



VNIVERSITATĪ VALÈNCIA

Facultat de **F**armàcia

**Departament de Medicina Preventiva i Salut Pública, Ciències de
l'Alimentació, Toxicologia i Medicina Legal**

**CONTROL SANITARIO DEL SECTOR AVÍCOLA
MEDIANTE EL DISEÑO E IMPLEMENTACIÓN DE MAPAS
DE PREVALENCIA Y SEROPREVALENCIA**

TESIS DOCTORAL

**PROGRAMA DE DOCTORADO: 265D CIENCIA DE LOS
ALIMENTOS**

2015

PRESENTADA POR:

Cristina García Bover

DIRIGIDA POR:

Dr. José Miguel Soriano del Castillo

Dr. Pablo Catalá Gregori

Valencia, 2015



José Miguel Soriano del Castillo, Profesor Titular de Universidad, del Departamento de Medicina Preventiva y Salud Pública, Ciencias de la Alimentación, Toxicología y Medicina Legal y Pablo Catalá Gregori, Director del Centro de Calidad Avícola y Alimentación Animal de la Comunidad Valenciana

INFORMAN QUE:

La Licenciada en Ciencias Químicas, Cristina García Bover, ha estado trabajando bajo nuestra dirección en la elaboración de la Tesis Doctoral titulada “CONTROL SANITARIO DEL SECTOR AVÍCOLA MEDIANTE EL DISEÑO E IMPLEMENTACIÓN DE MAPAS DE PREVALENCIA Y SEROPREVALENCIA“, razón por la cual autorizamos su presentación para optar al Grado de Doctor por la Universitat de València.

En Valencia, a 23 de Octubre de 2015.

Fdo. Dr. José Miguel Soriano

Fdo. Dr. Pablo Catalá

AGRADECIMIENTOS

Durante estos años son muchas las personas e instituciones que han participado en este trabajo y a quienes quiero expresar mi gratitud por el apoyo y la confianza que me han prestado de forma desinteresada.

En primer lugar quiero agradecer a CECAV (Centro de Calidad Avícola y Alimentación Animal de la Comunidad Valenciana) el apoyo brindado para llevar a cabo este proyecto. También a otras instituciones que han colaborado permitiendo el acceso a información imprescindible para realizarla y con financiación: ASAV (Asociación Avícola Valenciana) y su comité técnico, CEVA Salud Animal, Conselleria de Agricultura, Medio Ambiente, Cambio Climático y Desarrollo Rural y Fundación Agroalimed (Fundación de la Comunidad Valenciana para la Investigación Agroalimentaria).

Por supuesto no puedo olvidarme de mis compañeros y amigos de CECAV (Ana, Bea, Carlos, David, Diana, Issac, Lorena, Manoli, Merche, Pepe, Verónica, Victoria y Ximo) y ASAV (Amparo, Bea y Marcia). Os doy las gracias por vuestro trabajo, por vuestra paciencia y por vuestra comprensión durante todos estos años.

Expresar todo mi agradecimiento a mi familia, por su apoyo incondicional a lo largo de este trayecto:

A mis padres, César y Fina, nunca podré agradecerles todo el esfuerzo que han hecho por mí, sé que han sacrificado sus vidas por darme todo lo que soy y por eso he llegado hasta aquí.

Mi hermana Mónica ha sido un apoyo en todo lo que he hecho y me ha ayudado siempre.

Guso, con esa mezcla de buen humor, comprensión y cariño, has llenado mi vida de risas y estabilidad. Te quiero mucho.

Gracias a mis hijos Paula y Carlos (que todavía no ha nacido), que son la alegría más grande que tengo y me han dado fuerzas en los momentos de debilidad.

Por último, dar las gracias a mis directores, Dr. D. Pablo Catalá Gregori y Dr. D. José Miguel Soriano del Castillo, por todo el tiempo que han invertido en esta tesis. Sin vuestra orientación y esfuerzo esto no hubiera sido posible.

Muchas gracias!

ÍNDICES

ÍNDICE

1. INTRODUCCIÓN.....	7
1.1. Características de la avicultura de carne y puesta.....	7
1.1.1. Tipología de las granjas en la Comunidad Valenciana... ..	16
1.2. Control Sanitario en el sector avícola de la Comunidad Valenciana	21
1.3. Enfermedades infecciosas objeto de control en los Mapas de prevalencia y seroprevalencia	25
1.3.1. Salmonelosis.....	25
1.3.2. Influenza Aviar.....	36
1.3.3. Enfermedad de Newcastle	42
1.3.4. Enfermedad de Gumboro.....	49
1.3.5. Micoplasmosis por <i>Mycoplasma gallisepticum</i>	53
1.4. Técnicas de análisis microbiológico	58
1.4.1 ISO 6579 y serotipado.....	58
1.5. Técnicas de análisis serológico	67
1.5.1. Inmunoensayos	68
1.5.2. Inhibición de la hemaglutinación.....	71
1.6. Vacunación en avicultura	73
1.7. Herramienta informática.....	75
1.7.1. Integración de la información	77
1.7.2. Módulos	80
1.7.3. Representación geográfica y mapas de prevalencia y seroprevalencia.....	83
2. OBJETIVOS	87
3. CAPÍTULOS EXPERIMENTALES	91
3.1. Capítulo primero: Desarrollo y resultados de un mapa de seroprevalencia de la influenza aviar en pollos de engorde de la Comunidad Valenciana durante los años 2008, 2009 y 2010.....	95

3.2. Capítulo segundo: Desarrollo y resultado de un mapa de seroprevalencia de paramixovirus tipo 1 en pollos de engorde de la Comunidad Valenciana desde el año 2008 hasta el año 2012.....	119
3.3. Capítulo tercero: Desarrollo y resultados de un mapa de seroprevalencia de <i>Mycoplasma gallisepticum</i> en pollos de engorde en la Comunidad Valenciana durante los años 2009 y 2010.....	143
3.4. Capítulo cuarto: Control serológico de la respuesta a la vacunación in ovo mediante vacunas por inmunocomplejos frente a IBD en broilers.....	159
3.5. Capítulo quinto: Estudio microbiológico de prevalencia de <i>Salmonella</i> spp. en pollos de engorde de la Comunidad Valenciana desde el año 2009 hasta el año 2013 usando una herramienta de mapeo dinámico	183
3.6. Capítulo sexto: Evaluación de <i>Salmonella</i> spp. en heces, hisopos cloacales y huevos (cáscara de huevo y de contenido por separado) de una granja de gallinas ponedoras.....	209
3.7. Capítulo séptimo: Empleo de bacteriófagos frente a <i>Salmonella</i> Enteritidis como herramienta de prevención .	239
4. DISCUSIÓN GENERAL.....	253
5. CONCLUSIONES.....	265
6. REFERENCIAS	269

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Producción de <i>broilers</i> a nivel mundial (adaptado de AVEC, 2014).....	8
Figura 2. Producción de huevos a nivel mundial (adaptado de Global Poultry Trends, 2013).....	11
Figura 3. Producción mundial de huevo (millones de toneladas) en 2008. (www.elsitioavicola.com).....	12
Figura 4. Producción total de huevos en la Unión Europea, año 2013 (para incubar y de consumo, miles de toneladas y %) (adaptado de www.magrama.gob.es)	13
Figura 5. Distribución del censo total de gallinas ponedoras por Comunidades Autónomas en el año 2012 (miles de aves y %) (adaptado de www.magrama.gob.es)	15
Figura 6. Distribución de la producción total de huevos de gallina por Comunidades Autónomas en el año 2012 (miles de docenas y %) (adaptado de www.magrama.gob.es).....	16
Figura 7. Censo y explotaciones en la provincia de Castellón. (Berna, 2012).....	18
Figura 8. Censo y explotaciones en la provincia de Valencia. (Berna, 2012).....	19
Figura 9. Censo y explotaciones en la provincia de Alicante (Berna, 2012).....	20
Figura 10. ELISA Sandwich.....	69
Figura 11. ELISA indirecto	70
Figura 12. ELISA Competitivo	71
Figura 13. Inhibición de la hemaglutinación.....	72

Figura 14. Esquema clásico de una solución de BI.....	77
Figura 15. Preparación de las muestras y el procedimiento del ELISA de Idexx	101
Figura 16. Mapa de seroprevalencia de IANBP en <i>broilers</i> de la Comunidad Valenciana en 2008.....	103
Figura 17. Mapa de seroprevalencia de IANBP en <i>broilers</i> de la Comunidad Valenciana en 2009.....	104
Figura 18. Mapa de seroprevalencia de IANBP en <i>broilers</i> de la Comunidad Valenciana en 2010.....	105
Figura 19. Preparación de las muestras y el procedimiento de Inhibición de la Hemaglutinación.....	125
Figura 20. Efecto pro-zona	126
Figura 21. Mapa de seroprevalencia de APMV-1 en <i>broilers</i> de la Comunidad Valenciana en 2008.....	128
Figura 22. Mapa de seroprevalencia de APMV-1 en <i>broilers</i> de la Comunidad Valenciana en 2009.....	129
Figura 23. Mapa de seroprevalencia de APMV-1 en <i>broilers</i> de la Comunidad Valenciana en 2010.....	130
Figura 24. Mapa de seroprevalencia de APMV-1 en <i>broilers</i> de la Comunidad Valenciana en 2011.....	131
Figura 25. Mapa de seroprevalencia de APMV-1 en <i>broilers</i> de la Comunidad Valenciana en 2012.....	132
Figura 26. Mapa de seroprevalencia de MG en <i>broilers</i> de la Comunidad Valenciana en 2009.....	149
Figura 27. Mapa de seroprevalencia de MG en <i>broilers</i> de la Comunidad Valenciana en 2010.....	150

Figura 28. Preparación de las muestras y el procedimiento del ELISA de Biochek.....	164
Figura 29. Títulos de ELISA de pollos de engorde frente a la edad, durante 2012	165
Figura 30. Mapa de seroprevalencia de IBD de pollos de engorde vacunados <i>in ovo</i> con dosis única <i>in ovo</i> de vacuna frente a IBD basada en inmunocomplejos, en regiones españolas durante 2012	167
Figura 31. Preparación de las muestras de calzas.....	189
Figura 32. ISO 6579:2002/Amd. 1:2007 (calzas)	190
Figura 33. Mapa de prevalencia de <i>Salmonella</i> en <i>broilers</i> de la Comunidad Valenciana en 2009.....	194
Figura 34. Mapa de prevalencia de <i>Salmonella</i> en <i>broilers</i> de la Comunidad Valenciana en 2010.....	195
Figura 35. Mapa de prevalencia de <i>Salmonella</i> en <i>broilers</i> de la Comunidad Valenciana en 2011	196
Figura 36. Mapa de prevalencia de <i>Salmonella</i> en <i>broilers</i> de la Comunidad Valenciana en 2012.....	197
Figura 37. Mapa de prevalencia de <i>Salmonella</i> en <i>broilers</i> de la Comunidad Valenciana en 2013.....	198
Figura 38. Toma de muestra de heces	213
Figura 39. Toma de muestra de hisopos cloacales	214
Figura 40. Toma de muestra de huevos.....	215
Figura 41. Preparación de las muestras de heces, hisopos cloacales y huevos.....	217-218
Figura 42. ISO 6579:2002 (contenido del huevo).....	221

Figura 43. ISO 6579:2002/Amd. 1:2007 (heces, hisopos cloacales y cáscara del huevo)	222
Figura 44. Serotipado <i>Salmonella</i> spp.....	224
Figura 45. Macrorrestricción (PFGE).....	226
Figura 46. Resultados de <i>Salmonella</i> spp. en las diferentes matrices estudiadas	230-231
Figura 47. Patrones de electroforesis en gel de campo pulsado (PFGE) por digestión del DN genómica de cepas de <i>Salmonella</i> Enteritidis obtenidas de varias muestras en una granja de gallinas ponedoras.....	232
Figura 48. Metodología de trabajo empleada en la prueba de fagos	243
Figura 49. Subporciones analizadas	246

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Producción de <i>broilers</i> en la Unión Europea y terceros países (producción nacional bruta, tonelada de peso de canal) (adaptado de AVEC, 2014)	9
Tabla 2. Producción de <i>broilers</i> en la Unión Europea y terceros países (producción nacional bruta, tonelada de peso de canal) (AVEC, 2014).....	10
Tabla 3. Controles en broilers.....	22
Tabla 4. Clasificación de los serotipos de <i>Salmonella</i> (Curso serotipado de <i>Salmonella</i> spp., 2010).....	28
Tabla 5. Clasificación de los paramixovirus (Catalá-Gregori y Mateo, 2012; Shivaprasad, 2013).....	43
Tabla 6. Clasificación del Género <i>Salmonella</i> . (Curso serotipado de <i>Salmonella</i> spp., 2010).....	60
Tabla 7. Diferenciación de sub-especies de <i>Salmonella</i> . (Curso serotipado de <i>Salmonella</i> spp., 2010).....	61
Tabla 8. Serogrupos O de <i>Salmonella</i> . Los antígenos mayores dentro de cada serogrupo se indican en negrita (Curso serotipado de <i>Salmonella</i> spp., 2010)	64
Tabla 9. Títulos de referencia para IA de Idexx	106
Tabla 10. Comarcas de la Comunidad Valenciana: N° de registros, muestras analizadas y resultados cualitativos obtenidos de IA	107-109
Tabla 11. Brotes de IA recientes en 2014 y 2015.....	112-113

Tabla 12. Comarcas de la Comunidad Valenciana: número de lotes, número de muestras y título medio de IHA en 2008	134
Tabla 13. Comarcas de la Comunidad Valenciana: número de lotes, número de muestras y título medio de IHA en 2009	135
Tabla 14. Comarcas de la Comunidad Valenciana: número de lotes, número de muestras y título medio de IHA en 2010	136
Tabla 15. Comarcas de la Comunidad Valenciana: número de lotes, número de muestras y título medio de IHA en 2011	137
Tabla 16. Comarcas de la Comunidad Valenciana: número de lotes, número de muestras y título medio de IHA en 2012	138
Tabla 17. Comarcas de la Comunidad Valenciana, número de muestras, título medio y número de explotaciones estudiadas.....	153
Tabla 18. Pueblo o ciudad de España, coeficiente de variación (CV), número de muestras y título medio	168-177
Tabla 19. Lotes de pollos de engorde analizados usando la herramienta de mapeo dinámica desde 2009 a 2013	200-202
Tabla 20. Detección de <i>Salmonella</i> spp. en diferentes tipos de muestras (media en % de positividad de <i>Salmonella</i> spp.....)	227
Tabla 21. Resultados de los cultivos en las diferentes matrices estudiadas	228-229
Tabla 22. Resultados prueba de fagos	248-249

PUBLICACIONES

PUBLICACIONES

El trabajo desarrollado en la presente Tesis Doctoral ha dado lugar a la siguiente producción científica:

C. García, J.M. Soriano, P. Catalá-Gregori. Development of a seroprevalence map for avian influenza in broiler chickens from Comunidad Valenciana, Spain. *Rev. sci. tech. Off. int. Epiz.*, 2014, 33 (3), 947-955. Publicado.

C. García, J.M. Soriano, P. Catalá-Gregori. Development and results of a seroprevalence Map for Paramyxovirus type 1 in *broilers* in comunidad valenciana (spain) during five years (2008-2012). *Rev. sci. tech. Off. int. Epiz.* Enviado.

C. García, J.M. Soriano, P. Catalá-Gregori. Development and results of a Seroprevalence Map for *Mycoplasma gallisepticum* in Broilers from Comunidad Valenciana (SPAIN) during two years (2009 and 2010). *Vet. Med.* Enviado.

C. García, J.M. Soriano, P. Catalá-Gregori. Monitoring serological response to single in-ovo vaccination with an immune complex vaccine against IBD in broilers. *J. Food Protect.* Enviado.

C. García, J.M. Soriano, P. Catalá-Gregori. Microbiological survey of *Salmonella* spp. prevalence in broilers flocks from Comunidad Valenciana (spain) during five years (2009-2013) using adynamic mapping tool. *J. Food Protect.* Enviado.

C. García, J.M. Soriano, V. Benitez, P. Catalá-Gregori. Assessment of *Salmonella* spp. in feces, cloacal swabs, and eggs

(eggshell and content separately) from a laying hen farm. *Poult Sci.* 2011 Jul;90(7):1581-5. doi: 10.3382/ps.2010-01104. Publicado.

C. García, C. Marín, J.M. Soriano, P. Catalá-Gregori. Empleo de bacteriófagos frente a *Salmonella* Enteritidis como herramienta de prevención. *Nutr Hosp.* 2015;31(6):2740-2742. Publicado.

ABREVIATURAS

ABREVIATURAS

ADN: Ácido Desoxirribonucleico.

APMV-1: Paramixovirus Aviar del Tipo 1.

ARN: Ácido Ribonucleico.

ARP: Aglutinación Rápida en Placa.

ASAP: Placa de Agar *Salmonella* AES.

ASAV: Asociación Avícola Valenciana.

AVEC: Asociación de Productores de Aves de Corral y Comercio de Aves de la Unión Europea.

BI: Inteligencia de Negocios.

Caldo MKTTn: Caldo de Muller-Kauffmann.

Caldo RVS: Caldo de Rappaport-Vassiliadis con soja.

CAPAA: Conselleria d'Agricultura, Pesca, Alimentació i Aigua.

CAV: Virus de Anemia del Pollo.

CECAV: Centro de Calidad Avícola y Alimentación Animal de la Comunidad Valenciana.

CIRAD: Centro de Investigación para el Desarrollo Agrícola Francés.

CV: Coeficiente de variación.

DE: Desviación estándar.

DPM: Mapa Dinámico de Prevalencia.

EFSA: Autoridad Europea de Seguridad Alimentaria.

ELISA: Enzyme-Linked Immunosorbent Assay.

ETL: Extraer, transformar y cargar.

FAO: Organización para la Agricultura y la Alimentación.
FAV: Adenovirus aviar.
GAMA: Agent-based Modelling Architecture.
H: Hemaglutinina.
IA: Influenza Aviar.
IAAP: Influenza Aviar de Alta Patogenicidad.
IAAPN: Influenza Aviar de Alta Patogenicidad de
Declaración Obligatoria.
IABP: Influenza Aviar de Baja Patogenicidad.
IANBP: Influenza Aviar de Baja Patogenicidad de
Declaración Obligatoria.
IBD: Enfermedad de Gumboro.
IBV: Bronquitis Infecciosa.
ICPI: Índice de Patogenicidad Intracerebral en Pollo.
IHA: Inhibición de la Hemaglutinación.
ILT: Laringotraqueítis Infecciosa.
IVDT: IV Sequence Distribution Tool.
LIMS: Sistema de Gestión de Información de Laboratorio.
MG: *Mycoplasma gallisepticum*.
MS: *Mycoplasma synoviae*.
MSRV: Rappaport-Vassiliadis semisólido modificado.
N: Neuraminidasa.
NCD: Enfermedad de Newcastle.
OIE: Organización Mundial de Sanidad Animal.
OLAP: Procesamiento Analítico en Línea.
PAZ: Plan Anual Zoosanitario.

PCR: Reacción en Cadena de la Polimerasa.
PFGE: Electroforesis en Gel de Campo Pulsado.
PNCS: Programa Nacional de Control de *Salmonella*.
REGA: Registro General de Explotaciones Ganaderas.
RSS: Really Simple Syndication.
SIG: Sistema de Información Geográfica.
TRT: Rinotraqueítis.
UHA: Unidades de Actividad de Hemaglutinación.
vvIBD: Variantes muy virulentas del virus de la
Enfermedad de Gumboro.
XLD: Xilosa-lisina-desoxicolato.
XLT4: Xilosa Lisina Tergitol-4 Agar.

RESUMEN

RESUMEN

Actualmente, la salmonelosis, la influenza aviar (IA), la enfermedad de Newcastle (NCD), la enfermedad de Gumboro (Infectious Bursal Disease; IBD) y la micoplasmosis por *Mycoplasma gallisepticum* (MG) son enfermedades infecciosas aviares de gran interés.

En este contexto, en este trabajo se plantearon tres objetivos iniciales. El primero fue obtener e integrar la información sanitaria de las explotaciones avícolas estudiadas; el segundo abordó el diseño e implementación de los mapas de seroprevalencia para el control de IANBP (influenza aviar de baja patogenicidad de declaración obligatoria), NCD, MG e IBD y el mapa de prevalencia para *Salmonella* spp.; y por último, controlar y representar en un mapa dinámico la respuesta serológica después de una vacunación única *in ovo* frente a IBD, utilizando una vacuna de inmunocomplejos en pollos. Así, se desarrolló una herramienta informática basada en *Business Intelligence* (BI) que posibilitó la explotación *on-line*, a través de Internet, de la información de resultados analíticos (títulos de ELISA (enzyme-linked immunosorbent assay), títulos de IHA (Inhibición de la Hemaglutinación) y resultados cualitativos de ELISA y de presencia/ausencia obtenidos con el método de ensayo ISO 6579, a partir de muestras de explotaciones avícolas (sueros o calzas). Este sistema permitió la visualización geográfica de los resultados por provincias, comarcas y municipios, utilizando diferentes colores.

La monitorización del estado sanitario de las explotaciones de engorde puede ser una herramienta para el control de enfermedades, útil para los servicios técnicos veterinarios, constituyendo una fuente de información adicional para su prevención.

Dada la histórica relevancia de la zoonosis por salmonelosis en este sector, se continuó el trabajo incidiendo sobre aspectos relacionados con la prevención y caracterización de la *Salmonella* en gallinas ponedoras. Así, el cuarto objetivo se basó en el estudio cualitativo de la contaminación por *Salmonella* spp. (ISO 6579) de una explotación de gallinas ponedoras, previa al sacrificio por ser positiva a *Salmonella* serotipo Enteritidis en autocontroles de heces y en controles oficiales. Además, se serotiparon algunas cepas según el método de Kauffman-White-Le-Minor (Patrick, 2007) y se caracterizaron mediante macrorrestricción genómica utilizando la técnica de electroforesis en campo pulsante (PFGE) (Ribot *et al.*, 2006). La detección cualitativa del patógeno en altos niveles de contaminación en las heces de gallinas ponedoras no implicó su presencia en el contenido del huevo.

El quinto, y último objetivo, consistió en evaluar el efecto *in vitro* de bacteriófagos frente a *Salmonella* Enteritidis, previamente inoculada en muestras de heces frescas de gallinas ponedoras. El empleo de bacteriófagos contribuyó a reducir los aislamientos de *Salmonella* Enteritidis en las muestras de heces a las 24h de su aplicación, por lo que podría ser considerado una herramienta de prevención.

1. INTRODUCCIÓN

1. INTRODUCCIÓN

1.1. Características de la avicultura de carne y puesta

La producción de carne de ave ha crecido de manera continuada durante las últimas décadas, proliferando explotaciones avícolas con distintas orientaciones y especializaciones dentro del sector. En cualquier caso, predomina por su volumen de producción la cría de pollo de engorde de alta selección genética, también conocido como “pollo para carne” o “broiler”. Aunque inicialmente el término de broiler se aplicó a aquellos animales comercialmente destinados a asadero (“to broil” en inglés significa “asar”), en la actualidad se emplea la palabra broiler para designar, independientemente de su destino comercial, a un ave joven, macho o hembra, procedente de un cruce genéticamente seleccionado, de la especie *Gallus gallus*, para alcanzar una alta velocidad de crecimiento y un buen rendimiento de la canal, con la formación de notables masas musculares. El factor fundamental que ha contribuido a convertir al broiler en la base principal de la producción masiva de carne de ave, representando así el principal exponente de esta producción, es su rápido ciclo de producción (6-7 semanas) (Catalá-Gregori, 2007).

Considerando el informe anual de la Association of Poultry Processors and Poultry Trade in the EU (AVEC) correspondiente al año 2014, la Unión Europea se sitúa en cuarta posición en la

producción de *broilers* mundial (12%), tal como se refleja en la **figura 1**.

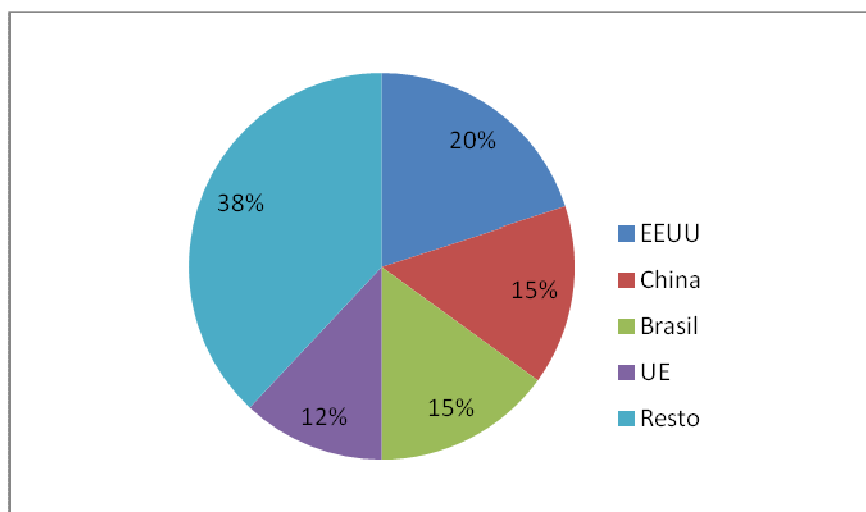


Figura 1. Producción de *broilers* a nivel mundial (adaptado de AVEC, 2014).

La cría de aves para producción de carne es, en la actualidad, una de las ganaderías más importantes de nuestro país. España se encuentra entre los primeros productores europeos de carne de ave, aunque el balance comercial es habitualmente importador. Así, a nivel Europeo de los 27 estados miembros, España fue la segunda productora de *broilers* en 2008 y 2009, tercera en 2010 y quinta en 2011, 2012 y 2013 (**figura 1 y tabla 1**).

Tabla 1. Producción de *broilers* en la Unión Europea y terceros países (producción nacional bruta, tonelada de peso de canal) (adaptado de AVEC, 2014).

	2008	2009	2010	2011	2012	2013
Austria	85	90	90	91	89	89
Bélgica/Luxemburgo	250	250	249	235	246	246
Dinamarca	175	175	175	175	175	168
Finlandia	91	86	88	93	99	104
Francia	1009	1008	1041	1096	1091	1146
Alemania	868	911	1073	1150	1160	1190
Grecia	160	160	160	160	160	160
Irlanda	91	98	109	110	116	117
Italia	713	742	780	796	816	820
Países Bajos	626	655	664	710	738	750
Portugal	251	263	269	265	258	259
España	1059	1063	1085	1073	1063	1041
Suecia	78	79	79	80	80	80
Eslovenia	46	47	46	47	49	50
Bulgaria	74	79	77	81	78	72
Chipre	28	27	28	27	25	25
República Checa	191	181	181	181	158	161
Estonia	14	14	14	14	14	14
Hungría	230	145	240	254	280	305
Letonia	23	23	23	23	25	25
Lituania	70	69	76	75	79	79
Malta	5	5	4	4	4	5
Polonia	730	1060	1123	1150	1325	1450
Reino Unido	1214	1220	1323	1297	1322	1391
Rumania	357	389	370	359	325	350
Eslovaquia	93	84	79	66	68	70
EU-27	8531	8923	9445	9612	9843	10166

Tabla 2. Producción de *broilers* en la Unión Europea y terceros países (producción nacional bruta, tonelada de peso de canal) (AVEC, 2014).

