pullorum* y produce extensas colonias con un olor peculiar semejante al del líquido seminal en la mayoría de medios. Los caldos incluyen agua de peptona tamponada y caldos nutritivos e infusión de carne o caldos universales de pre-enriquecimiento.

#### 1.1.1. Medios selectivos

i) Agar MacConkey

Este medio inhibe el desarrollo de los microorganismos no entéricos, diferencia a los fermentadores de la lactosa (colonias de color rosa) de los no fermentadores de la lactosa (colonias sin color). Se omite el NaCl para limitar la extensión de las colonias de *Proteus*. Las colonias de *Salmonella* son lisas e incoloras. *Salmonella Pullorum* produce colonias más pequeñas que otras salmonelas. El agar MacConkey es el idóneo para sembrar placas directamente a partir de los tejidos.

ii) Agar xilosa-lisina-desoxicolato

Este medio inhibe el desarrollo de los microorganismos no entéricos. *Salmonella Pullorum* crece escasamente formando colonias pequeñas de color rojo transparente. Las colonias de *S. Gallinarum* son pequeñas, abombadas y pueden tener una mancha negra central debida a la producción de H<sub>2</sub>S, pero esta reacción puede aparecer más tarde o ser variable.

iii) Agar verde brillante (BGA)

Este medio inhibe el desarrollo de los coliformes y de la mayoría de cepas de *Proteus*; es útil para distinguir las colonias de los microorganismos entéricos. Las salmonelas forman colonias pequeñas, convexas, traslúcidas, de color rojo pálido y de 1–3 mm de diámetro, similares a *Citrobacter*. *Proteus* forma colonias insignificantes, *Pseudomonas aeruginosa* aparece formando colonias rojas pequeñas y los fermentadores de lactosa son verdes. *Salmonella Pullorum* produce colonias pálidas más pequeñas que otras salmonelas. El medio BGA es el medio de elección después del enriquecimiento, pero cuando el BGA se utiliza para muestras fecales y ambientales, es fácil que si la cantidad de *Salmonella* es baja, su crecimiento se vea superado por el crecimiento de microorganismos competidores.

iv) Agar verde brillante-sulfapiridina

Este medio inhibe el desarrollo de los coliformes y de las cepas de *Proteus*. Se añade sulfapiridina para estabilizar selectivamente en presencia de los integrantes del huevo. *Salmonella Pullorum* produce colonias pequeñas.

*Salmonella Pullorum* y *Gallinarum* crecen escasamente y no producen colonias típicas en medios sólidos cromógenos más recientes, tales como el agar Rambach, pero podría determinarse la idoneidad de medios cromogénicos más recientes que presentan un intervalo de detección más amplio.

#### 1.1.2. Medios líquidos de enriquecimiento y selectivos:

i) Caldos selenito cisteína y F

Inhiben el desarrollo de los coliformes pero no el de *Proteus* y mejora si se le añade verde brillante. La pérdida de actividad pasadas 24 horas limita su uso. El caldo selenito-cisteína es más estable y menos inhibidor que el caldo selenito F, así que normalmente es preferible (por ejemplo, para el seguimiento en bandejas de incubación de las incubadoras o en el meconio) excepto en el caso de muestras fecales frescas de aves adultas, en las que puede haber flora muy competitiva. Aunque los caldos con selenito se consideran los preferidos para aislar *S. Pullorum* y *S. Gallinarum* a partir de heces mediante enriquecimiento directo (Shivaprasad *et al.*, 2013), en el caso de laboratorios con problemas de toxicidad o dificultades con el periodo de validez, se pueden utilizar otros caldos de enriquecimiento que se indican a continuación. Sin embargo, la mayoría de estos otros caldos se utilizarán después de una etapa de enriquecimiento no selectivo y *S. Gallinarum* y *S. Pullorum* crecen fácilmente y en exceso en cultivos fecales no selectivos debido a los microorganismos competidores, dando como resultado falsos negativos. Por tanto, se recomienda el enriquecimiento selectivo directo en el caso de las heces y de las muestras intestinales o medioambientales. El enriquecimiento no selectivo puede dar

mejores resultados en tejidos obtenidos postmortem de forma aséptica, circunstancia en la que no debería haber microorganismos competidores (Mallinson & Snoeyenbos, 1989).

ii) Tetrionato/caldo verde brillante

Inhibe el desarrollo de los coliformes y de *Proteus*, pero también puede inhibir algunas cepas de *S. Pullorum/Gallinarum*.

iii) Caldo peptona soja Rappaport–Vassiliadis (RVS)

Este caldo normalmente solo se utiliza para el enriquecimiento selectivo después de un pre-enriquecimiento, pero es más estable que el caldo selenito; se usa 1 parte de inóculo por cada 100 partes de medio. Es más probable que tanto *Salmonella Pullorum* como *Gallinarum* sean superadas por el desarrollo de otros microorganismos durante el pre-enriquecimiento de heces o contenidos intestinales que por otras salmonelas que no están adaptadas al hospedador, así que también se puede intentar el enriquecimiento con RVS.

## 1.2. Recuperación de salmonelas

Los métodos de recuperación de *S. Pullorum* y *S. Gallinarum* varían de acuerdo con el origen de las muestras. Si bien su aislamiento puede ser infructuoso a partir de muestras cloacales y heces, normalmente se tiene más éxito en el examen postmortem de los tejidos. Los métodos se indican a continuación:

### 1.2.1. Muestras cloacales y heces recientes de aves vivas

Es adecuado emplear hisopos para sumergir las muestras en caldo nutritivo y, en el caso de los polluelos, se utilizan hisopos pequeños. Los hisopos se utilizan para sembrar por estría en medios selectivos y se colocan en caldo de enriquecimiento. Las placas y los caldos se incuban a 37°C. Se pueden emplear temperaturas más altas con algunos caldos, p. ej. 41,5°C en el caso del medio Rappaport–Vassiliadis (RVS). Se realizan subcultivos empleando medios selectivos después de 24 y 48 horas.

### 1.2.2. Contenido de la vesicular biliar

Se toman muestras con hisopo del contenido de la vesicular biliar y se siembran por estría en medios sólidos selectivos y no selectivos y en caldos inhibidores y no inhibidores; a continuación se incuban a 37°C y se subcultivan en agar selectivo después de 24 y 48 horas.

### 1.2.3. Órganos y tejidos

Se toman de manera aséptica muestras con hisopo o segmentos de tejidos a partir de tejidos individuales y de lesiones y se cultivan en medios selectivos y no selectivos y en caldos similares selectivos y no selectivos. Se incuban a 37°C y se subcultivan en agar selectivo después de 24 y 48 horas. También puede emplearse una incubación paralela a una temperatura superior, por ejemplo a 40°C, para potenciar la rapidez global de aislamiento. Aves portadoras: Pueden requerirse cantidades mayores de material para identificar las aves portadoras. El ovario y el oviducto son los tejidos idóneos para el desarrollo de *S. Pullorum*, y se debe analizar el hígado, la vesícula biliar y las amígdalas cecales, así como el ovario y el oviducto en el caso de *S. Gallinarum*. Normalmente en la práctica es mejor juntar las muestras procedentes de varios tejidos, incluido el bazo, pero los tejidos intestinales no deben combinarse con otros tejidos. Los tejidos se homogeneizan en un volumen pequeño de caldo y se siembran directamente en placa. También se añaden aproximadamente 10 ml del homogeneizado a 100 ml de caldo de enriquecimiento no selectivo (p. ej. agua de peptona tamponada) y de caldo de enriquecimiento selectivo (p. ej. caldo selenito-cisteína o caldo verde brillante) y se incuban a 37°C. Estos caldos se subcultivan en agar selectivo y no selectivo después de 24 horas.

### 1.2.4. Conducto alimentario, incluidos las amígdalas cecales y el contenido intestinal

Después de triturar u homogeneizar en un volumen pequeño de caldo, se incuban 10 ml del homogenado en 100 ml de caldo de enriquecimiento selectivo a 37°C. En general se consigue un aislamiento mejor empleando el caldo selenito-cisteína.

### 1.2.5. Cáscaras de huevo

Se colocan las cáscaras rotas en un volumen diez veces superior de caldo de enriquecimiento (p. ej. caldo selenito-cisteína). El caldo se incuba a 37°C y se subcultiva en agar selectivo después de 24 y 48 horas.

