

## CAPÍTULO 3.9.8.

# SALMONELOSIS\*<sup>1</sup>

---

### RESUMEN

*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 y los quesos. 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 son los animales jóvenes, gestantes, o 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 animales pueden ser importantes en cuanto 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 especies de Salmonella específicas de hospedador, se presentan en el capítulo 3.3.11. de este Manual Terrestre.*

**Identificación del agente:** *El diagnóstico se basa en el aislamiento del microorganismo a partir de tejidos obtenidos asépticamente en necropsias o de las heces, de hisopos rectales o 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 necesario cultivar el contenido del estómago fetal, hisopos placentarios y vaginales y, en el caso de las aves de corral, huevos embrionados.*

*Salmonella puede aislarse mediante varias técnicas, una de las cuales es un pre-enriquecimiento para recuperar salmonelas con daños subletales, medios de enriquecimiento que contengan sustancias inhibitorias 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 precisen enviar las cepas a un laboratorio de referencia. Cada vez se utilizan más métodos de*

---

<sup>1</sup> 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.

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, contienen 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 septicemia, enteritis aguda o enteritis crónica. 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.

### 1. El 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; en la actualidad se reconocen más de 2 600 serovariedades (Issenhuth-Jeanjean *et al.*, 2014). 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* y las 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 a una lisogenación por bacteriófago(s) o cuando se producen flagelos diferentes como consecuencia de una variación en la fase.

### 2. Descripción 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 (Barrow y Methner, 2013), 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 *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 las infecciones causadas por *S. Pullorum* y *S. Gallinarum* (Barrow y Neto, 2011), 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 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 como anorexia, adipsia, 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 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 enfermedad clínica, anorexia, fiebre alta, letargo y cianosis en las extremidades.

Muchos animales, sobre todo las aves de corral y los cerdos, pueden resultar infectados pero no presentar enfermedad clínica (Barrow y Methner, 2013). Estos animales pueden ser importantes en cuanto a la transmisión de la infección entre 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 (Barrow y Methner, 2013).

### 3. Riesgo zoonótico y requisitos de bioseguridad

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 1,2 millones de personas por salmonelosis, y que esta enfermedad ocasiona más de 23 000 hospitalizaciones y 450 muertes (CDD, 2013). La causa más habitual de infección por *Salmonella* es la ingesta de alimentos contaminados crudos o cocidos de forma insuficiente que contengan huevo, ovoproductos, carne, ave de corral, 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. Choleraesuis* 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. Para prevenir la aparición de infecciones de laboratorio, las medidas de bioseguridad y bioprotección en los laboratorios veterinarios de diagnóstico y en las instalaciones de los animales deben ceñirse a lo que se establece en 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 aviares, 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. Choleraesuis* puede confundirse con la peste porcina clásica. La salmonelosis septicémica de los terneros 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 puede derivar no solo de *S. abortusovis* sino también de *Coxiella burnetii*, *Chlamydophila abortus*, *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
<b>Identificación del agente<sup>2</sup></b>						
<b>Aislamiento de <i>Salmonella</i></b>	+++	+++	+++	+++	+++	n/a
<b>Métodos rápidos alternativos, como la PCR</b>	+	+	+	+	+	n/a
<b>Detección de respuesta inmunitaria</b>						
<b>SAT</b>	++	–	++	–	+	++
<b>ELISA</b>	++	–	+++	+	++	++

Clave: +++ = método recomendado; ++ = método idóneo; + = puede utilizarse en algunas situaciones, pero el coste, la fiabilidad y otros factores limitan mucho su aplicación; – = no adecuado para este propósito; n/a = no aplicable. Aunque no todas las pruebas clasificadas como +++ o ++ han sido validadas formalmente, su uso sistemático y hecho de que se hayan utilizado ampliamente sin resultados dudosos las hace aceptables, aunque en algunas situaciones puede ser necesario repetir las pruebas.

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

### 1. Identificación 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 importación y a la exportación, 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 (Carrique-Mas y Davies, 2008), pueden ser el modo rentable de identificar explotaciones infectadas. En el caso de especies animales más pequeñas, es preferible enviar al laboratorio un número representativo de animales enfermos o recién muertos (OMS, 1994). 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 y la repetición de los muestreos. Dado que en las muestras fecales suele producirse una agrupación de las

2 Se recomienda utilizar una combinación de métodos de identificación del agente con la misma muestra clínica.

bacterias en determinadas partes, mezclar a fondo la muestra antes de cultivarla también puede aumentar la sensibilidad de este sistema (Cannon y Nicholls, 2002). Para identificar parvadas o rebaños infectados, más que para identificar animales específicos, también pueden emplearse métodos bacteriológicos o serológicos.

