

CAPÍTULO 3.10.7.

SALMONELOSIS*¹

RESUMEN

Descripción de la enfermedad: La salmonelosis es una enfermedad infecciosa del hombre y de los animales que está causada por bacterias del género *Salmonella*. Las salmonellas son agentes etiológicos causantes de infecciones diarreicas y sistémicas. A menudo causan infecciones subclínicas y pueden ser expulsadas en grandes cantidades con las heces de los animales que presentan signos clínicos o que son portadores, lo cual da lugar a una contaminación del medioambiente. La infección de los animales destinados al consumo humano a menudo da lugar a una contaminación de la carne, los huevos, la leche y los productos lácteos. La salmonelosis es una de las enfermedades humanas zoonóticas transmitidas por alimentos más frecuentes e importantes desde el punto de vista económico. Está reconocida en todos los países y las especies del género *Salmonella* no tifoideas parecen ser más prevalentes en zonas de actividad pecuaria intensiva, sobre todo en cerdos, terneros criados de forma intensiva y aves de corral.

La enfermedad puede afectar a todas las especies de animales domésticos; los más susceptibles a las infecciones clínicas son los animales jóvenes, gestantes, lactantes. Los signos clínicos más frecuentes de la enfermedad son los entéricos, pero se puede observar un espectro muy amplio de signos, que incluyen septicemia aguda, aborto, artritis y enfermedad respiratoria. Muchos animales, en especial los cerdos y las aves de corral, pueden estar infectados sin manifestar la enfermedad clínica. Tales especies de animales tienen un papel fundamental respecto a la difusión de la infección entre parvadas y rebaños y como fuente de contaminación alimentaria y de infección humana.

La tifosis aviar y la pullorosis, que son otras enfermedades de las aves de corral causadas por biovares de *Salmonella* específicas de hospedador, se presentan en el capítulo 3.3.11. de este Manual Terrestre.

Detección del agente: El diagnóstico se basa en el aislamiento y la identificación del microorganismo a partir de tejidos obtenidos asépticamente en necropsias o de las heces, de hisopos rectales, muestras ambientales, de productos alimentarios o de pienso. La infección anterior o actual de animales por algunas serovariedades también se puede diagnosticar serológicamente. Cuando aparece infección en los órganos reproductores o en caso de aborto, es habitual cultivar el contenido del estómago fetal, hisopos placentarios y vaginales y, en el caso de las aves de corral, huevos embrionados u ovarios/oviductos.

Salmonella puede aislarse mediante varias técnicas, una de las cuales es un pre-enriquecimiento para recuperar microorganismos con daños subletales, medios de enriquecimiento que contengan sustancias inhibitoras para evitar microorganismos competidores, y medios selectivos con agar en placa para diferenciar salmonelas de otras enterobacterias. También pueden usarse otros métodos, como la reacción en cadena de la polimerasa o la detección inmunológica de antígenos de *Salmonella*, según los requisitos legislativos.

Para obtener una confirmación definitiva de la cepa aislada, se pueden aplicar varias pruebas bioquímicas, serológicas y moleculares a los cultivos puros. *Salmonella* posee antígenos llamados somáticos (O), flagelares (H) y de virulencia (Vi), que pueden identificarse mediante sueros específicos de tipo, y después puede determinarse la serovariedad por referencia a las fórmulas antigénicas del esquema de White-Kauffmann-LeMinor. Es posible que muchos laboratorios

¹ A pesar de ciertas enfermedades causadas por *Salmonella* se incluyen en algunas secciones de especies individuales de la Lista de la OIE, este capítulo comprende varias especies de *Salmonella* y por consiguiente brindan una descripción más amplia.

precisen enviar las cepas a un laboratorio de referencia para la identificación del serotipo y la posterior caracterización. Entre los métodos alternativos de serotipificación se encuentran varios métodos basados en sistemas moleculares, como la secuenciación de microchips o del genoma completo, que se utilizan cada vez más. También existen esquemas de tipificación de fagos para algunos serovares, pero se utilizan con menos frecuencia que en años anteriores, habiendo sido sustituidos en gran medida por los métodos moleculares. Cada vez se utilizan más métodos de serotipificación alternativos, como la tipificación de la secuencia multilocus (MSLT) basada en la secuenciación del genoma completo. Para algunas serovariedades también se dispone de esquemas de fagotipificación.

Pruebas serológicas: Las pruebas serológicas deben realizarse en una muestra de la población que sea estadísticamente representativa, pero los resultados no siempre son indicativos de infección activa. En el laboratorio, el método preferido para la exportación y el diagnóstico de muestras de cualquier especie de producción es la prueba de aglutinación en tubo. Existen enzimoimmunoanálisis para algunas serovariedades, que pueden utilizarse para el diagnóstico serológico y la vigilancia, especialmente en el caso de aves de corral y cerdos. La vacunación contra *Salmonella* puede comprometer el valor diagnóstico de las pruebas serológicas.

Requisitos para las vacunas: Se comercializan vacunas inactivadas y vacunas vivas. Las inactivadas suelen contener adyuvantes oleosos o alhidrogel, que mejoran la eficacia.

A. INTRODUCCIÓN

La salmonelosis es una enfermedad infecciosa del ser humano y de los animales, que clínicamente se caracteriza por cursar con enteritis aguda o enteritis crónica, septicemia o aborto. Los animales pueden contraer la infección sin manifestar enfermedad evidente. Las salmonelas son bacterias básicamente intestinales y pueden expulsarse con las heces de forma continua o intermitente, ocasionando una contaminación del medioambiente (Barrow & Methner, 2013).

1. Clasificación y nomenclatura del agente patógeno

El género *Salmonella* incluye solo dos especies: *S. enterica* y *S. bongori* (Grimont y Weill, 2007). *Salmonella enterica* se divide en seis subespecies, que se distinguen por algunas características bioquímicas y la susceptibilidad a la lisis por el bacteriófago Felix O1. Estas subespecies son las siguientes:

Subgéneros originales	=	Nomenclatura actual
• Subespecie I	=	subespecie <i>enterica</i>
• Subespecie II	=	subespecie <i>salamae</i>
• Subespecie IIIa	=	subespecie <i>arizonae</i>
• Subespecie IIIb	=	subespecie <i>diarizonae</i>
• Subespecie IV	=	subespecie <i>houtenae</i>
• Subespecie VI	=	subespecie <i>indica</i>

El símbolo V se reserva para las serovariedades de *S. bongori* a fin de evitar confusiones con los nombres de serovariedad *S. enterica* subesp. *enterica*.

Las cepas de *Salmonella* se clasifican en serovariedades según la gran diversidad de antígenos (O) del lipopolisacárido (LPS) u O y de antígenos proteicos de los flagelos o H, de acuerdo con la clasificación del esquema de White-Kauffmann-Le Minor (Grimont & Weil, 2007); en la actualidad se reconocen más de 2600 serovariedades, pero también hay muchos clones de variantes monofásicas estables pertenecientes a varios serovares, y la lista de serovares no se ha actualizado en más de 10 años. Las serovariedades más comunes que causan infección en humanos y en animales de abasto pertenecen a la subespecie *enterica*. Las serovariedades de las otras subespecies tienen mayor probabilidad de presentarse en animales de sangre fría y en el ambiente, pero a veces se les asocia con la enfermedad en humanos. Algunas serovariedades de las subespecies *arizonae* y *diarizonae* pueden causar enfermedad en los pavos y en las ovejas, y otras pueden ser vehiculadas por reptiles y anfibios. Según el esquema de White-Kauffmann-Le Minor, solo tienen nombre las serovariedades de la subespecie *enterica*, como por ejemplo, *S. enterica* subsp. *enterica* serovariedad Enteritidis, o *S. enterica* serovariedad Enteritidis, o, de forma abreviada, *S. Enteritidis*. Las serovariedades de las demás subespecies de *S. enterica*,

variantes monofásicas y serovares dentro de *S. bongori* se designan solo por su fórmula antigénica (por ejemplo, *Salmonella* IV 48:g.z51).

Pueden tener lugar cambios en la clasificación de las serovariedades cuando se expresan antígenos O distintos debido a una variación en la forma de las colonias o lisogenia por bacteriófago(s) o cuando se expresan flagelos diferentes como consecuencia de una variación en la fase o deleciones o mutaciones en genes que codifican flagelos o mecanismos de expresión.

2. Descripción e impacto de la enfermedad

El curso de la infección, los signos clínicos, los hallazgos postmórtem y los modelos epidemiológicos varían según el serotipo y la especie animal implicada. La mayoría de serovariedades puede causar enfermedad en gran variedad de especies animales (Jajere, 2019), mientras que alguna son específicas de hospedador, como *S. Typhi* en el ser humano o *S. Abortusovis* en las ovejas. Otras serovariedades están adaptadas al hospedador, como por ejemplo, *S. Choleraesuis* en los cerdos o *S. Dublin*, en el ganado bovino. Las serovariedades específicas de hospedador o adaptadas al hospedador a menudo causan una enfermedad septicémica. En las aves de corral, la pullorosis y la tifosis aviar son infecciones específicas de hospedador causadas por *S. Gallinarum*, biovares *Pullorum* y *Gallinarum*, respectivamente. Para más información sobre la pullorosis y la tifosis aviar, consúltese el capítulo 3.3.11 de este *Manual Terrestre*.

Los niños pequeños, las personas de edad avanzada y las personas con compromiso inmunitario o que toman inhibidores de la bomba de protones son los seres humanos más susceptibles a la salmonelosis. La enfermedad puede afectar a todas las especies de animales domésticos, siendo los animales de corta edad y las hembras gestantes los más susceptibles. Puede observarse gran variedad de signos clínicos, como septicemia aguda, diarrea aguda o crónica, enfermedad respiratoria, aborto o artritis. Los pollitos y pavipollos de menos de 1 semana de edad son muy susceptibles a la infección por *Salmonella* y en ocasiones puede presentar signos clínicos como anorexia, adiposidad, abatimiento, erizado de plumas, apiñamiento, somnolencia, deshidratación, diarrea blanca y excremento pastoso que dan lugar a una considerable tasa de mortalidad, aunque incluso en las aves de corral de corta edad, lo más probable es el curso subclínico. En los terneros, tiene lugar una infección septicémica por la serovariedad *S. Dublin* adaptada al hospedador, principalmente a las 2-6 semanas de edad. Los terneros quedan apagados, febriles, anoréxicos, presentan diarrea con sangre y moco en las heces, pueden sufrir neumonía o necrosis de la parte distal de las extremidades, y a menudo se deshidratan con rapidez y mueren si no se les administra el tratamiento adecuado y a tiempo. En las vacas gestantes, la infección por *S. Dublin* es una causa frecuente de aborto. Los cerdos infectados por la serovariedad *S. Choleraesuis* adaptada al hospedador pueden presentar signos de septicemia que pueden dar lugar a muerte sin ningún signo clínico previo. Sin embargo, lo más habitual es que los signos clínicos de los cerdos afectados sean anorexia, fiebre alta, letargo, tos superficial, dificultad para respirar y extremidades cianóticas. *Salmonella* Typhimurium es también una causa común de salmonelosis en el ganado vacuno y en los cerdos destetados.