	2008	2009	2010	2011	2012	2013
Argentina	1435	1500	1680	1770	2014	2022
Brasil	11033	11021	12312	12863	12645	12308
China	11840	12100	12550	13200	13700	13500
India	2490	2550	2650	2900	3160	3420
Indonesia	1350	1409	1465	1515	1540	1550
Irán	1450	1525	1600	1660	.	.
Méjico	2853	2781	2822	2906	2958	3002
Rusia	1680	2060	2310	2575	2830	3050
Sudáfrica	1240	1250	1290	1300	.	.
Tailandia	1170	1200	1280	1350	1550	1500
USA	16561	15935	16563	16694	16621	16958
Mundo	80744	83366	87286	90100	92730	94000

Se denomina gallinas ponedoras las hembras de la especie *Gallus gallus* que se crían específicamente para la producción de huevos para consumo.

Entre 2000 y 2010 la producción mundial de huevo creció más de 2% anual, de 51 millones de toneladas a 63,8 millones de toneladas. Sin embargo, desde entonces parece que el aumento anual apenas ha sido de un promedio del 1%. En la mayoría de los casos las cifras de producción se refieren a la producción de todos los huevos de gallina, e incluyen los huevos incubados tanto para las manadas de ponedoras como de los pollos de engorde. Globalmente se considera que los huevos fértiles (futuros pollos)

representan aproximadamente 5% del total, aunque la proporción de huevo fértil varía mucho en cada país, dependiendo del tamaño de la industria del pollo de carne.

Las tasas anuales de crecimiento varían según los distintos continentes (**figura 2**). Mientras que el incremento mundial entre 2000 y 2010 promedió 2,3% por año, África registró una expansión anual promedio de 3,7%. Asia logró un crecimiento anual de 2,6%, mientras que América y Oceanía obtuvieron incrementos de un poco menos de 2%. En Europa la expansión fue más lenta, de solo 1,1% al año.

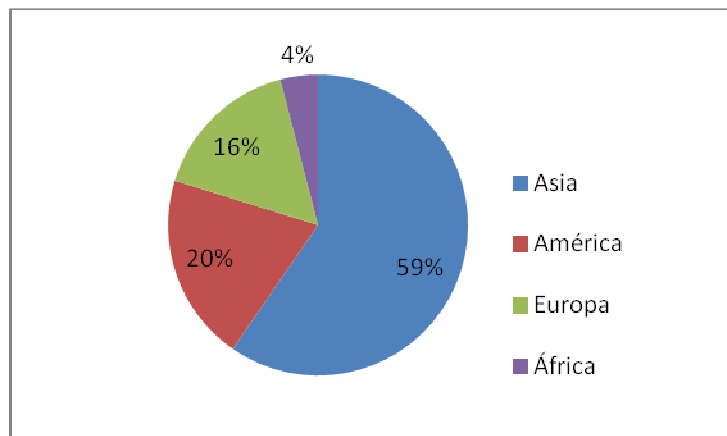


Figura 2. Producción de huevos a nivel mundial (adaptado de Global Poultry Trends, 2013).

Como resultado de estas diferencias, África logró aumentar su participación en el total mundial de 3,8% a 4,3%. La contribución de América ha bajado nuevamente un poco, de 20,4% a 20,1%, mientras que Asia ha aumentado su participación de

56,9% a 58,7%. La participación de Europa se contrajo de 18,6% a 16,5%. Si se dedujeran los huevos fértiles de las cifras de producción, los porcentajes cambiarían un poco, pero no alterarían la visión general de un aumento en la producción y participación del mercado en Asia y África, un crecimiento paralizado en el mejor de los casos en América, y una reducción en Europa.

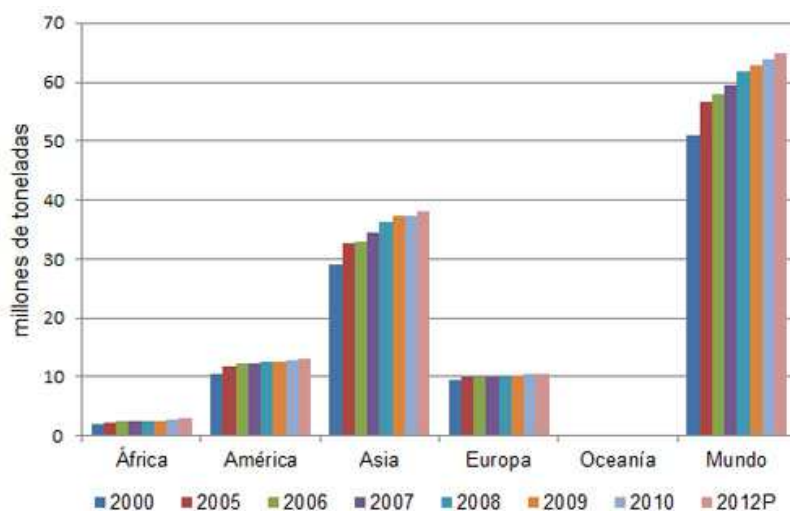


Figura 3. Producción mundial de huevo (millones de toneladas) en 2008 (www.elsitioavicola.com).

En cuanto a números de gallinas ponedoras, la Organización para la Agricultura y la Alimentación (FAO) estima que en 2010 hubo en el mundo casi 6556 millones de ponedoras, de las cuales 509 millones estaban en África, 1053 millones en América, 4211 millones en Asia, 765 millones en Europa y unos 18 millones en Oceanía (www.elsitioavicola.com).

El censo medio de ponedoras de la Unión Europea (UE 28) en 2013 se estima en 326,4 millones de aves. Destacan por el volumen de su parque España, Italia, Alemania, Francia, Holanda, Reino Unido y Polonia que en conjunto representan el 76,8% del censo total comunitario.

La producción de huevos de consumo en 2013 se estima en 6866 millones de docenas, lo que representa un descenso del 15% respecto a la del año 2012. En el gráfico siguiente (**figura 4**) puede observarse la distribución de la producción total de huevos (incubar y consumo) en los principales países de la Unión Europea en el año 2013.

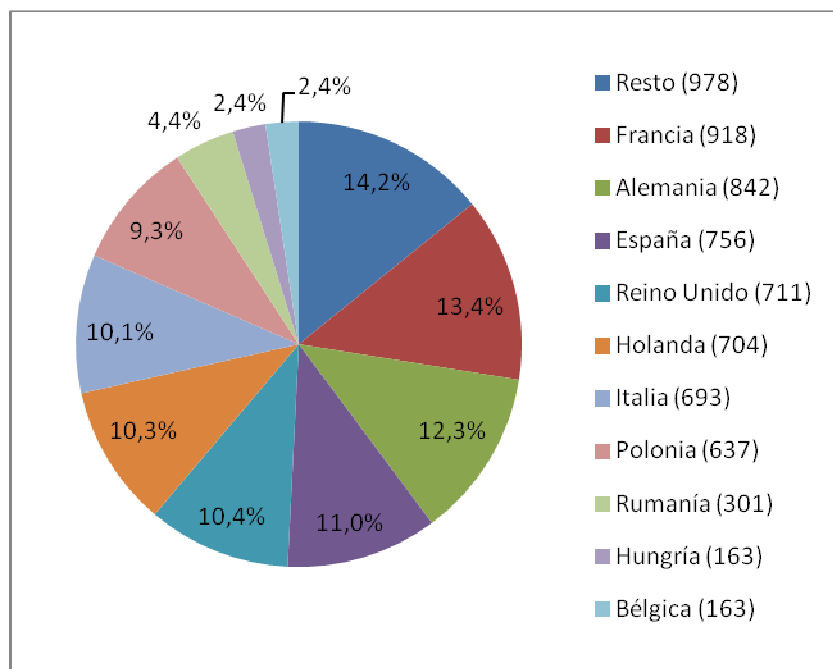


Figura 4. Producción total de huevos en la Unión Europea, año 2013 (para incubar y de consumo, miles de toneladas y %) (adaptado de www.magrama.gob.es).

El consumo humano global en la Unión Europea se estimó para el año 2012 en 4642681 toneladas y el consumo aparente por habitante y año estaría en unos 9,2 kg.

En 2012, el valor de la producción de huevos en España se estimó que superaba los 1204 millones de €, lo que supuso el 2,9% de la Producción Final Agraria y un 7,6% de la Producción Final Ganadera. Sin embargo, estas magnitudes descendieron cerca del 35%, hasta los 781,9 millones de € en 2013, a consecuencia de la disminución del censo derivado de la aplicación de la Directiva 1999/74/CE del Consejo de 19 de julio de 1999, por la que se establecen las normas mínimas de protección de las gallinas ponedoras. Así, en 2013 la producción de huevos representó el 1,8% de la producción final ganadera y el 4,9% de la producción final agraria.

En España el censo medio de gallinas ponedoras en 2012 se estima en 46,8 millones de aves, lo que supone una disminución del 5,5% respecto del censo medio de 2011. En esta cifra están incluidas tanto las estirpes selectas como las aves cuya producción se destina al autoconsumo en la explotación agraria (camperas y otras). La producción total de huevos fue de 1026,2 millones de docenas, es decir, inferior en un 5,2% a la de 2011. En los gráficos siguientes (**figura 5** y **figura 6**) aparece la distribución por Comunidades Autónomas del censo y producción de huevos del año 2011 (Magrama, 2013).

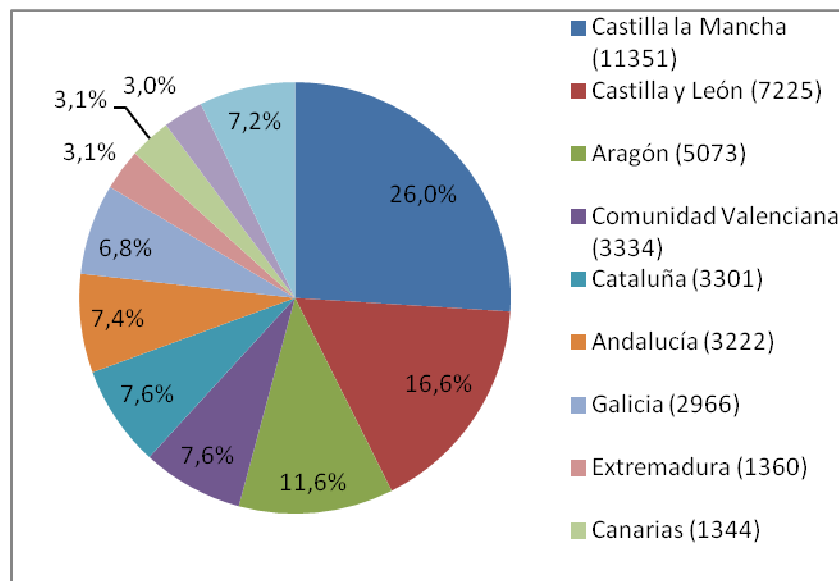


Figura 5. Distribución del censo total de gallinas ponedoras por Comunidades Autónomas en el año 2012 (miles de aves y %) (adaptado de www.magrama.gob.es).

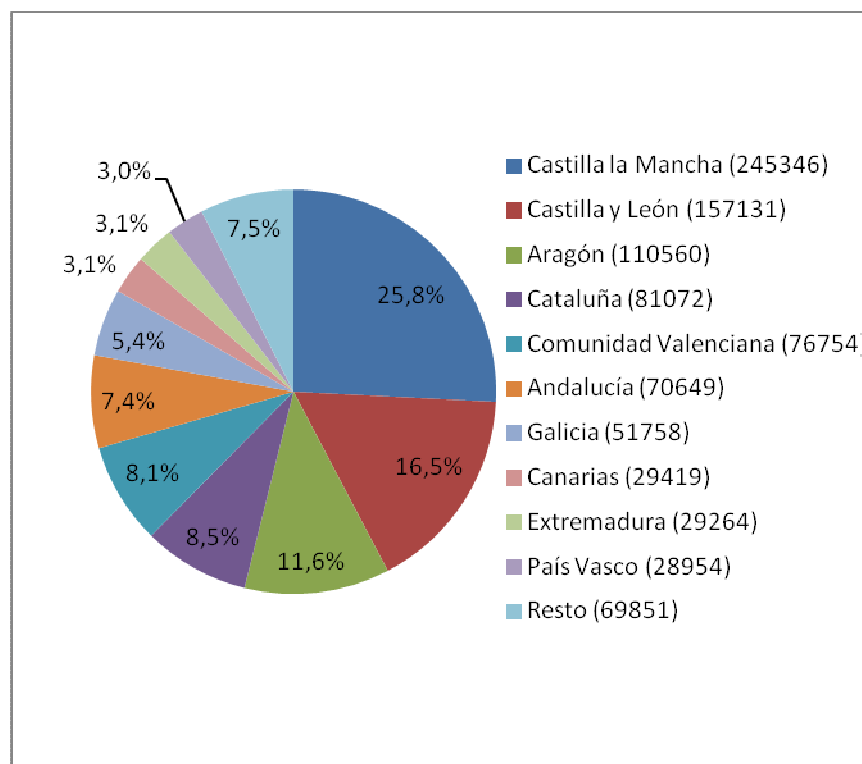


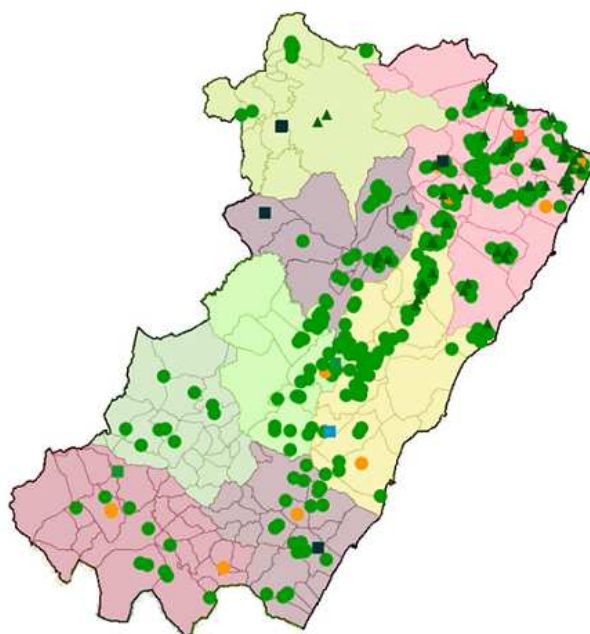
Figura 6. Distribución de la producción total de huevos de gallina por Comunidades Autónomas en el año 2012 (miles de docenas y %) (adaptado de www.magrama.gob.es).

En lo sucesivo nos referiremos a la situación en la Comunidad Valenciana.

1.1.1. Tipología de las granjas en la Comunidad Valenciana

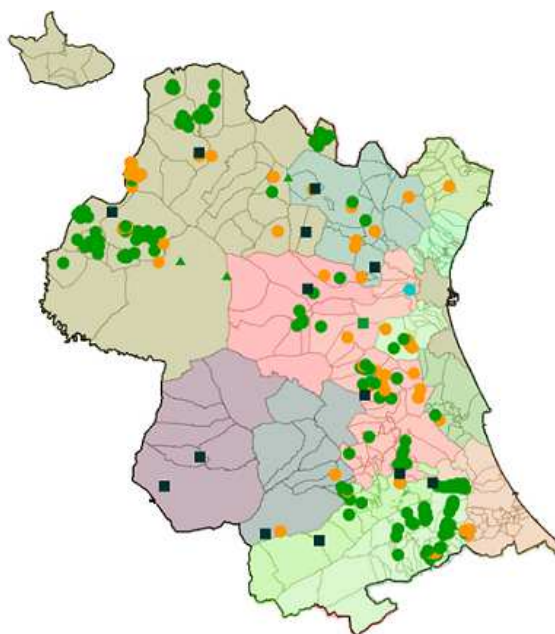
El sector productivo avícola de la Comunidad Valenciana contaba, a Noviembre de 2012, con 672 explotaciones avícolas con censo de 19003197 animales, alojados en 462 explotaciones de

broilers con censo de 12480784, 15 explotaciones de reproductoras con censo de 370401, 6 explotaciones de recría de reproductoras con censo de 124519, 67 explotaciones de gallinas ponedoras con censo de 3404939, 22 explotaciones de recría de ponedoras con censo de 1195128, 68 explotaciones de pavos con censo de 1176285, 3 explotaciones de patos y ocas con censo de 2510, 3 explotaciones de ratites con censo de 294 y 26 explotaciones de cinegéticas con censo de 248337, distribuidas a lo largo de toda la región (Conselleria d'Agricultura, Pesca, Alimentació i Aigua CAPAA, 2012). En las **figuras 7, 8 y 9** se muestran los datos de censo y explotaciones de la Comunidad Valenciana a fecha de Noviembre de 2012.



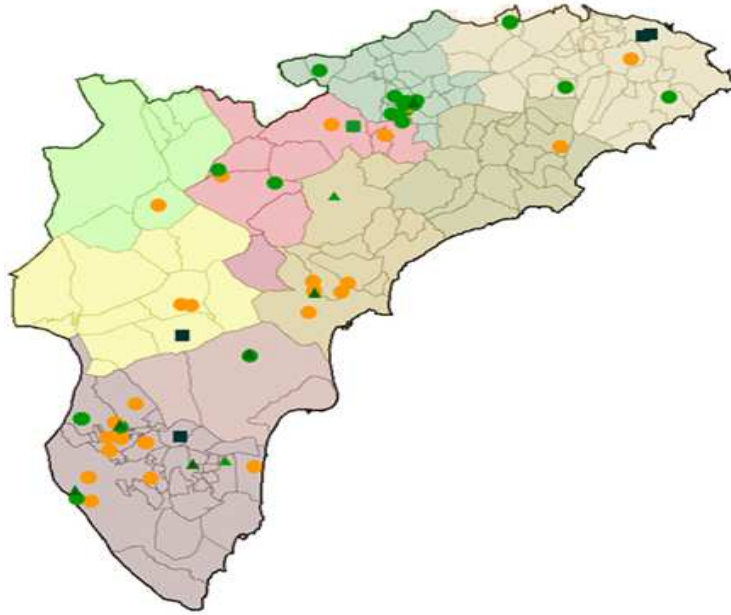
ESPECIE	EXPLOTACIONES	CLAS. ZOOTÉCNICA	CENSO	PLAZAS	
●	GALLINAS	269	GRANJAS DE PRODUCCIÓN PARA CARNE	6.349.359	6.911.268
●	GALLINAS	9	GRANJAS DE MULTIPLICACIÓN PARA CARNE	210.319	231.203
●	GALLINAS	4	GRANJAS DE CRÍA PARA CARNE (AVES DE CRÍA)	72.219	154.400
●	GALLINAS	1	GRANJAS DE CRÍA PARA CARNE (AVES DE EXPLOTACIÓN)	34.500	36.000
●	GALLINAS	1	INCUBADORA	1.200.000	1.209.600
●	GALLINAS	8	GRANJAS DE PRODUCCIÓN PARA HUEVOS	317.523	475.509
●	GALLINAS	3	GRANJAS DE CRÍA PARA HUEVOS	257.000	275.000
▲	PAVOS	64	GRANJAS DE PRODUCCIÓN PARA CARNE	1.171.920	1.211.648
▲	PATOS/OCAS	3	GRANJAS DE PRODUCCIÓN PARA CARNE	2.510	4.030
■	CINEGETICAS	4	GRANJAS DE PRODUCCIÓN PARA CAZA PARA REPOBLACIÓN	2.025	3.150
■	CINEGETICAS	1	GRANJAS DE CRÍA PARA CAZA PARA REPOBLACIÓN (AVES DE CRÍA)	700	1.000
■	CINEGETICAS	1	GRANJAS DE PRODUCCIÓN PARA HUEVOS	170.000	170.000

Figura 7. Censo y explotaciones en la provincia de Castellón. (Berna, 2012).



ESPECIE	EXPLOTACIONES	CLAS. ZOOTÉCNICA	CENSO	PLAZAS	
●	GALLINAS	167	GRANJAS DE PRODUCCIÓN PARA CARNE	5.656.165	6.437.354
●	GALLINAS	5	GRANJAS DE MULTIPLICACIÓN PARA CARNE	130.882	172.600
●	GALLINAS	2	GRANJAS DE CRÍA PARA CARNE (AVES DE CRÍA)	52.300	52.300
●	GALLINAS	1	GRANJAS DE SELECCIÓN PARA CARNE	23.000	35.000
●	GALLINAS	1	INCUBADORA	277.500	1.105.902
●	GALLINAS	37	GRANJAS DE PRODUCCIÓN PARA HUEVOS	2.861.483	3.333.790
●	GALLINAS	16	GRANJAS DE CRÍA PARA HUEVOS	924.720	1.412.520
▲	RATITES	1	INCUBADORA	0	1.140
▲	RATITES	1	GRANJAS DE PRODUCCIÓN PARA CARNE	185	1.100
▲	RATITES	1	GRANJAS DE MULTIPLICACIÓN PARA CARNE	69	72
■	CINEGETICAS	2	GRANJAS DE PRODUCCIÓN PARA CARNE	2.400	13.200
■	CINEGETICAS	9	GRANJAS DE PRODUCCIÓN PARA CAZA PARA REPOBLACIÓN	64.100	121.300
■	CINEGETICAS	3	GRANJAS DE MULTIPLICACIÓN PARA CAZA PARA REPOBLACIÓN	3.982	4.582
■	CINEGETICAS	1	GRANJAS DE CRÍA PARA CAZA PARA REPOBLACIÓN (AVES DE CRÍA)	20	6.000

Figura 8. Censo y explotaciones en la provincia de Valencia. (Berna, 2012).



	ESPECIE	EXPLOTACIONES	CLAS. ZOOTÉCNICA	CENSO	PLAZAS
●	GALLINAS	25	GRANJAS DE PRODUCCIÓN PARA CARNE	440.760	614.815
●	GALLINAS	1	GRANJAS DE MULTIPLICACIÓN PARA CARNE	29.200	30.000
○	GALLINAS	22	GRANJAS DE PRODUCCIÓN PARA HUEVOS	225.933	300.025
○	GALLINAS	3	GRANJAS DE CRÍA PARA HUEVOS	13.408	29.306
▲	PAVOS	4	GRANJAS DE PRODUCCIÓN PARA CARNE	4.365	10.500
▲	RATITES	1	GRANJAS DE PRODUCCIÓN PARA CARNE	40	235
■	CINEGETICAS	3	GRANJAS DE CRÍA PARA CAZA PARA REPOBLACIÓN (AVES DE CRÍA)	4.660	24.200
■	CINEGETICAS	2	GRANJAS DE PRODUCCIÓN PARA CAZA PARA REPOBLACIÓN	450	720

Figura 9. Censo y explotaciones en la provincia de Alicante. (Berna, 2012).

1.2. Control Sanitario en el sector avícola de la Comunidad Valenciana

Las enfermedades infecciosas aviares que tienen interés en *broilers* desde la perspectiva del control oficial son actualmente la salmonelosis, la influenza aviar (IA) y la enfermedad de Newcastle (NCD) (Plan Sanitario Avícola, 2003; Programa Nacional de Control de *Salmonella*, 2015). En la Comunidad Valenciana, la sistemática de control de estas enfermedades se publica anualmente en el Plan Anual Zoosanitario (PAZ) por la Conselleria d'Agricultura, Pesca, Alimentació i Aigua (CAPAA). En ella se detalla la periodicidad de control de cada enfermedad según la orientación productiva de las explotaciones ganaderas. Así, en *broilers*, se indicaban los siguientes controles a realizar sobre IA, NCD y *Salmonella* en el año 2013. En la **tabla 3** se incluye los controles marcados por el PAZ y otros adicionales realizados en 2013.

Tabla 3. Controles en *broilers*.

Edad	Origen muestra	Tipo de muestra	Nº muestras	Análisis	Técnica
Últimas 3 semanas	Autocontrol	2 pares de calzas	1	Cultivo <i>Salmonella</i>	ISO 6579
>30d	PAZ	Sangre	15 tubos	IA, EN	ELISA , IHA
Anual (municipios PAZ)					
>30d	Mapa de seroprevalencia	Sangre	15 tubos	MG	ELISA
Semestral					
2 manadas/explot en 2009 y 2010					
Anual					
1 manada/explot en 2011					

Desde el punto de vista productivo, por su trascendencia en los resultados económicos de la actividad ganadera, o por su impacto sobre la seguridad alimentaria, también son importantes otras enfermedades víricas como la bronquitis infecciosa (Infectious Bronchitis Virus; IBV) y sus cepas variantes, la enfermedad de Gumboro (Infectious Bursal Disease; IBD), la anemia infecciosa (Chicken Anemia Virus; CAV), la laringotraqueítis infecciosa (Infectious Laryngotracheitis; ILT), la rinotraqueítis (Turkey Rhinotracheitis; TRT) o la hepatitis por cuerpos de inclusión (Fowl Adenovirus; FAV). Entre las enfermedades bacterianas encontramos las micoplasmosis por *Mycoplasma gallisepticum* (MG) y *Mycoplasma synoviae* (MS), la colibacilosis o la campilobacteriosis. El sector cuenta con herramientas de diagnóstico de laboratorio para ayudar al control de estas enfermedades, como la serología (ELISA, IHA), la biología molecular (Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR), Genotipado) o los cultivos microbiológicos y pruebas bioquímicas.

El control de estas enfermedades se realiza por exigencias normativas, como parte del programa sanitario de la explotación o en caso de sospecha. La información obtenida está dispersa (gran cantidad de datos, diferentes laboratorios, técnicas de análisis, kits de análisis dentro de una misma técnica, diferentes planes de muestreo según la explotación, etc.), y no está disponible en tiempo real de forma agrupada.

Así, sería útil poder centralizar la información obtenida de los resultados analíticos, eliminando la dispersión de la

información y contemplando variables cruciales desde el punto de vista epidemiológico, como son las variables geográficas y temporales, para así facilitar el control de algunas enfermedades infecciosas. La inexistencia de un sistema que cubriera estas necesidades impulsó el desarrollo de la solución propuesta en esta Tesis Doctoral.

En la Comunidad Valenciana, el laboratorio autorizado para desarrollar las actuaciones contempladas en el Plan Anual Zoosanitario (PAZ) en materia avícola es el Centro de Calidad Avícola y Alimentación Animal de la Comunidad Valenciana (CECAV), centralizando así toda la información generada.

Por todo ello, se propuso la creación de un sistema de control sanitario en tiempo real, centralizando la información y contemplando variables geográficas y temporales, denominado mapa de prevalencia y mapa de seroprevalencia.

Para ello, se desarrolló una herramienta informática basada en *Business Intelligence* (BI) que posibilita la explotación *on-line*, a través de Internet, de la información de resultados analíticos realizados por el CECAV en las explotaciones avícolas. Este sistema permite la visualización geográfica de los resultados por provincias, comarcas y municipios.