### 1.1. Cultivo

Existen muchos métodos para aislar y detectar *Salmonella* que se utilizan a nivel internacional (Fricker, 1987; Harvey y Price, 1974; Lee *et al.*, 2015; Park *et al.*, 2014; Reissbrodt, 1995). 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 del microorganismo sospechoso a partir de un inóculo pequeño en presencia de una matriz de muestra significativa. 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 6579:2002; aunque este método no ha sido validado para muestras fecales ni ambientales y estaba prevista para alimento y piensos (ISO, 2002). En los últimos años se ha publicado un método estándar para la detección de *Salmonella* a partir de la industria de producción animal, y ahora se ha adoptado el método ISO (ISO, 2007). Lo esencial del método estándar es el pre-enriquecimiento en agua de peptona tamponada, el enriquecimiento en Rappaport–Vassiliadis semi-sólido modificado (MSRV), el aislamiento en agar xilosa-lisina-dexosicolato (XLD) y otro medio selectivo de cultivo en placa. También se ha observado que este método es muy eficaz para el pienso, para muestras ambientales del entorno de los animales y para productos cárnicos, y es más sencillo y barato que el método ISO completo. 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 los animales asintomáticos suele ser bajo, así como en muestras ambientales, en los piensos y en los alimentos humanos, por lo que es necesario utilizar medios de pre-enriquecimiento para facilitar el aislamiento, tales como el agua de peptona tamponada. Esto puede permitir que incluso cantidades muy bajas de salmonelas terminen multiplicándose y no muriendo por los efectos tóxicos de los medios de enriquecimiento, y puede ayudar a la recuperación de las que presentan daños subletales, como los debidos a la congelación, el calentamiento, la desecación o la exposición a ácidos biocidas u orgánicos (Harvey y Price, 1974). En los casos de excreción intermitente, resulta 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, el caldo Rappaport-Vassiliadis y el agar Rappaport-Vassiliadis semisólido modificado (MRSV). No obstante, algunos aditivos también son relativamente tóxicos para ciertas serovarietades 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 ahora se recomienda aplicar 41,5°C para la incubación de medios basados en caldo de Rappaport–Vassiliadis. Los medios de enriquecimiento selectivo por movilidad, como el MSRV o medio semisólido para el diagnóstico de *Salmonella* (DIASALM), se utilizan con frecuencia para aumentar la sensibilidad del proceso de aislamiento de *Salmonella* (Voogt *et al.*, 2001). Se recomienda utilizar al menos dos caldos de enriquecimiento, 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. 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 (Reissbrodt, 1995), 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 (H<sub>2</sub>S). 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 H<sub>2</sub>S puede ser variable. Se pueden detectar de modo más eficaz tales cepas atípicas cuando se utilizan medios de motilidad semi-sólidos. Algunos ejemplos son el MSR/V semisólido modificado y el DIASALM. La selectividad de estos medios se basa en la motilidad del microorganismo, en la presencia de verde de malaquita y de novobiocina, y de una alta concentración de cloruro de magnesio. El medio semisólido permite detectar motilidad en forma de halos de crecimiento a partir del punto de inoculación. El medio DIASALM es especialmente útil para la detección de cepas atípicas, ya que se puede realizar una confirmación provisional por aglutinación in porta utilizando antisueros polivalentes anti-O, anti-H o específicos, con líquido de la zona de crecimiento de la placa. Asimismo, 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. 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. Actualmente se dispone de una gran variedad de medios cromogénicos, como el agar Rambach y el SMID (agar para detección e identificación de *Salmonella*). Muchos de estos pueden servir de ayuda para la diferenciación entre colonias sospechosas, 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. No obstante, ciertos medios de agar cromogénicos, como el Brilliance o el Rapid, 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 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 *S. Pullorum/Gallinarum* en el capítulo 3.3.11 Tifosis y pullorosis aviar).
- ii) Se incuba el agua de peptona tamponada durante 16–20 horas a 37°C.
- iii) Se inoculan 20 ml de MSR/V o DIASALM en una placa de Petri con 0,1 ml de agua de peptona tamponada incubada.
- iv) Se inoculan 10 ml de caldo de tetrionato de Müller–Kauffmann con 1ml del agua de peptona tamponada incubada.
- v) Se incuba el MSR/V o DIASALM a 41,5°C y el caldo de tetrionato a 37°C (se ha de estar seguro de que se utiliza una marca fiable de tetrionato para uso a 37°C).
- vi) Después de 24 y 48 horas de enriquecimiento selectivo, se resiembran del MSR/V o DIASALM 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 (como el agar Rambach) 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 (como el agar Rambach) o agar verde brillante más novobiocina y en agar xilosa-lisina-desoxicolato.