Muchos animales, sobre todo las aves de corral y los cerdos, pero también el ganado bovino y ovino, pueden resultar infectados pero no presentar enfermedad clínica (Jajere, 2019). Estos animales tienen un papel fundamental en cuanto a la transmisión de la infección entre e dentro de parvadas o rebaños. La salmonelosis está reconocida en todos los países, pero la infección no tifoidea parece ser más prevalente en las zonas en las que se practica la producción intensiva, sobre todo la avicultura y la porcicultura (Jajere, 2019).

3. Potencial zoonótico y requisitos de bioseguridad y bioprotección

La salmonelosis humana es una de las enfermedades zoonóticas más frecuentes y económicamente importantes. Los *Centers for Disease Control and Prevention* (CDC) estiman que en EE.UU. enferman cada año más de 1,35 millones de personas por salmonelosis, y que esta enfermedad ocasiona más de 26500 hospitalizaciones y 429 muertes (CDD, 2021). Un estudio reciente en Australia informó que en 2015 hubo casi 91 000 casos de salmonelosis no tifoidea, de los cuales más de 4300 fueron hospitalizados y 19 pacientes murieron, con un costo social total de más de 100 millones de dólares estadounidenses (Ford et al., 2019). La causa más habitual de infección por *Salmonella* es la ingesta de alimentos contaminados crudos o cocidos de forma insuficiente que contengan huevo, ovoproductos, ave de corral y de cerdo, fruta o verdura cruda fresca contaminada o quesos blandos preparados a partir de leche sin pasteurizar.

Salmonella también puede transmitirse a las personas por contacto con aves, ganado, reptiles, anfibios, perros o gatos infectados. Estos animales pueden vehicular la bacteria incluso cuando no presentan ningún signo clínico. Se ha comprobado que muchas serovariedades, incluidas algunas que están adaptadas al hospedador, como *S.*

Cholerasuis o *S. Dublin*, causan enfermedad grave en el ser humano. Los trabajadores de los mataderos, todas las personas que trabajen con animales y los veterinarios pueden resultar infectados de forma directa en el trabajo al contactar con animales infectados. El personal de laboratorio también puede contraer la infección si no se implementan medidas de seguridad en el trabajo. Todas las manipulaciones de laboratorio con cultivos vivos o material que pueda estar infectado o contaminado deben llevarse a cabo a un nivel de bioseguridad y contención adecuado que vendrá determinado 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*).

4. Diagnóstico diferencial

Los signos de las aves de corta edad con salmonelosis generalizada se parecen mucho a los de la pullorosis y a los de la tifosis aviar, así como a los de otras enfermedades septicémicas agudas causadas por gran variedad de bacterias, como *Escherichia coli*. En todas las especies aviarias, la artritis causada por la infección debida a *Salmonella* puede confundirse con una sinovitis o una bursitis causadas por otras infecciones. La salmonelosis septicémica de los cerdos causada por *S. Cholerasuis* puede confundirse con la peste porcina clásica. La salmonelosis septicémica de los terneros o cerdos destetados puede confundirse con una colibacilosis, aunque esta última suele tener lugar a edades más tempranas. La forma entérica aguda de la salmonelosis de los terneros puede parecerse a la coccidiosis. Los abortos ovinos pueden derivar no solo de *S. abortusovis* sino también de *Chlamydia abortus*, *Campylobacter* spp., *Coxiella burnetii*, *Brucella ovis* u otros agentes patógenos.

B. TÉCNICAS DE DIAGNÓSTICO

Tabla 1. Métodos analíticos disponibles para el diagnóstico de la salmonelosis 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	Determinar la prevalencia de la infección – vigilancia	Determinar el estado inmunitario en animales o poblaciones tras la vacunación
Detección del agente^(a)						
Aislamiento de <i>Salmonella</i>	+++	+++	+++	+++	+++	n/a
Métodos rápidos alternativos, como la PCR	+	+	+	+	+	n/a
Detección de respuesta inmunitaria						
SAT	++	–	++	–	+	++
ELISA	++	–	+++	+	++	++

Clave: +++ = método recomendado para este propósito; ++ = método recomendado pero tiene limitaciones; + = método adecuado en muy pocas situaciones; – = no adecuado para este propósito.

PCR = reacción en cadena de la polimerasa; SAT = prueba de aglutinación sérica; ELISA = enzimoimmunoanálisis.

^(a)Se recomienda aplicar varios métodos de detección del agente a una misma muestra clínica.

1. Detección del agente

La frecuencia del muestreo y el tipo de muestras obtenidas dependerán en gran medida de los objetivos del programa de pruebas, las reglamentaciones relativas a la monitorización o comercio internacional, los hallazgos

clínicos, los niveles de detección o la precisión necesaria en la estimación de la prevalencia, el coste y la disponibilidad de recursos para el muestreo y de instalaciones de laboratorio. Las directrices generales sobre la obtención y envío de muestras para el diagnóstico o programas de vigilancia, el tamaño de las muestras, los datos que deben enviarse junto a las muestras y lo todo relativo al empaquetado y al transporte de las muestras se establecen en los Capítulos 1.1.2 y 1.1.3 de este *Manual Terrestre*.

Se toman muestras individuales para pruebas bacteriológicas tan asépticamente como sea posible y, en caso de enfermedad clínica o de control rutinario, deben tomarse antes de comenzar cualquier tratamiento antibiótico. Preferiblemente, las muestras clínicas se obtienen durante la fase aguda de la enfermedad o lo antes posible después de la muerte. En el caso de las parvadas de aves de corral o de otras especies avícolas, las muestras ambientales, como las heces de varios animales que hayan resultado mezcladas de forma natural, desechos y polvo del suelo, o hisopos de material barrido o de botas, o pueden utilizarse hisopos de tela grandes y húmedos como forma rentable de identificar parvadas infectadas, además, pueden ser útiles para otros tipos de unidades pecuarias. En los rebaños lecheros, los filtros de la leche pueden ser un tipo de muestra útil. En el caso de especies animales más pequeñas, es preferible enviar al laboratorio un número representativo de animales enfermos o recién muertos. Normalmente, las serovariedades adaptadas al hospedador son más difíciles de aislar de las heces, de modo que, si se sospecha esta situación, se deben cultivar tejidos infectados siempre que sea posible.

Se debe prestar una atención particular al aislamiento de salmonelas en animales con infecciones subclínicas, ya que es posible que estos liberen la bacteria solo de modo intermitente y en cantidades bajas. Se puede lograr aumentar la sensibilidad diagnóstica incrementando el tamaño de las muestras y el número de las muestras para que representen más individuos, todo ello combinado en algunos casos con la combinación de varias muestras para reducir el coste, y la repetición de los muestreos puede aportar un aumento de la sensibilidad diagnóstica, pero también puede reducir la detección si la prevalencia de la muestra o la concentración de bacterias objetivo son bajas. Dado que en las muestras fecales suele producirse una agrupación de las bacterias en determinadas partes, mezclar a fondo la muestra antes de cultivarla también puede aumentar la sensibilidad de este sistema. Para identificar parvadas o rebaños infectados y animales individuales infectados también pueden emplearse métodos bacteriológicos o serológicos.

1.1. Cultivo

Existen muchos métodos para aislar y detectar *Salmonella* que se utilizan a nivel internacional. Más adelante se describen algunos de los métodos más frecuentes. Las técnicas y medios de cultivo que pueden funcionar mejor en una situación diagnóstica concreta dependen de varios factores, como la serovariedad de *Salmonella*, el origen y tipo de muestra, la especie de origen, la experiencia del microbiólogo y la disponibilidad de medios de enriquecimiento selectivo y de medios selectivos para el cultivo en placas.

Todos los medios de cultivo preparados deben someterse a controles de calidad y permitir el crecimiento de *Salmonella* a partir de un inóculo pequeño en presencia de una matriz de muestra significativa o flora competidora. El uso sistemático de una cepa de referencia paralelamente con muestras rutinarias puede dar lugar a contaminación cruzada de las muestras si las técnicas no se utilizan con cuidado, así que debe utilizarse una serovariedad infrecuente con características de crecimiento típicas que sean semejantes a las de la cepa problema más prioritaria. También se pueden utilizar cepas con resistencia a antimicrobianos u otros marcadores, como la fluorescencia.

La creciente aplicación de programas para la garantía externa de la calidad ha impulsado que cada vez se utilicen más métodos estándar internacionales, como la norma ISO 6579-1:2017 (tras la enmienda de 2020). El método semi-sólido modificado de Rappaport-Vassiliadis (MSRV) basado en agar ha sido validado para muestras fecales, de alimento/pienso y ambientales y es el método exigido para la detección de *Salmonella* a partir de la industria de producción animal, y opcional para el alimento u objetos relacionados con la alimentación. La base del método estándar es el enriquecimiento previo en agua de peptona tamponada, seguido de un enriquecimiento selectivo obligatorio en agar MSRV y para las muestras de producción primaria, mientras que para los alimentos y los piensos el enriquecimiento selectivo prescrito es el caldo de tetrionato de Müller-Kauffmann (MKTTn) y el caldo Rappaport-Vassiliadis-soya (RVS) o MSRV, y luego el aislamiento se realiza en agar xilosa-lisina-desoxicolato (XLD) y en un medio de placa adicional de elección, que se basa en un indicador bioquímico diferente. El agar MSRV ha demostrado ser muy eficaz para la detección de salmonelas móviles. Los métodos y pruebas de diagnóstico deben validarse según se indica en el capítulo 1.1.6 de este *Manual Terrestre*.