Así, en una primera fase, se pretendió diseñar e implementar 4 mapas de seroprevalencia y 1 mapa de prevalencia en *broilers* de las enfermedades de control oficial (*Salmonella*, IA y NCD) y algunas de las enfermedades de interés en avicultura controladas a nivel sectorial (MG e IBD).

1.3. Enfermedades infecciosas objeto de control en los Mapas de prevalencia y seroprevalencia

1.3.1. Salmonelosis

La salmonelosis se mantiene, tras la campilobacteriosis, como la segunda zoonosis transmitida por alimentos con más casos registrados en el ser humano, con 82694 casos reportados durante 2013 en la Unión Europea, 4537 de ellos en España.

En los productos alimentarios se ha detectado la *Salmonella* sobre todo en huevos y ovoproductos y en carnes y productos cárnicos. El porcentaje de brotes (44,9% de los brotes) más elevado se detectó en huevos y ovoproductos. En carnes de cerdo, bovino y pollo se obtuvieron el 8,9%, 1,6% y 5,1% de los brotes, respectivamente. En otros alimentos como dulces y chocolate, vegetales, frutas y pescados también se ha detectado la bacteria (EFSA, 2015).

Teniendo en cuenta estos datos, el sector avícola es considerado el principal responsable de la elevada prevalencia de *Salmonella* spp.

Los serotipos objetivo en *broilers* según PNCS son *S. Enteritidis* y *S. Typhimurium* (incluyendo las cepas monofásicas de *Salmonella* Typhimurium con fórmula antigénica 1,4,[5],12:i:-).

Actualmente, en gallinas ponedoras, la legislación Nacional y Europea indica que si se confirma la presencia de *Salmonella* de ciertos serotipos (*S. Enteritidis*, *S. Typhimurium* incluyendo las cepas monofásicas de *Salmonella* Typhimurium con fórmula

antigénica 1,4,[5],12:i:-) en heces, se procede a la destrucción de los huevos bajo control oficial debiendo ser tratados de conformidad con el Reglamento (CE) 1774/2002, o podrán ser trasladados a un establecimiento autorizado para la elaboración de ovoproductos a fin de ser sometidos a un tratamiento térmico que garantice la destrucción de la *Salmonella*, de acuerdo con la legislación comunitaria de higiene de los alimentos y con la normativa sobre comercialización de los huevos (Reglamento (CE) 1028/2006).

Etiología

Las salmonellas son bacterias Gram negativas, forman parte de las γ -Proteobacterias y pertenecen al género *Salmonella* de la familia *Enterobacteriaceae*. Son bacterias anaerobias facultativas, por tanto, pueden crecer bien en condiciones aerobias y anaerobias. La temperatura óptima para *Salmonella* es 37°C, pero podemos observar su crecimiento en un rango de temperatura que oscila de 5° a 45°C (Bierer *et al.*, 1961). El pH óptimo para estas bacterias es de 7,0, aunque pueden crecer entre 4,0 y 9,0 (Booth, 1985; Padan *et al.*, 1987). Los requerimientos de crecimiento son relativamente simples y casi todos los medios de cultivo proporcionan las fuentes necesarias de carbono y nitrógeno para su crecimiento. La viabilidad de los cultivos puede mantenerse por muchos años en medios simples, tales como el agua de peptona y agar nutritivo (Shulman *et al.*, 1999).

Las salmonellas tienen un tamaño relativamente pequeño (0,5 μm por 2-3 μm) y al microscopio presentan forma de bacilos cortos, no esporulados y móviles debido a la presencia de numerosos flagelos que rodean la bacteria (flagelos peritricos), aunque existen dos serotipos que no son móviles, *S. Gallinarum* y *S. Pullorum*.

Las salmonellas típicas fermentan glucosa (para producir ácido y gas), dulcitol, manitol, maltosa y mucato, pero no fermentan lactosa, sacarosa, malonato o salicina. Las salmonellas paratifoideas no hidrolizan urea, ni producen indol. Las salmonellas paratifoideas pueden distinguirse del resto, *S. arizonae*, *S. Pullorum* y *S. Gallinarum*, en base a diferencias bioquímicas. *S. arizonae* no puede fermentar dulcitol, pero por lo general fermentan malonato; *S. Pullorum* no puede fermentar mucato ni dulcitol, y *S. Gallinarum* no puede descarboxilar ornitina o producir gas a partir de la fermentación de glucosa (Calnek *et al.*, 2000).

Se considera dos especies del género *Salmonella*: *S. enterica* y *S. bongori*. (Fookes *et al.*, 2011). Dentro de la especie *S. enterica* se distinguen 6 subespecies: *S. enterica indica*, *S. enterica salamae*, *S. enterica arizonae*, *S. enterica diarizonae*, *S. enterica houtenae* y *S. enterica enterica*.

Dentro de cada subespecie se separan, en función de sus respuestas serológicas, distintos serotipos o serovares. Los serotipos de *Salmonella enterica* subespecie *enterica* se identifican por nombre y corresponden a (Adelantado *et al.*, 2008), de acuerdo a la **tabla 4**.

Tabla 4. Clasificación de los serotipos de *Salmonella* (Curso serotipado de *Salmonella* spp., 2010).

Serogrupo	Serotipo
2	Paratyphi A, Paratyphi B, Stanley, Schwarzengrund, Saintpaul
4	Derby, Agona, Typhimurium, Bredeney, Brandenburg, Heidelberg
7	Cholerasuis, Paratyphi C, Livinstone, Montevideo, Thompson, Wirchow, Infantis, Mbandaka
8	Muenchen, Newport, Hadar
9	Enteritidis, Dublín, Panamá, Gallinarum, Typhi ¹
3,10	Anatum
1,3,19	Senftenberg
11	Rubislaw
13	Kedougou
Otras subespecies	
16/II	<i>Salmonella enterica</i> subsp. <i>salamae</i>
18/IIIa	<i>Salmonella enterica</i> subsp. <i>arizonae</i>
21,60,61/IIIb	<i>Salmonella enterica</i> subsp. <i>diarizonae</i>
43/IV	<i>Salmonella enterica</i> subsp. <i>houtenae</i>
6,14/VI	<i>Salmonella enterica</i> subsp. <i>indica</i>
* ²	<i>Salmonella bongori</i>

Dada la complejidad de la taxonomía y con el fin de facilitar las denominaciones se recomienda denominar una cepa con el nombre del serotipo correspondiente. Así, por ejemplo, si se identifica una cepa como *Salmonella enterica* subsp. *enterica* serotipo Enteritidis, podemos referirnos a ella como *Salmonella* Enteritidis.

¹ Para este último, algunos autores lo clasifican como especie con entidad propia, dada su importancia clínica, ya que se describe como el agente etiológico de la fiebre tifoidea en humanos.

² Se emplea la fórmula antigénica para nombrarla.

Clínicamente resulta útil clasificar los grupos de *Salmonella* según su huésped específico:

- El hombre (*S. Typhi* y *S. Paratyphi*).
- Los animales (En aves: *S. Pullorum*, *S. Gallinarum*, *S. arizonae*).
- Las salmonellas zoonóticas (más de 2000 serotipos).

La semejanza entre los serotipos aislados en el hombre y los de los animales ilustra el patrón de propagación entre humanos y los alimentos que consumen. (Shulman *et al.*, 1999).

Epidemiología y patogenia

Los problemas sanitarios que causa en humanos van desde episodios leves de gastroenteritis acompañados de depresión, fiebre, dolores o calambres abdominales y diarrea hasta problemas mucho más graves (como puede ser la artritis reactiva, también conocida como síndrome de Reiter) o incluso la muerte. Los casos mortales son poco frecuentes y se dan en poblaciones vulnerables que comprenden a lactantes, personas de edad avanzada y personas inmunodeprimidas (Zwadyk, 1992; D'Aoust, 1997). En general, únicamente se dan episodios leves, en los que el período de incubación varía entre 8 y 72 horas y los síntomas pueden prolongarse una semana.

Las infecciones de las aves pueden agruparse en tres categorías atendiendo a su patogenia y epidemiología (Palmer *et al.*, 1998):

- Infecciones con serotipos no móviles, *S. Pullorum* y *S. Gallinarum*.

Estas especies son específicas de huésped para las especies aviarias. La pullorosis, originada por *S. Pullorum*, es una enfermedad aguda septicémica. El tifus aviar causado por *S. Gallinarum*, es una enfermedad septicémica aguda o crónica, que afecta con mayor frecuencia a aves adultas. Tanto la pullorosis como el tifus aviar, se pueden transmitir a través del huevo por infección transovárica.

La mortalidad de la pullorosis se confina por lo general a las 2-3 primeras semanas de vida. Los pollos o pavos que sobreviven a la infección inicial llegan a ser portadores con o sin desarrollo de lesiones. Aunque el tifus aviar se relaciona generalmente como enfermedad de aves adultas, esta puede dar lugar a una elevada mortalidad en pollos jóvenes. Al igual que la pullorosis, las pérdidas empiezan en el momento de la incubación, sin embargo, esta última también continúa cuando las aves son adultas.

Estas dos enfermedades, hoy erradicadas de las explotaciones avícolas españolas, causaron en el pasado graves pérdidas económicas a los productores y han hecho que se pongan en práctica extensos programas de pruebas diagnósticas y de erradicación.

- Infecciones con serotipos móviles, salmonellas paratifoideas.

Generalmente las infecciones por *Salmonella* paratifoidea en adultos se caracterizan por la colonización asintomática del aparato intestinal, con persistencia hasta el sacrificio. Esto supone una excreción intermitente de *Salmonella* durante el ciclo de producción, favoreciendo la diseminación e infección de todo el lote.

En los pollitos recién nacidos, la infección por *Salmonella* paratifoidea puede causar alta morbilidad y mortalidad, mientras que en aves jóvenes suele cursar exclusivamente sintomatología digestiva, acompañada por una elevada excreción de la bacteria en heces (Gast *et al.*, 1990; Desmidt *et al.*, 1997). En animales adultos sólo puede observarse una ligera diarrea que remite en tres días y que va acompañada de la excreción de gran cantidad de *Salmonella* (Kinde *et al.*, 2000).

Algunos serotipos también pueden pasar al torrente sanguíneo y colonizar órganos internos (Van Immerseel *et al.*, 2004). Si la bacteria se acantona en tejidos linfoides, el ave se convertirá en portadora asintomática crónica, excretando agente de forma intermitente.

- Infecciones con serotipos móviles del subgénero *S. arizonae*.

Este grupo de microorganismos, aunque bioquímicamente distintos, causan una enfermedad que no se distingue en sus aspectos clínicos de otras infecciones por *Salmonella*. La arizonosis es de particular importancia económica en pavos, en los que produce una reducción drástica en la producción de huevo y la incubabilidad.

El principal reservorio de la *Salmonella* es el intestino de animales vertebrados (mamíferos, incluyendo el hombre, y las aves) aunque es un microorganismo ubicuo.

En las infecciones por *Salmonella* paratifoidea, las aves pueden padecer clínicamente la infección o comportarse como portadores asintomáticos, transmitiendo la infección transováricamente (transmisión vertical) (Shivaprasad *et al.*, 1990; Keller *et al.*, 1995). *S. Gallinarum* y *S. Pullorum*, son específicas de las especies aviares, y hoy se encuentran erradicadas de las explotaciones avícolas en España.

Las aves portadoras excretan de forma intermitente la *Salmonella* a través de las heces pudiendo permanecer viable en el material fecal y contaminar el medio ambiente (contaminación horizontal de jaulas, camas, ambiente, comederos, huevos etc.). La forma más importante de transmisión de la *Salmonella* spp. entre individuos es la ingestión de material contaminado por las heces de portadores o enfermos.

La resistencia de la *Salmonella* en el medio ambiente gracias a la formación de biofilm (Joerger *et al.*, 2009; Sheffield *et al.*, 2009) y, en condiciones favorables, su capacidad de multiplicación en él, constituyen un factor crítico que facilita su difusión y mantenimiento, y dificulta su control.

Síntomas y lesiones

Generalmente su presentación es asintomática en las aves. Solo se presentan síntomas, en ocasiones, en aves muy jóvenes. Se da somnolencia, ojos cerrados, alas caídas y plumas erizadas, así como anorexia, emaciación y diarrea acuosa profusa.

Generalmente su presentación es asintomática sin lesiones. Cuando hay síntomas, se ha descrito enteritis con focos necróticos en la mucosa intestinal; focos de necrosis en hígado y bazo, que están aumentados de tamaño y congestionados; riñones congestionados y aumentados de tamaño; perihepatitis y pericarditis fibrinopurulenta; vitelo no completamente absorbido.

Control y prevención

La prevención de la infección se basará en la implementación de las medidas de bioseguridad e higiene, la vacunación de los reproductores y el análisis periódico de las manadas mediante autocontroles.

En Europa y España existe una normativa específica para su control. El objetivo de la Normativa Europea 2160/2003 es garantizar que se toman las medidas apropiadas y eficaces para detectar y controlar la *Salmonella* y otros agentes zoonóticos en todas las fases de producción, transformación y distribución, en particular a nivel de la producción primaria, incluidos los piensos, con el fin de disminuir su prevalencia y el riesgo que suponen para la salud pública.

Así, entre octubre de 2005 y septiembre de 2006 se realizó un estudio de prevalencia para determinar la prevalencia de *Salmonella* en pollos de carne a nivel de la Unión Europea.

A nivel nacional durante 2007 y 2008 se aplicó el Plan Nacional de medidas de vigilancia de determinados serotipos de *Salmonella* hasta el 1 de enero de 2009 en el que comenzó la aplicación del Programa Nacional de Control a nivel comunitario.

El objetivo nacional contemplado para este programa para la reducción de la *Salmonella* Enteritidis y *Salmonella* Typhimurium, incluyendo las cepas monofásicas de *Salmonella* Typhimurium con fórmula antigénica 1,4,[5],12:i:-, en los pollos de engorde consistirá en la reducción al 1% o menos, a 31 de diciembre de 2011, del porcentaje máximo de manadas de pollos de engorde positivas respecto a los serotipos anteriores.

Una de las prácticas utilizadas en las explotaciones para controlar la *Salmonella* es el uso de antibióticos. Sin embargo, el elevado grado de resistencia de la bacteria plantea limitaciones graves en las posibilidades del tratamiento eficaz.

Los bacteriófagos (fagos) son virus que matan bacterias (Huff *et al.*, 2013). Los fagos han sido propuestos como alternativa al uso de antibióticos basado en su capacidad para invadir y perturbar el metabolismo bacteriano, que causa la lisis de las bacterias (Oliveira *et al.*, 2010).

Los bacteriófagos son específicos para cada bacteria previniendo la destrucción de la flora circundante; se adhieren a la pared bacteriana contribuyendo a atenuar factores de virulencia; no inducen fenómenos alérgicos; no se han detectado efectos secundarios (son inofensivos para los animales, las plantas y para el medio ambiente); pueden ser usados como tratamiento preventivo y para higienización; continúan multiplicándose hasta que la infección con el huésped se mantenga (terminan su acción cuando ya no hay bacteria huésped); se utilizan en una única aplicación y no tienen intervalo de seguridad (Sereno, 2013). Así, en uno de los capítulos de esta Tesis Doctoral se evaluó el efecto *in-vitro* de bacteriófagos frente a *Salmonella* Enteritidis, inoculada en muestras de heces frescas de gallinas ponedoras.

1.3.2. Influenza Aviar

Etiología

La Influenza aviar (IA) es una enfermedad incluida en la Lista única de enfermedades de declaración obligatoria de la Organización Mundial de Sanidad Animal (OIE) y en la lista de enfermedades de notificación obligatoria de la Unión Europea. Esta enfermedad está producida por el virus influenza tipo A de la familia *Orthomyxoviridae*, género *Influenzavirus* (Alexander y Brown, 2000).

Se clasifican en dos subtipos basados en dos antígenos de superficie, la hemaglutinina (H) y la neuraminidasa (N). Existen 16 antígenos de hemaglutinina (de H1 a H16) y 9 de neuraminidasa (de N1 a N9). Las cepas de IA se describen por su tipo, hospedador, lugar de aislamiento, número de cepa, año de aislamiento, y subtipo antigénico (Slavec *et al.*, 2012).

Epidemiología y patogenia

Los virus de IA suelen ser hospedadores específicos aunque pueden existir transmisiones entre individuos de especies muy próximas, e incluso se han señalado transmisiones a humanos (Banks *et al.*, 1998).

La cepa altamente patógena del subtipo H5N1 de origen asiático ha sido el centro de la atención durante los últimos años

debido a los importantes focos que han afectado a las aves domésticas y silvestres en el mundo (Tiensin *et al.*, 2005; Webster *et al.*, 2006).

La reciente y rápida dispersión de la variante asiática del subtipo H5N1 del virus de la IA representa una grave amenaza no sólo para la industria avícola, sino también para las aves silvestres, varias especies de mamíferos y humanos en contacto con estas especies (Alexander, 2000a; Kuiken *et al.*, 2004; Nicholson *et al.*, 2003; Subbarao y Shaw, 2000). Mientras que los virus de la IA son en general propios de determinadas especies, la cepa altamente patógena H5N1 ha infectado también a veces a los humanos (Hatta y Kawaoka, 2002) Cabe señalar que existen también cepas de H5N1 de baja patogenicidad pero no son vinculadas a signos patógenos con gravedad por parte de los animales infectados.

Varios factores pueden contribuir a la diseminación de los virus de la IA, entre ellos, la mundialización y el comercio internacional, las prácticas de comercialización (mercados de aves vivas), las prácticas ganaderas y la presencia de virus en las aves silvestres.

Los virus de la IA, por tanto, no son homogéneos, sino que hay una gran variedad de ellos, y esta variedad, que reside en su estructura genética y se refleja en su estructura antigénica, determina también su patogenicidad. Existen cepas de baja patogenicidad (IABP) y cepas de alta patogenicidad (IAAP). Todas ellas son capaces de infectar y por tanto multiplicarse en aves, pero mientras que las de baja patogenicidad apenas afectan a sus

huéspedes, las de alta patogenicidad producen una enfermedad letal en un porcentaje muy alto de las aves infectadas. No todos los subtipos de virus influenza tipo A son capaces de dar lugar a cepas altamente patógenas. Cuando se han aislado y estudiado las cepas altamente patógenas, se ha encontrado que hasta el momento todas pertenecen a los subtipos H5 o H7. En la actualidad todos los aislados de subtipo H5 y H7 deben ser notificados a las autoridades veterinarias competentes y se debe obtener información acerca de su patogenicidad o potencial patogenicidad a nivel molecular (<http://www.madrimasd.org>).

Los virus de la IA pueden propagarse por contacto directo con las secreciones de aves infectadas, en especial las heces, o con piensos, agua, equipos y ropa contaminados.

Además de ser altamente contagiosos entre las aves de corral, los virus de la IA se transmiten rápidamente de granja en granja por los movimientos de aves domésticas vivas, de la gente (especialmente si el calzado y otras prendas están contaminados) y vehículos, equipos, piensos y jaulas contaminados. Los virus altamente patógenos pueden sobrevivir durante largos periodos en el medio ambiente, sobre todo a bajas temperaturas (Swayne y Halvorson, 2008)

El virus de la IA es de ARN y de sentido negativo (Wright y Webster, 2001). El virus presenta 8 fragmentos de ácido nucléico y cada uno de ellos codifica para una o varias proteínas. Son virus de ARN de envoltura lipídica. La superficie lipídica está recubierta por proyecciones de glucoproteína de dos tipos: Hemaglutinina y

Neuraminidasa. La Hemaglutinina es el antígeno más importante del virus y uno de los condicionantes de su capacidad infecciosa y patogénica, facilita tanto la unión como la penetración del virus a la célula hospedadora. La Neuraminidasa juega un papel esencial en la liberación del virus desde las células infectadas y en su difusión por el sistema respiratorio, previene la agregación de las partículas víricas y permite al virus difundir a través de las secreciones respiratorias. La Hemaglutinina representa el 25% del total de las proteínas del virus frente al 5% de la Neuraminidasa (Horimoto y Kawaoka, 2005).

Síntomas y lesiones

Existen varias cepas de virus de la IA que suelen clasificarse en dos categorías: IA poco patógena, que por lo general produce pocos signos clínicos o ninguno en las aves; e IA altamente patógena, que produce signos clínicos graves y/o alta mortalidad entre las aves.

Afecta a los aparatos respiratorio, digestivo y nervioso de aves comerciales y silvestres. Los signos que produce pueden ser extremadamente virulentos, con alta mortalidad en muy pocos días (Bano *et al*, 2003).

En su forma leve, los signos de la enfermedad pueden manifestarse con plumaje erizado o efectos leves en el sistema respiratorio. En su forma grave, el virus no sólo afecta al tracto

respiratorio, sino que también invade varios órganos y tejidos y puede producir hemorragia interna masiva.

Las aves infectadas con la IA altamente patógena (incluida la cepa H5N1) pueden presentar los signos clínicos siguientes o al menos algunos (Swayne y Halvorson, 2008):

- Postración y depresión extrema.
- Edema y congestión de crestas.
- Edema de la piel debajo de los ojos.
- Tos, estornudos y signos nerviosos.
- Diarrea.
- Hemorragias.
- Se pueden producir algunas muertes durante varios días, seguidas de una difusión rápida y una tasa de mortalidad cercana al 100% dentro de las 48 horas.

Las lesiones varían mucho según la patogenicidad (Swayne y Halvorson, 2008):

- Baja patogenicidad: traqueítis catarral, sinusitis, aerosaculitis, conjuntivitis, neumonía, peritonitis, ooforitis, salpingitis, etc.
- Alta patogenicidad: lesiones hemorrágicas en piel de la cara, cresta y extremidades, y en el tracto gastrointestinal, neumonía intersticial, nefritis, encefalitis, conjuntivitis, miocarditis, adrenalitis, pancreatitis, miositis, necrosis linfoide, vasculitis y trombosis, etc.

Control y prevención

Para el diagnóstico se tendrá en cuenta los signos clínicos y se confirmará mediante pruebas de laboratorio de biología molecular, como el PCR. Para su vigilancia, es común el empleo de la serología mediante ELISA.

No hay tratamiento. Es sumamente importante poner en práctica sistemas de detección y alertas precoces y medios de prevención en el marco de una estrategia eficaz frente a la IA.

En España se encuentra prohibida la vacunación de aves domésticas contra la enfermedad. En caso de riesgo grave, se considera que la vacunación puede constituir una herramienta de gran utilidad en la lucha contra la IA, por lo que se dispone de un Plan de Vacunación de Emergencia. En éste se detalla los requisitos que habrían de cumplir en su caso los programas de vacunación que se elaboraran como método de control o lucha contra la IA, y que deberían ser aprobados por la Comisión Europea. En aves de corral, la vigilancia activa frente a este virus se basa en el muestreo y diagnóstico serológico de las aves frente a cepas H5 y H7 (Directiva 2005/94/EC).

Es esencial que los productores avícolas mantengan prácticas de bioseguridad a fin de prevenir la introducción del virus en sus manadas.

1.3.3. Enfermedad de Newcastle

Etiología

La enfermedad de Newcastle es una enfermedad altamente contagiosa incluida en la lista única de enfermedades de declaración obligatoria de la Organización Mundial de Sanidad Animal (OIE) y en la lista de enfermedades de notificación obligatoria de la Unión Europea. La enfermedad de Newcastle es causada por el paramixovirus aviar del tipo 1 (APMV-1). Estos virus, llamados APMV-1 o virus de la enfermedad de Newcastle (NDV), son miembros del género *Avulavirus* en la familia *Paramyxoviridae* (Alexander, 2000b).

Los paramixovirus se clasifican en nueve grupos basados en la relación antigénica (test de IHA) (**tabla 5**):

Tabla 5. Clasificación de los paramixovirus (Catalá-Gregori y Mateo, 2012; Shivaprasad, 2013).

Grupos	Hospedador primario	Otros hospedadores
PMV-1/Virus de la enfermedad de Newcastle	Varios	Varios
PMV-2/Yukaipa	Paseriformes, pavos	Gallinas, psitácidas
PMV-3	Pavos	Ninguno (el pollo es un posible hospedador pero no está comprobado)
PMV-3	Psitácidas	Paseriformes
PMV-4	Patos	Ganso
PMV-5/Kunitachi	Periquitos	Ninguno
PMV-6	Patos, Ocas	Pavos
PMV-7	Tórtola Palomas	Ninguno
PMV-8	Gansos, Patos	Ninguno
PMV-9	Patos	Ninguno

Epidemiología y patogenia

Se trata de una enfermedad altamente contagiosa que puede afectar a 236 especies de aves de 27 órdenes, siendo multitud especies de aves tanto domésticas como salvajes que pueden ser hospedadores. Los índices de mortalidad y de morbilidad varían según las especies y en función de la cepa viral. Las gallinas y pollos son las aves de corral más susceptibles, siendo los patos y los gansos las menos susceptibles (Ebako, 2003; King, 2002),

La transmisión del virus se produce por inhalación o por ingestión. Por contacto directo con las secreciones de las aves infectadas y especialmente con las heces, así como con la comida, agua, instrumentos, locales, vestuario, etc., contaminados. Son

fuentes de virus las secreciones respiratorias, heces y todas las partes de las aves muertas.

El virus se transmite durante el período de incubación y por un período limitado durante la convalecencia. Se ha demostrado que algunas psitácidas transmiten durante más de un año el virus de la enfermedad de Newcastle de manera intermitente (Alexander y Senne, 2008).

El periodo de incubación es breve, entre 2 y 12 días (media de 5 días), de tal forma que la aparición de la enfermedad se produce simultáneamente en todo el lote de aves tras la exposición. La mortalidad puede llegar al 100% en lotes de aves jóvenes (Al-Gari *et al.*, 2003).

Tradicionalmente se han clasificado las cepas en función de los signos clínicos, el tropismo por diversos órganos, patogenicidad, termoestabilidad (tiempo/temperatura necesaria para destruir la hemaglutinina de la cápside), etc. Aunque recientemente estos criterios han sido reemplazados por caracterización genética, se mantienen en parte los antiguos conceptos. Así, sobre la base de los signos clínicos observados en pollos infectados se definen cinco grupos de cepas. Las dos primeras son consideradas de alta patogenicidad (cepas velogénicas), la cepa mesogénica muestra una patogenicidad media, y las dos últimas (lentogénica y entérica asintomática) son consideradas de baja patogenicidad (Manual Terrestre OIE, 2014)

La clasificación actual de la OIE se basa en el índice de patogenicidad intracerebral en pollo (ICPI):

- IPIC > 0,7 es virus de enfermedad de Newcastle (anteriormente Velogénico y Mesogénico) o que contenga una secuencia de aminoácidos que se asemeja a las observadas en los virus altamente virulentos (aminoácidos básicos múltiples en el C-terminal de la proteína F2 y fenilalanina en el residuo 117 de la proteína F1).
- IPIC < 0,7 es un Paramixovirus aviar tipo 1 (anteriormente Lentogénico).

Síntomas y lesiones

Los síntomas clínicos varían con la patogenicidad de la cepa y las especies de aves. En pollos, cursan desde infecciones subclínicas o una leve afección respiratoria con tos, jadeo y estornudos hasta enfermedad respiratoria aguda y signos neurológicos con alta mortalidad.