- viii) Se incuban las placas a 37°C durante 24 horas.
- ix) Se examinan cinco colonias sospechosas (rojas/rosas con enrojecimiento de los medios en el caso del agar verde brillante, carmesí con bordes pálidos o naranja/incolores en agar Rambach, rojas con centro negro (u ocasionalmente rojo translúcido en el caso de cepas negativas a H<sub>2</sub>S) en agar xilosa-lisina-desoxicolato) por medios bioquímicos empleando medios compuestos como TSI, LDC y urea, o bien pruebas bioquímicas comerciales. Se confirma hasta nivel de serogrupo utilizando antisuero poli "O" y poli "H" (fase 1 y fase 2) o medios bioquímicos compuestos. La mera determinación del serogrupo no es suficiente debido a las reacciones cruzadas con sueros polivalentes, como la que ocasiona *Citrobacter* spp. La confirmación se puede establecer a partir de un conjunto de pruebas bioquímicas.
- x) Se subcultivan las colonias muy sospechosas que no aglutinen con antisuecos 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. Si los resultados de la aglutinación no son claros, hay que realizar más pruebas bioquímicas utilizando medios compuestos, como el TSI, o emplear ONPG (o-nitrofenil-beta-d-galactopiranosido) y urea o kits de pruebas bioquímicas comerciales.

Este método difiere del método de la ISO 6579:2002 y su Anexo D, puesto que permite la inoculación del medio DIASALM en lugar del medio MSR/V para el enriquecimiento selectivo y emplea el agar Rambach cromogénico como primer agar de siembra en placa. No obstante, proporciona la posibilidad de una detección adicional combinando elementos de enriquecimiento tanto de caldo como de agar semi-sólido (Carrique-Mas *et al.*, 2009).

## 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 (ISO, 2012) que se basa en Fravallo *et al.*, (2003). Asimismo, también se han creado otras reacciones en cadena de la polimerasa (PCR) en tiempo real cuantitativas.

## 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-suecos polivalentes para la tipificación de *Salmonella* (Ellis *et al.*, 1976). En algunos casos, la colonia sospechosa puede no aglutinar o 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]) (Ewing, 1986). Es especialmente importante garantizar que los cultivos de *Salmonella* para la determinación de resistencia a antimicrobianos no se mezclen con otros microorganismos, como *Pseudomonas*, que es más probable que sean multirresistentes. El método MALDI-TOF también resulta aceptable para la identificación de *Salmonella*.

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 antisuecos 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 antisuecos dirigidos contra varios factores, lo cual se puede continuar con el uso de sueros monovalentes de tipificación. En las referencias ISO (2014) y Grimont y Weill (2007) 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, incluida la 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 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 y las fluoroquinolonas (Figueiredo *et al.*, 2015; Greene *et al.*, 2008). Las cepas vacunales vivas también se identifican con frecuencia mediante marcadores de resistencia a antimicrobianos y por cambios bioquímicos como el auxotropismo o la rugosidad.