### 1.2.6. Contenido del huevo

Se toman los contenidos de los huevos frescos en condiciones asépticas y se homogeneizan y mezclan con 200 ml de agua de peptona tamponada o caldo nutritivo, se incuban a 37°C, y se subcultivan en agar selectivo y no selectivo después de 24 y 48 horas. Los huevos se incuban, y sean infértiles o contengan embriones pequeños, se pueden tratar de manera similar.

### 1.2.7. Embriones

Las vísceras homogeneizadas y las muestras tomadas con hisopo procedentes de los sacos vitelinos de los embriones bien desarrollados se pueden extender en estría en medios selectivos y no selectivos y además se introduce una muestra en 10 ml de un caldo no selectivo así como de un medio de enriquecimiento (p. ej. caldo selenito-cisteína o caldo verde brillante). La incubación se lleva a cabo a 37°C, y los subcultivos se realizan en medios solidificados selectivos y no selectivos después de 24 y 48 horas.

### 1.2.8. Muestras medioambientales

Estas muestras son de pelusa de los polluelos eclosionados, de restos de huevos destruidos y desechos de polluelos, así como de cajas de pollitos de las nacedoras y de los residuos o las heces del suelo; se mezclan 25 g con 225 ml de caldo de enriquecimiento (p. ej. caldo selenito-cisteína, caldo verde brillante), se incuban a 37°C, y se subcultivan en agar selectivo después de 24 y 48 horas.

Para confirmar el serovar o el estado respecto a la vacunación, también pueden utilizarse pruebas basadas en la reacción en cadena de la polimerasa (PCR), pero no han sido completamente validadas internacionalmente (Batista *et al.*, 2016; Kang *et al.*, 2012; Soria *et al.*, 2012).

## 1.3. Pruebas confirmativas

Las colonias típicas de *S. Gallinarum* en medio no selectivo son redondas, traslúcidas, abombadas lisas y con 1–2 mm de diámetro después de 24–48 horas de incubación. Las colonias de *Salmonella Pullorum* son ligeramente más pequeñas y traslúcidas. En los medios selectivos su aspecto varía con el medio, pero las colonias sospechosas se pueden investigar mediante pruebas serológicas demostrando la presencia de los antígenos somáticos “O” 9, observando la movilidad y mediante pruebas bioquímicas.

Después de una incubación de 20–24 horas, se deben examinar cuidadosamente las placas para comprobar si aparecen las colonias típicas de *S. Pullorum* y *S. Gallinarum*. Se deben reincubar las placas durante otras 24 horas y examinarlas de nuevo. Para la confirmación bioquímica y serológica, se deben elegir de cada placa cinco colonias típicas para su posterior examen. Si hay menos de cinco colonias típicas o sospechosas, se deben analizar todas. Las colonias seleccionadas se deben inocular sobre la superficie de agar selectivo, de una manera que permita el desarrollo separado de las colonias. Para la confirmación bioquímica, se deben utilizar sólo cultivos puros procedentes de medios no selectivos. Los medios siguientes se deben inocular utilizando un asa de inoculación: agar triple azúcar-hierro (TSI); agar lisina-hierro (o medio de descarboxilación de l-lisina); agar urea de Christensen; medio triptona/triptófano para la reacción del indol; medio con glucosa y una campana de Durham para detectar la producción de ácido y gas; medio con dulcitol, medio con maltosa, medio de descarboxilación de ornitina y medio semisólido para comprobar la movilidad. El resultado de las reacciones se indica en el cuadro 1.

Existen kits comerciales de identificación. Se han desarrollado pruebas moleculares con técnicas de ribotipificación en laboratorios de investigación (Kang *et al.*, 2012), y pueden utilizarse para la confirmación y la diferenciación entre *S. Gallinarum* y *S. Pullorum*.

Para confirmar el nivel de serogrupo mediante pruebas serológicas, se utilizan colonias procedentes de medios no selectivos (agar nutritivo o agar sangre). La primera fase consiste en la eliminación de las cepas autoaglutinables. Para ello, el material procedente de una colonia aislada de un cultivo puro se transfiere a un porta y se mezcla con una gota de solución salina estéril. Se sacude suavemente el porta o se extiende la gota con un asa durante 30–60 segundos y se observa si se produce aglutinación contrastándolo con un fondo oscuro, preferiblemente con la ayuda de una lupa o un

microscopio de disección. Si la bacteria se agrega formando grupos más o menos evidentes, la cepa se considerará autoaglutinable y no se debe someter a las pruebas siguientes. Si la muestra bacteriana se reconoce como no autoaglutinable, se analiza con un antisuero polivalente "O" (A-G). Con este fin, el material procedente de una colonia aislada se dispersa en la gota de antisuero polivalente "O" sobre un porta para obtener una suspensión homogénea y turbia. Después de un movimiento ligero durante 30–60 segundos, la reacción se observa frente a un fondo oscuro para detectar la posible aglutinación. Alternativamente, la prueba de aglutinación en porta se puede llevar a cabo con volúmenes más pequeños de suspensión bajo un microscopio de disección. En este caso una porción de la colonia que se va a analizar se añade a un asa llena de solución salina sobre un porta para conseguir una suspensión ligera de tal modo que se pueda detectar la posible autoaglutinación ("cepas rugosas"). Si no se produce aglutinación, se añaden una o dos asas de antisueros, se extienden las gotas con un asa y se observa si hay aglutinación. *Salmonella Pullorum* y *S. Gallinarum* deben aglutinar con los antisueros polivalentes "O" pero no con los antisueros polivalentes flagelares (poli "H" tipo 1 y tipo 2). Si la reacción es positiva, la colonia individual se analiza después de la misma manera empleando suero específico de grupo dirigido contra los serovares de *S. Pullorum* y *S. Gallinarum* (antisuero "O" 9). Después de establecer el serogrupo las cepas se pueden enviar a un laboratorio de referencia para su serotipificación.

**Tabla 1.** Investigación bioquímica de *Salmonella Pullorum* y *S. Gallinarum*

	<i>Salmonella Pullorum</i>	<i>Salmonella Gallinarum</i>
TSI glucosa (producción de ácidos)	+	+
TSI glucosa (producción de gas)	V	–
TSI lactosa	–	–
TSI sacarosa	–	–
TSI sulfuro de hidrógeno	V	V
Gas a partir de glucosa (medio con campana de Durham)	+	–
Hidrólisis de urea	–	–
Descarboxilación de lisina	+	+
Descarboxilación de ornitina	+	–
Fermentación de maltosa	– o más tarde +	+
Dulcitol	–	+
Movilidad	–	–

+ = reacción positiva del 90% o más en 1 o 2 días; – = reacción negativa (90% o más); v = reacciones variables.

También es posible confirmar y diferenciar *S. Gallinarum* mediante PCR específico (Kang *et al.*, 2012).

#### 1.4. Procedimiento analítico del cultivo de muestras viscerales, fecales, intestinales y medioambientales para la detección de *S. Pullorum* y *S. Gallinarum*

- i) Siempre que se pueda, se comienzan los procedimientos de laboratorio el mismo día de recogida de muestras.
- ii) El material se homogeneiza tanto como sea posible mediante la mezcla manual, maceración suave o con un homogeneizador en un volumen pequeño de solución salina estéril si se trata de material seco.
- iii) Se extiende la mezcla con un hisopo rectal pequeño o un asa y se hacen unas estrías gruesas sobre un cuarto de la superficie de una placa de agar verde brillante. (También se pueden extender sobre medio agar sangre las muestras tomadas con hisopo a partir de tejidos no contaminados).
- iv) Empleando esta cantidad de material depositado en la placa, se extiende sobre el resto de la misma para obtener colonias individuales.
- v) Se añaden 5–25 g de la muestra homogeneizada a caldo selenito-cisteína recién preparado (véase nota más arriba acerca de los medios líquidos de enriquecimiento y selectivos) para conseguir una relación de 1:10 de muestra respecto a caldo. Se extiende o se agita la muestra para dispersarla en el caldo.
- vi) Se incuban las placas de agar verde brillante y el caldo selenito-cisteína a 37°C durante 24 horas.