Los síntomas respiratorios y/o nerviosos son jadeo y tos; alas caídas, arrastran las patas, cabeza y cuellos torcidos (tortícolis), desplazamientos en círculos, depresión, inapetencia, parálisis completa. Se describe en ocasiones una diarrea verde acuosa y tejidos hinchados en torno a los ojos y el cuello.

La morbilidad y mortalidad dependen de la virulencia de la cepa del virus, del grado de inmunidad a la vacunación, de las condiciones ambientales y del estado de las aves de la explotación (Alexander y Senne, 2008).

Las lesiones que se pueden encontrar son edema del tejido intersticial o peritraqueal del cuello, especialmente cerca de la entrada torácica; congestión y algunas veces hemorragias en la mucosa traqueal; edema, petequias y pequeñas equimosis en la mucosa del proventrículo, concentradas alrededor de los orificios de las glándulas mucosas; edema, hemorragias, necrosis o ulceraciones del tejido linfoide en la mucosa de la pared intestinal; edema, hemorragias o degeneración de los ovarios (Manual práctico de operaciones en la lucha contra la enfermedad de Newcastle, 2009).

El cuadro clínico de la enfermedad puede ser común a otras enfermedades que cursen con síntomas respiratorios como son Cólera aviar, IA, Laringotraqueítis infecciosa aviar, Viruela aviar (forma diftérica), Micoplasmosis, Bronquitis infecciosa aviar y errores de manejo, tales como falta de agua, aire, alimentación (Manual práctico de operaciones en la lucha contra la enfermedad de Newcastle, 2009).

A este nivel, la enfermedad es prácticamente indiferenciable de la IA.

Control y prevención

Se recomienda seguir las pautas establecidas en el Manual práctico de operaciones en la lucha contra la enfermedad de Newcastle elaborado por el Ministerio de Medio Ambiente y Medio Rural y Marino en 2009.

Para el diagnóstico se tendrá en cuenta los signos clínicos y se confirmará mediante pruebas de laboratorio.

Se confirma con un índice de patogenicidad intracerebral (IPIC) igual o superior a 0,7 en pollitos de un día de edad. Actualmente, se admite como alternativa al test IPIC la confirmación del virus por técnicas moleculares apropiadas, como el RT-PCR.

Para su vigilancia, es común el empleo de la serología mediante IHA y ELISA.

No hay tratamiento. Es sumamente importante poner en práctica sistemas de detección y alertas precoces y medios de prevención en el marco de una estrategia eficaz frente a la enfermedad de Newcastle.

Debido a que se trata de una enfermedad altamente transmisible, que en caso de aparición y diseminación puede provocar importantes pérdidas económicas, la política de la UE se encamina a lograr la detección precoz y en su caso a impedir la diseminación o lograr su rápida erradicación en aves de corral, palomas mensajeras y otras aves cautivas.

Para llevar a cabo esta premisa es necesario emplear una combinación de las siguientes estrategias:

- Sacrificio inmediato de todas las aves de corral que se encuentren en la explotación o explotaciones afectadas y destrucción de las aves de corral muertas o sacrificadas y de todos sus restos.
- Movimientos controlados de las aves de corral, y sus productos, estiércoles y todo aquel material relacionado con el manejo de las aves que pudiese estar contaminado, en las áreas declaradas, para evitar la propagación del virus.
- Estrictas medidas de bioseguridad, desinfección de instalaciones, material y vehículos de transporte que pudiesen estar contaminados.
- Rastreabilidad y vigilancia para determinar la fuente de contagio y las vías de expansión de la enfermedad.
- Zonificación para establecer áreas infectadas y aquellas libres de la enfermedad, así como compartimentación territorial para controlar los movimientos de vehículos que puedan suponer un riesgo para la difusión o propagación de la enfermedad

Es esencial que los productores avícolas mantengan prácticas de bioseguridad a fin de prevenir la introducción del virus en sus manadas.

1.3.4. Enfermedad de Gumboro

Etiología

Los primeros brotes de la infección de la bolsa de Fabricio (IBD) se produjeron en el área de Gumboro (Delaware), y por esto motivo en 1966, se denominó enfermedad de Gumboro (Etteradossi y Saif, 2008). Este virus pertenece a la familia *Birnaviridae* (Brown, 1986; Dobos *et al.*, 1979; Müller *et al.*, 1979), género *Avibirnavirus*.

Epidemiología y patogenia

Es una afección vírica altamente contagiosa que afecta a pavos, patos, pintadas y avestruces, aunque la enfermedad clínica sólo ocurre en pollos.

El órgano diana del virus es la bolsa de Fabricio, un órgano importante en pollos jóvenes con el sistema inmune aún en desarrollo. Su presencia se ha asociado a importantes mortalidades en pollitos de corta edad, que han llegado hasta el 40%, sobre todo cuando coincide en el tiempo con infecciones secundarias. Por otra parte, cuando no conduce a un desenlace fatal, la enfermedad provoca una inmunosupresión cuya importancia no es fácil evaluar. La inmunosupresión sufrida da lugar a retrasos en el crecimiento, empeoramiento de los índices de conversión, disminución en la respuesta a otras vacunas y mayor susceptibilidad al padecimiento

de otras enfermedades (salmonelosis y colibacilosis, coccidiosis, laringotraqueítis, bronquitis infecciosa, anemia del pollo, dermatitis gangrenosa y enfermedad de Marek (Eterradossi y Saif, 2008)).

McFerran *et al.* (1980) evidenciaron la presencia de dos serotipos, designándolos serotipo 1 y serotipo 2. El serotipo 1 es patógeno y el serotipo 2 no es virulento, por tanto la enfermedad clínica se asocia con el serotipo 1 y contra él se han preparado vacunas. Existen variantes del serotipo 1 (Rosenberger y Cloud, 1986; Saif, 1984). Mientras que el serotipo 1 es específico de pollos, el serotipo 2 se es común tanto en pollos como en pavos (Jackwood y Saif, 1983; Kibenge *et al.*, 1988).

Se transmite de forma directa entre las aves de la granja y de forma indirecta a través del agua, pienso, polvo, cama, material de la granja, ropa del personal, etc. (Benton *et al.*, 1967). El escarabajo de la cama (*Alphitobius diaperinus*) es capaz de actuar como reservorio del virus de IBD (Snedeker *et al.*, 1967). El virus de IBD también se ha aislado en mosquitos (*Aedes vexans*) (Howie y Thorsen, 1981).

El virus de IBD es muy estable, resistiendo a numerosos desinfectantes y al calor (Benson *et al.*, 1967; Landgraf *et al.*, 1967; Shirai *et al.*, 1994).

En España, en numerosos casos clínicos se han detectado variantes muy virulentas, denominadas vvIBD (Cortey *et al.*, 2012).

Síntomas y lesiones

Los primeros síntomas aparecen a los 2-3 días tras la infección (Etteradossi y Saif, 2008). Se describen síntomas como plumas sucias, diarrea acuosa, anorexia, deshidratación, depresión, plumas erizadas, temblores, postración, y finalmente, la muerte (Islam y Samad, 2003).

Las lesiones que se presentan son deshidratación, coloración oscura de la pechuga, hemorragias en muslo y pechuga.

Se producen alteraciones secuenciales de la bolsa de Fabricio. En relación al tamaño y peso, al tercer día post-infección, la bolsa empieza a aumentar de tamaño a causa del edema y de la hiperemia. El día 4 ya tiene un peso que duplica al normal. El quinto día la bolsa vuelve a su peso normal, y partir del octavo día pesa aproximadamente un tercio o menos de su peso normal. En relación al aspecto de la serosa, a día 2 y 3 post-infección presenta un exudado gelatinoso amarillento que desaparece a medida que la bolsa retoma su tamaño normal. Los pliegues se hacen más prominentes y el color blanco de la bolsa pasa a ser cremoso (Etteradossi y Saif, 2008). Las bolsas presentan focos de necrosis y petequias y equimosis en la superficie de la mucosa.

En el caso de las cepas vvIBD, se presenta una mayor disminución del peso del timo y más lesiones en las tonsilas cecales, timo, bazo y médula ósea.

A nivel microscópico, ya al primer día post-infección existe degeneración y necrosis de los linfocitos en la zona medular de los

folículos. En el tercer o cuarto día, todos los folículos están afectados. El aumento de tamaño de la bolsa se corresponde histológicamente con edema, hiperemia y acumulación de heterófilos. Son características las cavidades quísticas en la zona medular de los folículos una vez que la reacción inflamatoria disminuye (Eterradossi y Saif, 2008).

Control y prevención

Es posible controlar la enfermedad observando la sintomatología, lesiones macroscópicas de la bolsa de Fabricio y técnicas laboratoriales como ELISA, Anatomía Patológica y PCR. Los dos serotipos se diferencian por virus-neutralización pero no se distinguen por ELISA (Eterradossi y Saif, 2008).

El análisis por ELISA se realiza sobre muestras de sueros y los ensayos moleculares y de histopatología en bolsas de Fabricio.

La enfermedad no tiene tratamiento. La prevención consiste en medidas de bioseguridad y vacunación, mediante tres tipos de vacunas (vivas, vectoriales o por inmunocomplejos).

1.3.5. Micoplasmosis por *Mycoplasma gallisepticum*

La micoplasmosis aviar está causada por varios micoplasmas patógenos. El *Mycoplasma gallisepticum* (MG) es el más importante y ocasiona una enfermedad de declaración obligatoria incluida en la lista única de la OIE. Se trata de un patógeno presente en el mundo entero, y es el micoplasma que afecta con mayores repercusiones económicas a las aves de corral.

Etiología

MG es una bacteria que pertenece al género *Mycoplasma*, clase *Mollicutes*, orden *Mycoplasmatales*, familia *Mycoplasmataceae*. Es particularmente importante en pollos y pavos como causa de enfermedad respiratoria y del descenso de la producción de carne y de huevos (Bradbury, 2001). En aves de corral, la infección se transmite verticalmente a través de los huevos infectados y horizontalmente por contacto entre las aves, por aspiración del polvo contaminado, el agua de bebida, los utensilios contaminados y a través de los intermediarios como el hombre (Sasipreeyajan *et al.*, 1987; Marois *et al.*, 2002). Los micoplasmas son microorganismos exigentes y necesitan un medio de crecimiento rico en suero (Kleven, 1998).

MG miden entre 0,3-0,8 μm de diámetro, son inmóviles, aerobias y anaerobias facultativas y gram negativos. Son pleomórficas y algunas veces se presentan en forma cocoide y otras

como filamentos o alargadas, debido a la carencia de la pared celular.

Son fermentadores de la glucosa y maltosa, con producción de ácido y sin producción de gas, raramente fermentan la sacarosa y se obtienen resultados variables con la galactosa, fructosa y manitol (Holt *et al.*, 1994).

Epidemiología y patogenia

El periodo de incubación en condiciones experimentales puede variar de 6 a 21 días, pero aparentemente es bastante difícil determinar el momento preciso de infección en condiciones naturales; las aves infectadas pueden ser asintomáticas durante varios días o meses hasta que sufren estrés (Bradbury y Levisohn, 1996; Dingfelder *et al.*, 1991).

Los signos clínicos de MG en aves de corral infectadas pueden variar de subclínicos a síntomas respiratorios obvios como estornudos, conjuntivitis y tos (Ley y Yoder, 2000). Puede aparecer exudación nasal, estertores traqueales y soplos a través del pico parcialmente abierto. También puede ser característica una sinusitis unilateral o bilateral, particularmente en pavos y aves de caza, y los senos infraorbitales pueden presentarse tan inflamados que los párpados llegan a cerrarse. La conjuntivitis con exudado ocular espumoso es también una característica común en pavos y aves de caza, y a veces en pollos. Los pavos se manchan las plumas de las

alas con frecuencia como resultado de los intentos de eliminar el exudado de los ojos.

MG se puede asociar con las enfermedades respiratorias agudas en pollos y pavos, especialmente en las aves jóvenes, siendo más susceptibles los pavos. En los pavos existe sinergismo con la infección debida al neumovirus aviar. Las lesiones del tracto respiratorios se manifiestan al principio por un exudado mucoso excesivo y después por una exudación catarral caseosa, que puede formar masas amorfas en los sacos aéreos. En los pavos y aves de caza, los senos infraorbitales se encuentran inflamados y contienen una exudación mucosa o caseosa.

La gravedad de la enfermedad está muy influida por el grado de la infección secundaria con virus tales como el de la enfermedad de Newcastle y el de la bronquitis infecciosa, y con bacterias tales como *E. coli* (Fabricant y Levine, 1962; Gross, 1961; Gross, 1990; Fischer *et al.*, 1997). La enfermedad por MG en los pollos puede aparentar padecer una enfermedad respiratoria causada por otros patógenos, como las cepas de baja patogenicidad de la enfermedad de Newcastle y la bronquitis infecciosa aviar. Estas se pueden presentar en infecciones mixtas con MG o *M. synoviae*.

También deberían descartarse infecciones con *Avibacterium paragallinarum* (anteriormente denominada *Haemophilus paragallinarum*), y *Pasteurella multocida*. En los pavos, MG se puede confundir con infecciones producidas por el neumovirus

aviar y la presencia de sinusitis también puede parecerse a una infección por *P. multocida*, *Chlamydia* o *M. synoviae*.

La morbilidad aumenta progresivamente hasta alcanzar el 100% de las aves después de varias semanas. La mortalidad es más alta en aves jóvenes que en las adultas, ya que éstas son más resistentes a la infección por virus respiratorios. La mortalidad suele darse en un porcentaje que varía entre el 5 y el 20% de las aves (Ley y Yoder, 2000).

Síntomas y lesiones

Los signos clínicos pueden variar de subclínicos a síntomas respiratorios obvios como estertores, conjuntivitis, tos y descarga nasal.

La gravedad de la enfermedad está muy condicionada por el grado de la infección secundaria con virus tales como el de la enfermedad de Newcastle y el de la bronquitis infecciosa, y con bacterias tales como *Escherichia coli*. (Fischer *et al.*, 1997; Gross, 1990).

Se reduce el consumo y los pollos pierden peso. Se suele presentar a partir de la cuarta semana de vida.

Las lesiones que se encuentran son exudado catarral en cavidad nasal, tráquea, bronquios y sacos aéreos. Sinusitis. Exudado caseoso en sacos aéreos, pérdida de transparencia. En casos severos, aerosaculitis, perihepatitis fibrinosa o fibrinopurulenta y perdicarditis (David, 2008)

A nivel microscópico, se caracteriza por un adelgazamiento de las membranas mucosas de los tejidos afectados, infiltración mononuclear e hiperplasia de las glándulas mucosas. En la tráquea, destrucción de cilios. Se observan áreas neumónicas en pulmón, cambios linfoculares y lesiones granulomatosas.

Control y prevención

El diagnóstico se basará en los datos clínicos, las lesiones y el aislamiento e identificación de *Mycoplasma gallisepticum*. Es de gran utilidad la PCR a partir de hisopos traqueales. Para la monitorización de la enfermedad, es frecuente el uso de la serología (ARP y ELISA, mayoritariamente).

El tratamiento consiste en antibioterapia con macrólidos, tetraciclinas, fluoroquinolonas. Es resistente a la penicilina y a otros antibióticos que actúan inhibiendo la biosíntesis de la pared celular (David, 2008)

Se recomienda medidas de bioseguridad y medidas de manejo básicas. La vacunación no se suele aplicar a los pollos.

1.4. Técnicas de análisis microbiológico

La determinación de *Salmonella* spp. en calzas se realizó utilizando el anexo D de la norma ISO 6579:2002.

1.4.1. ISO 6579 y serotipado

El método de aislamiento e identificación de *Salmonella* spp. es la norma ISO 6579:2002 y su modificación (Anexo D). La norma ISO 6579:2002 se aplica para alimentos de consumo humano y alimentación animal y el anexo D de esta misma norma a heces de animales y muestras medioambientales en la etapa de producción primaria. Tanto la norma ISO como su anexo constan de cuatro etapas sucesivas:

1. Preenriquecimiento en medio líquido no selectivo.
2. Enriquecimiento en medio selectivo.
3. Siembra e identificación.
4. Confirmación de identidad.

La única diferencia entre la norma ISO 6579:2002 y su modificación se basa en la segunda etapa ya que en la norma se utiliza como medios selectivos de enriquecimiento el caldo de Rappaport-Vassiliadis con soja (caldo RVS) y el caldo de Muller-Kauffmann (caldo MKTTn), y en el anexo D se usa el medio Rappaport-Vassiliadis semisólido modificado (MSRV).

El género *Salmonella* se divide en dos especies: *S. enterica* (incluye seis subespecies) y *S. bongori* (**tabla 6**).

Los siete subgrupos en que se divide *Salmonella* pueden diferenciarse por sus propiedades fenotípicas, lo que en la práctica permite la identificación basándonos en sus características bioquímicas de acuerdo a la **tabla 7**.

Tabla 6. Clasificación del Género *Salmonella*. (Curso serotipado de *Salmonella* spp., 2010).

ESPECIE	SUBESPECIE	Símbolo correspondiente a cada subespecie
<i>S. enterica</i>	<i>enterica</i>	I
	<i>salamae</i>	II
	<i>arizonae</i>	IIIa
	<i>diarizonae</i>	IIIb
	<i>houtenae</i>	IV
	<i>indica</i>	VI
<i>S. bongori</i>		V

Tabla 7. Diferenciación de sub-especies de *Salmonella*. (Curso serotipado de *Salmonella* spp., 2010).

ESPECIE SUBESPECIE	<i>S. enterica</i>					<i>indica</i>	<i>S. bongori</i>
	<i>enterica</i>	<i>salamae</i>	<i>arizonae</i>	<i>diarizonae</i>	<i>Houtenae</i>		
Dulcitol	+	+	-	-	-	d	+
ONPG (2 h)	-	-	+	+	-	d	+
Malonato	-	+	+	+	-	-	-
Gelatinasa	-	+	+	+	+	+	-
Sorbitol	+	+	+	+	+	-	+
Crecimiento en KCN	-	-	-	-	+	-	+
L(+)-tartrato	+	-	-	-	-	-	-
Galacturonato	-	+	-	+	+	+	+
ΓGlutamyltransferasa	+*	+	-	+	+	+	+
β- glucuronidasa	d	d	-	+	-	d	-
Ácido místico	+	+	+	-(70%)	-	+	+
Salicina	-	-	-	-	+	-	-
Lactosa	-	-	-(75%)	-(75%)	-	d	-
Lisis por fago O1	+	+	-	+	-	+	d

*: Typhimurium d, Dublín –
 +: reacciones positivas en un 90% o más de los casos.
 -: reacciones negativas en un 90% o más de los casos.
 d: reacciones diferentes según serotipos.

Sólo reciben nombre los serotipos pertenecientes a la subespecie *enterica*, que suponen más del 99,5 % de las cepas de *Salmonella* que se aíslan (por ejemplo *Salmonella enterica* subespecie *enterica* serotipo Enteritidis). El nombre del serotipo no se escribe en cursiva y la primera letra es mayúscula.

Los serotipos pertenecientes al resto de las subespecies no reciben nombre propio sino que se designan sólo con su fórmula antigénica, por ejemplo *Salmonella enterica* subespecie *arizonae* 47: z51: -

De acuerdo a la norma ISO 6579:2003, tras la confirmación bioquímica de las colonias sospechosas de pertenecer al género *Salmonella*, hay que realizar la confirmación serológica y el serotipado de las mismas.

Como el resto de enterobacterias, el género *Salmonella* posee tres tipos de antígenos principales:

- Antígenos somáticos (O).
- Antígenos flagelares (Vi).
- Antígenos flagelares (H).

La determinación de estos antígenos mediante sueros específicos es lo que permite conocer la fórmula antigénica de una cepa y por tanto llevar a cabo su serotipado. El serotipado de las cepas se realizará según el esquema de Kaufmann-White-Le-Minor: para describir los serotipos de *Salmonella* se ha diseñado una fórmula antigénica que consta de tres partes, que expresan por

orden el antígeno somático, el antígeno flagelar de fase 1 y el antígeno flagela de fase 2 (O : H1 : H2).

Antígenos somáticos (O): Los antígenos somáticos se expresan con números. Se han individualizado gran número de factores antigénicos, 67 de los cuales se usan para la identificación serológica (O1 al O67).

Por otra parte, los serotipos se agrupan por serogrupos O. Cada uno de estos serogrupos está caracterizado por la presencia de un antígeno somático mayor, que estará siempre presente en cada uno de los serotipos incluidos en el serogrupo (**tabla 8**).

Los serogrupos se designaron inicialmente con las letras del alfabeto (de la A a la Z) y algunos grupos se dividieron en subgrupos (por ejemplo A, B, C₁ etc.). Más tarde a medida que se descubrieron nuevos factores fue necesario continuar la designación de los serogrupos con números (del 51 al 67). Actualmente se denomina cada serogrupo O por el antígeno somático característico de ese serogrupo. Las letras se mantienen provisionalmente entre paréntesis (por ejemplo O:4 (B)).

Aunque se han descrito 67 antígenos somáticos, sólo 46 de ellos se consideran como antígenos mayores, es decir que dan lugar a un serogrupo. El resto de los factores no poseen valor discriminatorio (por ejemplo O:12) o vienen determinados por conversión por fagos (por ejemplo O:5) y por tanto pueden aparecer o no. Estos antígenos somáticos denominados menores pueden aparecer en cepas pertenecientes a distintos serogrupos.

Tabla 8. Serogrupos O de *Salmonella*. Los antígenos mayores dentro de cada serogrupo se indican en negrita (Curso serotipado de *Salmonella* spp., 2010).

SEROGRUPO	ANTÍGENOS O	SEROGRUPO	ANTÍGENOS O
A	2,12	T	42
B	4,12	U	43
C ₁ -C ₄	6,7	V	44
C ₂ -C ₃	8	W	45
D ₁	9,12	X	47
D ₂	9,46	Y	48
D ₃	9,46,27	Z	50
E ₁ -E ₂ -E ₃	3,10	51	51
E ₄	1,3,9	52	52
F	11	53	53
G ₁ -G ₂	13	54	54
H	6,14	55	55
I	16	56	56
J	17	57	57
K	18	58	58
L	21	59	59
M	28	60	60
N	30	61	61
O	35	62	62
P	38	63	63
Q	39	65	65
R	40	66	66
S	41	67	67

Antígenos flagelares (H): En cuanto a los antígenos flagelares, los de la primera fase fueron denominados inicialmente con letras minúsculas y los de segunda fase con números. Cuando se usaron todas las letras del alfabeto comenzó a utilizarse la letra z con un subíndice para la primera fase, pero la complejidad de las

relaciones antigénicas llevó a la adición de letras a los antígenos de segunda fase.

Antígenos capsulares (Vi): Los antígenos capsulares en *Salmonella* pueden enmascarar los antígenos O y la bacteria no aglutinará con los antisueros O.

Uno de los antígenos capsulares más conocidos es el Vi, denominado así por su relación con la virulencia. Este antígeno sólo aparece en algunas cepas de tres de los serotipos de *Salmonella* conocidos: Typhi, Paratyphi y Dublín (las cepas de estos serotipos pueden tener o no el antígeno Vi).

El calentamiento a 100°C generalmente solubiliza el antígeno Vi y de esta manera las bacterias así tratadas pueden ser aglutinadas con antisueros O.

Presentación del esquema de símbolos: Cuando encontramos factores de los antígenos somáticos subrayados esto nos indica que ese factor puede estar presente o no, dependiendo de que el cultivo haya sido lisado por el fago correspondiente.

Cuando encontramos factores O ó H entre corchetes, esto quiere decir que ese factor puede estar presente o ausente independientemente de la conversión por fagos. Cuando los que están entre corchetes son factores H nos indica además que son factores que se encuentran excepcionalmente en las cepas salvajes. Cuando encontramos factores O ó H entre paréntesis esto nos indica que ese factor es débilmente aglutinable.

Grupo 54: Se ha demostrado que el factor 54 está determinado por un plásmido. Si el plásmido se pierde, el factor O:54 no se expresa. Se consideran los siguientes serovares:

- Toney como variante 54+ de Minnesota
- Winnipeg como variante 54+ de Ferruch
- Poeseldorf como variante 54+ de Kentucky
- Ochsenwerder como variante 54+ de Thompson
- Steiwerder como variante 54+ de Orion var. 15+
- Canton como variante 54+ de Hadar
- Barry como variante 54+ de Mbandaka
- Newholland como variante 54+ de Banana

Patrick en 2007 describió procedimiento de serotipado de *Salmonella* spp. detallado en este trabajo.

1.5. Técnicas de análisis serológico

Una herramienta diagnóstica útil, sencilla y económica para evaluar el contacto con el virus (y por lo tanto la presencia del mismo) es la serología,

La detección de anticuerpos (debidos a la vacunación o desafíos de campo) se realiza a través de la técnica ELISA y la inhibición de la hemaglutinación (IHA), entre otras.

Así, se ha realizado un análisis serológico de todas las enfermedades estudiadas excepto para *Salmonella*, es decir, para IA, NCD, MG e IBD.

El ELISA no presenta especificidad de cepas o tipo, pero es adecuado para analizar respuestas a la vacunación en condiciones de campo (De Wit *et al.*, 1997; Karaca y Naqi, 1993). Por esta técnica han sido analizadas las enfermedades de IA, MG e IBD.

El virus de NCD puede emplearse como un antígeno en una variedad amplia de pruebas serológicas, lo que permite que se utilicen las técnicas de neutralización o de ELISA e IHA para valorar el nivel de anticuerpos en las aves. En la actualidad, la prueba IHA es la más ampliamente utilizada para la detección de anticuerpos contra el NCD en las aves, aunque también se utilizan kits de ELISA comerciales para valorar los niveles de anticuerpos tras la vacunación. Normalmente, para el análisis de NCD se ha utilizado la técnica de inhibición de la hemaglutinación porque los kits de ELISA no son multiespecie frente a la técnica de IHA que sí que lo es. Se emplea de rutina la IHA para otras especies diferentes

de *broilers* y el uso del ELISA para el análisis de NCD supondría tener que aplicar técnicas diferentes dependiendo de la especie avícola a analizar.

1.5.1. Inmunoensayos

El ELISA (enzyme linked immunosorbent assay) es una técnica que permite detectar tanto antígenos (Ag) como anticuerpos (Ac). Para la detección, un enzima conjugado a un anticuerpo reacciona con el sustrato adecuado produciendo color. Entre los enzimas más utilizados tenemos la peroxidasa de rábano picante, la fosfatasa alcalina y la glucosa oxidasa.

Se han adaptado varios tipos de ELISA tanto para la detección de Antígenos como de Anticuerpos. La modalidad más frecuente de ELISA para la determinación de antígenos es el Sandwich. En cuanto a la determinación de anticuerpos específicos frente a un determinado antígeno se utilizan normalmente el ELISA indirecto y el de competición (aunque el ELISA de competición también puede utilizarse para la detección de Anticuerpos).