1.1.1. Medios de pre-enriquecimiento

El número de salmonelas en las heces de animales asintomáticos, en las muestras ambientales, en los piensos y en los alimentos suele ser bajo, y a veces las muestras están dañadas, por lo que es necesario utilizar medios de enriquecimiento previo, como el agua de peptona tamponada, para maximizar la detección. Esto puede permitir que se multipliquen las pequeñas cantidades de salmonelas que, de otro modo, podrían morir por el efecto tóxico de los medios de enriquecimiento selectivo, y puede ayudar a resucitar las salmonelas que han sufrido daños subletales, por ejemplo, por congelación, calentamiento, desecación o exposición a biocidas o ácidos orgánicos. Si se analizan muestras tratadas con ácidos, puede ser ventajoso aumentar la capacidad de amortiguación del medio de pre-enriquecimiento. En el caso de muestras muy absorbentes o de heces frescas y contenido intestinal, el aumento de la relación entre el peso del caldo y el de la muestra puede mejorar la detección. En el caso de los animales de excreción intermitente, es ventajoso analizar al menos tres muestras fecales consecutivas.

1.1.2. Medios de enriquecimiento selectivos

Los medios de enriquecimiento son medios de agar líquidos o semisólidos que contienen aditivos que permiten el crecimiento selectivo de las salmonelas a la vez que inhiben el crecimiento de otras bacterias. Algunos ejemplos de medios de enriquecimiento selectivos son el tetrionato, como el caldo de Müller–Kauffmann, el selenito-cistina, el caldo verde brillante, RVS el caldo RVS y el agar MSRV. No obstante, algunos aditivos pueden ser relativamente tóxicos para ciertas serovariedades de *Salmonella*; así, por ejemplo, el selenito inhibe *S. Choleraesuis*, y el colorante verde brillante es tóxico para muchas cepas de *S. Dublin*. También se han utilizado las temperaturas altas para aumentar la selectividad, de modo que en algunos laboratorios se utiliza una temperatura de 43°C, aunque esta puede ser inhibitoria con algunos medios, como el tetrionato.

Con Rappaport–Vassiliadis, a 43°C se inhiben las cepas termosensibles, especialmente *S. Dublin*, y se recomienda aplicar 41,5°C para la incubación de medios basados en caldo de RVS y agar MSRV. Los medios de enriquecimiento selectivo por movilidad, como el agar MSRV, se utilizan con frecuencia para aumentar la sensibilidad del proceso de aislamiento de *Salmonella*. Se recomienda utilizar al menos dos medios de enriquecimiento selectivos para una recuperación máxima, y para la detección de contaminación por serovares mezclados, e incubar uno a 37°C y el otro a una temperatura superior adecuada. La composición del medio, que puede variar en función del proveedor, o incluso en algunos casos de un lote a otro, la temperatura y la duración de la incubación, y el volumen de las muestras utilizadas como inóculo del medio, pueden servir para influir en la tasa de aislamiento, y estas variables se deben tener siempre en cuenta. La selectividad de estos medios se basa en la motilidad del microorganismo, la presencia de colorante verde malaquita y novobiocina, y una alta concentración de cloruro de magnesio. El medio semisólido permite detectar la motilidad en forma de halos de crecimiento que se extienden dentro del agar desde el lugar de la inoculación. Si no hay tal crecimiento, la muestra a menudo puede considerarse negativa para *Salmonella* sin necesidad de realizar más placas. Sin embargo, las cepas no móviles no pueden detectarse utilizando el enriquecimiento selectivo semisólido. A los medios de enriquecimiento selectivo se pueden añadir aditivos, como la ferrioxamina E, para mejorar el aislamiento de *Salmonella* en muestras con limitación de hierro o de nutrientes, como los huevos, el agua o el suelo, o pueden añadirse antibióticos, como la novobiocina, para suprimir la mayoría de microorganismos grampositivos u otras bacterias gramnegativas, como *Proteus*. Asimismo, se pueden añadir antibióticos concretos para mejorar el aislamiento de las cepas de *Salmonella* resistentes a los antimicrobianos.

1.1.3. Medios selectivos en placa

Estos son medios selectivos sólidos con agar que permiten un crecimiento diferencial en varios grados. Inhiben el crecimiento de bacterias distintas a *Salmonella* y proporcionan información sobre algunas de las principales características bioquímicas diferenciales – normalmente la incapacidad de fermentar la lactosa y la producción de sulfuro de hidrógeno (H₂S). Los resultados se obtienen después de 24 y 48 horas de cultivo a 37°C. En dichos medios *Salmonella* forma colonias características que se suelen poder diferenciar de las producidas por otras bacterias en la placa, con la posible excepción de *Proteus*, *Pseudomonas*, *Citrobacter* y *Hafnia*. En ocasiones, se pueden aislar salmonelas fermentadoras de la lactosa y la producción de H₂S puede ser variable. Se pueden detectar de modo más eficaz tales cepas atípicas cuando se utilizan medios

de motilidad semi-sólidos para el enriquecimiento selectivo. Pueden utilizarse placas como el agar desoxicolato/citrato (DCA), el agar verde brillante (BGA) o el agar sulfito de bismuto (BS), pero estos dan con mayor frecuencia colonias que son falsos positivos. *Salmonella* Abortusovis es una serovariedad de crecimiento lento, y es normal incubar las placas durante 72 horas y utilizar el medio no selectivo de agar-sangre, o agar MacConkey mínimamente selectivo. Ejemplos de medios selectivos para el cultivo en placa son el agar verde brillante, el agar xilosa-lisina-desoxicolato, el agar desoxicolato/citrato y el agar bismuto sulfito. También se dispone de una gran variedad de medios cromógenos para el aislamiento selectivo de salmonelas. Muchos de estos pueden servir de ayuda para la diferenciación entre colonias sospechosas, sobre todo a partir de muestras fecales, pero deben ser validados para las matrices de muestra, los sistemas de cultivo y la gama de serovariedades que se pretenda detectar, ya que, en ciertas condiciones, la sensibilidad puede ser baja, por ejemplo en el caso de serovares adaptados al hospedador o ciertos serovares *arizonae* o *diarizonae*. No obstante, ciertos medios de agar cromogénicos pueden ser más eficientes para la detección de salmonelas bioquímicamente atípicas.

1.1.4. Ejemplo de procedimiento analítico para el aislamiento de *Salmonella* en muestras de alimento, pienso, fecales y ambientales

- i) Se añade una muestra de 10–25 g a, al menos, un volumen 10 veces superior de agua de peptona tamponada a temperatura ambiente. (NB: en muchas serovariedades adaptadas a un hospedador, y en algunas serovariedades *arizonae*, es preferible añadir la muestra a un medio selectivo de enriquecimiento, como caldo selenito-cisteína, y analizar muestras de tejido cuando sea posible [incluyendo la siembra directa]; véase el método de cultivo para Gallinarum (biovares Gallinarum y Pullorum) en el capítulo 3.3.11 *Tifosis y pullorosis aviar*).
- ii) Se incuba el agua de peptona tamponada previamente calentada durante 16–20 horas a 34–38°C.
- iii) Se inoculan 15–20 ml de agar MSR/V en una placa de Petri de 90 mm de diámetro con 0,1 ml de agua de peptona tamponada incubada, preferiblemente en tres gotas separadas.
- iv) Se inoculan 10 ml de caldo de tetrionato de Müller–Kauffmann con 1 ml del agua de peptona tamponada incubada.
- v) Se incuba el MSR/V a 40,5–42,5°C y el caldo de tetrionato a 34–38°C. El extremo superior del rango de temperatura de tetración para el preenriquecimiento y el enriquecimiento selectivo se recomienda para mejorar el aislamiento de *Salmonella* de muestras fecales e intestinales, o de muestras ambientales con una flora compleja. La parte inferior del rango puede ser más adecuada para algunas muestras de alimentos/piensos y ambientales secas.
- vi) Después de 24 y 48 horas de enriquecimiento selectivo, se resiembrar del MSR/V tomando material del borde de la zona turbia con el asa de 1 µl y extendiéndolo por siembra en estría sobre una placa de agar cromogénico o agar verde brillante más novobiocina, y sobre una placa con agar xilosa-lisina-desoxicolato.
- vii) Se resiembran 10 µl del caldo de tetrionato en una placa de agar cromogénico o agar verde brillante más novobiocina y en agar xilosa-lisina-desoxicolato.
- viii) Se incuban las placas a 34–38°C durante 21–27 horas.
- ix) Se comprueban bioquímicamente hasta cinco colonias sospechosas (rojas/rosadas con enrojecimiento del medio en BGA, rojas con centro negro (u ocasionalmente rojas translúcidas en el caso de cepas H₂S negativas en agar XLD), utilizando medios compuestos como TSI, LDC y urea, o kits comerciales de pruebas bioquímicas, y mediante aglutinación en portaobjetos con antiseros polivalentes “O” (A-S) y poli “H” (fase 1 y fase 2). Se confirma hasta el nivel de serogrupo utilizando antisuero específico del grupo ‘O’. La combinación de los resultados bioquímicos y serológicos puede proporcionar la confirmación de *Salmonella* spp. El serogrupo por sí solo no es suficiente para descartar falsos positivos debido a reacciones cruzadas, por ejemplo, por *Citrobacter* o *Enterobacter* spp. Las pruebas bioquímicas compuestas, la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) o la espectrometría de masas de desorción láser asistida por tiempo de vuelo (MALDI-ToF) también pueden proporcionar la confirmación de *Salmonella* spp.
- x) Se subcultivan las colonias muy sospechosas que no aglutinen con antiseros poli H en medios no selectivos y se repiten después las pruebas. Si se obtiene una aglutinación fuerte

con poli O y poli H, es suficiente para una confirmación preliminar. A continuación, las cepas confirmadas bioquímica y serológicamente se pueden enviar a un laboratorio de referencia para la serotipificación.

1.2. Métodos de cuantificación

Se puede cuantificar *Salmonella* mediante el cultivo directo en placa, pero en el caso de muestras fecales, de pienso o ambientales serán necesarias técnicas del número más probable (MPN). Recientemente se ha descrito un método de MPN miniaturizado y que figura en la lista de la ISO, 2012 (ISO/TS 6579-2, 2012). Asimismo, también se han creado otras reacciones en cadena de la polimerasa (PCR) en tiempo real cuantitativas (Zhang et al., 2020).