- vii) Se examina la placa después de 24 horas de cultivo. Se llevan a cabo las pruebas de aglutinación de hasta cinco colonias sospechosas con antisueños polivalentes “O” (A-G) y antisueños polivalentes H (tipo 1 y tipo 2). Si la aglutinación no es clara se subcultivan las colonias sospechosas en agar nutritivo o en agar sangre y las pruebas se repiten después de una incubación de 24 horas de estos medios.
- viii) Si la prueba con antisueños poli “O” da positivo, entonces se analiza con el antisuero “O”9. Si este último da positivo y el poli “H” da negativo, esto indica la posible presencia de *S. Pullorum* o *S. Gallinarum*.
- ix) Si no hay colonias positivas en la placa de agar verde brillante, se toma con un asa y se extienden unos 10 µl del cultivo incubado en caldo selenito-cisteína sobre agar verde brillante, como se indica más arriba en el paso (iv).
- xi) Se incuban las placas de agar verde brillante a 37°C durante 24 horas y se reincuban los caldos selenito-cisteína y las placas de agar verde brillante previos (negativos) durante otras 24 horas más.
- xii) Se repite el examen de las placas como se indica más arriba en el paso (vii).
- xiii) Si las placas son todavía negativas, se vuelve a sembrar en placa a partir del caldo selenito-cisteína y se incuba en placas de agar verde brillante, que fue inoculado en el paso (ix), durante otras 24 horas más y se examinan como se indica más arriba en el paso (vii).
- xiii) Para confirmar la presencia de *S. Pullorum* y *S. Gallinarum*, se emplean pruebas bioquímicas como las indicadas en el cuadro 1. Las cepas aisladas se pueden enviar a un laboratorio de referencia de *Salmonella* para confirmar el serotipo y para una tipificación molecular posterior en caso de que sea necesaria para fines epidemiológicos.

### 1.5. Epidemiología molecular

Las técnicas moleculares estándar de “huellas genéticas” empleadas para *Salmonella*, tal como el análisis de los perfiles de los plásmidos, la electroforesis en gel de campo pulsado, el análisis del polimorfismo de los fragmentos de restricción obtenidos por PCR (PCR-RFLP) o la ribotipificación, se pueden utilizar para investigar los brotes de *S. Pullorum* o *S. Gallinarum*. Con frecuencia es necesario utilizar combinaciones de tales métodos y distintas combinaciones de enzimas de restricción para obtener una discriminación máxima debido a un alto nivel de clonalidad. Las técnicas más eficaces también pueden variar entre países debido al tipo de clones circulantes en cada región. A *S. Gallinarum* también se ha aplicado una secuenciación de genoma completo de alto rendimiento, pero todavía no está disponible o no económicamente viable en todos los países (De Carli *et al.*, 2016).

## 2. Pruebas serológicas

Las pruebas serológicas se aplican mejor como pruebas de parvada, porque los resultados obtenidos a partir de aves individuales variarán en función de la etapa de infección. Por tanto, para determinar la infección en una parvada es necesario tomar suficientes muestras individuales. El número de muestras dependerá de la prevalencia esperada y del nivel de confianza deseado (véase el capítulo 1.1.2 *Recogida, presentación y almacenamiento de muestras para el diagnóstico* y el capítulo 1.1.3 *Transporte de material biológico*). Si la prueba se utiliza para detectar aves infectadas individuales con el fin de sacrificarlas selectivamente, se debe repetir al menos dos veces y preferiblemente hasta que la parvada completo haya dado al menos dos resultados negativos.

Las pruebas más fáciles de aplicar son la aglutinación rápida de sangre entera, la aglutinación rápida de suero (RST), la aglutinación en tubo y la micro-aglutinación (USDA, 1996). Otras especies invasivas de *Salmonella*, tales como *S. Enteritidis* y *S. Typhimurium* o el uso de la vacunación pueden dar falsos positivos en las pruebas serológicas destinadas a detectar *S. Pullorum*.

Tanto *S. Pullorum* como *S. Gallinarum* poseen los antígenos O9 y O12 y también pueden poseer el antígeno O1 (Brooks *et al.*, 2008). Sin embargo, en el caso de *S. Pullorum*, hay una variación en la relación de 12<sub>1</sub>, 12<sub>2</sub> y 12<sub>3</sub>; la cepa estándar contiene más 12<sub>3</sub> que 12<sub>2</sub>, mientras que sucede lo contrario con la forma variante. También existen formas intermedias. (Parece que no existe tal variación de formas en el caso de *S. Gallinarum*). Debido a esta variación, es necesario utilizar un antígeno polivalente en las pruebas de inmunodiagnóstico. El mismo antígeno se utiliza para detectar *S. Pullorum* y *S. Gallinarum*, pero la detección de este último puede ser relativamente mala (Proux *et al.*, 2002).

## 2.1. Prueba rápida de aglutinación de sangre entera

La prueba rápida de aglutinación de sangre entera se puede utilizar en condiciones de campo para detectar tanto *S. Pullorum* como *S. Gallinarum*, y las aves que reaccionan a la prueba se pueden identificar de forma inmediata. Sin embargo, esta prueba no es fiable en el caso de los pavos o patos, ya que se obtiene una proporción significativa de falsos positivos. Los sueros pueden analizarse mediante la prueba rápida de aglutinación en porta y confirmando las reacciones positivas mediante la prueba de aglutinación en tubo, que es más específica. Los pollos se pueden analizar a cualquier edad, aunque algunas autoridades especifican un mínimo de edad de 4 meses (Shivaprasad *et al.*, 2013; USDA, 1996) y además los resultados positivos de los polluelos menores de 4 semanas de edad pueden deberse a los anticuerpos de origen materno.

### 2.1.1. Preparación del antígeno teñido para las pruebas rápidas de aglutinación de sangre entera y de suero

Se incuba una cepa de tipo estándar de *S. Pullorum* (con estructura antigénica 9, 12<sub>1</sub>, 12<sub>3</sub>) y una de tipo variante (con estructura antigénica 9, 12<sub>1</sub>, 12<sub>2</sub>) a 37°C y se recogen por separado hasta la mezcla final para detectar el antígeno completo.

Se siembran las cepas por separado en tubos de agar inclinado. Se incuban a 37°C durante 24 horas, se emulsiona la masa microbiana con solución salina normal estéril y se extiende por estría un inóculo sobre una placa de agar para conseguir fácilmente colonias aisladas. Para ello se incuban las placas durante 48 horas, se marcan ciertas colonias y cada una de ellas se observa para comprobar si presenta aglutinación sobre un porta con 1/500 acriflavina en solución salina. Las colonias en fase lisa no producen aglutinación. Se separan las colonias típicas que no produzcan aglutinación, se inoculan en tubos de agar inclinado y se incuban durante 24 horas. Se emulsiona la masa microbiana con una solución salina y se distribuyen de manera uniforme 2 ml sobre la superficie del medio (200 ml) en un frasco de Roux o similar. Los frascos se incuban durante 60 horas.