Sandwich: Si el análisis se realiza para determinar el antígeno presente en una muestra, utilizaremos un anticuerpo específico fijado a una fase sólida. Incubamos el suero problema que contiene el antígeno buscado en el pocillo con el anticuerpo específico. Después procedemos a un lavado para eliminar los componentes del suero que no han reaccionado. Seguidamente, añadiremos anticuerpo marcado enzimáticamente que se une al antígeno del

suero, formando así el “sandwich”. Se incuba y se procede a otro lavado para eliminar el exceso de anticuerpo conjugado que no ha reaccionado. Se añade el sustrato cromogénico específico del enzima y se produce un color cuya intensidad se mide por métodos espectrofotométricos. Esta intensidad es directamente proporcional a la concentración de antígeno presente en la muestra problema. En el caso de que el análisis se realice para buscar anticuerpo en el suero problema, usaremos pocillos recubiertos del antígeno específico. El resto de ensayo es similar al descrito.

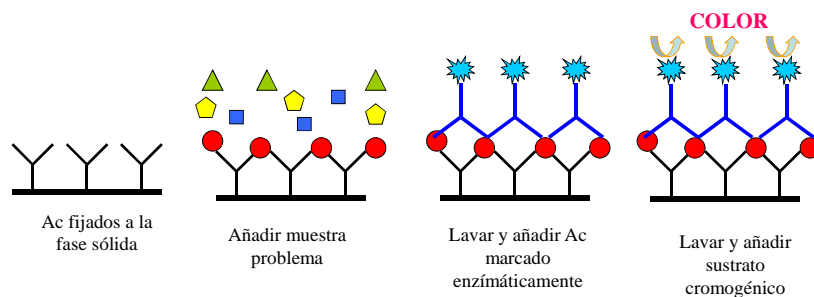


Figura 10. ELISA Sandwich.

Indirecto: Se inmoviliza el antígeno a la fase sólida del que queremos conocer si en el suero problema existen anticuerpos específicos. Se pueden utilizar proteínas virales o bacterianas e incluso virus completos como antígenos. El primer paso es la incubación de la muestra. Los anticuerpos presentes en la muestra se unirán al antígeno específico y el resto de los componentes se eliminarán por lavado. Luego se añade el anticuerpo conjugado

marcado enzimáticamente. El último paso es la adición de un sustrato cromogénico específico de ese enzima, y se producirá un color de intensidad directamente proporcional a la concentración de anticuerpo presente en la muestra problema.

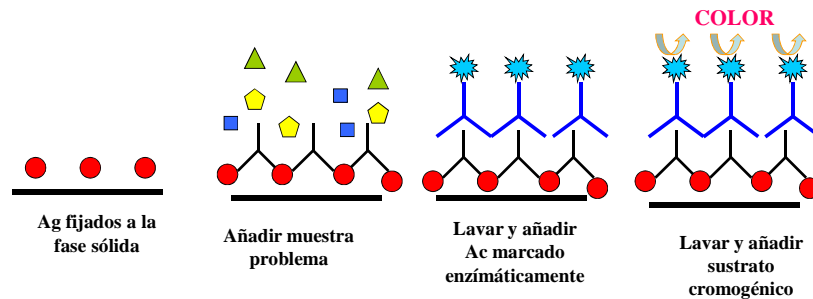


Figura 11. ELISA indirecto.

Competitivo: Se fija a la fase sólida un anticuerpo frente a un antígeno conocido. Previamente a la incubación en la placa de ELISA, ese incuba el suero problema con el antígeno. Al incubar se produce una competencia por los sitios de unión del anticuerpo. La mezcla anterior se deposita sobre los pocillos donde previamente se ha fijado un suero anti antígeno, se lava para eliminar resto y se añade el conjugado marcado enzimáticamente. Se lava el exceso y añadimos el sustrato. Se producirá un color, en este caso será inversamente proporcional a la concentración del anticuerpo presente en la muestra.

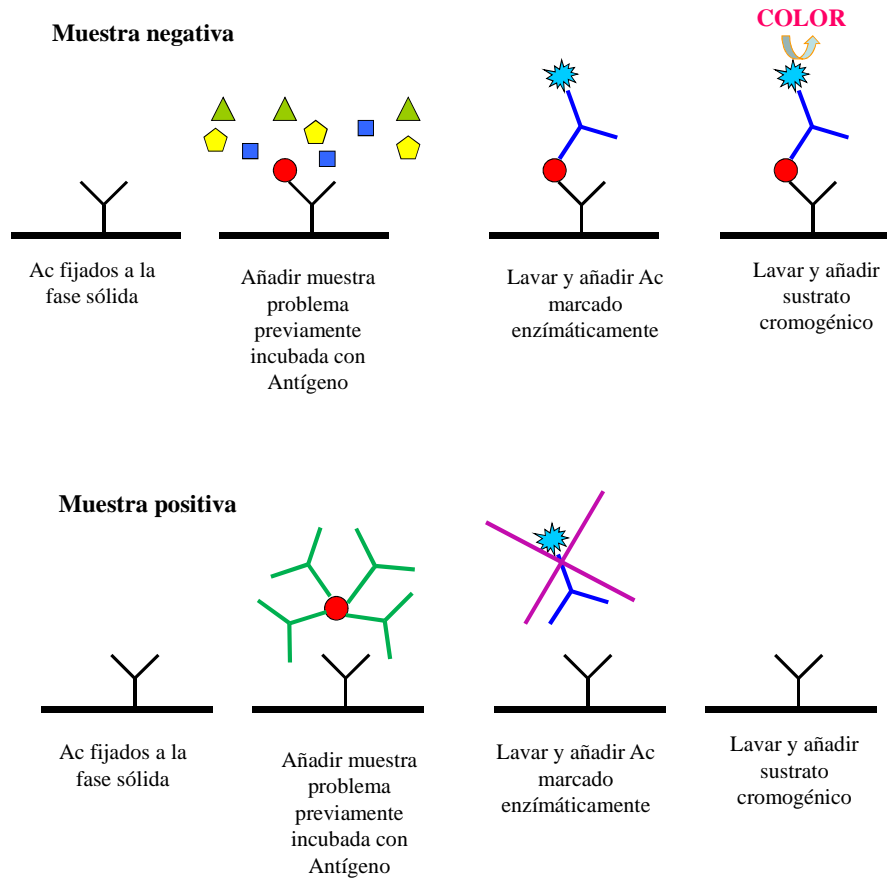


Figura 12. ELISA Competitivo.

1.5.2. Inhibición de la hemaglutinación

La prueba de inhibición de la hemaglutinación (IHA) es una prueba serológica con la que se puede cuantificar títulos de anticuerpos presentes en suero frente a un virus determinado. Estas pruebas se basan en la capacidad de algunos patógenos para causar

la aglutinación de los eritrocitos. Esto se demuestra haciendo reaccionar la mezcla de antígeno con anticuerpo (suero problema) con glóbulo rojo. Cuando los anticuerpos de un suero positivo se unen al antígeno, se produce la inhibición de la hemaglutinación y los eritrocitos sedimentan formando un botón o punto; en ausencia del anticuerpo específico se expresa la propiedad hemaglutinante del virus (**figura 13**).

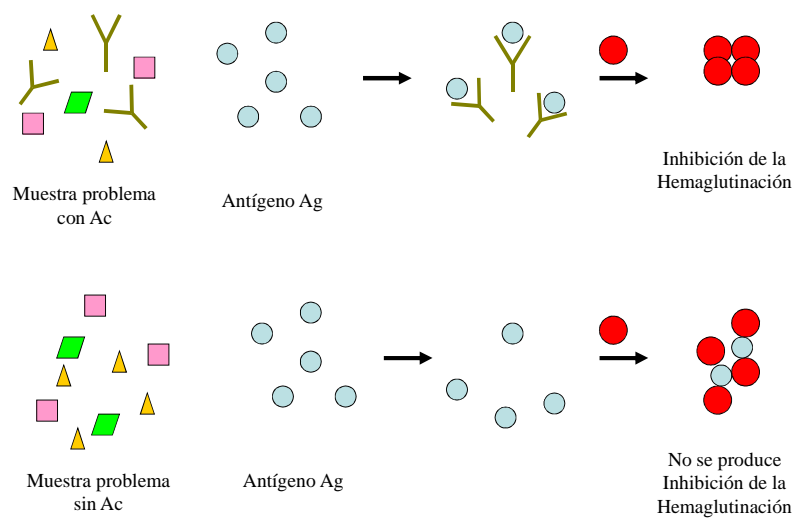


Figura 13. Inhibición de la hemaglutinación.

1.6. Vacunación en avicultura

La prevención y el control de las enfermedades infecciosas es de gran importancia en la avicultura.

Los principios básicos para la prevención y el control de las enfermedades infecciosas se basan en medidas de higiene y bioseguridad. Sin embargo, estas medidas no son suficientes para la protección de la avicultura intensiva contra las enfermedades infecciosas. Esto se debe principalmente a la alta concentración de poblaciones, lo que exige una continua mejora en la prevención de enfermedades. Por otra parte, en los últimos años han aparecido nuevas enfermedades o ha habido cambios en los cuadros de las enfermedades conocidas. Por tanto, deberá haber un compromiso entre la implementación de un manejo razonable, el cual incluya medidas profilácticas y terapéuticas.

La vacunación es el proceso por el cual se exponen individuos a un antígeno de un agente causante de una enfermedad para inmunizarlo contra el mismo. Una vez alcanzado este objetivo, los individuos se benefician de su inmunidad activa mientras que su progenie podrá beneficiarse a través de inmunidad maternal, conocida también como inmunidad pasiva.

La regulación específica de la vacunación frente a la IA está determinada por la Directiva 2005/94/EC, de 20 de diciembre, relativa a las medidas comunitarias de lucha contra la IA. Como principio general, la vacunación frente a la IA está prohibida, salvo en dos situaciones:

Vacunación preventiva, que se llevará a cabo cuando, por las características de determinadas zonas, tipo de producción o categoría de de aves de corral u otras aves cautivas, y basándose en un análisis de riesgo, se llegue a la conclusión de que se encuentran especialmente expuestos al virus. Se considera como una medida a largo plazo. En la situación actual española, sólo se prevé realizar o mantener este tipo de vacunación en determinados zoológicos.

Vacunación de urgencia, que se llevará a cabo como medida a corto plazo para contener un foco cuando una evaluación de riesgo indique que existe riesgo de difusión o de introducción de la IA, como resultado de la declaración de un brote en España o en un país cercano (ya sea o no de la Unión Europea), tras una cuidadosa evaluación del riesgo de difusión de estos brotes.

En el caso de *Salmonella*, NCD y MG sí está permitida la vacunación en el sector avícola, pero no se suele vacunar en *broilers* debido a su coste unitario, corto ciclo de vida productivo o ausencia de vacunas autorizadas.

Para el control de la enfermedad de IBD en *broilers*, según González y Balaguer (2011), uno de los mayores cambios sufridos en el organigrama de producción avícola en los últimos años en el mundo es la evolución y el protagonismo que han adquirido los programas de vacunación en la sala de incubación. La vacunación vía subcutánea o *in ovo* en la sala está cada vez más generalizada, y en el caso de la prevención frente a IBD, aproximadamente el 30% de los *broilers* vacunados frente a esta enfermedad en España en 2011 se vacunaron en sala de incubación.

1.7. Herramienta informática

La Asociación Avícola Valenciana (ASAV) había venido realizando mapas de seroprevalencia aplicados al sector avícola de la Comunidad Valenciana, donde se mostraban los resultados analíticos por comarca y por municipio para toda la comunidad, de forma manual y con periodicidad semestral. Se disponía de diferentes sistemas y herramientas informáticas que daban soporte a esta actividad, sin embargo no se disponía de ninguna herramienta que permitiera integrar la información de las diferentes aplicaciones y ofreciera un análisis sencillo y potente de la gran cantidad de resultados generados.

La elaboración de mapas dinámicos a lo largo del tiempo no es frecuente en el sector avícola. Por tanto, resultaría de gran utilidad proporcionar una herramienta informática que posibilite la explotación *on-line*, a través de Internet, de la información de resultados analíticos de serología de la Comunidad Valenciana. Esto permitirá la consulta del estatus sanitario a los servicios veterinarios oficiales y a los propios productores y veterinarios habilitados, permitiendo así la prevención de la propagación de los procesos patológicos.

Para ello se planteó el uso de la aplicación de *Business Intelligence* (BI) SaaS Litebi, en colaboración con la empresa Litebi y pionero a nivel internacional aplicado a este fin.

BI SaaS Litebi es una aplicación Web que permite integrar datos de cualquier origen, relacionarlos entre ellos y disponer de potentes posibilidades de análisis.

Actualmente la mayoría de las organizaciones y empresas poseen y generan diariamente una enorme cantidad de datos imposibles de analizar a simple vista. La mayor parte de estos datos generados no aportan la información necesaria a la toma de decisiones, pues para poder usarlos es necesario que se transformen en conocimiento útil. Estos datos se transforman en información cuando se analizan para estructurarlos de forma inteligente. En la actualidad, poseer un conocimiento proveniente de información comprensible, detallada, relevante y útil es vital para lograr y sostener una ventaja competitiva en el mundo empresarial. Para transformar los datos y convertirlo en información, y ésta a su vez, ser aprovechada como conocimiento, se necesitan distintas técnicas y procesos. A todos estos procesos de tratamiento de datos se les atribuye el término de BI o Inteligencia de Negocio. En la **figura 14** se puede observar el esquema clásico de una solución de BI (Arias, 2010).

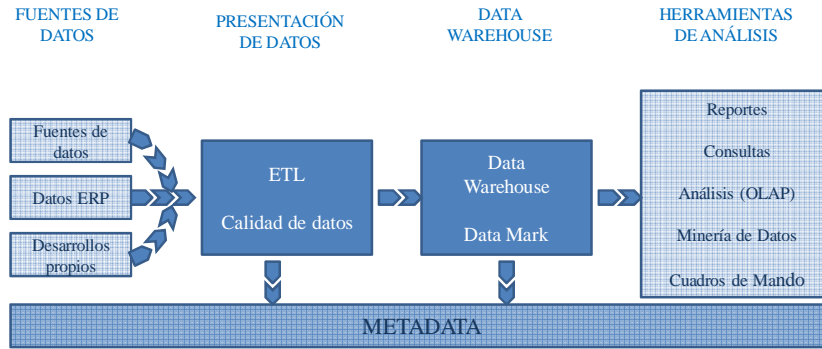


Figura 14. Esquema clásico de una solución de BI.

1.7.1. Integración de la información

Los procesos **Extraer, Transformar y Cargar** (*Extract, Transform and Load; ETL*) son los encargados de extraer datos de múltiples fuentes, darles formato y presentación, convertirlos en información útil y organizada, y cargarlos y almacenarlos en un almacén de datos o *data mart* para su posterior análisis a través de las herramientas disponibles:

- **Extraer:** Este paso se basa en extraer e integrar la información de diferentes fuentes (ERP, CRM, Excel) en el data warehouse. En este proceso de extracción se estandariza un formato para todos los datos que poblarán el data warehouse, ya que provienen de diferentes fuentes y cada una originalmente poseerá un formato propio.

- **Transformar:** En esta fase se ponen en práctica una serie de reglas de negocio para seleccionar únicamente la información necesaria para el data warehouse. Utilizando técnicas de filtrado, manipulación de datos y cálculos evitaremos almacenar información no necesaria, redundante o errónea.
- **Cargar:** En esta última fase los datos ya formateados, integrados y seleccionados se almacenan en el data warehouse.

Los procesos ETL adaptarán la información original en función del perfil del usuario final en distintos formatos de presentación, como pueden ser aplicaciones de análisis, informes, scorecards o cuadros de mando.

Se ha desarrollado una capa de metadatos capaz de incluir las estructuras (cubo y dimensiones) que alberguen y permitan el análisis de la información integrada. Los procesos de integración ETL, pueblan las estructuras de metadatos con la información necesaria para facilitar los análisis establecidos, a partir de la información de los orígenes de datos anteriormente indicados.

Las tres aplicaciones implicadas (Oralims, xCheck y Biochek) poseen herramientas integradas de reporting básico y exportación de información.

Oralims es una aplicación de gestión destinada para centros de investigación, desarrollo e innovación, y laboratorios de control

de calidad y pruebas. Esta aplicación posee módulos para conectar equipos de laboratorio, integrarse con Enterprise Resource Planning (ERP's) y para ofrecer servicios en línea. Este sistema se apoya en una base de datos Oracle.

Está basado en el concepto LIMS, una solución de tecnología de la información que permite a los usuarios modificar el formato de los datos sin tener conocimientos de programación y adaptarse de forma rápida y flexible a las nuevas necesidades laborales. Se trata de una solución modular estandarizada que permite incorporar módulos y procedimientos nuevos para adaptar el sistema a las necesidades del usuario.

Esta aplicación es utilizada para:

- **Registro de muestras:** Consiste en la identificación de las muestras que se van a analizar y registro de sus datos de origen. Los datos que se almacenan en este programa son: datos del cliente, tipo de muestra, tipo de ave, cantidad de muestra, veterinario responsable, número de muestras, determinaciones que se van a realizar, etc.
- **Introducción de resultados:** Después de la realización del análisis de las muestras, esta aplicación permite introducir los resultados. El resultado de los análisis puede ser un valor cualitativo (por ejemplo en *Salmonella*, el resultado es presencia o ausencia), cuantitativo (el resultado es un valor numérico), una matriz (por ejemplo en

la técnica de Inhibición de la Hemaglutinación) o, como en el caso del ELISA, un informe adjunto.

- **Validación de resultados:** Consiste en la comprobación de los datos y resultados asociados a la muestra.

Los informes de xCheck y Biochek se obtienen con unas aplicaciones orientadas a los análisis de muestras de avicultura y ganadería, utilizada por las casas comerciales Idexx y Biochek. Se trata de unas aplicaciones altamente editables por medio de plantillas y con gran capacidad de realizar exportaciones (Excel), informes y gráficas de los resultados analizados y con múltiples formatos de presentación.

Por medio de estas aplicaciones, se analiza una serie de muestras para determinar las enfermedades de IA y MG por xCheck e IBD por Biochek.

1.7.2. Módulos

BI SaaS Litebi es una plataforma de Inteligencia de negocios basada en cubos OLAP (*On-Line Analytical Processing*), Reportes, Cuadros de Mando y una Herramienta ETL de integración de datos. Esta plataforma BI permite definir un data warehouse completo, o simplemente cargar y analizar datos de un excel en pocos minutos.

Los módulos de los que se compone son:

- ***liteSpace***: Es el diccionario de datos de Litebi, contiene datos y estructuras de metadatos que serán utilizados en los procesos de análisis de información por el usuario, divididos en dos familias:
 - Estructurados: Cubos y dimensiones para el análisis OLAP. Enfocados al análisis cuantitativo.
 - No estructurados: Para análisis semánticos, textuales y de contenido. Enfocado al análisis conceptual.
- ***liteIntegrator***: Herramienta de integración de datos basada en la popular y potente herramienta de ETL Open Source Kettle de Pentaho, que pretende llevar la integración de información en organizaciones al entorno actual, en el que cada vez hay más información distribuida en múltiples formatos y fuentes en Internet.
- ***liteExplorer***: Una vez los datos están cargados en liteSpace mediante liteIntegrator es posible utilizar diferentes herramientas analíticas a través de la plataforma *liteExplorer*. Es una potente herramienta OLAP de análisis y exploración de datos estructurados, de uso sencillo orientada al usuario final, permite interactuar con la información *residente en* liteSpace, realizar operaciones de

exploración multidimensional, visualizar gráficamente los datos explorados, exportar los informes generados a formatos habituales como Excel y PDF y realizar operaciones de minería de datos (predicciones, extrapolaciones).

- ***liteMonitor***: Es la herramienta de cuadros de mando de Litebi (dashboards), permite al usuario diseñar cuadros de mando utilizando controles visuales para representar la información existente en LiteSpace: Tablas de datos OLAP, gráficas, alarmas, datos textuales, patrones, scorecards...etc., permitiendo la interacción mediante filtros y operaciones de drill-through. En definitiva, *liteMonitor* permite al usuario monitorizar los aspectos clave del negocio, integrando recursos.

Básicamente Litebi funciona en tres pasos:

1. Definir la información que se desea analizar a través de una interfaz web. Esto genera todas las estructuras de datos y metadatos (datawarehouse y modelos analíticos) necesarios para satisfacer las necesidades de información del cliente. Es a lo que se denomina como liteSpace.
2. Cargar la información proveniente de los sistemas del cliente (ERP, CRM, Excel, Web Services, etc.) a los modelos definidos en liteSpace. Para hacer

esto se apoya en un producto open source de ETL y una capa de servicios web que permite construir de forma sencilla procesos de integración de datos muy potentes. A este conjunto, que nos permite integrar la información que se desea analizar, se le denomina liteIntegrator.

3. Analizar una vez los datos residen en liteSpace, se cuenta con una herramienta de reporting avanzado (OLAP) con la que el usuario final puede, de forma muy sencilla y potente analizar desde cualquier punto de vista la información y generar sus propios informes que pueden ser compartidos a lo largo de toda la organización. Es el fin de los informes hecho a medida o el caos semi-gestionado a base de excels.

1.7.3. Representación geográfica y mapas de prevalencia y seroprevalencia

Para la elaboración de los mapas de prevalencia y seroprevalencia, se ha desarrollado un sistema de informes interactivos que permite, a un usuario no técnico interactuar con toda la información de forma dinámica y construir los informes necesarios a partir de las estructuras de metadatos definidas. Esta herramienta optimiza la preparación y consumo de la información sanitaria.

El objetivo era de disponer de una herramienta de visualización geográfica de los resultados por comarcas o municipios que permitiera poder tomar decisiones con eficacia y analizar la situación sanitaria avícola.

La herramienta permite realizar el análisis geográfico de los resultados obtenidos en el laboratorio utilizando sus potentes posibilidades de análisis basadas en cubos OLAP, Reportes y Cuadros de Mando. Así, es capaz de representar sobre un mapa la información sanitaria en forma de codificaciones de color. Esta herramienta permite, de forma automatizada presentar cualquier información analítica residente en las estructuras de metadatos del sistema sobre un mapa, a cualquier nivel de detalle geográfico. Por ejemplo permite representar un mapa resumen anual de los resultados de los análisis para un patógeno determinado para cada municipio a través de codificaciones de color, así como poder detectar un foco en concreto de una enfermedad que afecta al sector avícola.

2. OBJETIVOS

2. OBJETIVOS

Los objetivos de este trabajo fueron:

1. Obtener e integrar la información sanitaria de las explotaciones avícolas estudiadas.
2. Diseñar e implementar los mapas de seroprevalencia para el control de Influenza Aviar (IA), Enfermedad de Newcastle (NCD), *Mycoplasma gallisepticum* (MG), Enfermedad de Gumboro (IBD) y el mapa de prevalencia para el control de *Salmonella* spp.
3. Controlar y representar en un mapa dinámico la respuesta serológica después de una vacunación única *in ovo* frente a IBD, utilizando una vacuna de inmunocomplejos en pollos.

Estudiar cualitativamente la contaminación de *Salmonella* spp. en muestras de heces, hisopos cloacales y huevos (interior y exterior) de una explotación de gallinas ponedoras, previa al sacrificio por ser positiva a *Salmonella* serotipo Enteritidis en autocontroles de heces y en controles oficiales. Evaluar el efecto *in vitro* de bacteriófagos frente a *Salmonella* Enteritidis, inoculada en muestras de heces frescas de gallinas ponedoras.

3. CAPÍTULO EXPERIMENTALES

3. CAPÍTULOS EXPERIMENTALES

En los cinco *primeros* capítulos experimentales de esta Tesis Doctoral se diseñaron e implementaron mapas sanitarios en *broilers* con ayuda de la herramienta informática descrita *anteriormente*.

En concreto, tres mapas de seroprevalencia, uno por cada una de estas enfermedades: IA, NCD y *MG*; *un* cuarto de prevalencia de *Salmonella* spp., y por último, el quinto, donde se evaluó la respuesta serológica frente a la vacunación *in ovo* mediante vacunas por inmunocomplejos para la Enfermedad de Gumboro.

Debida a la importancia que tiene la *Salmonella* en el control sanitario del sector avícola, además del capítulo antes mencionado, se dedicaron dos capítulos más a este patógeno, el primero relacionado con el estudio comparativo de *Salmonella* en heces y huevos y el segundo, y último capítulo de la presente Tesis Doctoral, abordando el estudio *in vitro* del efecto de los bacteriófagos sobre la *Salmonella* en heces.

**3.1 CAPÍTULO PRIMERO:
DESARROLLO Y RESULTADOS DE UN
MAPA DE SEROPREVALENCIA DE LA
INFLUENZA AVIAR EN POLLOS DE
ENGORDE DE LA COMUNIDAD
VALENCIANA DURANTE LOS AÑOS 2008,
2009 Y 2010.**

3.1. Capítulo primero: Desarrollo y resultados de un mapa de seroprevalencia de la influenza aviar en pollos de engorde de la Comunidad Valenciana durante los años 2008, 2009 y 2010.

Resumen

El objetivo de este estudio fue diseñar e implementar un mapa seroprevalencia para influenza aviar de baja patogenicidad de declaración obligatoria (IANBP) en pollos de engorde en la Comunidad Valenciana basado en inteligencia de negocio. La herramienta de mapeo de software desarrollada para este estudio consistió en tres fases principales: recopilación de datos, análisis de datos y representación de datos. Para obtener los datos serológicos, se analizaron 8520 muestras de suero de granjas de pollos a lo largo de tres años. Los datos fueron representados en un mapa de la Comunidad Valenciana, incluyendo la información geográfica de la localización de la granja para facilitar el seguimiento de la enfermedad. No se reportaron signos clínicos de IANBP en las manadas estudiadas. Los datos de este estudio no mostraron evidencia de contacto con IANBP en manadas de pollos de engorde y la novedosa herramienta de mapeo de software resultó ser un método valioso para monitorear fácilmente la respuesta serológica frente a la gripe aviar, incluyendo información geográfica.

Introducción

La gripe aviar es una enfermedad viral causada por el tipo A Orthomyxoviridae (Capua y Alexander, 2001). Se incluye en la lista única de enfermedades de declaración obligatoria de la Organización Mundial de Sanidad Animal (OIE), así como en la lista de enfermedades de declaración obligatoria en la Unión Europea. El virus de la gripe contiene ocho segmentos de ARN de sentido negativo, y cada uno de codificación para una o más proteínas (Capua y Alexander, 2001).

La envoltura viral se cubre con proyecciones de glicoproteína de dos tipos: la hemaglutinina y la neuraminidasa (Fouchier *et al*, 2005). La hemaglutinina es el antígeno más importante del virus y uno de los determinantes de la capacidad infecciosa y patogénica facilitando la fijación y la penetración del virus en la célula huésped. La neuraminidasa juega un papel esencial en la liberación de virus de las células infectadas y su difusión a través del sistema respiratorio. Previene la agregación de las partículas virales y permite que el virus se propague a través de las secreciones respiratorias. La hemaglutinina representa el 25% de las proteínas virales, en comparación con el 5% para la neuraminidasa (Horimoto y Kawaoka, 2005).