#### 1.4. Métodos inmunológicos y de reconocimiento de ácidos nucleicos

Se usan numerosos métodos alternativos de detección de *Salmonella* y algunos se comercializan. Estos incluyen la separación inmunomagnética (IMS) (Park *et al.*, 2011), PCR con transcripción inversa (RT) en tiempo real (Park *et al.*, 2014), los enzoinmunoanálisis (ELISA) (Barrow, 1992; Wang *et al.*, 2015), la PCR con sondas génicas, la PCR en tiempo real (Malorny *et al.*, 2004), la PCR cuantitativa (Piknova *et al.*, 2005) y el análisis por microchip (Porwollik *et al.*, 2004; Rasooly y Herold, 2008). Estos métodos pueden emplearse para identificar serovariedades de *Salmonella* específicas (Maurischat *et al.*, 2015a) o para distinguir entre cepas vacunales vivas y serovariedades de *Salmonella* que hayan infectado a la parvada o al rebaño (Maurischat *et al.*, 2015b). Algunos consisten en varios métodos, como un enriquecimiento en dos pasos y una PCR en tiempo real (Krascseniscová *et al.*, 2008). Muchos de estos métodos no han sido totalmente validados para muestras fecales y ambientales, aunque se han producido avances Eriksson y Aspan, 2007; Malorny y Hoorfar, 2005). Estos métodos resultan más adecuados para el análisis de alimentos humanos, en los cuales los inhibidores de las reacciones de la PCR no son tan problemáticos como en las heces (Kanki *et al.*, 2009), aunque los métodos rápidos tienen cierta cabida en el análisis y liberación de lotes de 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. Como hasta ahora no se ha demostrado que ninguno de los métodos rápidos sea adecuado para la detección directa de *Salmonella*, 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 basados en el ADN, la inhibición de la reacción de la PCR por elementos de la matriz de la muestra, especialmente en el caso de las heces, resulta problemática y requiere técnicas adecuadas de extracción del ADN y controles para detectar inhibición, lo cual puede reducir la sensibilidad de la prueba en ciertos casos (Jensen *et al.*, 2013). 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 (EFSA, 2013) y 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. Es importante que los kits que se utilicen hayan sido totalmente validados según lo establecido en el Capítulo 1.1.6. Los kits deben escogerse preferiblemente de entre los que figuran en la lista del Registro de la OIE (consúltese <http://www.oie.int/es/nuestra-experiencia-cientifica/registro-de-los-kits-de-diagnostico/registro-de-kits-de-diagnostico/>).

## 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 animales. En aves de corral, para la identificación de parvadas infectadas por *S. Pullorum/Gallinarum*, se han utilizado con éxito durante más de 50 años la prueba de sangre total, que utiliza un antígeno teñido, y la prueba de aglutinación sérica (SAT) (consúltese el Capítulo 3.3.11). Como *S. Enteritidis* posee el mismo antígeno somático del grupo D que *S. Pullorum/Gallinarum* y se considera que se origina en él (Thomson *et al.*, 2008), la prueba de sangre total y otras relacionadas pueden utilizarse en el diagnóstico de la infección por *S. Enteritidis*, pero la sensibilidad es baja. En los últimos años se han desarrollado otras pruebas, como las de tipo ELISA (Barrow, 1994), para el diagnóstico de las infecciones por *S. Enteritidis* y *S. Typhimurium* en aves de corral y para otras serovariedades de animales de producción. Los ELISA se han utilizado con eficacia para identificar serológicamente ganado bovino portador de *S. Dublin* y se pueden aplicar a la leche sin envasar para detectar la enfermedad en ganado lechero estabulado. En Dinamarca, Alemania, Holanda, el Reino Unido y algunos otros países se utiliza un ELISA que incluye antígenos somáticos de una mezcla de serovariedades (“ELISA mixto”) para muestras de suero o líquido tisular liberado por congelación y descongelación de muestras de músculo para detectar infecciones por *Salmonella* en cerdos (Nielsen *et al.*, 1998). Se puede utilizar una prueba similar para detectar anticuerpos contra *S. Enteritidis* y *S. Typhimurium* en la yema de huevo de parvadas de ponedoras comerciales no vacunadas.



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 Dinamarca<sup>3</sup> y en los Países Bajos<sup>4</sup>.

## 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 desvieje 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 salmonellosis 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. Otros animales de la granja pueden estar todavía infectados. Los animales serológicamente negativos pueden ser el resultado de una infección reciente que origine la excreción antes de que la producción de inmunoglobulinas sea máxima, 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 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* de sus progenitores a través 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 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 *S. Enteritidis* en pollos pueden producir una respuesta de anticuerpos muy prolongada. Se han producido vacunas vivas marcadoras que pueden distinguirse de las cepas de desafío de campo debido a sus resistencias antimicrobianas a la rifampicina y mediante PCR en tiempo real (Maurischat *et al.*, 2015b).
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 salmonellosis más útil que el cultivo.
6. Existen aproximadamente 2 600 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. Pullorum* y *S. Enteritidis*. En algunos casos pueden producirse reacciones cruzadas como resultado de la exposición a microorganismos distintos de *Salmonella*.