Para recoger el cultivo bacteriano, se inunda la superficie de cada frasco con alrededor de 10 ml de cosolución salina con formol tamponada y estéril, pH 6,5 (cloruro sódico a 8,5 g/litro, formalina neutra a 10 ml/litro, fosfato sódico 0,5 M a 4 ml/litro: se lleva hasta 1 litro con agua destilada, el pH se ajusta hasta 6,5 empleando ácido ortofosfórico 1 M o hidróxido sódico 1 M), hasta conseguir unas suspensiones celulares densas. Se añaden 12–15 perlas de vidrio estériles de 3–5 mm de diámetro y se agitan suavemente los frascos hasta que todo el cultivo microbiano constituya una suspensión homogénea; se deja en posición vertical al menos durante 15 minutos. Se comprueba la morfología y la pureza de las suspensiones mediante la preparación y el examen de muestras realizando la tinción de Gram. Se juntan las suspensiones procedentes de los frascos que contengan las mismas cepas. A cada 100 ml de suspensión se le añaden 200 ml de alcohol absoluto. Se agita la mezcla y se deja estática durante 36 horas o hasta que la precipitación sea completa. Se comprueba la capacidad de aglutinación del estándar y de la variante precipitando primero por centrifugación de una muestra para separar el alcohol, que se elimina, se diluye con solución salina normal y se analiza con un suero que se sepa que es positivo y otro que se sepa que es negativo. Si la prueba resulta satisfactoria se elimina el alcohol del sobrenadante claro (una centrifugación a 2.000 *g* durante 10 minutos puede ser útil en la precipitación), y se añade suficiente solución salina tamponada con fosfato (PBS) que contenga glicerol al 10% (v/v) para estandarizar la densidad hasta 75 x tubo Wellcome de grado de opacidad No. 1 (o 50 x tubo No. 1,0 según la escala de McFarland). Se añaden volúmenes iguales de las cepas estándar y variante y se añade al 1% (v/v) una solución alcohólica de cristal violeta al 3% (w/v) hasta conseguir la mezcla final, y se deja sin mover durante 48 horas a temperatura ambiente. Se conserva en un contenedor cerrado firmemente a 0–4°C hasta 6 meses. Para que la evaluación sea segura, se lleva a cabo una prueba de cultivo en agar sangre para confirmar la falta de viabilidad del antígeno no lavado antes de la estandarización. Cada botella de antígeno se debe probar después de la precipitación alcohólica y antes de la estandarización frente a antisueros de título estándar dirigidos contra *S. Pullorum* y *S. Gallinarum*, y frente a un suero negativo. Si es posible, también se realiza la prueba con sueros positivo y negativo conocidos y sangre procedente de pollos positivos y negativos.

Se dispone comercialmente de productos antigénicos teñidos para la prueba de aglutinación en placa de sangre íntegra y, aunque parece que existen algunas pequeñas diferencias en su sensibilidad (Gast, 1997), es improbable que parvadas infectadas con las variantes diferentes de *S. Pullorum* sean pasadas por alto.

### 2.1.2. Procedimiento analítico

- i) Se usa una placa blanca, limpia y marcada con cuadrados de aproximadamente 3 × 3 cm. Si se emplea una placa con 3 × 4 cuadrados, se pueden analizar al mismo tiempo hasta doce muestras de sangre.
- ii) Se pone 1 gota (aproximadamente 0,02 ml) de antígeno teñido con cristal violeta en el centro de cada cuadrado.
- iii) Se obtiene una muestra de sangre entera reciente. Es conveniente hacerlo a través de una vena del ala mediante una aguja con una punta triangular.
- iv) Se coloca una gota de igual tamaño de sangre entera fresca junto a la gota del antígeno.
- v) Se mezclan las gotas de antígeno y sangre con una varilla fina de cristal, que se frota para limpiarla entre muestras.
- vi) Se realiza un movimiento suave para mantener agitadas las gotas durante dos minutos. En la misma placa se pueden realizar varias pruebas simultáneamente, pero durante este tiempo las gotas no se deben secar. En condiciones de temperaturas más elevadas puede ser necesario un menor número de gotas más grandes por placa para que no se sequen.
- vii) La aglutinación fácilmente visible del antígeno en unos 2 minutos indica una reacción positiva.
- viii) La ausencia de aglutinación del antígeno en 2 minutos indica una reacción negativa.
- ix) Se incluyen sueros control positivo y negativo conocidos en cada prueba, siguiendo el mismo procedimiento que el seguido para la muestra de sangre.
- x) Después de completar un juego de pruebas, la placa se lava y seca, dejándola preparada para su utilización posterior.

En ausencia de reacciones positivas, las reacciones inconcluyentes sólo se puede interpretar a la luz del historial previo de pruebas para la detección de *Salmonella* en la parvada. En el caso de que existan aves que muestren reacción positiva, cualquier reactor dudoso se debe considerar como positivo. Además, las aves infectadas recientemente puede que no muestren una reacción positiva típica hasta que no se les realice de nuevo la prueba a las 3–4 semanas.

### 2.2. Prueba de la seroaglutinación rápida

La RST se lleva a cabo de la misma manera con la excepción de sustituir la sangre entera por suero. Para pruebas con fines de exportación, la aproximación óptima consiste en realizar un muestreo inicial de los sueros mediante una RST con la posterior confirmación de los resultados positivos mediante una prueba de aglutinación en tubo. Lo ideal es que las muestras de suero que se vayan a probar siguiendo cualquier método se analicen en un plazo de 72 horas tras la recogida, ya que en las muestras más viejas pueden aumentar las reacciones inespecíficas. Las muestras recientes pueden congelarse si es inevitable.

### 2.3. Prueba de la aglutinación en tubo

El suero reciente procedente de pollos, pavos u otras aves se utiliza a una dilución inicial de 1/25, obtenida mezclando 0,04 ml de suero con 1,0 ml de antígeno<sup>3</sup>. En cada prueba se incluyen sueros control positivo y negativo. El antígeno se prepara a partir de cultivos no teñidos de *S. Pullorum* o *S. Gallinarum* diluidos hasta una concentración de No. 1 según la escala de McFarland (como se ha descrito más arriba). La mezcla se incuba a 37° o 50°C durante 18–24 horas antes de la lectura. Una reacción se considera positiva cuando se observa un depósito blanco granular y un sobrenadante claro; una reacción negativa muestra una turbidez uniforme. Las muestras positivas a una dilución de 1/25 se analizan de nuevo en un rango superior de diluciones y un título de 1/50 se suele considerar positivo, aunque este valor parece que varía en la bibliografía. En muchos casos se utiliza una sola dilución al 1/50 pero puede que esta no sirva para detectar las infecciones de algunas parvadas si solo se toma un pequeño número de muestras.

---

3 Para la preparación de volúmenes pequeños de antígenos somáticos véase el Capítulo 3.9.8 *Salmonellosis*.

## 2.4. Prueba de la microaglutinación

Esta prueba es parecida a la prueba de aglutinación en tubo pero requiere volúmenes de reactivos mucho menores. La prueba se lleva a cabo en las placas de microtitulación. Primero se diluyen los sueros añadiendo a cada 10 µl de suero 90 µl de solución salina normal y a continuación se añaden 100 µl del antígeno teñido estandarizado previamente hasta conseguir una dilución final de 1/20. Mediante la titulación del suero en diluciones a la mitad en las que se añade un volumen igual del antígeno teñido estandarizado se puede obtener un punto final (título). Las placas se sellan y se incuban a 37°C durante 18–24 o 48 horas. La reacción positiva consiste en una precipitación fina y difusa en tanto que una reacción negativa muestra un precipitado en forma de botón. Los títulos de 1/40 normalmente se consideran positivos pero esta prueba tiende a producir más falsos positivos con los sueros de pavo.

Otras pruebas serológicas son la micro-antiglobulina (Coombs), la inmunodifusión, la hemaglutinación y el enzimoimmunoanálisis (ELISA).

Se han descrito ELISA para detectar anticuerpos frente a *S. Pullorum* y *S. Gallinarum* (Oliviera *et al.*, 2004). Probablemente, el ELISA indirecto que utiliza el antígeno del lipopolisacárido es la prueba más sensible y específica de las pruebas serológicas para detectar *Salmonella* en parvadas, como *S. Gallinarum* y *S. Pullorum*. Es relativamente fácil llevarla a cabo con el suero o la yema, y se puede utilizar para cuantificar el título de anticuerpos (Barrow, 1992; 1994). Actualmente no se dispone de kits comerciales de ELISA para detectar *S. Pullorum* ni *S. Gallinarum*, pero a menudo se puede lograr una indicación de infección probable empleando un ELISA comercial basado en lipopolisacárido (LPS) para *S. Enteritidis*; estas pruebas no se han validado para este fin.

## C. REQUISITOS PARA LAS VACUNAS

### 1. Antecedentes

#### 1.1. Fundamentos y uso previsto del producto

Aunque contra *S. Gallinarum* se han preparado tanto vacunas vivas como inactivadas (Paiva *et al.*, 2009), la vacuna más utilizada se ha preparado a partir de la cepa rugosa 9R (Harbourne *et al.*, 1963; Revollo & Ferreira, 2012). Normalmente solo se utiliza en pollos. Es importante el número de microorganismos viables por dosis; estos microorganismos pueden sobrevivir en las aves vacunadas durante muchos meses y se pueden transmitir a través del huevo (y quizás de ave a ave). La vacunación puede reducir las pérdidas en los grupos de aves, pero no evitará la infección con las cepas de campo. Además, la vacunación con la cepa 9R a veces puede provocar una alta mortalidad en las aves infectadas (Silva *et al.*, 1981), y puede estimular la producción de anticuerpos transitorios. Es habitual vacunar a las 8 semanas de vida y de nuevo a las 16 semanas. Se debe evitar el uso de antimicrobianos antes y después de la vacunación.