Los virus de la gripe aviar son normalmente específicos de su huésped, pero pueden transmitirse entre individuos de especies estrechamente relacionadas e incluso se ha reportado la transmisión

a humanos (Banks *et al.*, 1998). En las aves de corral, los signos clínicos se presentan como alteraciones en los sistemas respiratorio, digestivo, urinario y los órganos reproductivos (Swayne *et al.*, 2013).

La vigilancia activa de este virus se basa en un muestreo y pruebas serológicas de aves contra las cepas H5 y H7. La vacunación de las aves de corral contra la gripe aviar está prohibida en España. Sin embargo, en caso de grave riesgo, la vacunación podría ser considerada una herramienta útil para combatir la gripe aviar, por lo que existe un plan de vacunación de urgencia.

Una herramienta de diagnóstico útil, fácil y barata para evaluar el contacto de las aves de corral con el virus de IA de baja patogenicidad de declaración obligatoria (IANBP) es la serología.

Por otra parte, un mapa seroprevalencia permite el monitoreo de la presencia, distribución y evolución de las enfermedades de los animales a través del tiempo y el espacio. La ubicación de la granja es de interés debido al alto potencial de contagioso de los virus IANBP. Por lo tanto, el desarrollo de estos mapas a intervalos específicos revela el comportamiento de estos procesos, que están vinculados a otros factores de riesgo, como el movimiento de las aves, la evolución del clima y otros factores ecológicos. El conocimiento de estos parámetros epidemiológicos ayuda a controlar la enfermedad y por lo tanto a minimizar su incidencia.

El objetivo de este trabajo fue controlar y representar geográficamente, con la ayuda de una novedosa herramienta de

mapeo, la respuesta serológica de los pollos de engorde de la Comunidad Valenciana frente a IANBP, mediante un kit de ensayo específico basado en inmunoabsorción ligado a enzimas (enzyme-linked immunosorbent assay, ELISA) disponible en el mercado.

Materiales y métodos

El estudio se llevó a cabo en granjas avícolas de pollos de engorde de la Comunidad Valenciana.

En primer lugar, describiremos de la herramienta de software, y a continuación, definiremos las pruebas serológicas asociadas realizadas.

La herramienta de software consta de tres fases principales: recopilación de datos, análisis de datos y representación de datos. Durante la primera fase de recopilación de datos, los procesos de extracción, transformación y carga (ETL) nos permitieron obtener datos de varias fuentes diferentes y cargarlo en una sola base de datos, para ser analizados en otro sistema operativo. De este modo, Oracle, Excel y xChek se integraron para este proyecto. Para el análisis de los datos, se desarrolló una aplicación informática *On-Line Analytical Processing* (OLAP), que permite un análisis dinámico y geográfico a través de la utilización de cubos multidimensionales que contienen información sanitaria, y la integración de los resultados para IANBP en las granjas de engorde en la Comunidad Valenciana, en colaboración con una empresa externa. Un cubo es una base de datos multidimensional, en la que

el almacenamiento físico de los datos se realiza en un vector multidimensional. Podemos considerar cubos OLAP como una extensión de las dos dimensiones de una hoja de cálculo en tres o más dimensiones, también llamado hipercubos. Finalmente, después de la obtención de los datos mediante los procesos ETL y analizarlos utilizando la herramienta de OLAP, el siguiente paso fue representar la información geográficamente. Un sistema de información geográfica (SIG) se integró con un servidor de código abierto llamado GeoServer. Esta herramienta genera información geográfica de España, tales como comunidades, provincias, regiones o ciudades. Asocia datos para cada muestra con el código de identificación de cada unidad geográfica. Esta información está contenida en el registro de explotaciones ganaderas (Registro General de Explotaciones Ganaderas, o REGA) para cada explotación, estableciendo así la relación entre SIG y OLAP. Los datos fueron categorizados en diferentes áreas, identificadas por colores, donde los valores de cada zona se podrían obtener haciendo clic sobre ellas.

En el período de tres años que abarca el presente estudio, se analizaron un total de 8520 muestras. Fueron analizadas 3315 muestras de 131 granjas de pollos en 2008; 2925 muestras de 173 granjas en 2009, y 2280 muestras de 145 granjas en 2010. Estas muestras se obtuvieron de animales de más de 30 días de edad, con 15 sueros tomados por cada manada o lote. La venopunción se realizó con una aguja o bisturí en la vena braquial y la sangre se recogió en un tubo de vidrio de 5 ml (un tubo por animal) para

obtener aproximadamente 3 ml de muestra. Los tubos se mantuvieron en posición horizontal a temperatura ambiente hasta la formación del coágulo y posteriormente se refrigeraron hasta su llegada al laboratorio. Una vez en el laboratorio, las muestras se registraron utilizando ORALIMS (Nobel Biocare AB, Gothenburg, Suecia), un programa basado en ORACLE. A cada lote de 15 sueros se le asignó un número de registro para mantener la trazabilidad durante todo el proceso de análisis y evaluación de los resultados. Las muestras se centrifugaron a 2500 revoluciones por minuto (rpm) durante 5 min. Los glóbulos rojos se depositaron en el fondo del tubo y el suero en la parte superior. Se recogieron 250 µl de cada muestra de suero aproximadamente en placas de 96 pocillos, que fueron identificados con su número de registro correspondiente.

Para el análisis, se utilizó FlockChek (Idexx Laboratories Inc., Westbrook, EE.UU.), un ensayo de inmunoabsorción diseñado para detectar anticuerpos frente la nucleoproteína del virus de influenza A en los sueros (**figura 15**). Los títulos se calcularon como se describe por el fabricante.

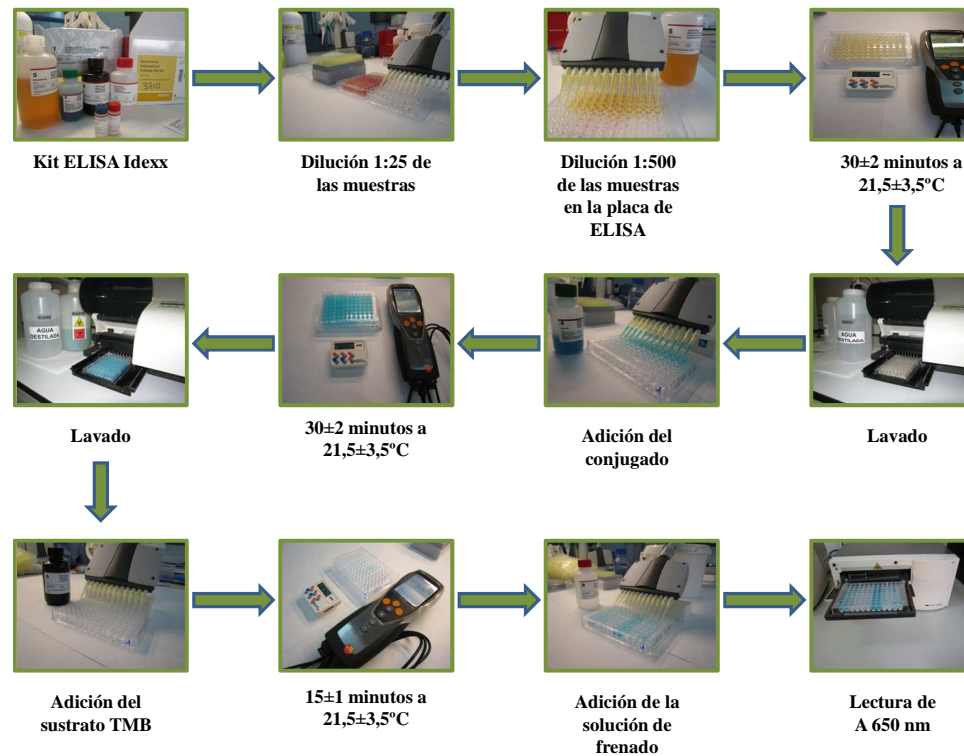


Figura 15. Preparación de las muestras y el procedimiento del ELISA de Idexx.

Resultados

La monitorización del estado sanitario de las explotaciones de engorde puede ser una herramienta para el control de enfermedades útil para los servicios técnicos veterinarios. En este estudio, se diseñó e implementó un mapa seroprevalencia para IANBP en pollos de engorde de la Comunidad Valenciana para evaluar la situación de la enfermedad en este territorio. Se empleó una aplicación informática para el análisis dinámico y geográfico OLAP, con cubos multidimensionales que contienen información sanitaria, integrando los resultados cualitativos de la serología de IANBP en las granjas de engorde en la Comunidad Valenciana. Con la herramienta de software, se obtuvieron mapas de seroprevalencia de IANBP en las granjas de engorde en la Comunidad Valenciana durante el año 2008, 2009 y 2010 (**figura 15, figura 16 y figura 17**).

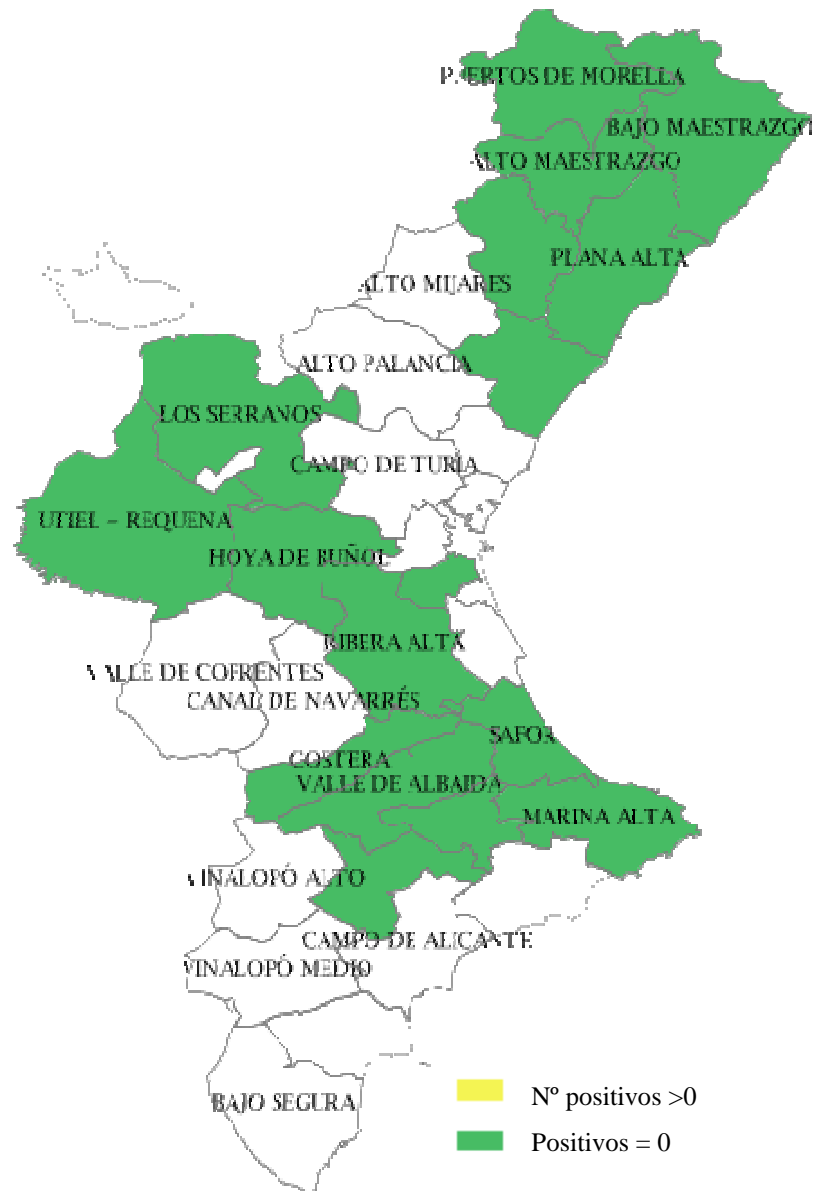


Figura 16. Mapa de seroprevalencia de IANBP en *broilers* de la Comunidad Valenciana en 2008.



Figura 17. Mapa de seroprevalencia de IANBP en *broilers* de la Comunidad Valenciana en 2009.

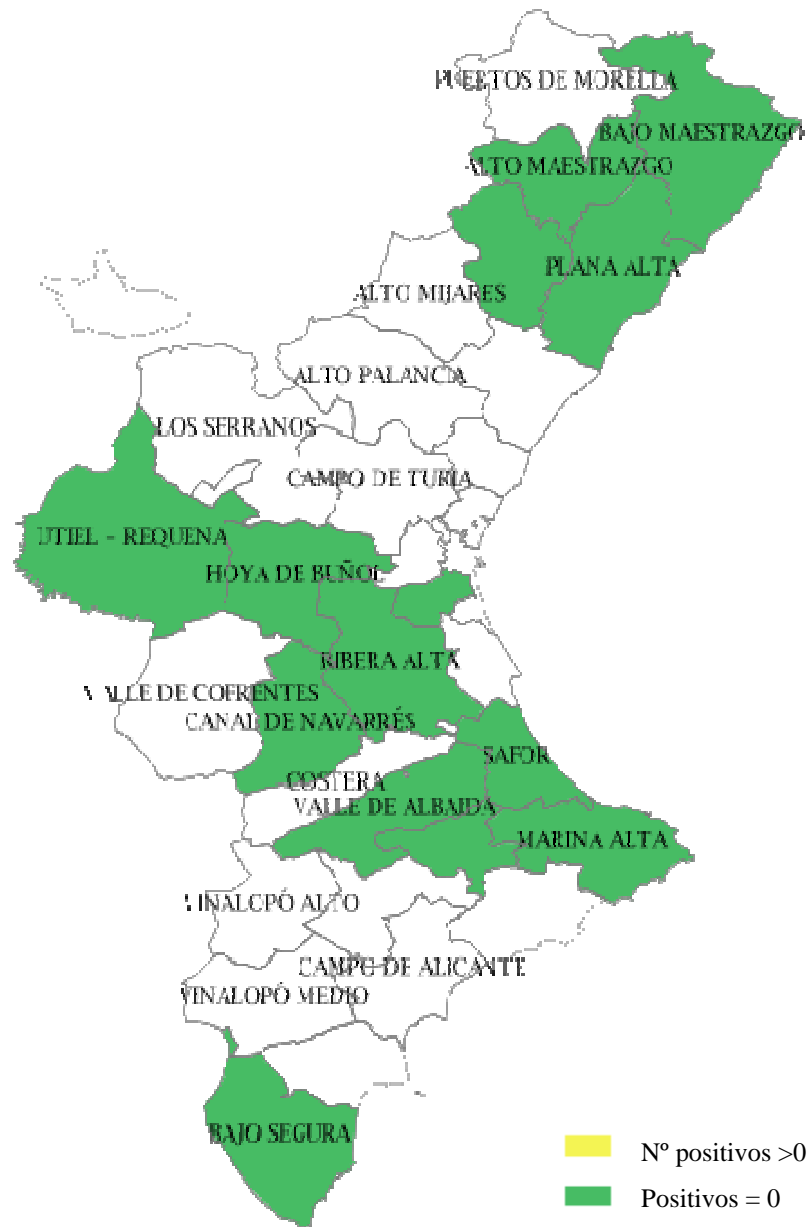


Figura 18. Mapa de seroprevalencia de IANBP en *broilers* de la Comunidad Valenciana en 2010.

Estos mapas muestran gráficamente los resultados cualitativos (positivo / negativo) obtenidos por ELISA (**tabla 9**).

Tabla 9. Títulos de referencia para IA de Idexx.

Tipo de ave	M/P	Interpretación	Color
<i>Broilers</i> >30 días	≤0,5	No vacunados y no infectados	Verde
	>0,5	Vacunados, seroconversión o desafío de campo	Amarillo

El resultado de una muestra se evalúa por la relación de muestra (del inglés *sample*, S) a positivo (P) (relación S/P):

$$S/P = \frac{\text{Absorbancia media muestra} - \text{Absorbancia media control negativo}}{\text{Absorbancia media control positivo} - \text{Absorbancia media control negativo}}$$

Esta herramienta nos permitió comparar la respuesta humoral frente a IANBP en diferentes lugares geográficos durante este período, destacando las posibles presiones de infección. La edad media de los animales muestreados en este estudio fue 42,34 días, con una desviación estándar (DE) de 8,44 en 2008; 40,64 días con una DE de 8,11 en 2009; y 41,13 días con una DE de 8,95 en 2010. La **tabla 10** muestra las regiones de la Comunidad Valenciana con el número de lotes analizados, el número de sueros testados, y el número de resultados positivos y negativos obtenidos. Todos los resultados fueron negativos, indicando que no existió infección en las explotaciones analizadas durante este periodo.

Tabla 10. Comarcas de la Comunidad Valenciana: N° de registros, muestras analizadas y resultados cualitativos obtenidos de IA.

COMARCA	Número de lotes			Número de muestras			Número de resultados negativos			Número de resultados positivos		
	2008	2009	2010	2008	2009	2010	2008	2009	2010	2008	2009	2010
Alcalatén	9	3	3	135	45	45	135	45	45	0	0	0
Alto												
Maestrazgo	12	7	9	180	105	135	180	105	135	0	0	0
Alto Palancia	0	1	0	0	15	0	0	15	0	0	0	0
Bajo												
Maestrazgo	50	44	35	750	660	525	750	660	525	0	0	0
Bajo Segura	0	1	1	0	15	15	0	15	15	0	0	0
Campo de												
Turia	0	1	0	0	15	0	0	15	0	0	0	0
Canal de												
Navarrés	0	0	2	0	0	30	0	0	30	0	0	0
Condado de												
Cocentaina	5	14	8	75	210	120	75	210	120	0	0	0

COMARCA	Número de lotes			Número de muestras			Número de resultados negativos			Número de resultados positivos		
	2008	2009	2010	2008	2009	2010	2008	2009	2010	2008	2009	2010
Costera	1	1	0	15	15	0	15	15	0	0	0	0
Hoya de Alcoy	3	0	0	45	0	0	45	0	0	0	0	0
Hoya de Buñol	4	1	1	60	15	15	60	15	15	0	0	0
Huerta Sur	2	1	1	30	15	15	30	15	15	0	0	0
Los Serranos	5	6	0	75	90	0	75	90	0	0	0	0
Marina Alta	4	1	3	60	15	45	60	15	45	0	0	0
Plana Alta	52	47	40	780	705	600	780	705	600	0	0	0
Plana Baja	1	2	0	15	30	0	15	30	0	0	0	0
Puertos de Morella	1	1	0	15	15	0	15	15	0	0	0	0
Ribera Alta	6	5	2	90	75	30	90	75	30	0	0	0
Safor	27	28	21	405	420	315	405	420	315	0	0	0
Utiel - Requena	4	3	3	60	45	45	60	45	45	0	0	0

COMARCA	Número de lotes			Número de muestras			Número de resultados negativos			Número de resultados positivos		
	2008	2009	2010	2008	2009	2010	2008	2009	2010	2008	2009	2010
Valle de												
Albaida	35	28	23	525	420	345	525	420	345	0	0	0
TOTAL	221	195	152	3315	2925	2280	3315	2925	2280	0	0	0

Discusión y conclusiones

Se espera que el consumo de carne de aves de corral siga creciendo en los próximos años, con Francia, el Reino Unido, los Países Bajos, Alemania, Italia, Polonia y España como principales países productores dentro de los (entonces) 27 Estados miembros de la Unión Europea (ahora 28) (Van Horne, 2007). González *et al.* recomendaron, en 2010, que la Comisión Europea discutiera la necesidad de evaluar las actividades de vigilancia con sus Estados Miembros para optimizar el diseño de un programa de vigilancia para IANBP en aves de corral. España lleva a cabo medidas de control contra la gripe aviar, ya que teniendo en cuenta el hecho de que con frecuencia se actualiza la legislación, la buena coordinación y comunicación entre las autoridades de sanidad animal y de salud pública son cruciales (Arteaga *et al.*, 2006). Los brotes de gripe aviar causan gran daño a la industria avícola, que conduce a la prohibición de exportación y al despoblamiento intensivos (Henzler *et al.*, 2003). La combinación de análisis en las explotaciones y las medidas de prevención, junto con el desarrollo de mapas de seroprevalencia son herramientas vitales en la tarea de mantener las aves de corral seguras. En 2013 se reportaron brotes de IA altamente patógena (IAAPN) en tres explotaciones avícolas en Italia: en Ostellato (en la provincia de Ferrara), Mordano (la provincia de Bolonia), y Portomaggiore, cerca de Ostellato, en la región de Emilia-Romagna. Estos brotes se produjeron los días 15, 21 y 23 de agosto de 2013, respectivamente (europa.eu/rapid/press-release_MEMO-13-753_en.htm). Además, recientemente se han

producido nuevos brotes de alta y baja patogenicidad en 2014 y 2015 (**tabla 11**).

Tabla 11. Brotes de IA recientes en 2014 y 2015.

País	Provincia	Comarca	Foco	Tipo foco	Fecha sospecha	Fecha confirmación	Nº animales	Especie	Serotipo	Patogenicidad
Alemania	Cuxhaven		2015/1	Aves de corral	27/02/2015	03/03/2015	23500	Aves de corral	H5	Baja
Hungría	Füzesgyarmet	Békés	2015/1	Aves de corral	23/02/2015	24/02/2015	21170	Patos de engorde	H5N8	Alta
Italia	Venecia		2015/2	Aves de corral	04/02/2015	06/02/2015	39	Aves de corral	H5	Baja
Reino Unido	Hampshire	Upham village	2015/1	Aves de corral	28/01/2015	02/02/2015	10539	Pavos reproductores	H7N7	Baja
Bulgaria	Burgas	Konstantinovo	2015/1	Aves de corral	30/01/2015	02/02/2015	22	Aves de corral	H5N1	Alta
Bulgaria	Burgas		2015/1	Aves silvestres	23/01/2015	26/01/2015	2	Pelicano ceñudo	H5N1	Alta
Italia	Arezzo		2015/1	Aves de corral	20/01/2015	24/01/2015	81	Aves de corral	H5	Baja
Alemania	Pomerania Occidental	Anklan	2015/2	Explotación de traspatio	Zona de protección del foco de Anklan	26/01/2015	36	Aves de traspatio	H5N8	Alta
Alemania	Ostvorpommern		2015/2	Aves cautivas	20/01/2015	20/01/2015	196	Aves cautivas	H5N8	Alta
Alemania	Pomerania Occidental	Anklan	2015/1	Explotación de traspatio	16/01/2015	20/01/2015	98	Gallinas, patos y gansos junto con otros animales de granja.	H5N8	Alta
Alemania	Rostock	Rostock	2015/1	Aves cautivas	07/01/2015	07/01/2015	496	Colección de aves de	H5N8	Alta

País	Provincia	Comarca	Foco	Tipo foco	Fecha sospecha	Fecha confirmación	Nº animales	Especie	Serotipo	Patogenicidad
								diferentes especies en un Zoo		
Alemania	Baja Sajonia	Emsland	2014/3	Aves de corral	20/12/2014	20/12/2014	10102	Patos de engorde	H5N8	Alta
Italia		Rovigo	2014/1	Aves de corral	15/12/2014	20/12/2014	31985	Pavos de engorde	H5N8	Alta
Alemania	Cloppenburg	Barssel	2014/2	Aves de corral	16/12/2014	17/12/2014	17887	Pavos de engorde	H5N8	Alta
Holanda	Zoeterwoude	Nine	2014/5	Aves de corral	29/11/2014	30/11/2014	28000	Gallinas ponedoras y reproductoras	H5N8	Alta
Holanda	Kamperveen	Seven	2014/4	Aves de corral	1 km del foco anteriormente notificado en Kamperveen	21/11/2014	14600	Gallinas ponedoras y reproductoras	H5N8	Alta
Holanda	Kamperveen	Seven	2014/3	Aves de corral	20/11/2014	21/11/2014	10000	Aves de corral reproductoras	H5N8	Alta
Holanda	Ter Aar	Nine	2014/2	Aves de corral	19/11/2014	21/11/2014	43000	Gallinas ponedoras	H5N8	Alta
Alemania	Mecklenburg-Vorpommern	Isla de Rügen	2014/1	Aves silvestres	N/A	17/11/2014	1	Aves silvestres	H5N8	Alta
Reino Unido	Yorkshire	East Riding	2014/1	Aves de corral	14/11/2014	16/11/2014	6000	Patos	H5N8	Alta
Holanda	Hekendorp	Twelve	2014/1	Aves de corral	14/11/2014	16/11/2014	150000	Gallinas ponedoras y reproductoras	H5N8	Alta
Alemania	Mecklenburg-Vorpommern	Uecker-Randow	2014/1	Aves de corral	04/11/2014	05/11/2014	30939	Pavos de engorde	H5N8	Alta

Aunque el origen exacto de la infección no ha sido identificado en la mayoría de los brotes de gripe aviar altamente patógena, las aves acuáticas silvestres se han sugerido como la fuente más probable de virus IANBP, que se convierten en virus IAAPN en muchos brotes de virus IAAPN (excluyendo, por el momento, los causados por la línea Asiática de virus IAAPN H5N1). Sin embargo, la circulación de un virus IANBP en los sistemas avícolas industrializados, aunque se considera un factor importante en la aparición de algunas cepas IAAPN, no es un requisito esencial para la génesis de un virus de la gripe aviar altamente patógena (FAO, 2013).

El mapa de seroprevalencia desarrollado en el presente estudio puede filtrar los resultados por varias métricas, como el tiempo (año, trimestre, mes o día) o geografía (provincia, comarca o municipio). Si se produce un brote de IANBP, sería necesario prevenir la propagación de la infección monitoreando y restringiendo los movimientos de aves de corral y de los productos animales que podrían estar infectados; fortaleciendo las medidas de bioseguridad en todos los niveles de la producción avícola a través de la limpieza y desinfección de las instalaciones infectadas; estableciendo zonas de protección y vigilancia alrededor del foco y, en caso necesario, mediante la vacunación. Thomas *et al.* (Thomas *et al.*, 2005) plantearon la hipótesis de que la introducción de la gripe aviar en una explotación, que tuvo lugar en los Países Bajos en 2003, podría haber sido causado por, en orden de importancia relativa:

- Los transportes de aves de corral
- Infección horizontal
- Personal en la industria avícola que manejan aves e entran en los gallineros (por ejemplo, ayudantes de granja, funcionarios, transportistas de huevo)
- Las aves silvestres infectadas
- La transferencia mecánica de heces de granjas comerciales con aves silvestres infectadas y otras plagas, o cerdos en las explotaciones mixtas.