1.3. Identificación de colonias sospechosas

Las colonias sospechosas se subcultivan en medios sólidos selectivos y no selectivos para asegurar la ausencia de posibles contaminantes, como *Proteus* spp. Si hay un crecimiento abundante en cultivo puro, pueden analizarse colonias sospechosas mediante aglutinación en porta con anti-sueros polivalentes para la tipificación de *Salmonella* (Ellis et al., 1976). En algunos casos, la colonia sospechosa puede no aglutinar o puede autoaglutinar, en cuyo caso es necesario utilizar pruebas bioquímicas para confirmar la identificación. Estas pruebas se pueden realizar con azúcares en agua de peptona o con sistemas comerciales o en medios compuestos (tales como el agar triple azúcar-hierro [TSI]). Es especialmente importante garantizar que los cultivos de *Salmonella* para la determinación de resistencia a antimicrobianos en las vacunas vivas no se mezclen con otros microorganismos, como *Pseudomonas*, que es más probable que sean multiresistentes o que enmascaren auxotropismo. El método MALDI-TOF también resulta aceptable y rápido para la identificación de *Salmonella* (Dieckmann & Malorney, 2011).

La identificación del/los factor/es O y del/los antígeno/s H, y en circunstancias especiales, del antígeno Vi (presente en *S. Typhi*, *S. Paratyphi C* y *S. Dublin*), se realiza mediante aglutinación directa en porta o por aglutinación en tubo utilizando antisueros específicos. En el caso de microorganismos bifásicos, es necesario identificar ambas fases mediante el uso de la inversión de fase, lo que implica el pase por medio semisólido que contenga antisuero contra la fase conocida. La detección se facilita si se dispone de antisueros dirigidos contra varios factores, lo cual se puede continuar con el uso de sueros monovalentes de tipificación. En las referencias ISO/TR 6579-3:2014 se ofrece más información sobre la serotipificación de *Salmonella*. Aunque muchos de los laboratorios pueden identificar las serovariedades más comunes, para confirmar la identidad de una cepa, o se lleva a cabo una fagotipificación en el caso de que se disponga de fagos para la tipificación específicos de serovariedad, y para llevar a cabo la caracterización genética normalmente se precisan los servicios de un Laboratorio de Referencia. Se pueden necesitar otras pruebas bioquímicas o PCR para identificar algunas variantes serotípicas, como la del d-tartrato, que permite diferenciar *S. Paratyphi B* var. Java (d-tartrato +) de *S. Paratyphi B*. Se debe comprobar la sensibilidad de las cepas a un conjunto de agentes antimicrobianos, ya que existe una preocupación creciente por la emergencia de múltiples cepas nuevas resistentes que albergan genes transferibles de resistencia a las cefalosporinas, colistina y las fluoroquinolonas (Antonelli et al., 2019; Jajere, 2019). Las cepas vacunales vivas también se identifican con frecuencia mediante marcadores de resistencia a antimicrobianos o cambios bioquímicos como el auxotropismo o la rugosidad, así como kits comerciales de PCR o ensayos PCR publicados.

1.4. Métodos inmunológicos y de reconocimiento de ácidos nucleicos

Se usan numerosos métodos alternativos de detección de *Salmonella* y algunos se comercializan. Existen métodos convencionales o de PCR cuantitativa en tiempo real, que a veces incluyen la identificación simultánea de serovares clave (Heymans et al., 2018; Zhang et al., 2020), métodos de amplificación isotérmica mediada por bucle (LAMP) (Yang et al., 2018), ensayos de inmunodiagnóstico ligados a enzimas (Cetin et al., 2019). Muchos de estos métodos no han sido totalmente validados para las muestras fecales y ambientales, aunque se han hecho algunos progresos (Malorny y Hoorfar, 2005; Heymans et al., 2018) y en la UE es posible validar métodos alternativos para su uso reglamentario siguiendo la norma ISO16140-2, a través de un organismo de acreditación autorizado. Estos métodos rápidos son más adecuados para el análisis de alimentos humanos, donde los inhibidores de las reacciones de PCR y los microorganismos que compiten o tienen reacciones cruzadas no son tan problemáticos como en el caso de las heces. La optimización de la detección por PCR requiere técnicas

adecuadas de extracción de ADN y controles para detectar la inhibición, lo que puede reducir la sensibilidad de la prueba en algunos casos (Jensen *et al.*, 2013; Kanki *et al.*, 2009). Una de las principales ventajas de estos métodos en comparación con los cultivos es su rapidez, y pueden ser una valiosa herramienta de diagnóstico para el análisis y liberación de lotes de alimentos y piensos libres de *Salmonella*. Los métodos rápidos suelen ser más costosos que los cultivos convencionales, pero pueden resultar económicamente viables para analizar inicialmente materiales en los que se espere una prevalencia baja de contaminación o en caso de materiales, como los piensos, que se retengan a la espera de que den un resultado negativo. Un método de enriquecimiento/IMS en combinación con un ELISA o PCR permite identificar la mayoría de las contaminaciones por *Salmonella* en 24 horas (Wang *et al.*, 2018). Como hasta ahora no se ha demostrado que ninguno de los métodos rápidos sea adecuado para la detección directa de cantidades bajas de *Salmonella* en las muestras, se necesitan etapas de enriquecimiento selectivo o no selectivo (Oliveira *et al.*, 2003). Normalmente, esto introduce más pasos en el proceso de detección y exige más tiempo al operario. En los métodos rápidos para detección de *Salmonella* hay muchas variaciones y avances, pero ninguno parece reemplazar satisfactoriamente al cultivo en todas las circunstancias.

Por el contrario, los métodos moleculares para la serotipificación o la subtipificación de cepas de *Salmonella* se utilizan cada vez más para la investigación de brotes y la atribución de orígenes de los brotes (Munck *et al.*, 2020). Algunos de los kits en los que se emplean estos métodos son adecuados para su uso en pequeños laboratorios que carecen de las instalaciones de un Laboratorio de Referencia (Diep *et al.*, 2019) y uno está registrado por la OIE. Los métodos basados en la PCR multiplex o en la secuenciación del genoma completo pueden utilizarse para identificar serovares específicos de *Salmonella* (Maurischat *et al.*, 2015a) o para distinguir las cepas de vacunas vivas de los serovares de *Salmonella* que infectan el rebaño o la manada (Maurischat *et al.*, 2015b; Tang *et al.*, 2019). Una nueva norma ISO (ISO 16140-6:2019) cubre la validación de los métodos de subtipificación y es un requisito previo para que dichos métodos se utilicen para sustituir el serotipado de *Salmonella* en los programas de control reglamentarios de la UE. Es importante que los kits utilizados hayan sido totalmente validados de acuerdo con el capítulo 1.1.6. Los kits deben escogerse preferiblemente de entre los que figuran en la lista del Registro de la OIE².

2. Pruebas serológicas

2.1. Identificación serológica de animales, parvadas y explotaciones infectadas

Se han desarrollado varias pruebas serológicas para el diagnóstico de las infecciones por *Salmonella* en los animales. En las aves de corral, la prueba de sangre completa, que utiliza un antígeno teñido, y la prueba de seroaglutinación (SAT) se han utilizado con éxito durante más de 50 años para la identificación de manadas infectadas por *S. Gallinarum* (biovares *Gallinarum* y *Pullorum*) (véase el capítulo 3.3.11). Dado que *S. Enteritidis* posee el mismo antígeno somático del grupo D que *S. Gallinarum* y se cree que procede de un ancestro común (Thomson *et al.*, 2008), la prueba de sangre completa y las pruebas relacionadas pueden utilizarse para el diagnóstico de la infección por *S. Enteritidis*, pero la sensibilidad es baja. Se han desarrollado otras pruebas, como el ELISA (Feld *et al.*, 2000) para el diagnóstico de las infecciones por *S. Enteritidis* y *S. Typhimurium* en aves de corral y para otros serovares en animales de granja. El ELISA se ha utilizado eficazmente para identificar serológicamente al ganado portador de *S. Dublin* y puede aplicarse a la leche a granel para el cribado de rebaños lecheros. En varios países se utiliza una prueba ELISA que incluye antígenos somáticos de una mezcla de serovares (“mix-ELISA”) en suero o líquido tisular liberado por la congelación y posterior descongelación de muestras musculares para detectar infecciones por *Salmonella* en cerdos. Una prueba similar puede utilizarse para detectar anticuerpos contra *S. Enteritidis* y *S. Typhimurium* en la yema de huevo de manadas de ponedoras comerciales no vacunadas. Existen varios kits comerciales de ELISA, pero su rendimiento puede ser variable (Van der Heijden, 2001).

Hoy en día, algunas pruebas ELISA se utilizan sistemáticamente y se han comercializado varias. Se precisa una estandarización de su utilización, y para ello se dispone de valores de sueros control de referencia que se comercializan en Dinamarca³ y en los Países Bajos⁴.

2 <https://www.woah.org/es/que-ofrecemos/productos-veterinarios/kits-de-diagnostico/>

3 Statens Serum Institut, Copenhagen, Dinamarca (www.ssi.dk)

4 GD, Deventer, Holanda (www.gddeventer.com)

2.2. Factores que influyen en el diagnóstico serológico

1. Los métodos serológicos deben utilizarse para identificar poblaciones infectadas más que para identificar animales específicos infectados, aunque se pueden repetir pruebas en la explotación como una ayuda al desvío selectivo de animales portadores crónicos. Normalmente, las pruebas serológicas se diseñan para detectar una pequeña variedad de serovariedades o serogrupos de *Salmonella*.
2. Se sabe que algunos animales con respuesta serológica positiva tal vez no resulten infectados de nuevo por *Salmonella*, y en países con una prevalencia de salmonelosis baja las pruebas con problemas de especificidad darán unos resultados positivos que en su mayor parte serán falsos. Animales que excretan activamente *Salmonella* pueden ser serológicamente negativos en las primeras fases de la enfermedad y algunos animales individuales infectados nunca seroconvierten. Los animales que son serológicamente positivos pueden haber cesado de excretar *Salmonella* aunque las concentraciones de inmunoglobulinas circulantes permanezcan altas, sobre todo en animales portadores latentes, pero otros animales de la granja pueden estar todavía excretando el microorganismo de forma intermitente. Los animales serológicamente negativos pueden ser el resultado de una infección reciente y de una excreción máxima antes de la producción de inmunoglobulinas, o de una infección con serotipos menos invasivos. Con toda probabilidad, los animales que han sido infectados recientemente terminarán siendo detectados serológicamente por un programa adecuado de análisis a lo largo de la vida de la parvada/explotación, pero a menudo existen limitaciones económicas para la aplicación de programas de seguimiento eficaces.
3. Los animales recién nacidos son inmunológicamente inmaduros y no responden serológicamente al antígeno somático LPS hasta las 2–3 semanas de edad. Sin embargo, sí producen una respuesta serológica a los antígenos de la proteína flagelar. El ganado bovino puede no responder serológicamente hasta que tiene unas 10–12 semanas de edad, y es posible que los lechones lactantes no desarrollen una respuesta inmunitaria o posean una respuesta de anticuerpos que refleje la inmunidad materna. En cerdos, pueden utilizarse respuestas diferenciadas que implican diferentes clases de anticuerpos (IgM, IgA, IgG) para ayudar a distinguir las infecciones recientes de las antiguas, pero con frecuencia este fenómeno no es de utilidad para analizar piaras en las que los individuos se hallan normalmente en diferentes fases de la infección. La mayoría de las pruebas se basan en la IgG, y es típico que aparezcan niveles altos de anticuerpos entre 1 y 3 semanas después de la infección y que duren entre 2 y 3 meses.