Pero las vacunas de las que se dispone actualmente intervienen poco en el control de la tífosis aviar, dado que ofrecen una protección corta contra la enfermedad clínica y una protección escasa o variable contra la infección. Para controlar la enfermedad clínica también pueden emplearse vacunas autógenas o producidas localmente, pero debe tenerse cuidado de evitar la inestabilidad de la cepa, que comportaría una reversión a la virulencia (Okamoto *et al.*, 2010; van Immerseel *et al.*, 2013). El control se puede conseguir mejor aplicando las medidas adecuadas de bioseguridad, higiene y buen manejo, así como de seguimiento y eliminación de las parvadas infectadas, aunque la vacunación de rutina contra *S. Enteritidis* y contra *S. Typhimurium* que se lleva a cabo en poblaciones de reproductores y de gallinas ponedoras en muchos países podría ser parcialmente protectora contra la introducción de *S. Gallinarum* (Lee, 2015). Para la reducción de *S. Enteritidis* en parvadas de ponedoras en ciertos países se han empleado las vacunas comercializadas 9R, pero pueden estar prohibidas o no comercializarse en ciertos países en los que no hay tífosis aviar (Lee *et al.*, 2005). Incluso en los países con tífosis aviar, el empleo de vacuna puede complicar el control, porque no previene la infección, solo reduce la enfermedad clínica y permite que la producción siga adelante en parvadas infectadas. Por tanto, es preferible tener por objetivo la erradicación del microorganismo que la aceptación de que la enfermedad siga presente, pero a menudo no es económicamente viable en explotaciones grandes en las que hay animales de distintas edades, puesto que para garantizar la continuidad de la ausencia de infección es necesaria la erradicación del piojo rojo (Wales *et al.*, 2010).

En el capítulo 1.1.8. Principios de producción de las vacunas veterinarias, se dan las directrices para la producción de vacunas veterinarias. Las directrices aquí indicadas y en el Capítulo 1.1.8 son de

carácter general y pueden completarse con los requisitos nacionales y regionales. La mayoría de vacunas se producen en procesos comerciales muy industriales que están regulados por las autoridades nacionales competentes. En laboratorios privados se producen cantidades menores de vacunas para casos de urgencia o vacunas autógenas, pero cada producción debe autorizarse individualmente. Se recomienda utilizar vacunas comerciales validadas a no ser que no haya alternativa, por la necesidad de mantener la calidad y de evitar el riesgo relacionado con la reversión a la virulencia. Las vacunas vivas también tienen que ser bacteriológicamente distinguibles de las cepas naturales, de lo contrario, los programas de vigilancia y control pueden quedar comprometidos. Las observaciones realizadas en algunos países sugieren que no siempre es sencillo distinguir las vacunas de *S. Gallinarum* de las cepas naturales (van Immerseel *et al.*, 2013). Inevitablemente habrá cierta interferencia con el seguimiento serológico de *S. Gallinarum* y una posible interferencia con el seguimiento serológico en el caso de *S. Enteritidis*, a no ser que se emplee un enfoque paso a paso, en el cual se emplean un ELISA sensible basado en el LPS para detectar anticuerpos contra los antígenos O9 y, y los sueros positivos se vuelven a analizar con un ELISA de detección del antígeno de los flagelos, que dará una reacción negativa en los casos de infección por *S. Gallinarum* (Shivaprasad *et al.*, 2013). El trabajo reciente sobre los mecanismos moleculares de la infección debe comportar el desarrollo de vacunas mejoradas en el futuro (Barrow *et al.*, 2012).

## 2. Descripción de la producción y requisitos mínimos para las vacunas convencionales

### 2.1. Características del inóculo

#### 2.1.1. Características biológicas

En el caso de las vacunas muertas o vivas, la cepa bacteriana debe ser un microorganismo tan estrechamente emparentado con las cepas naturales que circulen actualmente como sea posible. se debe escoger cuidadosamente de casos de enfermedad clínica grave, y debe evaluarse la virulencia y la producción de antígeno. Es mejor evaluar un conjunto de posibles cepas de esta forma antes de analizar la opción final. La cepa vacunal final debe identificarse mediante registros históricos y caracterizarse mediante marcadores fenotípicos y/o genéticos, preferiblemente utilizando una secuenciación del genoma completo. Las cepas vacunales vivas deben marcarse mediante caracteres estables que permitan distinguir las fácilmente de las naturales. Pueden emplearse marcadores como la resistencia a los antimicrobianos, como la rifampicina o el auxotropismo. La atenuación de la virulencia debe ser estable y preferiblemente debe conseguirse mediante dos mutaciones definidas independientes. La estabilidad de las cepas vacunales vivas puede verificarse mediante comprobaciones periódicas empleando una secuenciación del genoma completo.

La vacuna viva contra la tífosis aviar consiste en una suspensión de microorganismos vivos adecuadamente atenuados a partir de una cepa rugosa de *S. Gallinarum*, p. ej. 9R. Los microorganismos de esta vacuna dan las reacciones bioquímicas características de *S. Gallinarum*. Al examinarlas mediante la prueba en porta con acriflavina, se observa que las colonias de un cultivo de 24 horas preparado a partir de la vacuna en placas de agar nutritivo son rugosas. El cultivo no debe producir colonias lisas en absoluto ni contener los antígenos somáticos característicos de las formas lisas de *S. Gallinarum*.

#### 2.1.2. Criterios de calidad (esterilidad, pureza, ausencia de agentes extraños)

i) Esterilidad y pureza

La cepa vacunal debe comprobarse del siguiente modo:

- a) Tinción de un frotis de suspensión bacteriana en un porta de vidrio mediante tinción de Gram.
- b) Homogeneidad del cultivo en medios no selectivos.
- c) Requisitos metabólicos, según indiquen las pruebas bioquímicas.
- d) Detección de marcadores fenotípicos y/o genéticos.
- e) Aglutinación con antisuero específico.
- f) El cultivo vacunal y todos los adyuvantes, conservantes u otros materiales deben ser microbiológicamente estériles y no tóxicos a las concentraciones empleadas.

ii) Inocuidad

Pueden determinarse la DL<sub>50</sub> (dosis letal del 50%) o la DI<sub>50</sub> (dosis infecciosa del 50%) en pollos o, preferiblemente, comprobar signos más leves de reacciones adversas en las especies de destino. Debe administrarse a la especie de destino diez veces la dosis de campo de vacuna viva o dos veces la dosis en el caso de las vacunas muertas, a la edad y por la vía de administración recomendadas. Se observan los animales para comprobar si presentan reacciones adversas. En el caso de las vacunas vivas debe demostrarse la estabilidad y la ausencia de reversión a la virulencia tras varios pases en especies susceptibles. También es necesario plantearse una repetición de la vacunación. Debe demostrarse que la vacuna viva no persiste durante largos periodos de tiempo en los animales vacunados ni se transmite a la carne ni a los huevos que vayan al consumo humano, y el método de aplicación no debe suponer un peligro para los operarios. En el caso de la vacuna de *S. Gallinarum*, se inyecta por vía subcutánea a un mínimo de seis pollos sanos susceptibles (preferiblemente libres de patógenos específicos [SPF]) y de 8–16 semanas de edad diez veces la dosis de la vacuna, y se observan durante al menos 7 días; no debe aparecer ninguna reacción local ni sistémica.