---

3 Statens Serum Institut, Copenhagen, Dinamarca ([www.ssi.dk](http://www.ssi.dk))

4 GD, Deventer, Holanda ([www.gddeventer.com](http://www.gddeventer.com))

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 tienen 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 barata; 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 ( $\pm 2^\circ\text{C}$ ).
- 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 37°C ( $\pm 2^\circ\text{C}$ ).
- 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  $10^8$  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 resiembra *Salmonella*, desde el cultivo original apropiado, en una placa con medio BAB, u otro medio adecuado. Se incuba durante toda la noche a 37°C ( $\pm 2^\circ\text{C}$ ).
- 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 37°C ( $\pm 2^\circ\text{C}$ ). (Si la fase es incorrecta, se vuelve a pasar por el agar semisólido).
- iv) Se pipetea en la suspensión de antígeno 250  $\mu\text{l}$  de formaldehído al 40% (se deben usar guantes y se debe trabajar preferiblemente en una cabina de seguridad), 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, 1994).

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 (Nielsen *et al.*, 1998). Este ELISA contiene los antígenos "O" de tipo 1, 4, 5, 6, 7 y 12 del LPS de *S. Typhimurium* y *S. Cholerasuis*, 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 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.

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 produce 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.

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.

Un ejemplo de un ELISA validado es el desarrollado por el Laboratorio de Referencia de la OIE (consúltese la dirección en la Tabla de la Parte 4 de este *Manual Terrestre*). 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  $-20^{\circ}\text{C}$  en alícuotas de 100  $\mu\text{l}$  en solución salina tamponada con 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  $\mu\text{g}/\text{ml}$ .

#### 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  $4^{\circ}\text{C}$  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  $4^{\circ}\text{C}$  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  $37^{\circ}\text{C}$  antes de distribuirse, y el pH de la solución debe ajustarse a 9,8 con ácido clorhídrico 1 M. Se conserva a  $4^{\circ}\text{C}$  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  $4^{\circ}\text{C}$  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. 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 incluyen mutantes auxotróficos y “de deriva metabólica”, que se usan en Alemania para evitar infecciones por *Salmonella* en animales de granja y en el Reino Unido para *S. Enteritidis* y *S. Typhimurium* en aves de corral. 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*) (Desin *et al.*, 2013; Hassan y Curtiss III, 1997). 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 competentes en materia de medicamentos de uso veterinario. Laboratorios privados 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 la determinación molecular sensible de las huellas de ADN y las técnicas de hibridación en microchips.

### 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, y fagotipo
- 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<sub>50</sub> (dosis letal 50%) o la DI<sub>50</sub> (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 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.

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. En ponedoras no deben usarse vacunas vivas durante la puesta de huevos.

## 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.

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 autorización

### 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 maternal 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 (van Immerseel *et al.*, 2013).

## BIBLIOGRAFÍA

- BARROW P.A. (1992). ELISAs and the serological analysis of salmonella infections 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. & NETO O.F. (2011). Pullorum disease and fowl typhoid – new thoughts on old diseases: a review. *Avian Pathol.*, **40**, 1–13.
- BARROW P.A. & METHNER U., EDS (2013). *Salmonella in domestic animals*. CAB International, Wallingford, Oxon, UK.
- CANNON R.M. & NICHOLLS T.J. (2002). Relationship between sample weight, homogeneity, and sensitivity of fecal culture for *Salmonella enterica*. *Vet. Diagn. Invest.*, **14**, 60–62.
- CARRIQUE-MAS J.J., BARNES S., MCLAREN I. & DAVIES R. (2009). Comparison of three plating media for the isolation of *Salmonella* from poultry environmental samples in Great Britain using ISO 6579:2002 (Annex D). *J. Appl. Microbiol.*, **107**, 1976–1983.
- CARRIQUE-MAS J.J. & DAVIES R.H. (2008). Sampling and bacteriological detection of *Salmonella* in poultry and poultry premises: A review. *Rev. sci. tech. Off. int. Epiz.*, **27**, 665–677.
- CENTERS FOR DISEASE CONTROL AND PREVENTION (CDC) (2013). An Atlas of Salmonella in the United States, 1968–2011: Laboratory-based Enteric Disease Surveillance. Atlanta, Georgia: US Department of Health and Human Services, CDC, Atlanta, Georgia, USA.
- DESIN T.S., KOSTER W. & POTTER A.A. (2013). Salmonella vaccines in poultry: past, present and future. *Exp. Rev. Vaccines*, **12**, 87–96.
- EUROPEAN FOOD SAFETY AUTHORITY (EFSA) (2013). EFSA BIOHAZ Panel (EFSA Panel on Biological Hazards). Scientific Opinion on the evaluation of molecular typing methods for major food-borne microbiological hazards and their use for attribution modelling, outbreak investigation and scanning surveillance: Part 1 (evaluation of methods and applications). *EFSA Journal*, **11** (12), 3502 [84 pp.]. doi:10.2903/j.efsa.2013.350.
- 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.
- ERIKSSON E. & ASPAN A. (2007). Comparison of culture, ELISA and PCR techniques for salmonella detection in faecal samples for cattle, pig and poultry. *BMC Vet. Res.*, **3**, 21–40.
- EWING W.H. (1986). Edwards and Ewing's Identification of Enterobacteriaceae, Fourth Edition. Elsevier, New York, USA, London, UK, and Amsterdam, The Netherlands.