Estos autores sugirieron que la falta de control de la enfermedad se debió al hecho de que los datos de SIG en lugares agrícolas no estaban disponibles. El uso de los SIG es muy importante en la determinación de los factores de riesgo. La literatura refleja el uso de la tecnología SIG en la prevención de enfermedades de las aves en países como Italia y China. Ehlers *et al.* (Ehlers *et al.*, 2003) aplica esta tecnología en el marco de un plan de contingencia implementado durante la epidemia de 1999 a 2001 de la gripe aviar en Italia. Los brotes en 1999-2000 en Lombardía y Véneto fueron asignados, utilizando la interfaz entre la tasa de incidencia de la infección y el sistema de información geográfica denominada GRASS 5.0 (Chang *et al.*, 2007). En China, Chang *et al.* (2007) desarrollaron la herramienta IV Sequence Distribution Tool (IVDT), similar a los SIG, que busca en los datos de coordenadas y después dibuja el mapa de distribución. A nivel mundial, Boulos y Burden (Boulos *et al.*, 2007) aplicaron una Web-Based Really Simple Syndication (RSS) alimentada de

noticias sobre la gripe aviar e incluyendo información de Google Maps. El precursor de este sistema fue diseñado por la Organización de Alimentación y Agricultura de las Naciones Unidas (Food and Agriculture Organization, FAO), que, en 1994, desarrolló un sistema de información sanitaria mundial basado en la web llamada EMPRES-i, que se aplicó a la IAAP, entre otras enfermedades (Martin *et al.*, 2007). Este sistema fue desarrollado utilizando diversas fuentes de información, como los sitios web oficiales de la OIE, la Organización Mundial de la Salud, Comisión Europea, los Gobiernos y los Ministerios de Agricultura. Además de estas fuentes oficiales, los datos se han extraído de las listas de correo como ProMed, GPHIN, o AI-watch y se trazan noticias sobre la gripe aviar a través de la investigación en Internet. Vietnam, en colaboración con el Centro de Investigación Agronómica para el Desarrollo (French Agricultural Research Centre for Development, CIRAD), desarrolló el SIG y Agent-based Modelling Architecture (GAMA) plataforma de simulación (Amouroux *et al.*, 2009).

El uso de los mapas de seroprevalencia durante 2008, 2009 y 2010 mostró, en tiempo real, que no hubo contacto con los virus IANBP en las granjas de engorde en la Comunidad Valenciana y demostró la utilidad de este método para el seguimiento de la respuesta serológica, incluida la información geográfica.

**3.2 CAPÍTULO SEGUNDO:
DESARROLLO Y RESULTADO DE UN
MAPA DE SEROPREVALENCIA DE
PARAMIXOVIRUS TIPO 1 EN POLLOS DE
ENGORDE DE LA COMUNIDAD
VALENCIANA DESDE EL AÑO 2008 HASTA
EL AÑO 2012.**

- 3.2. Capítulo segundo:** Desarrollo y resultado de un mapa de seroprevalencia de paramixovirus tipo 1 en pollos de engorde de la Comunidad Valenciana desde el año 2008 hasta el año 2012.

Resumen

El objetivo de este estudio fue diseñar e implementar un mapa seroprevalencia basado en inteligencia de negocio para paramixovirus tipo 1 (APMV-1) de declaración obligatoria en pollos de engorde en la Comunidad Valenciana. La herramienta de mapeo de software desarrollada para este estudio consistió en tres fases principales: recopilación de datos, análisis de datos y representación de datos. Para obtener los datos serológicos, se analizaron 12495 muestras de suero de granjas de pollos a lo largo de cinco años. Los datos fueron representados en un mapa de la Comunidad Valenciana, incluyendo la información geográfica de la localización de la granja para facilitar el seguimiento de la enfermedad. No se reportaron signos clínicos de APMV-1 en las manadas estudiadas. Los datos de este estudio no mostraron evidencia de contacto con APMV-1 en manadas de pollos de engorde y la novedosa herramienta de mapeo de software resultó ser un método valioso para monitorear fácilmente la respuesta serológica frente al paramixovirus tipo 1, incluyendo información geográfica.

Introducción

La enfermedad de Newcastle (NCD) es una enfermedad sumamente contagiosa incluida en la lista de la Organización Mundial de Sanidad Animal (OIE) y la lista de enfermedades de declaración obligatoria en España (Orden ARM/831/2009, 2009) y la Unión Europea (Directiva 82/894 / CEE) (82/894/EEC, 1982). NCD es causada por un paramixovirus aviar tipo 1 (APMV-1). Estos virus, llamados APMV-1 virus o virus de la enfermedad de Newcastle (NDV), son miembros del género *Avulavirus* en la familia *Paramyxoviridae* (Alexander, 2000). Las cepas de APMV-1 se clasifican en cinco patotipos dependiendo de su virulencia en los pollos. El primero es el patotipo asintomático entérico, que generalmente consiste en la infección enterica subclínica. Las cepas lentogénicas son menos virulentas, mesogénica son moderadamente virulentas, y velogénica son las más virulentas. Los virus velogénicos pueden subdividirse en forma neurotrópico, que está típicamente relacionado con signos respiratorios y neurológicos y lesiones viscerotrópicas asociadas con el sangrado del intestinal (Beard *et al.*, 1993). El período de incubación varía en aves de corral de 2 a 15 días dependiendo de la virulencia de la cepa y la susceptibilidad de la población. Los síntomas clínicos varían con la patogenicidad de la cepa y especies de aves. En pollos, las cepas lentogénicas típicamente causan infecciones subclínicas o enfermedad respiratoria leve, con tos, respiración con silbido y estornudos. Las cepas mesogénicas pueden causar enfermedad respiratoria aguda y signos neurológicos en algunos

pollos, pero la tasa de mortalidad es generalmente baja. Las cepas lentogénicas o mesogénicas pueden causar síntomas más graves si la manada es co-infectada con otros patógenos (Al-Garib *et al.*, 2003). La mayoría de ellos son de baja patogenicidad, y las infecciones son asintomáticas. A pesar de que no causan normalmente enfermedad grave en las aves silvestres, una vez introducidos en las aves de corral pueden mutar a cepas altamente patógenas (Dimitrov *et al.*, 2010).

El reciente aumento en el número de epidemias de NCD notificadas en España y en otros países miembros de la Unión Europea (UE), junto con la falta de identificación de la fuente de las epidemias españolas causan preocupación por la vulnerabilidad que nuestro país tiene a la enfermedad (Sanchez-Vizcaino *et al.*, 2010). Una herramienta útil, fácil y barata para evaluar el contacto con el virus es la serología. El mapa de seroprevalencia permite monitorizar la presencia, distribución y evolución de las enfermedades animales a través del tiempo y el espacio.

La ubicación de la granja es de interés debido al alto potencial de contagioso de los virus APMV-1. Por lo tanto, el desarrollo de estos mapas a intervalos específicos revela el comportamiento de estos procesos, que están vinculados a otros factores de riesgo, como el movimiento de las aves, la evolución del clima y medidas de seguridad. El conocimiento de estos parámetros epidemiológicos ayuda a controlar la enfermedad y por lo tanto a minimizar su incidencia.

En Europa, la OIE proporciona “Mapas de Distribución de Enfermedades” incluyendo NCD, por países y por períodos de seis meses o por meses del año. Esta herramienta de monitorización se puede mejorar mediante la adición de factores seleccionables como información en tiempo real, tipo de producción, y unidades geográficas menores (comunidades, provincias o comarcas). Actualmente, no existe tal herramienta a disposición de los veterinarios en España.

El objetivo de este trabajo fue controlar y representar geográficamente, con la ayuda de una novedosa herramienta de mapeo, la respuesta serológica de los pollos de engorde de la Comunidad Valenciana frente a APMV-1, mediante la técnica de la Inhibición de la Hemaglutinación (IHA).

Métodos y materiales

El estudio se llevó a cabo en granjas avícolas de pollos de engorde ubicadas en la Comunidad Valenciana.

En primer lugar, describiremos de la herramienta de software, y a continuación, definiremos las pruebas serológicas asociadas realizadas.

La herramienta de software empleada figura detallada en el capítulo primero, y aquí únicamente fue optimizada para alimentarse con la información de NCD de ORALIMS.

En el período de cinco años que abarca el presente estudio, se analizaron un total de 12495 muestras. Fueron analizadas 3345

muestras de 131 granjas de pollos en 2008; 2925 muestras de 173 granjas en 2009; 2280 muestras de 145 granjas en 2010; 2430 muestras de 147 granjas en 2011 y 1515 muestras de 127 granjas en 2012. Estas muestras se obtuvieron de animales de más de 30 días de edad, con 15 sueros tomados por cada manada o lote. La venopunción se realizó con una aguja o bisturí en la vena braquial y la sangre se recogió en un tubo de vidrio de 5 ml (un tubo por animal) para obtener aproximadamente 3 ml de muestra. Los tubos se mantuvieron en posición horizontal a temperatura ambiente hasta la formación del coágulo y posteriormente se refrigeraron hasta su llegada al laboratorio. Una vez en el laboratorio, las muestras se registraron utilizando ORALIMS (Nobel Biocare AB, Gothenburg, Suecia), un programa basado en ORACLE. A cada lote de 15 sueros se le asignó un número de registro para mantener la trazabilidad durante todo el proceso de análisis y evaluación de los resultados. Las muestras se centrifugaron a 2500 revoluciones por minuto (rpm) durante 5 min. Los glóbulos rojos se depositaron en el fondo del tubo y el suero en la parte superior. Se recogieron 250 µl de cada muestra de suero aproximadamente en placas de 96 pocillos, que fueron identificados con su número de registro correspondiente.

Para el análisis, la técnica de Inhibición de la Hemaglutinación (IHA) se llevó a cabo como se describe en el Manual de la OIE sobre animales terrestres (OIE, 2008). Varios orthomyxovirus y paramixovirus aviares son hemaglutinantes, tales como IA, virus de la enfermedad de Newcastle, Adenovirus, Síndrome de Caída de la

Puesta y Virus de la Bronquitis Infecciosa. Esta hemaglutinación generalmente ocurre como resultado de la presencia de receptores naturales (hemaglutinina) en la superficie del virus.

En primer lugar, las placas con fondo en "V" fueron identificadas y se dispensaron 25 μ L s de PBS en pocillos de la placa. Se añadieron 25 μ L s de la muestra a testar en el primer pocillo de cada fila, 25 μ L s de control positivo y negativo de control y después, se hicieron diluciones seriadas 1:2 desde el primer pocillo. Se dispensaron 25 μ L de la disolución de antígeno a cuatro unidades de actividad de hemaglutinación (4UHA), las placas se agitaron 30 segundos en las placas agitador horizontal y se incubaron durante 30 minutos a temperatura ambiente. Después, se dispuso 25 μ L s de la suspensión de glóbulos rojos al 1% en toda la placa, las placas se agitaron durante aproximadamente 30 segundos en la placa de agitador horizontal y se incubaron 40 minutos a temperatura ambiente. El título de IHA es la dilución mayor de suero que causa la inhibición completa de 4UHA de antígeno. La aglutinación se valoró inclinando las placas. El procedimiento de ensayo se esquematiza en la **figura 19**.

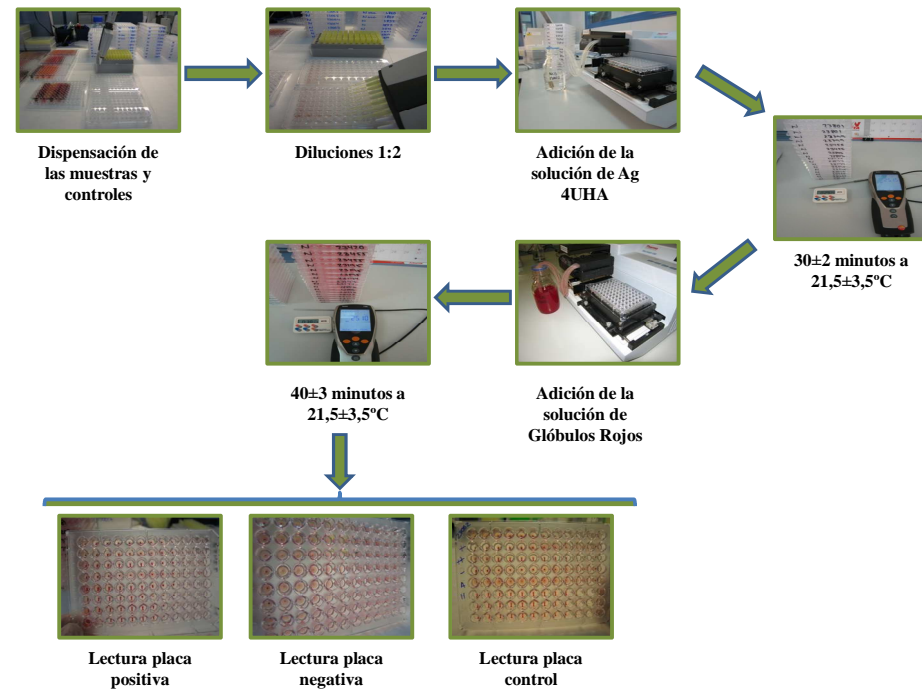


Figura 19. Preparación de las muestras y el procedimiento de Inhibición de la Hemaglutinación.

Se consideró que muestran inhibición sólo aquellos pocillos en los que la corriente de glóbulos rojos se produce a la misma velocidad que los pocillos control (que contienen 25 μ L de Glóbulos Rojos y 25 μ L de PBS). La validez de los resultados se evaluó frente a un suero control negativo, que no presentó presentar un título mayor de $\frac{1}{4}$ ($>2^2$), y un suero control positivo para el cual el título se encontró entre una de las diluciones del título conocido.

Hubo que tener en cuenta que se puede producir un efecto pro-zona. Se trata de una hemaglutinación en la placa de la inhibición debido a la concentración excesiva de anticuerpos en el suero. Ejemplo:

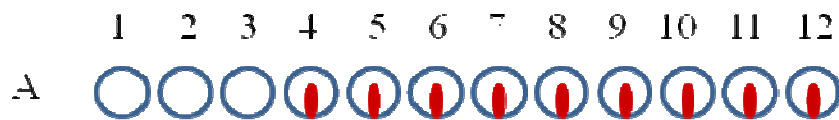


Figura 20. Efecto pro-zona. En este caso en los pocillos 1, 2, 3 se produce el efecto pro-zona y sin embargo el título del suero sería 10 que es donde se produce una inhibición completa de la hemaglutinación.

El valor de la serología en el diagnóstico está relacionado claramente con el estado inmune esperado de las aves afectadas. Los títulos de IHA pueden considerarse positivos si hay inhibición a una dilución del suero de $1/16$ (2^4) o superiores, contra 4 UHA de antígeno.

Resultados

La monitorización del estado sanitario de las explotaciones de engorde es una herramienta para el control de enfermedades utilizada por los servicios técnicos veterinarios. En este estudio, se diseñó e implementó un mapa seroprevalencia para APMV-1 en pollos de engorde de la Comunidad Valenciana para evaluar la situación de la enfermedad en este territorio. Se empleó una aplicación informática para el análisis dinámico y geográfico OLAP, con cubos multidimensionales que contienen información sanitaria, integrando los resultados cuantitativos de los títulos de APMV-1 de la serología en las granjas de engorde en la Comunidad Valenciana. Con la herramienta de software, se obtuvieron mapas de seroprevalencia de APMV-1 en las granjas de engorde en la Comunidad Valenciana durante los años 2008, 2009, 2010, 2011 y 2012 (**figura 21, figura 22, figura 23, figura 24 y figura 25**). Se representaron los títulos más bajos en verde, los más altos en rojo y los valores intermedios en amarillo. Este código de colores depende de los valores obtenidos en el periodo analizado. Así, se puede comparar respuestas humorales frente a NCD para ese periodo en regiones geográficas diferentes, delimitando posibles presiones de infección. Se debe considerar el valor absoluto para la interpretación correcta.

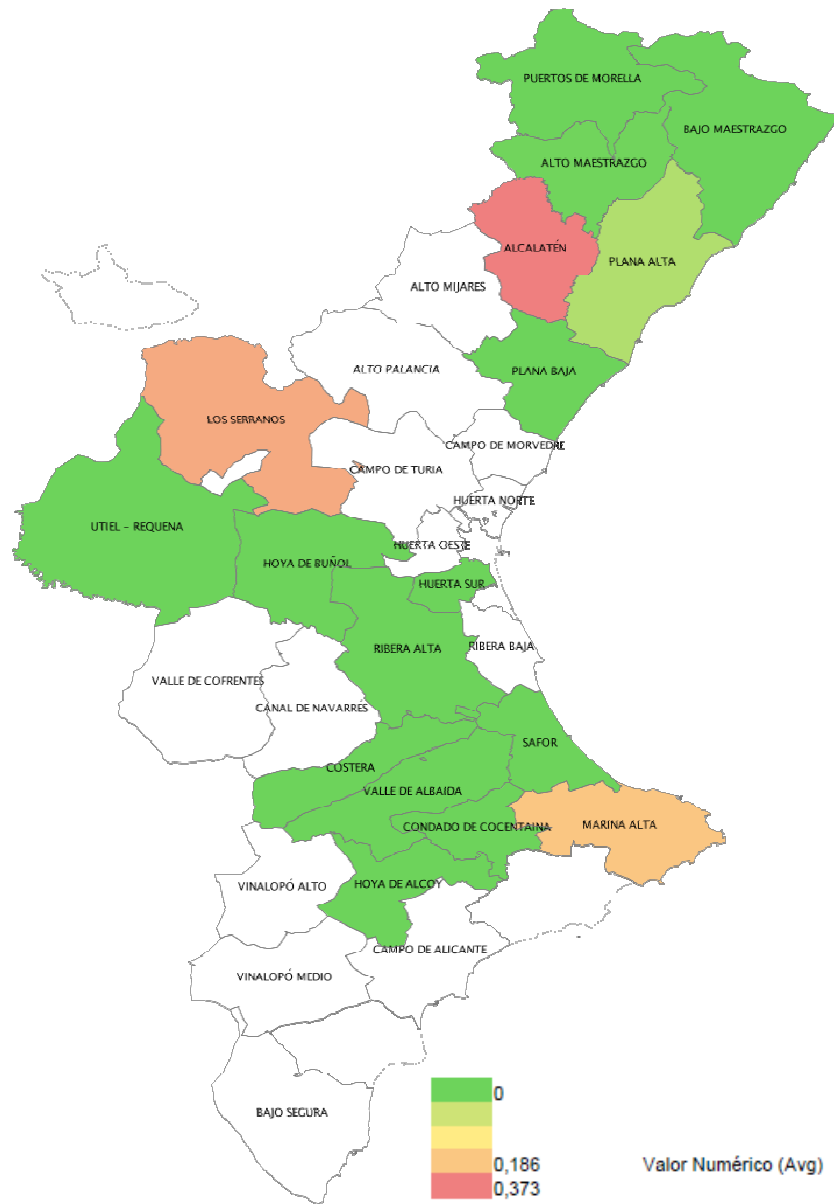


Figura 21. Mapa de seroprevalencia de APMV-1 en *broilers* de la Comunidad Valenciana en 2008.

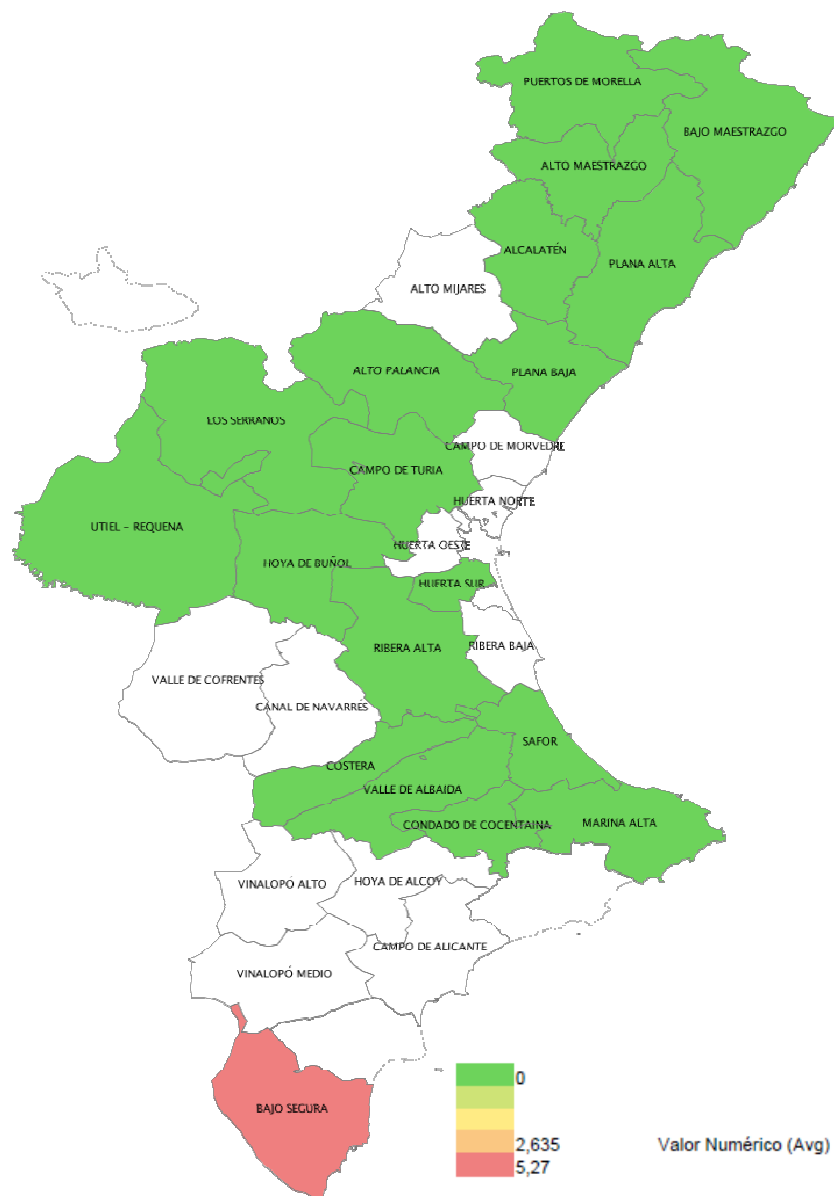


Figura 22. Mapa de seroprevalencia de APMV-1 en *broilers* de la Comunidad Valenciana en 2009.

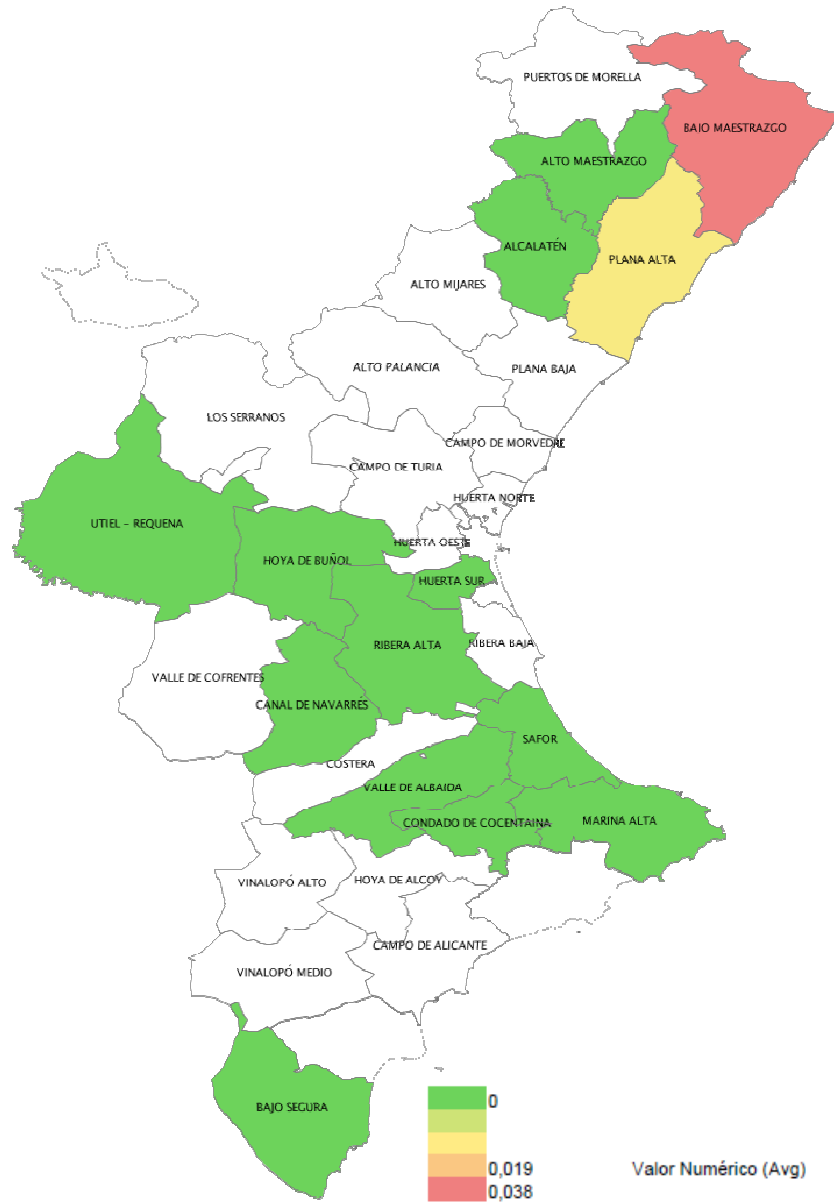


Figura 23. Mapa de seroprevalencia de APMV-1 en *broilers* de la Comunidad Valenciana en 2010.

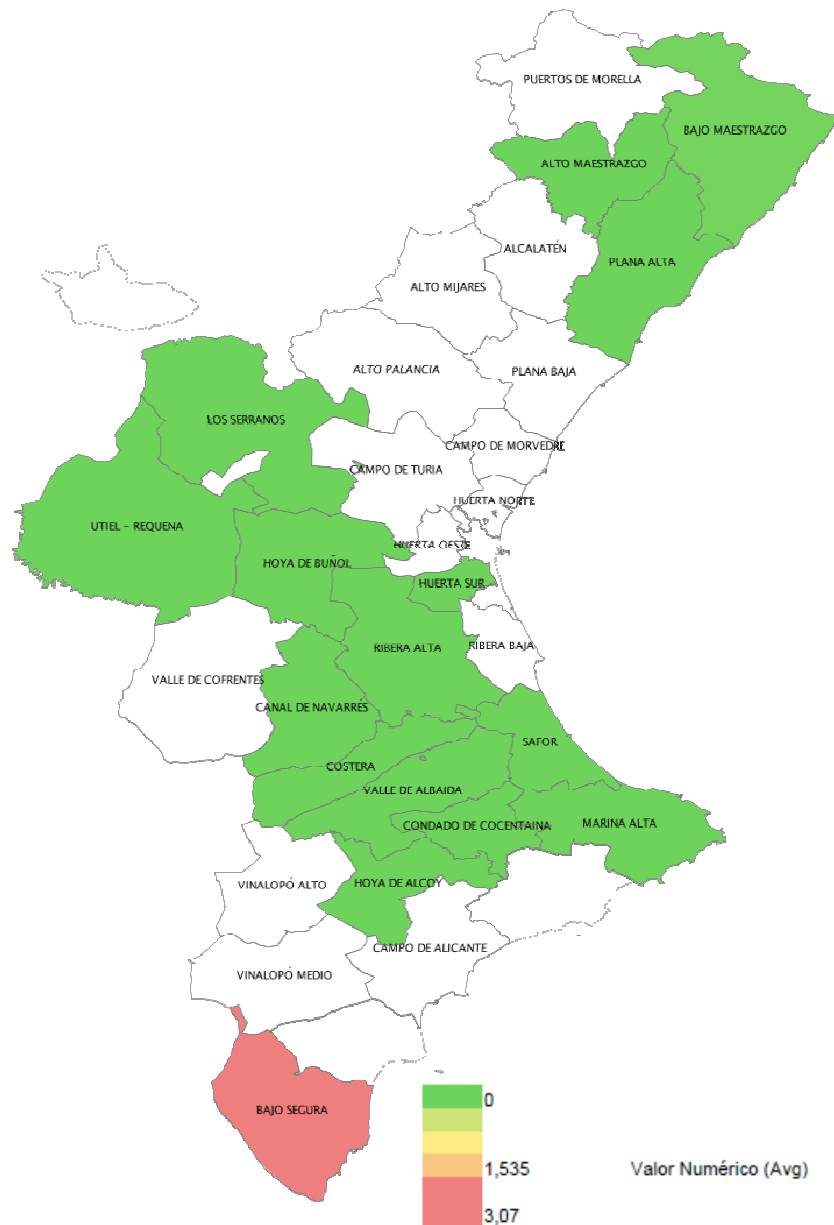


Figura 24. Mapa de seroprevalencia de APMV-1 en *broilers* de la Comunidad Valenciana en 2011.