iii) Eficacia

Deben emplearse pruebas de laboratorio y ensayos de campo para demostrar que la vacuna es eficaz. Las pruebas de laboratorio consisten en pruebas de vacunación-desafío en las especies de destino a la dosis y edad recomendadas. Los datos de eficacia también pueden utilizarse como base para una prueba de potencia en el lote. En cuanto a los ensayos de campo, son más difíciles de llevar a cabo respecto a la comprobación de la eficacia debido a las dificultades con la estandarización del desafío y con la disponibilidad de controles adecuados. En el caso de la vacuna 9R contra *S. Gallinarum* o vacunas similares, se inyecta por vía subcutánea a un mínimo de 15 pollos sanos de 8–16 semanas de edad y de una raza híbrida de ponedora marrón escogidos de una población libre de infección por *S. Pullorum*, una cantidad de vacuna correspondiente a una dosis de campo, es decir,  $5 \times 10^7$  microorganismos viables. Tras un intervalo de 21–28 días, los pollos vacunados y un número igual de pollos similares no vacunados se privan de alimento durante unas 18 horas. a continuación, se exponen mediante administración por vía oral a 1 ml de una suspensión de caldo que contenga  $5 \times 10^7$  microorganismos de una cepa virulenta de *S. Gallinarum* mezclada con 300 mg de un polvo compuesto de caliza (40%), caolina ligera (43%) y trisilicato de magnesio (17%). Todos los pollos se observan durante 14–21 días. La vacuna supera la prueba si al final de este periodo el número de pollos vacunados supervivientes que no presenta lesiones macroscópicas de tifosis aviar en el examen post-mortem supera en ocho o más al número de pollos control definidos del mismo modo.

iv) Aspectos medioambientales

Las cepas de vacuna viva deben analizarse para comprobar su capacidad de persistencia en el medio y de infección de especies no de destino, como roedores o aves salvajes que puedan estar expuestas. Una larga supervivencia de ciertas vacunas vivas en las heces, el material de cama o el polvo puede suponer un riesgo medioambiental inaceptable cuando el material se elimina de las instalaciones de los animales. No deben emplearse vacunas vivas en parvadas de ponedoras comerciales durante la puesta.

## 2.2. Método de fabricación

### 2.2.1. Procedimiento

El cultivo de inóculo se propaga y mantiene empleando medios adecuados para el cultivo de *Salmonella*. Los medios utilizados no pueden contener suero ni tejidos animales a no ser que la normativa nacional lo permita. El cultivo puede realizarse en medio sólido, en frascos Roux o en medio líquido, en cuyo caso puede emplearse equipo de fermentación a gran escala. La limitación del hierro o una incubación a baja temperatura en un medio mínimo pueden potenciar la producción del antígeno del lipopolisacárido (LPS) por parte de la cepa vacunal. En el caso de *S. Gallinarum* (9R), la vacuna se puede preparar mediante inoculación de un medio adecuado, como caldo de peptona, con un cultivo fresco de *S. Gallinarum* (9R) e incubación a 37°C durante 24 horas, con agitación. Los microorganismos se recogen mediante sedimentación o centrifugación.

Como alternativa, los microorganismos se pueden cultivar y recoger de un medio sólido, como un agar nutritivo. En cualquier caso, la suspensión se diluye en solución de PBS, a pH 7,0, y puede liofilizarse. La dosis empleada por ave es de entre  $5 \times 10^6$  y  $5 \times 10^7$  microorganismos.

La vacuna debe producirse en salas limpias adecuadas a las cuales solo podrá acceder personal autorizado. Debe tenerse cuidado de evitar una contaminación cruzada entre zonas en las que se procesen microorganismos vivos y otras zonas. Debe evitarse la contaminación por parte de operarios y/o del ambiente, y la preparación de la vacuna debe llevarse a cabo en una zona distinta de aquella en la que se realicen los cultivos de diagnóstico. Los operarios no pueden trabajar con la vacuna si están enfermos y no pueden sufrir trastornos inmunosupresores ni estar tomando medicación para este tipo de trastornos. Al personal de las zonas de producción y de las salas donde hay animales debe proporcionársele ropa protectora.

Como alternativa, los microorganismos se pueden cultivar y recolectar de un medio sólido, como un agar nutritivo. En el caso de las vacunas vivas, la suspensión se diluye en PBS, a pH 7,0, y puede liofilizarse.

Los cultivos de lote de siembra se preparan a partir del lote de siembra primario, y el número de pases dependen de la validación del proceso. La vacuna se puede preparar mediante inoculación de un medio adecuado, como un caldo nutritivo, con un cultivo fresco e incubación en un agitador a 37°C durante 24 horas, con o sin aireación. Los microorganismos se recogen mediante sedimentación o centrifugación.

El periodo de inactivación de las vacunas muertas debe ser de al menos un 33% más que el aplicado para reducir el número viable hasta un nivel indetectable. El proceso de inactivación debe aplicarse a todo el volumen de células recolectadas para la vacuna.

Los conservantes, los excipientes para la liofilización, los estabilizantes para los recipientes multidosis u otras sustancias que se añadan o combinen con una preparación vacunal no pueden ejercer efectos perjudiciales en la potencia inmunizante del producto.

#### 2.2.2. Requisitos para los sustratos y los medios

Debe estar garantizado que todas las sustancias químicas y medios de crecimiento se ajustan al objetivo y que se han comprobado utilizando controles adecuados.

#### 2.2.3. Controles durante el proceso

Es necesario prestar atención a los siguientes aspectos:

- i) Control visual de la suspensión y control de la homogeneidad mediante tinción de Gram, cultivo en medio no selectivo.
- ii) Aglutinación en porta con antisueros específicos.
- iii) Titulación de las bacterias mediante turbidimetría y/o recuento en placa.
- iv) Prueba de eficacia de la inactivación (en las vacunas muertas) mediante siembra en medio no selectivo o uso de un medio que dé la máxima probabilidad de crecimiento, como un medio de producción con neutralización del componente inactivante.
- v) Titulación de las bacterias viables (en las vacunas vivas) antes y después de la liofilización.

#### 2.2.4. Pruebas en lotes de producto final

- i) Esterilidad/pureza

Las pruebas de esterilidad y ausencia de contaminación en materiales biológicos destinados a uso veterinario se explican en el capítulo 1.1.9 de este *Manual Terrestre*.

- ii) Inocuidad

Para determinar la ausencia de efectos perjudiciales en los animales vacunados, puede emplearse una prueba de laboratorio que previamente se haya demostrado que presenta correlación con la inocuidad en las especies de destino. Cada lote debe analizarse en las especies de destino a la edad y por la vía recomendadas, empleando al menos el doble de la dosis de campo en el caso de las vacunas muertas, y diez veces dicha dosis en el caso de las vacunas vivas. Se anotan las observaciones relativas a todo posible efecto adverso en la conducta y la salud de los animales vacunados y puede realizarse una valoración de las reacciones tisulares en el punto de inyección.

Las autoridades reguladoras no exigen pruebas de inocuidad en los animales de destino para la puesta en circulación de los lotes. Cuando sean necesarias, generalmente se

llevan a cabo procedimientos estándar utilizando menos animales que los utilizados en las pruebas de inocuidad requeridas para la aprobación por parte de las autoridades reguladoras correspondientes.

iii) Potencia del lote

La potencia se comprueba empelando pruebas de vacunación-exposición en pollos y/u otras especies, como (en el caso de que sea posible) cualquier otra especie de destino, y evaluando la respuesta inmunitaria en las especies de destino.

## 2.3. Requisitos para la autorización

### 2.3.1. Requisitos de inocuidad

Ciertas vacunas muertas en ocasiones pueden causar reacciones en los animales vacunados debido a su contenido en LPS o al adyuvante utilizado, y de igual forma las vacunas vivas deben utilizarse con precaución en los animales que no estén del todo sanos en el momento de vacunarlos. Sin embargo, a menudo es necesario vacunar parvadas en caso de tifosis aviar clínica. Ciertas vacunas también pueden causar hinchazón en el punto de inyección, en concreto si se emplea un adyuvante oleoso.

i) Inocuidad en las especies de destino y no de destino

Las vacunas muertas se evalúan en una prueba a dosis doble, y las vivas en una prueba en la que se emplea una dosis diez veces la normal, teóricamente en las especies de destino. Es necesario demostrar que las vacunas vivas son inocuas en las especies no de destino relevantes que pudieran resultar expuestas a la vacuna diseminada por animales vacunados. Dado que *S. Gallinarum* y *S. Pullorum* son específicos de hospedador, las especies no de destino preocupan muy poco.

ii) Reversión a la virulencia en vacunas atenuadas/vivas

Mediante pruebas de replicación en las especies de destino, es necesario demostrar que las vacunas vivas no revierten a cepas virulentas durante un número suficientemente alto de replicaciones. También hay que demostrar que las mutaciones, en concreto las indefinidas, son estables, y pueden comprobarse dicha estabilidad mediante secuenciación del genoma completo. Se recomienda que las vacunas vivas que contienen serotipos de *Salmonella* que no son endémicos en una región en particular no se utilicen para el control de otros serotipos (van Immerseel *et al.*, 2013). Se debe tener especial cuidado para asegurar que las vacunas atenuadas no se atenúen o contaminen de forma incompleta por microorganismos de siembra.

iii) Consideraciones ambientales

Las vacunas vivas no deben poder replicarse en el ambiente, y podrán persistir solo durante un breve periodo de tiempo.