- FIGUEIREDO R., HENRIQUES A., SERENO R., MENDOÇA N. & DA SILVA G.J. (2015). Antimicrobial resistance and extended-spectrum  $\beta$ -lactamases of *Salmonella enterica* serotypes isolated from livestock and processed food in Portugal: an update. *Foodborne Pathog. Dis.*, **12**, 110–117.
- FRAVALO P., HASCOET Y., LEFELLIC M., QUEGUINER S., PETTON J. & SALVAT G. (2003). Convenient method for rapid and quantitative assessment of *Salmonella enterica* contamination: The mini-MSRV MPN technique. *J. Rapid Method Automat. Microbiol.*, **11**, 81–88.
- FRICKER C.R. (1987). The isolation of salmonellas and campylobacters. *J. Appl. Bacteriol.*, **63**, 99–116.
- GERHARDT P. (1981). Manual of Methods for General Microbiology. American Society for Microbiology, Washington DC, USA, 332–334.
- GREENE S.K., STUART A.M., MEDALLA F.M., WHICHARD J.M., HOEKSTRA R.M. & CHILLER T.M. (2008). Distribution of multidrug-resistant human isolates of MDR-ACSSuT *Salmonella* Typhimurium and MDR-AmpC *Salmonella* Newport in the United States, 2003–2005. *Foodborne Pathog. Dis.*, **5**, 669–680.
- 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.
- HARVEY R.W.S. & PRICE T.H. (1974). Isolation of Salmonellas. Public Health Laboratory Service. Monograph Series 8. Her Majesty's Stationery Office, London, UK.
- HASSAN J.O. & CURTISS R. III (1997). Efficacy of a live avirulent *Salmonella typhimurium* vaccine in preventing colonization and invasion of laying hens by *Salmonella typhimurium* and *Salmonella enteritidis*. *Avian Dis.*, **41**, 783–791.
- INTERNATIONAL ORGANIZATION FOR STANDARDIZATION (2002). ISO 6579:2002. Microbiology of food and animal feeding stuffs – Horizontal method for the detection of *Salmonella* spp., International Organization for Standardization, Geneva, Switzerland.
- INTERNATIONAL ORGANIZATION FOR STANDARDIZATION (2007). ISO 6579:2002/Amd 1:2007 (Annex D). Detection of *Salmonella* spp. in animal faeces and in samples of the primary production stage – Horizontal method for the detection of *Salmonella* spp., International Organization for Standardization, Geneva, Switzerland.
- 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.
- ISSENHUTH-JEANJEAN S., ROGGENTIN P., MIKOLEIT M., GUIBOURDENCHE M., DE PINNA E., NAIR S., FIELDS P.I. & WEILL F. X. (2014). Supplement 2008–2010 (no. 48) to the White–Kauffmann–Le Minor scheme. *Res. Microbiol.*, **165**, 526–530.
- JENSEN A.N., NIELSEN L.R. & BAGGESEN D.L. (2013). Use of real-time PCR on fecal samples for detection of sub-clinical *Salmonella* infection in cattle did not improve the detection sensitivity compared to conventional bacteriology. *Vet. Microbiol.*, **163**, 373–377
- 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 preenrichment broths. *Food Microbiol.*, **26** (1), 1–3.
- KRASCENICSOVÁ K., PIKNOVÁ L., KAČLÍKOVÁ E. & KUČHTA T. (2008). Detection of *Salmonella enterica* in food using two-step enrichment and real-time polymerase chain reaction. *Lett. Microbiol.*, **46**, 483–487.
- LEE K.M., RUNYON M., HERRMAN T.J., PHILLIPS R. & HSIEH J. (2015). Review of *Salmonella* detection and identification methods: Aspects of rapid emergency response and food safety. *Food Control*, **47**, 264–276.