Es posible que los pollos también adquieran pasivamente anticuerpos anti-*Salmonella* a través de los anticuerpos del saco vitelino; esto puede indicar que la parvada de los progenitores estaba infectada o vacunada. Los mamíferos pueden adquirir anticuerpos de la madre a través del calostro.

4. Durante muchos años se ha utilizado la inmunización para ayudar a controlar ciertas infecciones por *Salmonella* en animales de producción y, si se emplea serología en el diagnóstico, es necesario diferenciar entre la respuesta a la vacuna y a una infección real. Muchas vacunas vivas que se administran oralmente no proporcionan una respuesta de anticuerpos séricos significativa en la mayoría de los animales, pero puede haber excepciones ocasionales que son difíciles de interpretar. Las vacunas muertas inyectables utilizadas para el control de *Salmonella* en los pollos pueden producir una respuesta de anticuerpos muy prolongada, dependiendo del adyuvante utilizado. No se dispone fácilmente de una verdadera prueba DIVA (detección de la infección en animales vacunados) para la identificación específica de la respuesta de los anticuerpos a la vacunación, pero en el caso de *S. Gallinarum* (biovars *Gallinarum* y *Pullorum*), el uso combinado de un ELISA basado en LPS y flagelos puede ayudar a excluir la posibilidad de un falso positivo en una parvada vacunada contra *S. Enteritidis*.
5. El efecto de la terapia con antibióticos en la respuesta serológica no está claro. Algunos investigadores encuentran títulos bajos después de la terapia, mientras que otros no detectan efecto alguno. No obstante, si se ha empleado terapia antimicrobiana, la serología puede ser una técnica de diagnóstico para la salmonelosis más útil que el cultivo.
6. Existen aproximadamente 2600 serovariedades diferentes de *Salmonella*. Dependiendo del antígeno y de la prueba utilizada, pueden producirse reacciones serológicas cruzadas entre diferentes serovariedades, por ejemplo entre *S. Typhimurium*, *S. Abortusequi*, *S. Gallinarum*

S. Pullorum y *S. Enteritidis*. En algunos casos pueden producirse reacciones cruzadas como resultado de la exposición a microorganismos distintos de *Salmonella*.

7. En las aves de corral, se puede comprobar si la yema del huevo contiene inmunoglobulinas frente a *Salmonella*, y los huevos constituyen, por tanto, una muestra para el análisis de las parvadas. En Dinamarca se emplea esta estrategia para el seguimiento de parvadas comerciales de ponedoras. En el ganado bovino, se puede utilizar la leche para la detección de anticuerpos anti-*Salmonella* con el fin de cribar las explotaciones lecheras.
8. La utilización de discos de papel de filtro para obtener muestras de suero elimina la necesidad de separar el suero. Los discos también permiten la conservación a largo plazo y reducen los costes de transporte al laboratorio. La sensibilidad de la prueba puede resultar levemente menor que en las pruebas realizadas con suero fresco.

2.3. La prueba en sangre total

La prueba en sangre total es una prueba rápida para la tifosis aviar y la pullorosis aviar que puede utilizarse en la explotación. La sensibilidad de esta prueba es baja y, sin experiencia, se pueden obtener muchos falsos positivos y falsos negativos. Para una descripción detallada de la prueba en sangre total, consúltese el capítulo 3.3.11.

2.4. Prueba rápida de aglutinación en porta

Se mezcla suero (0,02 ml) con antígeno polivalente teñido con cristal violeta (0,02 ml). El porta se mueve cuidadosamente durante 2 minutos, tras los cuales se lee el resultado de la prueba. Los componentes de la prueba se conservan a 4°C y antes de usarlos deben haber alcanzado la temperatura ambiente.

Los sueros problema deben estar libres de contaminantes y de hemólisis. Puede ser conveniente centrifugar las muestras de suero que se hayan mantenido conservadas durante algún tiempo.

Si se sospecha la existencia de reacciones falsas positivas inespecíficas, los sueros positivos/sospechosos deben analizarse de nuevo después de una inactivación térmica a 56°C durante 30 minutos.

2.5. Prueba de aglutinación sérica

La SAT es relativamente poco sensible, y muchos animales viejos pueden tener niveles bajos de aglutininas en sus sueros derivados de enterobacterias distintas a *Salmonella*. Las muestras aisladas carecen de valor diagnóstico excepto como muestras para el cribado inicial a nivel de rebaño. Se necesitan muestras pareadas como requisito mínimo para confirmar una infección activa. La prueba es relativamente sencilla; los antígenos se pueden preparar con facilidad y no se requiere un equipo costoso. La SAT se puede adaptar a formato de microtitulación y se puede utilizar para determinar títulos somáticos o flagelares. Se recomienda utilizar sueros estándar y otros métodos confirmativos para el control de calidad de la pureza y la inmunogenicidad de las preparaciones de antígeno(s) para SAT que no dependan de los sueros producidos a partir de dichos antígenos. Este método se ha utilizado para la identificación de la exposición a distintos serotipos de *Salmonella*, como *S. Typhimurium*, *S. Enteritidis*, *S. Dublin*, *S. diarizonae* en pavos y *S. Abortusequi*.

2.5.1. Preparación del antígeno somático

- i) Se resiembró *Salmonella* desde el cultivo original apropiado a una placa con medio agar-sangre base (BAB), u otro medio adecuado, para crecimiento de colonias aisladas. Se incubó durante toda la noche a 37°C (±2°C).
- ii) Se selecciona una colonia lisa y se realiza una prueba de aglutinación en porta para confirmar que está presente el antígeno somático requerido.
- iii) Mediante un asa estéril, se inocula con la colonia seleccionada un tubo de agar nutritivo inclinado en un tubo universal.
- iv) Se incubó el cultivo durante 8–12 horas a 34–38°C.

- v) Con una pipeta Pasteur, se retira el cultivo, trabajando preferentemente en el interior de una cabina de seguridad, con aproximadamente 2 ml de alcohol absoluto y se transfiere el contenido a un tubo universal estéril.
- vi) Se deja el antígeno a temperatura ambiente durante 4–6 horas para que el alcohol mate las bacterias y desprenda flagelos.
- vii) Se centrifuga el tubo en una centrífuga de mesa durante 5 minutos a 1 000 *g*. Se vierte el líquido y se añade suficiente solución salina con fenol para conseguir que el antígeno alcance una opacidad equivalente a la de un tubo No. 2 en la escala de Braun (aproximadamente 10⁸ unidades formadoras de colonias/ml) u otro estándar apropiado.
- viii) Se realiza una titulación estándar con un suero conocido para confirmar que el antígeno es positivo para el factor requerido.
- ix) Se conserva en una nevera a 4°C hasta su utilización.

2.5.2. Preparación de antígenos flagelares

- i) Se resiembr *Salmonella*, desde el cultivo original apropiado, en una placa con medio BAB, u otro medio adecuado. Se incuba durante toda la noche a 34–38°C.
- ii) Se realiza un pase en medio semisólido (con aproximadamente un 0,3% de agar) en un tubo de Craigie, u otro tubo adecuado, para inducir la expresión óptima del antígeno flagelar apropiado. Si el serotipo es bifásico, se añade al medio antisuero H que corresponda a la fase a suprimir.
- iii) Se utiliza la aglutinación en porta para comprobar que *Salmonella* está en la fase requerida. Si es así, se inoculan con un asa de cultivo 20 ml de caldo nutritivo. Para que el crecimiento sea óptimo, se incuba durante 12–18 horas a 34–38°C. (Si la fase es incorrecta, se vuelve a pasar por el agar semisólido).
- iv) Se pipetea en la suspensión de antígeno 250 µl de formaldehído al 40% (se deben usar guantes y se debe trabajar preferiblemente en una cabina de seguridad/para humos), y se deja toda la noche.
- v) Se analiza el antígeno mediante SAT utilizando el suero de tipificación apropiado.

2.5.3. Procedimiento analítico

- i) Es más fácil analizar los sueros a una dilución de 1/20; se añaden 0,25 ml de antígeno a 0,25 ml de suero prediluido a 1/10 en solución salina normal.
- ii) Las mezclas se incuban en un baño de agua a 50°C durante 24 horas en el caso de los antígenos somáticos, y durante 4 horas en el caso de los antígenos flagelares. La dilución y el tiempo de incubación pueden variar dependiendo de los antisueros usados.
- iii) Los sueros que dan reacción positiva se diluyen luego de 1/20 a 1/320 y se vuelven a analizar con el antígeno apropiado.

2.6. Enzimoimmunoanálisis para *Salmonella* Enteritidis

Para la detección de IgG (IgY) específica contra *S. Enteritidis*, existen dos sistemas básicos principales: el ELISA indirecto y el ELISA de competición “tipo sándwich” (Barrow & Methner, 2013).

El ELISA indirecto supone el uso de un antígeno detector que recubre los pocillos de una placa de microtitulación. Después de aplicar un reactivo bloqueante para reducir uniones inespecíficas, se añaden a los pocillos las muestras problema. El anticuerpo de la muestra que se une específicamente se detecta con un conjugado anticuerpo/enzima. Se han utilizado varios antígenos, como LPS, flagelos, fimbrias SEF 14, proteínas de la membrana externa y preparaciones de antígenos celulares totales.

El ELISA en sándwich de competición emplea un reactivo específico – un anticuerpo monoclonal (MAb) o policlonal – para recubrir los pocillos con antígeno. Luego se añade una preparación pura o cruda de antígeno. Después se aplican las muestras problema seguidas del anticuerpo conjugado, que no se unirá al antígeno si la muestra contiene anticuerpos específicos. El tiempo que dura la prueba se puede acortar

añadiendo simultáneamente la muestra problema y el conjugado. Se han preparado MAb contra LPS, flagelos y SEF14 de *S. Enteritidis*.