### 2.3.2. Requisitos de eficacia

i) Para la producción animal

La duración de la inmunidad probablemente varíe de forma importante entre productos, pautas de vacunación y animales vacunados. La vacuna debe aportar protección a lo largo de todo el ciclo de puesta, lo cual puede determinarse mediante pruebas de potencia (eficacia) en distintas fases de la puesta. Durante la puesta, puede ser necesaria una dosis de refuerzo, pero no deben emplearse vacunas vivas durante la puesta en parvadas de ponedoras que pongan huevos destinados al consumo humano.

La inmunidad contra *Salmonella* suele ser específica de serovariedad o de serogrupo. Las consultas entre expertos sugieren que la mayoría de vacunas muertas aportan cierta protección durante 6 meses, mientras que ciertas vacunas vivas administradas mediante inyección pueden desencadenar una inmunidad más fuerte, que puede persistir durante 1 año o más. Las vacunas administradas por vía oral pueden producir una protección más variable, particularmente en el caso de las vacunas lábiles que se administran en agua potable. La vacunación de pollitos de un día mediante pulverización con gota gruesa puede ser beneficiosa cuando existe un desafío temprano, y los programas que combinan vacunas muertas y vivas pueden proporcionar una protección superior. No obstante, hay que recordar que una exposición fuerte como la que tiene lugar en explotaciones



ocupadas continuamente o a aves salvajes infectadas y poblaciones de ácaros puede ser excesiva para la inmunidad vacunal, y que las vacunas vivas comerciales podrían atenuarse para reducir la supervivencia ambiental de tal forma que se reduzca la respuesta inmunitaria. También puede haber problemas para asegurar la precisión de la inyección en el uso de vacunas inyectables muertas y vivas. Las vacunas contra *Salmonella* tienen por objetivo reducir el grado de enfermedad clínica en aves de corral, y también reducir el riesgo de introducción de infección en las parvadas. Si es posible, la prueba de potencia debe relacionarse con la eficacia de la vacuna en las especies de destino, y deben aplicarse criterios adecuados para dar los lotes por buenos. Tal vez se puedan evaluar vacunas muertas e inyectadas mediante la respuesta de anticuerpos O-H que hayan producido, aunque hay que recordar que los anticuerpos séricos son solo una parte del mecanismo de protección del hospedador contra *Salmonella*. Como alternativa, la potencia de la vacuna puede valorarse mediante su efecto en animales vacunados y expuestos que se compararán cuantitativa y estadísticamente con controles no vacunados.

ii) Para el control y la erradicación

Las vacunas contra *Salmonella* no permiten erradicar la infección de parvadas pero pueden aumentar el umbral de infección, reducir el nivel de diseminación de microorganismos y reducir la transmisión vertical en aves de corral que dé lugar a contaminación de huevos en incubación o de mesa. Por tanto, la vacunación ayuda a otras medidas de erradicación y control, como el desvieje, la producción todo dentro-todo fuera y la higiene en las explotaciones.

### 2.3.3. Estabilidad

Falta información sobre la estabilidad de las vacunas muertas. La estabilidad viene determinada por las condiciones de almacenaje y por la presencia de microorganismos contaminantes que crezcan en el producto. Como conservantes de vacunas bacterianas muertas a menudo se emplean sustancias químicas con actividad antimicrobiana, como el tiomersal, el fenol o el cristal violeta. La estabilidad se valora mediante pruebas de potencia que se repiten a intervalos adecuados. La estabilidad de las vacunas vivas puede evaluarse mediante recuentos del número de microorganismos viables, que se repetirán a intervalos determinados, y mediante pruebas de genotipificación para hallar posibles cambios genéticos que tengan lugar durante la fermentación.

## BIBLIOGRAFÍA

- BARBOUR E.K., AYYASH D.B., ALTURKISTNI W., ALYAHIBY A., YAGHMOOR S., IYER A., YOUSEF J., KUMOSANI T. & HARAKEH S. (2015). Impact of sporadic reporting of poultry *Salmonella* serovars from selected developing countries. *J. Infect. Dev. Ctries*, **9**, 1–7.
- BARROW P.A. (1992). ELISAs and the serological analysis of *Salmonella* in poultry: a review. *Epidemiol. Infect.*, **109**, 361–369.
- BARROW P.A. (1994). Serological diagnosis of *Salmonella* serotype *enteritidis* infections in poultry by ELISA and other tests. *Int. J. Food Microbiol.*, **21**, 55–68.
- BARROW P.A., JONES M.A., SMITH A.L. & WIGLEY P. (2012). The long view: *Salmonella* – the last forty years. *Avian Pathol.*, **41**, 413–420.
- BATISTA D.F., DE FREITAS NETO O.C., DE ALMEIDA A.M., BARROW P.A., DE OLIVEIRA BARBOSA F. & BERCHIERI JUNIOR A.B. (2016). Molecular identification of *Salmonella enterica* subsp. *enterica* serovar Gallinarum biovars Gallinarum and Pullorum by a duplex PCR assay. *J. Vet. Diagn. Invest.*, **28**, 419–422.
- BROOKS B.W., PERRY M.B., LUTZE-WALLACE C.L. & MACLEAN L.L. (2008). Structural characterization and serological specificities of lipopolysaccharides from *Salmonella enterica* serovar *gallinarum* biovar pullorum standard, intermediate and variant antigenic type strains. *Vet. Microbiol.*, **126**, 334–344.
- DE CARLI S., GRÄF T., MAYER F.Q., CIBULSKI S., LEHMANN F.K., FONSECA A.S., IKUTA N. & LUNGE V.R. (2016). Draft genome sequence of a *Salmonella enterica* subsp. *enterica* Serovar Gallinarum bv. Gallinarum isolate associated with fowl typhoid outbreaks in Brazil. *Genome Announc.*, **4**, e00019-16.