- 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.
- MALORNY B., PACCASSONI E., FACH P., BUNGE C., MARTIN A. & HELMUTH R. (2004). Diagnostic real-time PCR for detection of *Salmonella* in food. *Appl. Environ. Microbiol.*, **70**, 7046–7052.
- 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.
- NIELSEN B., EKEROTH L., BAGER F. & LIND P. (1998). Use of muscle fluid as a source of antibodies for serologic detection of *Salmonella* infection in slaughter pig herds. *J. Vet. Diagn Invest.*, **10**, 158–163.
- 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.
- PARK S.H., AYDIN M., KHATIWARA A., DOLAN M.C., GILMORE D.F., BOULDIN J.L., AHN S. & RICKE S.C. (2014). Current and emerging technologies for rapid detection and characterization of *Salmonella* in poultry and poultry products. *Food Microbiol.*, **38**, 250–262.
- PARK S.H., JARQUIN R., HANNING I., ALMEIDA G. & RICKE S.C. (2011). Detection of *Salmonella* spp. survival and virulence in poultry feed by targeting the *hilA* gene. *J. Appl. Microbiol.*, **111**, 426–432.
- PIKNOVA L., KACLIKOVA E., PANGALLO D., POLEK B. & KUCHTA T. (2005). Quantification of *Salmonella* by 5'-nuclease real-time polymerase chain reaction targeted to *fimC* gene. *Curr. Microbiol.*, **50**, 38–42.
- PORWOLLIK S., BOYD E.F., CHOY C., CHENG P., FLOREA L., PROCTOR E. & MCCLELLAND M. (2004). Characterization of *Salmonella enterica* subspecies I genovars by use of microarrays. *J. Bacteriol.*, **186**, 5883–5898.
- RASOOLY A. & HEROLD K.E. (2008). Food microbial pathogen detection and analysis using DNA microarray technologies. *Foodborne Pathog. Dis.*, **5**, 531–550.
- REISSBRODT R. (1995). Conventional and alternative methods for isolation and identification of *Salmonella* – an overview. *Biotest Bull.*, **5**, 143–156.
- 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 IMMERSEEL F., STUDHOLME D.J., EECKHAUT V., HEYNDRIX M., DEWULF J., DEWAELE I., VAN HOOREBEKE S., VAN MEIRHAEGHE H., DUCATELLE R., PASZKEWICZ K. & TITBALL R.W. (2013). *Salmonella Gallinarum* field isolates from laying hens are related to the vaccine strain SG9R. *Vaccine*, **31**, 4940–4945.
- VOOGT N., RAES M., WANNET W.J.B., HENKEN N.M. & VAN DE GIESSEN A.W. (2001). Comparison of selective enrichment media for the detection of *Salmonella* in poultry faeces. *Lett. Appl. Microbiol.*, **32**, 89–92.
- WANG W., LIU L., SONG S., TANG L., KUANG H. & XU C. (2015). A highly sensitive ELISA and immune-chromatographic strip for the detection of *Salmonella typhimurium* in milk samples. *Sensors*, **15**, 5281–5292.

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

WORLD HEALTH ORGANIZATION (WHO) (1994). Guidelines on Detection and Monitoring of *Salmonella* Infected Poultry Flocks with Particular Reference to *Salmonella enteritidis*. Wray C. & Davies R.H., eds. WHO, Geneva, Switzerland, ZOO/94.173.

\*

\* \*

**NB:** Existen Laboratorios de Referencia de la OIE para la Salmonelosis (puede consultarse la lista actualizada en la Tabla de la Parte 4 de este *Manual Terrestre* o en la página web de la OIE: <http://www.oie.int/es/nuestra-experiencia-cientifica/laboratorios-de-referencia/lista-des-laboratorios/>). 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 2016.