Ambos sistemas presentan ventajas y desventajas. La prueba indirecta es más simple y hay reactivos disponibles para todos los serotipos de *Salmonella* de pollos, pavos, patos y mamíferos. El ELISA de competición se puede aplicar a todas las especies animales y, en general, ofrece mayor especificidad. Sin embargo, no hay reactivos comercializados para todos los serotipos. También hay algunos problemas de afinidad y puede ser menos sensible que las técnicas indirectas. En condiciones de campo, ambos sistemas han producido falsos positivos y en algunos casos el análisis con un ELISA indirecto para LPS puede confirmarse después con un ELISA de competición para flagelos. Esta combinación se ha utilizado para diferenciar la infección natural por *S. Enteritidis* de una respuesta a la vacuna *S. Gallinarum* 9R, que carece de antígenos flagelares.

Ambos tipos de prueba pueden utilizarse con suero, yema de huevo o sangre seca reconstituida eluida de discos de papel de filtro. En Dinamarca y otros países se emplea un ELISA mixto (o ELISA para jugo de carne) para detectar infecciones por *Salmonella* en cerdos (Van der Heijden, 2001). Este ELISA contiene los antígenos “O” de tipo 1, 4, 5, 6, 7 y 12 del LPS de *S. Typhimurium* y *S. Choleraesuis*, lo que capacita a la prueba para detectar serológicamente el 95% de los serogrupos de *Salmonella* que se han hallado en cerdos en la mayoría de los países europeos. También se han añadido antígenos del grupo D a algunos kits para ELISA. El suero se utiliza para analizar explotaciones de producción y de multiplicación, mientras que, para los cerdos que se hallan en el matadero, la prueba se realiza con el líquido tisular (“jugo de carne”) que se libera cuando se descongelan 10 g de muestra de músculo congelado. Este método se utiliza en la mayoría de los países, pero el suero obtenido de vasos sanguíneos grandes de las vísceras puede proporcionar resultados más sensibles y específicos.

Con algunos ELISA se puede diferenciar entre las infecciones producidas por serotipos de *Salmonella* de diferentes serogrupos. Entre los grupos B y D y otros serotipos invasivos se puede producir alguna reacción cruzada. Sin embargo, normalmente hay una mayor respuesta de anticuerpos cuando en el ELISA se utiliza LPS del serotipo homólogo. Aún no se ha decidido ni existe acuerdo internacional sobre cuál es el mejor método para establecer un valor de “corte” de la absorbancia, por encima del cual los sueros se designan como procedentes de una población afectada por *S. Enteritidis*, sin que se produzca un nivel inaceptable de positivos falsos, y en la UE, los ELISA se utilizan menos porque se utiliza mucho la vacunación contra *S. Enteritidis* y *S. Typhimurium*, sobre todo en parvadas de reproductores para gallinas ponedoras y broilers.

Los ELISA ya están adaptados a la automatización y, por tanto, a programas de muestreo a gran escala. Un problema importante es que se necesita un equipo costoso, y que muchos de los reactivos son también caros. Existen varios kits comercializados de ELISA y de ELISA-mixto para *S. Enteritidis*, *S. Typhimurium* y Grupo B/C. En teoría, estos deben validarse mediante pruebas internacionales coordinadas antes de adoptarse a efectos de vigilancia. Recientemente se ha añadido un kit de ELISA para *S. Abortusovis* al registro de la OIE de kits de diagnóstico⁵; se necesita una prueba similar validada para *S. Abortusequi*.

Un ejemplo de ELISA interno validado es el que se ha desarrollado en el Laboratorio de Referencia en APHA Weybridge⁶.

Los requisitos se indican a continuación.

2.6.1. Equipo

Placas de PVC; pipetas apropiadas y cilindros de medición; lavador de placas de microprueba; lector de placas ELISA; filtro de prueba de 405–410 nm y filtro de referencia de 630 nm.

2.6.2. Antígeno

- i) Se comercializa LPS de *S. Enteritidis* extraído con fenol. Este se reconstituye en 1 ml de agua desionizada y se conserva a –20°C en alícuotas de 100 µl en solución salina tamponada con

5 <https://www.woah.org/es/que-ofrecemos/productos-veterinarios/kits-de-diagnostico/>

6 <https://www.woah.org/es/que-ofrecemos/red-de-expertos/laboratorios-de-referencia/#ui-id-3>

fosfato (PBS), pH 7, a una concentración de 2,5 mg/ml. Para su uso, el antígeno debe ser descongelado en tampón de recubrimiento a la concentración apropiada.

- ii) El antígeno LPS también se puede preparar por la técnica de Westphal y Luderitz (1954) y estandarizarse, en lo que respecta a su concentración en carbohidrato, por el método de Gerhardt (1981) y ajustarse a 1 000 µg/ml.

2.6.3. Diluyente del suero y del conjugado

Se añade seroalbúmina bovina (BSA) (2 g) y Tween 20 (0,05 ml) a PBS (100 ml) (Como alternativa, la leche en polvo [1 g] puede reemplazar a la BSA). Se conserva a 4°C y se hacen soluciones frescas cada semana.

- i) Tampón de recubrimiento

Se añade carbonato de sodio (1,59 g) y bicarbonato de sodio (2,93 g) a agua desionizada (1 litro) y se ajusta a pH 9,6. Se conserva a 4°C y se renueva cada 2 semanas.

- ii) Tampón de sustrato

Se prepara una solución de dietanolamina al 10% (v/v) en agua desionizada. La dietanolamina debe precalentarse a 37°C antes de distribuirse, y el pH de la solución debe ajustarse a 9,8 con ácido clorhídrico 1 M. Se conserva a 4°C y se renueva cada 2 semanas.

- iii) Conjugado enzimático

Suero anti-inmunoglobulina de pollo generado en cabra y conjugado a fosfatasa alcalina o anti- globulina de pollo generada en otras especies. Se conserva a 4°C diluida en diluyente a la concentración apropiada y se renueva cada semana.

- iv) Substrato del enzima

Se disuelve un comprimido de *p*-nitrofenil fosfato disódico (5 mg) en tampón de sustrato (5 ml) no antes de los 30 minutos previos a su uso, y se conserva en la oscuridad.

2.7. Estándares

- i) Antisuero control positivo preparado por inoculación intramuscular de cuatro pollos libres de patógenos específicos (SPF) de 1 semana de edad con un inóculo que contenga 10^6 *S. Enteritidis*. El suero se obtiene 3–4 semanas después, cuando los títulos de anticuerpo son máximos.
- ii) Suero control negativo A de cuatro aves SPF de 1 semana de edad.
- iii) Suero control negativo B de 58 reproductores de 1 semana de edad que se sepa que están libres de infecciones por *Salmonella*. Se juntan los sueros y se guardan en volúmenes de 100 µl a –20°C.

C. REQUISITOS PARA LAS VACUNAS

1. Antecedentes

1.1. Fundamentos y uso previsto del producto

Se utilizan muchas vacunas inactivadas contra la salmonelosis causada por distintas serovariedades en distintas especies animales, como una vacuna combinada contra *S. Enteritidis* y *S. Typhimurium* para empleo en aves de corral, y una vacuna más reciente también incluye *S. infantis*. La inactivación suele realizarse por calentamiento o por tratamiento con formalina y se suele utilizar un adyuvante, como alhidrogel o aceite mineral. En varios países también se han utilizado vacunas vivas, como las cepas semi-rugosas, tales como la 9R para la tifosis aviar y la HWS51 para las infecciones por *S. Dublin* (Mastroeni et al., 2001). Otras vacunas atenuadas son los mutantes auxotróficos y de "deriva metabólica", que se utilizan para prevenir las infecciones por *Salmonella* en los animales de granja en Europa, especialmente para *S. Enteritidis* y *S. Typhimurium* en las aves de corral y *S. Typhimurium* en los cerdos. Se han desarrollado vacunas mutantes, atenuadas racionalmente por supresión de genes mediante técnicas de biología molecular, para aves de corral y para otras especies; estas comprenden los

mutantes *aroA* y las cepas con mutaciones en los genes que codifican la adenilato ciclasa (*cya*) y la proteína receptora del adenosín monofosfato cíclico (*crp*) (Redweik et al., 2020). La atenuación de las vacunas vivas es esencial para limitar la replicación intestinal y la persistencia en los animales y el medio ambiente, idealmente sin influir en la inmunogenicidad, pero es poco probable que dicha atenuación no tenga ningún impacto en la respuesta vacunal (Redweik et al., 2020). La atenuación de las vacunas vivas es esencial para limitar la replicación intestinal y la persistencia en los animales y el medio ambiente, idealmente sin influir en la inmunogenicidad, pero es poco probable que dicha atenuación no tenga ningún impacto en la respuesta vacunal (Redweik et al., 2020). Las directrices para la producción de vacunas veterinarias se presentan en el Capítulo 1.1.8. *Principios de producción de vacunas veterinarias*. Las directrices que se indican aquí y en el Capítulo 1.1.8 son de carácter general y pueden suplementarse con requisitos nacionales y regionales. La mayoría de vacunas se producen mediante procesos comerciales altamente industrializados y están reguladas por autoridades nacionales responsables de la aprobación para el registro de medicamentos de uso veterinario. Ciertos laboratorios y fabricantes de vacunas producen cantidades menores de vacunas para un rebaño o vacunas autógenas de emergencia, pero cada producción debe también autorizarse específicamente.

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

2.1. Características del inóculo

2.1.1. Características biológicas

Para vacunas vivas o muertas, la cepa bacteriana debe estar tan estrechamente relacionada como sea posible con las cepas de campo que circulen en el momento de la fabricación. Debe escogerse cuidadosamente de casos de enfermedad clínica grave, y debe determinarse su virulencia y la producción de antígeno. Es mejor evaluar varias posibles cepas de este modo antes de analizar la selección final. Las cepas vacunales finales deben identificarse por documentación histórica y caracterizarse por marcadores fenotípicos y/o genéticos estables. Las cepas de vacunas vivas deberán poseer caracteres estables que permitan su distinción de las cepas naturales. Se pueden usar marcadores de resistencia a antimicrobianos, como la rifampicina, o el auxotropismo. La atenuación de la virulencia debe ser estable y lograrse preferiblemente por dos mutaciones independientes definidas. La estabilidad de las cepas vacunales vivas puede verificarse mediante comprobaciones periódicas utilizando técnicas de determinación molecular sensible de las huellas de ADN, preferiblemente la secuenciación del genoma completo.