- ELLIS E.M., WILLIAMS J.E., MALLINSON E.T., SNOEYENBOS G.H. & MARTIN W.J. (1976). Culture Methods for the Detection of Animal Salmonellosis and Arizonosis. Iowa State University Press, Ames, Iowa, USA.
- ESWARAPPA S.M., JANICE J., BALASUNDARAM S.V., DIXIT N.M. AND DIPSHIKHA C. (2009). Host-specificity of *Salmonella enterica* serovar *gallinarum*: Insights from comparative genomics. *Infect Genet. Evol.*, **9**, 468–473.
- GAST R.K. (1997). Detecting infections of chickens with recent *Salmonella Pullorum* isolates using standard serological methods. *Poult. Sci.*, **76**, 17–23.
- GRIMONT P.A.D. & WEILL F.-X. (2007). Antigenic formulae of the *Salmonella* serovars. WHO Collaborating Centre for reference and research on *Salmonella*. Institut Pasteur, Paris, France.
- HAIDER G., CHOWDHURY E.H. & HOSSAIN M. (2014). Mode of vertical transmission of *Salmonella enterica* sub. *enterica* serovar Pullorum in chickens. *Afr. J. Microbiol. Res.*, **8**, 1344–1351.
- HARBOURNE J.F., WILLIAMS B.M., PARKER W.H. & FINCHAM I.H. (1963). The prevention of fowl typhoid in the field using a freeze-dried 9R vaccine. *Vet. Rec.*, **75**, 858–861.
- HITCHNER S.B. (2004). History of biological control of poultry diseases in the U.S.A. *Avian Dis.*, **48**, 1–8.
- HOLT P.S. & CHAUBAL L.H. (1997). Detection of motility and putative synthesis of flagellar proteins in *Salmonella pullorum* cultures. *J. Clin. Microbiol.*, **35**, 1016–1020.
- IVANICS E., KASZANYITZKY E., GLAVITS R., SZEREDI L., SZAKALL S., IMRE A., KARDOS G. & NAGY B. (2008). Acute epidemic disease in laying hen flocks, caused by *Salmonella gallinarum*. *Magyar Allatorvosok Lapja*, **130**, 611–617.
- KANG M.S., KWON Y.K., KIM H.R., OH J.Y., KIM M.J., AN B.K., SHIN E.G., KWON J.H. & PARK C.K. (2012). Differential identification of *Salmonella enterica* serovar Gallinarum biovars Gallinarum and Pullorum and the biovar Gallinarum live vaccine strain 9R. *Vet. Microbiol.*, **160**, 491–495.
- LEE J.H. (2015). Protection against *Salmonella typhimurium*, *Salmonella gallinarum*, and *Salmonella enteritidis* infection in layer chickens conferred by a live attenuated *Salmonella Typhimurium* strain. *Immune Netw.*, **15**, 27–36.
- LEE Y.J., MO I.P. & KANG M.S. (2005). Safety and efficacy of *Salmonella gallinarum* 9R vaccine in young laying chickens. *Avian Pathol.*, **34**, 362–366.
- LIU G.-R., RAHN, A., LIU W.-Q., SANDERSON K.E., JOHNSTON R.N. & LIU S.-L. (2002). The evolving genome of *Salmonella enterica* serovar Pullorum. *J. Bacteriol.*, **184**, 2626–2633.
- LOPES P.D., NETO O.F., BATISTA D.F.A., DENADAI J., ALARCON M.F.F., ALMEIDA A.M., VASCONCELOS R.O., SETTA A., BARROW P.A. & BERCHIERI A. (2016). Experimental infection of chickens by a flagellated motile strain of *Salmonella enterica* serovar Gallinarum biovar Gallinarum. *Vet. J.*, **214**, 40–46.
- MALLINSON E.T. & SNOEYENBOS G.H. (1989). Salmonellosis. In: Isolation and Identification of Avian Pathogens, Third Edition, Purchase H.G. et al., eds. American Association of Avian Pathologists, Kendall Hunt Publishing, Iowa, USA, 3–11.
- OKAMOTO A.S., MENCONI A., GONCALVES G.A.M., ROCHA T.S., ANDREATTI R.F., SAVANO E.N. & SESTI L. (2010). Reversion to virulence evaluation of a 9r vaccine strain of *Salmonella enterica* serovar *Gallinarum* in commercial brown layers. *Brazilian J. Poult. Sci.*, **12**, 47–52.
- OLIVIERA G.H. DE, BERCHIERI JUNIOR A., MONTASSIER H.J. & FERNANDES A.C. (2004). Assessment of serological response of chickens to *Salmonella Gallinarum* and *Salmonella Pullorum* by ELISA. *Rev. Bras. Cienc. Avic.*, **6**, 111–115.
- PAIVA J.B.D., PENHA FILHO R.A.C., ARGUELLO Y.M.S., SILVA M.D.D., GARDIN Y., RESENDE F., BERCHIERI JUNIOR A. & SESTI L. (2009) Efficacy of several *Salmonella* vaccination programs against experimental challenge with *Salmonella gallinarum* in commercial brown layer and broiler breeder hens. *Brazilian J. Poult. Sci.*, **11**, 65–72.
- PARMAR D. & DAVIES R.H. (2007). Fowl typhoid in a small backyard laying flock. *Vet. Rec.*, **160**, 348.

PARVEJ M.S., NAZIR K.H., RAHMAN M.B., JAHAN M., KHAN M.F. & RAHMAN M. (2016). Prevalence and characterization of multi-drug resistant *Salmonella enterica* serovar Gallinarum biovar Pullorum and Gallinarum from chicken. *Vet. World*, **9**, 65–70.

PROUX K., HUMBERT F., JOUY E., HOUDAYER C., LALANDE F., OGER A. & SALVAT G. (2002). Improvements required for the detection of *Salmonella* Pullorum and Gallinarum. *Can. J. Vet. Res.*, **66**, 151–157.

REVOLLEDO L. & FERREIRA A.J.P. (2012). Current perspectives in avian salmonellosis: Vaccines and immune mechanisms of protection. *J. Appl. Poultry Res.*, **21**, 418–431.

SHIVAPRASAD H.L. (2000). Fowl typhoid and pullorum disease. *Rev. sci. tech. Off. int. Epiz.* **19**, 405–424.

SHIVAPRASAD H.L., METHNER U. & BARROW P.A. (2013). *Salmonella* infections in the domestic fowl. In: *Salmonella in Domestic Animals*, Second Edition, Barrow P.A. & Methner U., eds. CAB International, Wallingford, Oxfordshire, UK, 162–192.

SILVA E.N., SNOEYENBOS G.H., WEINACK O.M. & SMYSER C.F. (1981). Studies on the use of 9R strain *Salmonella Gallinarum* as a vaccine in chickens. *Avian Dis.*, **25**, 38–52.

SORIA M.C., SORIA M.A. & BUENO D.J., (2012). Comparison of 2 culture methods and PCR assays for *Salmonella* detection in poultry feces. *Poult. Sci.*, **91**, 616–626.

THOMSON N.R., CLAYTON D.J., WINDHORST D., VERNIKOS G., DAVIDSON S., CHURCHER C., QUAIL M.A., STEVENS M., JONES M.A., WATSON M., BARRON A., LAYTON A., PICKARD D., KINGSLEY R.A., BIGNELL A., CLARK L., HARRIS B., ORMOND D., ABDELLAH Z., BROOKS K., CHEREVACH I., CHILLINGWORTH T., WOODWARD J., NORBERCZAK H., LORD A., ARROWSMITH C., JAGELS K., MOULE S., MUNGALL K., SANDERS M., WHITEHEAD S., CHABALGOITY J.A., MASKELL D., HUMPHREY T., ROBERTS M., BARROW P.A., DOUGAN G. & PARKHILL J. (2008) Comparative genome analysis of *Salmonella enteritidis* pt4 and *Salmonella gallinarum* 287/91 provides insights into evolutionary and host adaptation pathways. *Genome Res.*, **18**, 1624–1637.

UNITED STATES DEPARTMENT OF AGRICULTURE (USDA) (1996). Auxiliary Provisions on National Poultry Improvement Plan. Code of Federal Regulations, Title 9, Part 147, 717–727.

VAN IMMERSEEL F., STUDHOLME D.J., EECKHAUT V., HEYNDRIKX M., DEWULF J., DEWAELE I., VAN HOOREBEKE S., HAESEBROUCK F., VAN MEIRHAEGHE H., DUCATELLE R. & PASZKIEWICZ K. (2013). *Salmonella* Gallinarum field isolates from laying hens are related to the vaccine strain SG9R. *Vaccine*, **31**, 4940–4945.

VIELITZ E. (2016). Evolution of avian pathology in Europe during the past 50 years. *Lohmann Information*, **50**, 4–10.

WALES A.D., CARRIQUE-MAS J.J., RANKIN M., BELL B., THIND B.B. & DAVIES R.H. (2010) Review of the carriage of zoonotic bacteria by arthropods, with special reference to *Salmonella* in mites, flies and litter beetles. *Zoonoses Public Health*, **57**, 299–314.

WIGLEY P., HULME S.D., POWERS C., BEAL R.K., BERCHIERI A., SMITH A. & BARROW P. (2005). Infection of the reproductive tract and eggs with *Salmonella enterica* serovar Pullorum in the chicken is associated with suppression of cellular immunity at sexual maturity. *Infect. Immun.*, **73**, 2986–2990.

\*

\* \*

**NB:** En el momento de la publicación (2018) no existían Laboratorios de Referencia de la OIE para la pulorosis y tifosis aviar (puede consultarse la página web de la OIE:

<https://www.oie.int/es/que-ofrecemos/red-de-expertos/laboratorios-de-referencia/#ui-id-3>)

**NB:** ADOPTADO POR PRIMERA VEZ EN 1991. ÚLTIMAS ACTUALIZACIONES ADOPTADAS EN 2018.