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 empleando la tinción de Gram
- b) Homogeneidad del cultivo en medios no selectivos
- c) Requerimientos metabólicos indicados por pruebas bioquímicas
- d) Detección de marcadores moleculares, serotipo y fagotipo, si es aplicable
- e) Aglutinación con antisuero específico
- f) El cultivo de la vacuna y todo posible adyuvante, conservantes u otros materiales deben ser microbiológicamente estériles y no tóxicos a las concentraciones utilizadas.

ii) Inocuidad

Se puede determinar en ratones la DL_{50} (dosis letal 50%) o la DI_{50} (dosis infectiva 50%), o preferiblemente comprobar si las especies de destino presentan signos de las reacciones adversas más leves. A la especie a vacunar se le debe administrar diez veces la dosis de campo de vacuna viva a la edad y por la vía recomendadas. Se comprueba si los animales presentan reacciones adversas. En el caso de las vacunas vivas debe demostrarse su estabilidad y la ausencia de reversión a la virulencia después de pases seriados en especies susceptibles. También es necesario considerar vacunaciones repetidas. Debe demostrarse que las vacunas vivas no persistan mucho tiempo en los animales vacunados y en el medio

ambiente cuando estén en explotación pecuaria, y que no se transmitan a la leche ni a los huevos destinados al consumo humano, y el método de aplicación no debe comportar riesgo alguno para los operarios. Las vacunas vivas no se deben utilizar en parvadas de ponedoras comerciales durante el periodo de puesta a no ser que los huevos se procesen con tratamiento térmico.

iii) Eficacia

Para demostrar que la vacuna es eficaz deben utilizarse experimentos de laboratorio y ensayos de campo. Los experimentos de laboratorio consisten en pruebas de vacunación e inoculaciones de desafío en la especie a vacunar, a las dosis y edad recomendadas. Los datos sobre eficacia también pueden utilizarse como base para la prueba de potencia de los lotes. Los ensayos de campo para comprobar la eficacia son más difíciles de realizar, debido a las dificultades para estandarizar las condiciones del desafío y disponer de los controles apropiados.

iv) Aspectos medioambientales

Debe comprobarse la capacidad de las vacunas vivas de persistir en el ambiente e infectar otras especies no de destino, como roedores o aves salvajes que puedan resultar expuestas. La supervivencia prolongada de algunas vacunas vivas en las heces y en las camas puede suponer un riesgo ambiental inaceptable cuando el material se extrae de los habitáculos de los animales.

2.2. Método de fabricación

2.2.1. Procedimiento

El cultivo del inóculo se propaga y mantiene utilizando los medios adecuados para el crecimiento de *Salmonella*. Los medios utilizados no deben contener suero ni tejidos de animales (a no ser que la reglamentación nacional lo permita). El cultivo puede llevarse a cabo en medio sólido, en frascos Roux, o bien en medio líquido, en cuyo caso puede utilizarse equipo de fermentación a gran escala. La limitación de hierro o la baja temperatura de incubación en medios mínimos pueden potenciar la producción de antígeno de LPS por parte de la cepa vacunal.

Las vacunas deben producirse en habitaciones limpias y adecuadas a las que solo tenga acceso personal autorizado. Se debe tener cuidado de evitar la contaminación cruzada entre zonas donde se procesan microorganismos vivos y otras zonas. Debe evitarse la contaminación procedente de operarios y/o del medio, y la preparación de las vacunas debe tener lugar en una zona separada de la de trabajo con cultivos para diagnóstico. Los operarios no deben manejar la vacuna mientras estén enfermos y no deben estar pasando por enfermedades ni tratamientos inmunosupresores. En las zonas de producción y en las salas para animales se debe proporcionar ropa protectora al personal.

A partir del lote del inóculo primario se preparan cultivos del lote de siembra, y el número de pases depende de la validación del proceso. La vacuna se puede preparar por inoculación de un medio adecuado, como caldo nutritivo, con un cultivo reciente y mediante incubación en un agitador a 37°C durante 24 horas, con o sin aireación. Los microorganismos se recogen por sedimentación o centrifugación. Como alternativa, los microorganismos se pueden cultivar y recoger tanto de medios sólidos, como de agar nutritivo. En el caso de las vacunas vivas, la suspensión se diluye en PBS, pH 7,0, y se puede liofilizar.

El tiempo de inactivación para una vacuna muerta debe ser al menos un 33% superior al necesario para reducir el número de microorganismos viables a un nivel indetectable. El proceso de inactivación se debe aplicar a todo el volumen de células recogidas como vacuna y se debe confirmar mediante un método de cultivo sensible.

Los conservantes, excipientes para la liofilización, estabilizadores para recipientes multidosis y otras sustancias añadidas o en combinación con una preparación vacunal no deben tener efecto perjudicial en la potencia inmunizante del producto.

2.2.2. Requisitos para los sustratos y los medios

Todas las sustancias químicas y medios de crecimiento utilizados deben ser adecuados para el fin perseguido y se deben comprobar mediante controles adecuados.

2.2.3. Controles durante el proceso

Los siguientes aspectos precisan atención:

- i) Control visual de la suspensión, homogeneidad por la tinción de Gram, cultivo en medio no selectivo
- ii) Aglutinación en porta con antisueros específicos
- iii) Titulación de bacterias por turbidimetría y/o recuento en placa
- iv) Prueba de inactivación eficaz (vacunas muertas) sembrando en medio no selectivo o utilizando un medio que proporcione óptima probabilidad de crecimiento, como por ejemplo, medio de producción con la neutralización del compuesto inactivante.
- v) Titulación de bacterias viables (vacunas vivas) antes y después de la liofilización

2.2.4. Pruebas en los lotes de producto final

- i) Esterilidad/pureza

Las pruebas de esterilidad y ausencia de contaminación en los materiales biológicos de uso veterinario se hallan en el Capítulo 1.1.9 de este *Manual Terrestre*.

- ii) Inocuidad

Se puede utilizar una prueba de laboratorio, que previamente se haya visto que se correlaciona con la seguridad en la especie de destino. Cada lote se debe probar en la especie de destino, a la edad y por la vía recomendadas, utilizando al menos dos veces la dosis de campo para vacunas muertas y diez veces la dosis para vacunas vivas. Se realizan observaciones sobre cualquier efecto adverso en el comportamiento y salud de los animales vacunados, y se realiza una evaluación de las reacciones tisulares en el punto de inyección.

- iii) Potencia del lote

La potencia se determina mediante pruebas de vacunación-desafío en ratones y/u otras especies, incluida (si es posible) la especie de destino y la respuesta inmunológica en la especie de destino. Muchas vacunas contra *Salmonella* están destinadas a aves de corral, de modo que estas deben utilizarse en las pruebas de potencia y de inocuidad.

2.3. Requisitos para la aprobación para el registro

2.3.1. Requisitos de inocuidad

En ocasiones, ciertas vacunas muertas pueden causar abortos en hembras gestantes por su contenido en LPS; en cuanto a las vacunas vivas, también deben utilizarse con cautela en animales gestantes. No obstante, a menudo es necesario vacunar animales gestantes para proporcionar inmunidad materna a la descendencia. Puede ser útil incluir pruebas de endotoxinas en el programa de pruebas de inocuidad para que los niveles puedan compararse con los considerados inocuos en las pruebas de dosis doble. Las vacunas también pueden causar hinchazón en el punto de inyección, sobre todo si se utiliza un adyuvante en emulsión oleosa.

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

Las vacunas muertas se evalúan en una prueba de dosis doble, y las vivas en una prueba en la que se utiliza diez veces la dosis, teóricamente en la especie de destino. Debe comprobarse que las vacunas vivas sean inocuas en las especies no de destino relevantes que puedan resultar expuestas a la vacuna excretada por animales vacunados.

ii) Reversión a la virulencia en las vacunas atenuadas/vivas

Debe comprobarse que las vacunas vivas no reviertan a la virulencia en pruebas de replicación en las especies de destino, durante un número de replications lo suficientemente alto. Debe comprobarse que las mutaciones, sobre todo las no definidas, sean estables, y pueden realizarse pruebas de estabilidad mediante métodos moleculares de análisis de la huella de ADN o de secuenciación. Aunque el riesgo es bajo, es mejor no utilizar vacunas vivas en los países en que el microorganismo de la vacuna haya sido erradicado.

iii) Consideraciones medioambientales

Las vacunas vivas no deben ser capaces de replicarse en el medio ni persistir más allá de un corto periodo de tiempo.

2.3.2. Requisitos de eficacia

i) Para la producción animal

Es probable que la duración de la inmunidad varíe considerablemente en función del producto, de las pautas de vacunación y del animal vacunado. La inmunidad frente a *Salmonella* suele ser específica de serovariedad o de serogrupo. Las consultas entre colegas sugieren que la mayoría de vacunas muertas conferirán cierta protección durante 6 meses, mientras que algunas vacunas vivas administradas mediante inyección pueden desencadenar una inmunidad más fuerte, que puede persistir durante 1 año o más. Sin embargo, hay que recordar que un desafío fuerte, como el asociado a explotaciones continuamente ocupadas o infestadas por roedores puede superar la capacidad de la inmunidad vacunal, y es posible que las vacunas vivas comerciales se atenúen hasta tal punto para reducir la supervivencia ambiental que resulte también reducida la respuesta inmunitaria. También puede haber problemas para garantizar la eficacia de la administración oral de vacunas vivas o la exactitud de la inyección de vacunas inyectables muertas o vivas. Las vacunas contra *Salmonella* tienen por objetivo reducir la gravedad de la enfermedad clínica en el caso de los rumiantes y de los cerdos, y de *S. Gallinarum* en las aves de corral. Si es posible, en la especie de destino la prueba de potencia debe relacionarse con la eficacia de la vacuna, y deben aplicarse criterios adecuados de aprobación de los lotes. Tal vez se puedan evaluar vacunas muertas mediante la respuesta de anticuerpos contra O-H, aunque es necesario recordar que los anticuerpos séricos son solo una parte del mecanismo de protección del hospedador contra *Salmonella*. Como alternativa, puede evaluarse la potencia de la vacuna mediante su efecto en animales vacunados y expuestos al microorganismo, por comparación cuantitativa y estadística con controles no vacunados.

ii) Para el control y la erradicación

Las vacunas contra *Salmonella* no sirven para erradicar la infección de explotaciones ni parvadas, pero permiten aumentar el umbral de infección, reducir el nivel de excreción del microorganismo y reducir la transmisión vertical en aves de corral que da lugar a la contaminación de huevos de nacedora o de mesa. Por tanto, la vacunación constituye una ayuda a otras medidas de erradicación y control, como el desvieje, la producción mediante el sistema “todo dentro-todo fuera”, la bioseguridad y la higiene de la explotación.

iii) Estabilidad

Se carece de información sobre la estabilidad de las vacunas muertas. La estabilidad resulta afectada por las condiciones de conservación y por la presencia de microorganismos contaminantes que crecen en el producto. En las vacunas muertas contra bacterias a menudo se incluyen sustancias químicas con actividad antimicrobiana, como el tiomersal, el fenol o el cristal violeta, a modo de conservantes. La estabilidad se evalúa mediante pruebas de potencia que se repiten a intervalos de tiempo adecuados. La estabilidad de las vacunas vivas se puede evaluar llevando a cabo recuentos del número de microorganismos viables, que se repetirán a intervalos de tiempo adecuados, así como pruebas de genotipificación para identificar alteraciones genéticas durante la fermentación. Se recomienda que las vacunas vivas que contengan serovariedades de *Salmonella* que no

sean endémicas en una región determinada no se utilicen para controlar otras serovariedades.

BIBLIOGRAFÍA

ANTONELLI P., BELLUCO S., MANCIN M., LOSASSO C. & RICCI A. (2019). Genes conferring resistance to critically important antimicrobials in *Salmonella enterica* isolated from animals and food: a systematic review of the literature, 2013–2017. *Res. Vet. Sci.*, **126**, 59–67.

BARROW P.A. & METHNER U., EDS (2013). *Salmonella in Domestic Animals, Second Edition*. CAB International, Wallingford, Oxon, UK. ISBN: 9781845939021; doi:10.1079/9781845939021.0000

CENTERS FOR DISEASE CONTROL AND PREVENTION (CDC) (2021). *Salmonella*. Available at: <https://www.cdc.gov/salmonella/index.html> (accessed on 6 January 2021).

CETIN E., TEMELLI S. & EYIGOR A. (2019). *Salmonella* prevalence and serovar distribution in healthy slaughter sheep and cattle determined by ISO 6579 and VIDAS UP *Salmonella* methods. *J. Food Sci. Technol.*, **56**, 5317–5325.

DIECKMANN R. & MALORNY B. (2011). Rapid screening of epidemiologically important *Salmonella enterica* subsp. *enterica* serovars by whole-cell matrix-assisted laser desorption ionization-time of flight mass spectrometry. *Appl. Environ. Microbiol.*, **77**, 4136–4146.

DIEP B., BARRETTO C., PORTMANN A.-C., FOURNIER C., KARCMAREK A., VOETS G., LI S., DENG X. & KLIJN A. (2019). *Salmonella* serotyping; comparison of the traditional method to a microarray-based method and an in silico platform using whole genome sequencing data. *Front. Microbiol.*, **10**, 2554.

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, USA.

FELD N.C., EKEROTH L., GRADEL K.O., KABELL S. & MADSEN M. (2000). Evaluation of a serological *Salmonella* Mix-ELISA for poultry used in a national surveillance programme. *Epidemiology & Infection*, **125**, 263–268.

FORD L., HAYWOOD P., KIRK M.D., LANCSAR E., WILLIAMSON D.A. & GLASS K. (2019). Cost of *Salmonella* Infections in Australia, 2015. *J. Food Protection*, **82**, 1607–1614.

GERHARDT P. (1981). *Manual of Methods for General Microbiology*. American Society for Microbiology, Washington DC, USA, 332–334.

GRIMONT P.A.D. & WEILL F.-X. (2007). *Antigenic Formulae of the Salmonella Serovars, Ninth Edition*, World Health Organization Collaborating Centre for Reference and Research on *Salmonella*. Institut Pasteur, Paris, France.

HEYMANS R., VILA A., VAN HEERWAARDEN C.A., JANSEN C.C., CASTELIJN G.A., VAN DER VOORT M. & BIESTA-PETERS E.G. (2018). Rapid detection and differentiation of *Salmonella* species, *Salmonella* Typhimurium and *Salmonella* Enteritidis by multiplex quantitative PCR. *PLoS one*, **13**(10), p.e0206316.

INTERNATIONAL ORGANIZATION FOR STANDARDIZATION (2012). ISO/TS 6579-2:2012. Microbiology of food and animal feed – Horizontal method for the detection, enumeration and serotyping of *Salmonella* – Part 2: Enumeration by a miniaturized most probable number technique, International Organization for Standardization, Geneva, Switzerland.

INTERNATIONAL ORGANIZATION FOR STANDARDIZATION (2014). ISO/TR 6579-3:2014. Microbiology of the food chain -- Horizontal method for the detection, enumeration and serotyping of *Salmonella* – Part 3: Guidelines for serotyping of *Salmonella* spp., International Organization for Standardization, Geneva, Switzerland.

INTERNATIONAL ORGANIZATION FOR STANDARDIZATION (2017). ISO 6579-1:2017. Microbiology of food and animal feed – Horizontal method for the detection, enumeration and serotyping of *Salmonella* – Part 1: Detection of *Salmonella* spp. International Organization for Standardization, Geneva, Switzerland. Amended 2020.

JAJERE S.M. (2019). A review of *Salmonella enterica* with particular focus on the pathogenicity and virulence factors, host specificity and antimicrobial resistance including multidrug resistance. *Vet. World*, **12**, 504.

JENSEN M.B.F., SCHJØRRING S., BJÖRKMAN J.T., TORPDAHL M., LITRUP E., NIELSEN E.M. & NISKANEN, T. (2017). External quality assessment for molecular typing of *Salmonella* 2013–2015: performance of the European national public health reference laboratories. *Euro. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis.*, **36**, 1923–1932.

KANKI M., SAKATA J., TAGUCHI M., KUMEDA Y., ISHIBASHI M., KAWAI T., KAWATSU K., YAMASAKI W., INOUE K. & MIYAHARA M. (2009). Effect of sample preparation and bacterial concentration on *Salmonella enterica* detection in poultry meat using culture methods and PCR assaying of pre-enrichment broths. *Food Microbiol.*, **26**, 1–3.

MALORNY B. & HOORFAR J. (2005). Toward standardization of diagnostic PCR testing of fecal samples: lessons from the detection of salmonellae in pigs. *J. Clin. Microbiol.*, **43**, 3033–3037.

MASTROENI P., CHABALGOITY J.A., DUNSTAN S.J., MASKELL D.J. & DOUGAN G. (2001). *Salmonella*: Immune responses and vaccines. *Vet. J.*, **161**, 132–164.

MAURISCHAT S., BAUMANN B., MARTIN A. & MALORNY B. (2015a). Rapid detection and specific differentiation of *Salmonella enterica* subsp. *enterica* Enteritidis, Typhimurium and its monophasic variant 4,[5],12:i:- by real-time multiplex PCR. *Int. J. Food Microbiol.*, **193**, 8–14.

MAURISCHAT S., SZABO I., BAUMANN B. & MALORNY B. (2015b). Rapid real-time PCR methods to distinguish *Salmonella* Enteritidis wildtype field isolates from vaccine strains Salmovac SE/Gallivac SE and AviPro *Salmonella* Vac E. *J. Microbiol. Methods*, **112**, 92–98.

MUNCK N., NJAGE P.M.K., LEEKITCHAROENPHON P., LITRUP E. & HALD T. (2020). Application of Whole-Genome Sequences and Machine Learning in Source Attribution of *Salmonella* Typhimurium. *Risk Analysis*, **40**, 1693–1705.

OLIVEIRA S.D., RODENBUSCH M.C. CE, ROCHA S.L.S. & CANAL C.W. (2003). Evaluation of selective and non-selective enrichment PCR procedures for *Salmonella* detection. *Lett. Appl. Microbiol.*, **36**, 217–221.

REDWEIK G.A., JOCHUM J. & MELLATA M. (2020). Live Bacterial Prophylactics in Modern Poultry. *Front. Vet. Sci.*, **7**, 826.

TANG Y., DAVIES R. & PETROVSKA-HOLMES L. (2019). Identification of Genetic Features for Attenuation of Two *Salmonella* Enteritidis Vaccine Strains and Differentiation of These From Wildtype Isolates Using Whole Genome Sequencing. *Front. Vet. Sci.*, **6**, 447.

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.

VAN DER HEIJDEN H.M.J.F. (2001). First international ring trial of ELISAs for *Salmonella*-antibody detection in swine. *Berl. Munch. Tierarztl.*, **114**, 389–392. PMID: 11570186.

WANG J., LI Y., CHEN J., HUA D., DENG H., LI Y., LIANG Z. & HUANG J. (2018). Rapid detection of food-borne *Salmonella* contamination using IMBs-qPCR method based on *pagC* gene. *Braz. J. Microbiol.*, **49**, 320–328.

WESTPHAL O. & LUDERITZ O. (1954). Chemische Erforschung von Lipopolysacchariden gramnegativer Bakterien. *Angew. Chem.*, **66**, 407–417.

YANG Q., DOMESLE K.J. & GE B. (2018). Loop-mediated isothermal amplification for *Salmonella* detection in food and feed: current applications and future directions. *Foodborne Pathog. Dis.*, **15**, 309–331.

ZHANG J., KHAN S. & CHOUSALKAR K.K. (2020). Development of PMAxxTM-Based qPCR for the Quantification of Viable and Non-viable Load of *Salmonella* from Poultry Environment. *Front. Microbiol.*, **11**. doi:10.3389/fmicb.2020.581201.

*
* *

NB: Existen Laboratorios de Referencia de la OIE para la salmonelosis
(puede consultarse la página web de la OIE:

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

Por favor, contacte con los Laboratorios de Referencia de la OIE para más información sobre las pruebas de diagnóstico, los reactivos y las vacunas para la salmonelosis

NB: ADOPTADO POR PRIMERA VEZ EN 1991 COMO SALMONELLOSIS (*S. ABORTUS OVIS* Y *S. EQUI*) Y SALMONELLOSIS (*S. TYPHIMURIUM* Y *S. ENTERITIDIS*). ÚLTIMAS ACTUALIZACIONES ADOPTADAS EN 2022.