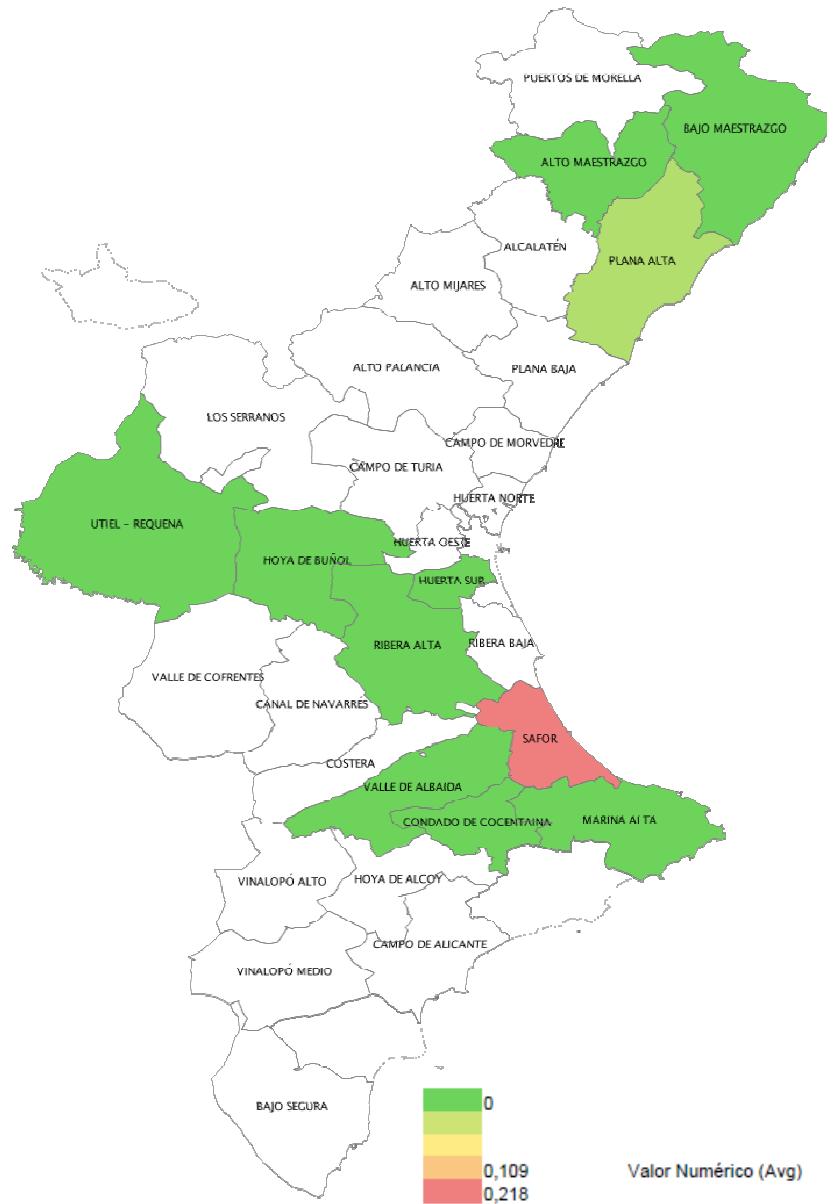


Figura 25. Mapa de seroprevalencia de APMV-1 en *broilers* de la Comunidad Valenciana en 2012.

Esta herramienta nos permitió comparar la respuesta humoral frente a APMV-1 en diferentes lugares geográficos durante este período, destacando las posibles presiones de infección. La edad media de los animales muestreados en este estudio fue 42,34 días, con una DE de 8,44 en 2008; 40,64 días con una DE de 8,11 en 2009; y 41,13 días con una DE de 8,95 en 2010; 41,74 días con una DE de 13,27 en 2011 y 40,49 días con una DE de 10,81 en 2012. Las **tablas 12, 13, 14, 15 y 16** muestran las regiones de la Comunidad Valenciana con el número de lotes analizados, el número de sueros testados, y los títulos promedio de IHA en 2008, 2009, 2010, 2011 y 2012, respectivamente.

Tabla 12. Comarcas de la Comunidad Valenciana: número de lotes, número de muestras y título medio de IHA en 2008.

2008			
Comarca	Número de lotes	Número de muestras	Título medio de IHA
Alcalatén	10	150	0,37
Alto Maestrazgo	13	195	0,00
Bajo Maestrazgo	50	750	0,00
Condado de Cocentaina	5	75	0,00
Costera	1	15	0,00
Hoya de Alcoy	3	45	0,00
Hoya de Buñol	4	60	0,00
Huerta Norte			
Huerta Oeste			
Huerta Sur	2	30	0,00
Los Serranos	5	75	0,30
Marina Alta	4	60	0,25
Plana Alta	52	780	0,09
Plana Baja	1	15	0,00
Puertos de Morella	1	15	0,00
Ribera Alta	6	90	0,00
Ribera Baja			
Safor	27	405	0,00
Utiel - Requena	4	60	0,00
Valle de Albaida	36	540	0,00
Total	224	3360	

Tabla 13. Comarcas de la Comunidad Valenciana: número de lotes, número de muestras y título medio de IHA en 2009.

2009			
Comarca	Número de lotes	Número de muestras	Título medio de IHA
Alcalatén	3	45	0,00
Alto Maestrazgo	7	105	0,00
Alto Palancia	1	15	0,00
Bajo Maestrazgo	44	660	0,00
Bajo Segura	1	15	5,27
Campo de Turia	1	15	0,00
Condado de Cocentaina	14	210	0,00
Costera	1	15	0,00
Hoya de Buñol	1	15	0,00
Huerta Sur	1	15	0,00
Los Serranos	6	90	0,00
Marina Alta	1	15	0,00
Plana Alta	47	705	0,00
Plana Baja	2	30	0,00
Puertos de Morella	1	15	0,00
Ribera Alta	5	75	0,00
Safor	28	420	0,00
Utiel - Requena	3	45	0,00
Valle de Albaida	29	435	0,00
Total	196	2940	

Tabla 14. Comarcas de la Comunidad Valenciana: número de lotes, número de muestras y título medio de IHA en 2010.

2010			
Comarca	Número de lotes	Número de muestras	Título medio de IHA
Alcalatén Alto	3	45	0,00
Maestrazgo Bajo	9	135	0,00
Maestrazgo Bajo Segura	35	525	0,04
Canal de Navarrés	1	15	0,00
Condado de Cocentaina	2	30	0,00
Hoya de Buñol	8	120	0,00
Huerta Sur	1	15	0,00
Marina Alta	1	15	0,00
Plana Alta	3	45	0,00
Ribera Alta	40	600	0,02
Safor	2	30	0,00
Utiel - Requena	21	315	0,00
Valle de Albaida	3	45	0,00
Total	152	2280	

Tabla 15. Comarcas de la Comunidad Valenciana: número de lotes, número de muestras y título medio de IHA en 2011.

2011			
Comarca	Número de lotes	Número de muestras	Título medio de IHA
Alto Maestrazgo	8	120	0,00
Bajo Maestrazgo	36	540	0,08
Bajo Segura	1	15	3,07
Canal de Navarrés	1	15	0,00
Condado de Cocentaina	12	180	0,00
Costera	1	15	0,00
Hoya de Alcoy	1	15	0,00
Hoya de Buñol	1	15	0,00
Huerta Sur	1	15	0,00
Los Serranos	1	15	0,00
Marina Alta	3	45	0,00
Plana Alta	40	600	0,01
Ribera Alta	4	60	0,00
Safor	23	345	0,00
Utiel - Requena	4	60	0,00
Valle de Albaida	25	375	0,00
Total	162	2430	

Tabla 16. Comarcas de la Comunidad Valenciana: número de lotes, número de muestras y título medio de IHA en 2012.

2012			
Comarca	Número de lotes	Número de muestras	Título medio de IHA
Alto Maestrazgo	7	105	0,00
Bajo Maestrazgo	24	360	0,00
Condado de Cocentaina	3	45	0,00
Hoya de Buñol	1	15	0,00
Huerta Sur	1	15	0,00
Marina Alta	3	45	0,00
Plana Alta	30	450	0,05
Ribera Alta	1	15	0,00
Safor	15	225	0,22
Utiel - Requena	1	15	0,00
Valle de Albaida	15	225	0,00
Total	101	1515	

El único resultado positivo durante el periodo en estudio fue en el Bajo Segura en 2009, sin sintomatología reportada. Se determinó como un falso positivo mediante técnicas moleculares (Reacción en Cadena de la Polimerasa, PCR). Probablemente la reacción cruzada con otros paramixovirus o cepas vacunales de explotaciones de recrias cercanas fue la causa de este resultado de IHA. Estos resultados indican que, para el periodo analizado, no hubo contacto con el virus en las granjas de engorde de la Comunidad Valenciana.

Discusión y conclusiones

Se espera que el consumo de carne de aves de corral siga creciendo en los próximos años, con Francia, el Reino Unido, los Países Bajos, Alemania, Italia, Polonia y España como principales países productores dentro de los (entonces) 27 Estados miembros de la Unión Europea (ahora 28) (Soberano *et al.*, 2009). De 2000 a 2009 en la Unión Europea (UE), se detectaron virus virulentos de NCD en aves silvestres, palomas domésticas y aves de corral, en los Estados Miembros (Alexander, 2011). La ley aplicable en el control de NCD en la Unión Europea es la Directiva 92/66 / CEE. Debido a que esta enfermedad es altamente transmisible, la política de Estados Unidos tiene como objetivo lograr la detección temprana y prevenir la propagación o asegurar su rápida erradicación de los animales. Para llevar a cabo esta premisa son necesarios trazabilidad y vigilancia para determinar la fuente de infección y vías de propagación de la enfermedad.

El riesgo de introducción de patógenos de enfermedades en el país y la propagación del agente dentro del mismo depende de una serie de factores que incluyen los controles de importación, circulación de animales y productos para mascotas y la bioseguridad aplicada por los productores de ganado. En un estudio previo realizado en el sur de España, la mayor incidencia de APMV-1 a 3 en las aves silvestres se registró en el verano, mientras que en las especies domésticas la prevalencia alcanzó su

máximo en el invierno (Maldonado *et al.*, 1994). Un plan de contingencia adecuado es un instrumento importante en la preparación y el manejo de una epidemia. La legislación de la UE exige que todos los Estados miembros elaboren un plan de contingencia que especifique las medidas nacionales necesarias para mantener el alto nivel de concienciación y preparación y que se aplicará en caso de brote de la enfermedad (Westergaard, 2008). Los enfoques más eficaces para controlar la propagación del APMV-1 incluyen estrictas medidas de bioseguridad, la vigilancia continua y la erradicación de los lotes infectados. La rápida expansión de la industria avícola en todo el mundo en áreas geográficas restringidas y las graves pérdidas económicas debidas a APMV-1 conducen la puesta en marcha nuevas herramientas de seguimiento (OIE, 2009).

El monitoreo de la situación sanitaria de las explotaciones de engorde es una herramienta para los servicios técnicos veterinarios para el control de enfermedades. Estos mapas dinámicos de seroprevalencia para paramyxovirus-1 aplicados en pollos de engorde de la Comunidad Valenciana podría ser una herramienta eficaz para el control de NCD, lo que puede ayudar a los veterinarios y Servicios Veterinarios Oficiales a estar mejor preparados para combatir esta enfermedad.

**3.3 CAPÍTULO TERCERO:
DESARROLLO Y RESULTADOS DE UN
MAPA DE SEROPREVALENCIA DE
MYCOPLASMA GALLISEPTICUM EN
POLLOS DE ENGORDE EN LA
COMUNIDAD VALENCIANA DURANTE
LOS AÑOS 2009 Y 2010.**

3.3. Capítulo tercero: Desarrollo y resultados de un mapa de seroprevalencia de *Mycoplasma gallisepticum* en pollos de engorde en la Comunidad Valenciana durante los años 2009 y 2010.

Resumen

El objetivo de este estudio fue diseñar e implementar un mapa seroprevalencia para *Mycoplasma gallisepticum* en pollos de engorde en la Comunidad Valenciana basado en inteligencia de negocio. Para obtener los datos serológicos se analizaron 7363 muestras de granjas de pollos de engorde de más de 30 días de edad durante dos años (3813 y 3550 muestras en 2009 y 2010, respectivamente, de 189 y 193 granjas de pollos de engorde en 2009 y 2010, respectivamente). Los datos fueron representados en un mapa de la Comunidad Valenciana, incluyendo la información geográfica de la localización de la granja para facilitar el seguimiento de la enfermedad. En cuanto a los títulos medios de ELISA, sólo una comarca presentó valores superiores a 500 en el periodo de 2009, lo que indica un contacto previo con MG en manadas de pollos de engorde. El resto de regiones no mostraron la presión de la infección, lo que indica una seroprevalencia baja para MG. Además, los datos de este estudio presentan una novedosa herramienta de mapeo para monitorear fácilmente la respuesta serológica, incluyendo información geográfica.

Introducción

Mycoplasma gallisepticum (MG) es una bacteria causante de una enfermedad en aves incluida en la Organización Mundial de Sanidad Animal (OIE) y la lista de enfermedades transmisibles en España (Orden ARM / 831/2009).

MG pertenece al género *Mycoplasma* de la clase *Mollicutes*, orden *Mycoplasmatales*, familia *Mycoplasmataceae* (David, 2008). Es particularmente importante en pollos y pavos como causa de enfermedades respiratorias y de la disminución de la producción de carne y huevos (Bradbury *et al.*, 2001; Pillai *et al.*, 2003). En las aves, la infección se transmite verticalmente a través de los huevos infectados y horizontalmente a través del contacto entre las aves, por aspiración de polvo contaminado, agua potable, utensilios contaminados y a través de intermediarios como el hombre (Marois *et al.*, 2002). El período de incubación en condiciones experimentales puede variar de 6 a 21 días, pero aparentemente es muy difícil determinar el momento preciso de la infección en condiciones naturales; las aves infectadas pueden ser asintomáticas durante varios días o meses antes de experimentar el estrés (Dingfelder *et al.*, 1991). Los signos clínicos de MG en aves varían de infección subclínica a los síntomas respiratorios obvios, como los estornudos, conjuntivitis y tos (Pillai *et al.*, 2003). También puede ser característica la sinusitis unilateral o bilateral, particularmente en pavos y aves de caza, y puede ocurrir que los senos infraorbitario estén tan hinchados que los párpados se

cierren. La conjuntivitis con secreción ocular de espuma es también una característica común en pavos y aves de caza, y a veces en los pollos. A menudo los pavos se manchan las plumas de las alas como resultado de los intentos para eliminar el exudado de los ojos. La gravedad de la enfermedad está fuertemente influenciada por el grado de infección secundaria con virus tales como la enfermedad de Newcastle y la bronquitis infecciosa, y bacterias tales como *Escherichia coli* (Fischer *et al.*, 1997).

Una herramienta de diagnóstico útil, sencilla y barata para evaluar el contacto con las bacterias es la serología.

Por otra parte, la elaboración de un mapa seroprevalencia permite el monitoreo de la presencia, distribución y evolución de las enfermedades de los animales a través del tiempo y el espacio. La ubicación de la explotación es de interés debido a la posibilidad de contagio de MG a otras explotaciones cercanas.

Así, el desarrollo de estos mapas a intervalos específicos de tiempo puede revelar el comportamiento de estos procesos, que están vinculados a otros factores de riesgo, como el movimiento de las aves, la evolución del clima y otros factores ecológicos.

El conocimiento de estos parámetros epidemiológicos puede ayudar a controlar la enfermedad y por lo tanto a minimizar su incidencia.

En Europa, la OIE proporciona "mapas de distribución de enfermedades", incluyendo MG, por países y por períodos mensuales o semestrales. Sin embargo, esta herramienta sanitaria no incluye otros factores importantes como que la información sea

en tiempo real, datos sobre el tipo de producción avícola e información sobre unidades geográficas menores a la del país (comunidades, provincias o comarcas). Actualmente no existen herramientas de mapeo similares disponibles incluyendo estas características mencionadas para el control de MG en pollos de engorde en España por los servicios técnicos veterinarios.

El objetivo de este trabajo fue desarrollar un Mapa Dinámico de Seroprevalencia para MG en pollos de engorde de la Comunidad Valenciana que fuera una herramienta útil para el control de su incidencia por los servicios técnicos veterinarios, y que constituye una fuente de información adicional para su prevención.

Materiales y métodos

El estudio se llevó a cabo en granjas de pollos no vacunados frente a MG en la Comunidad Valenciana.

En primer lugar, describiremos la herramienta de software, y a continuación, definiremos las pruebas serológicas asociadas realizadas.

La herramienta de software empleada figura detallada en el capítulo primero, y aquí únicamente fue optimizada para alimentarse con la información de MG de xCheck.

Los datos fueron categorizados en diferentes áreas, identificadas por colores, donde los valores de cada zona se podrían obtener haciendo clic sobre ella.

En el período de dos años que abarca el presente estudio, se analizaron un total de 7363 muestras. Fueron analizadas 3813 muestras de 189 granjas de pollos en 2009 y 3550 muestras de 193 granjas en 2010. Estas muestras se obtuvieron de animales de más de 30 días de edad, con 15 sueros tomados por cada manada o lote. La venopunción se realizó con una aguja o bisturí en la vena braquial y la sangre se recogió en un tubo de vidrio de 5 ml (un tubo por animal) para obtener aproximadamente 3 ml de muestra. Los tubos se mantuvieron en posición horizontal a temperatura ambiente hasta la formación del coágulo y posteriormente se refrigeraron hasta su llegada al laboratorio. Una vez en el laboratorio, las muestras se registraron utilizando ORALIMS (Nobel Biocare AB, Gothenburg, Suecia), un programa basado en ORACLE. A cada lote de 15 sueros se le asignó un número de registro para mantener la trazabilidad durante todo el proceso de análisis y evaluación de los resultados. Las muestras se centrifugaron a 2500 revoluciones por minuto (rpm) durante 5 min. Los glóbulos rojos se depositaron en el fondo del tubo y el suero en la parte superior. Se recogieron 250 µl de cada muestra de suero aproximadamente en placas de 96 pocillos, que fueron identificados con su número de registro correspondiente. Para el análisis, se utilizó FlockChek (Idexx Laboratories Inc., Westbrook, EE.UU.), un ensayo de inmunoabsorción diseñado para detectar anticuerpos frente a MG. Los títulos se calcularon como se describe por el fabricante. El esquema de trabajo utilizado para MG fue el mismo que para IA.

Resultados

La monitorización del estado sanitario de las explotaciones de engorde es una herramienta para el control de enfermedades utilizada por los servicios técnicos veterinarios.

En este estudio, se diseñó e implementó un mapa seroprevalencia para MG en pollos de engorde de la Comunidad Valenciana para evaluar la situación de la enfermedad en este territorio. Se empleó una aplicación informática para el análisis dinámico y geográfico OLAP, con cubos multidimensionales que contienen información sanitaria, integrando los resultados cuantitativos (títulos de MG) en las granjas de engorde en la Comunidad Valenciana. Con la herramienta de software, se obtuvieron mapas de seroprevalencia de MG en las granjas de engorde en la Comunidad Valenciana durante el año 2009 y 2010 (**figuras 26 y 27**), en las que se representa los títulos más bajos en verde, los más altos en rojo y los valores intermedios en amarillo, agrupados por comarcas, como unidad geográfica.

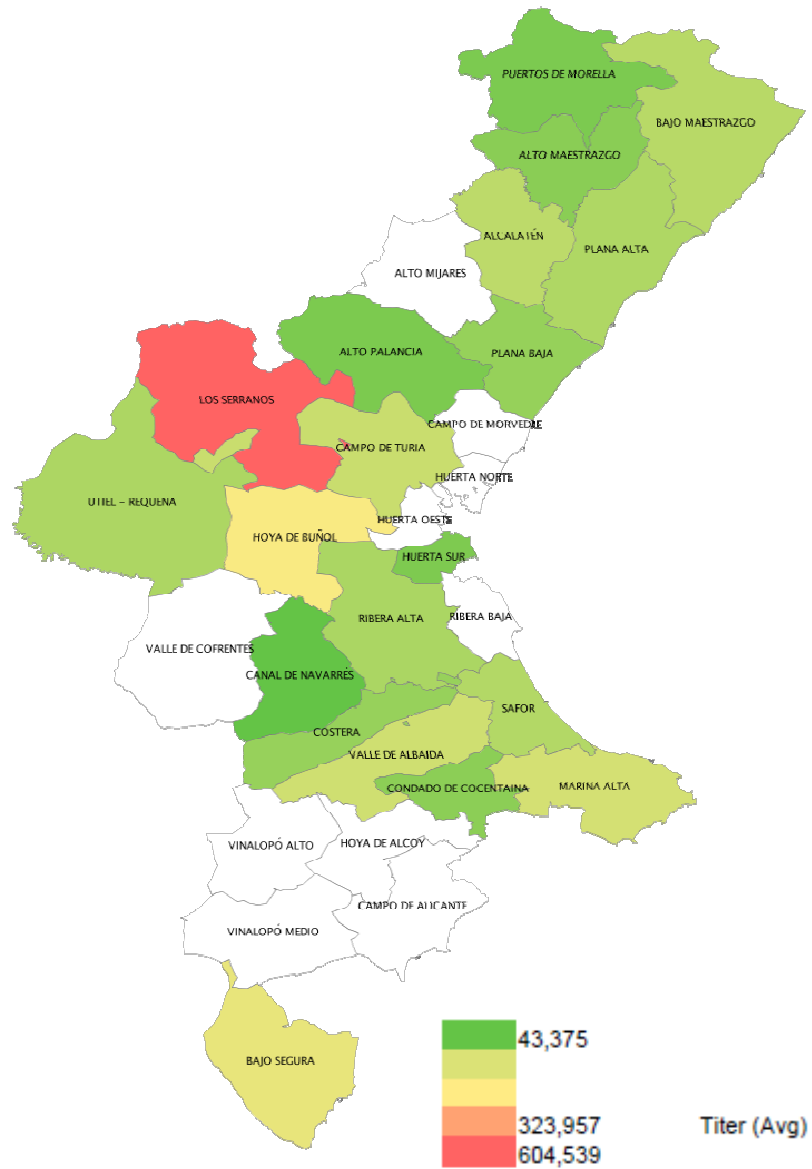


Figura 26. Mapa de seroprevalencia de MG en *broilers* de la Comunidad Valenciana en 2009.

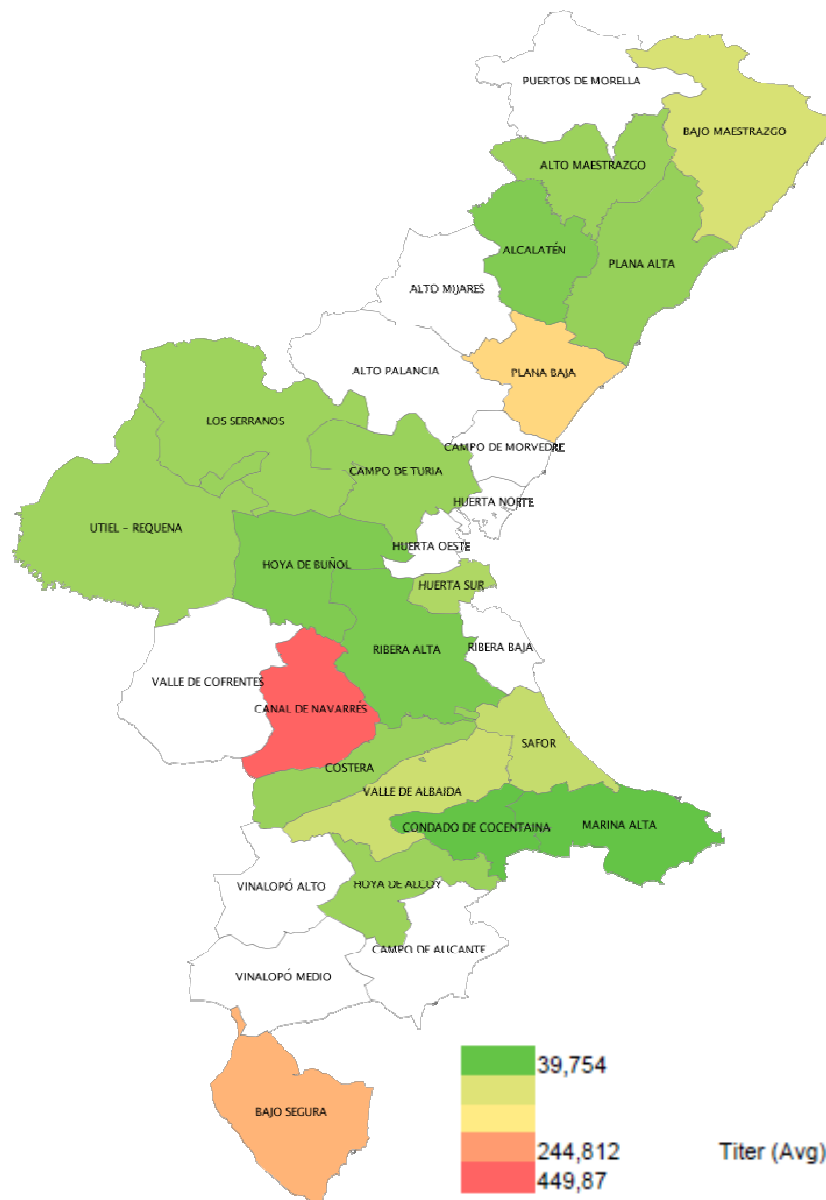


Figura 27. Mapa de seroprevalencia de MG en *broilers* de la Comunidad Valenciana en 2010.

El resultado de una muestra se evalúa por la relación de muestra (del inglés *sample*, S) a positivo (P) (relación S/P):

$$S/P = \frac{\text{Absorbancia media muestra} - \text{Absorbancia media control negativo}}{\text{Absorbancia media control positivo} - \text{Absorbancia media control negativo}}$$

Esta codificación de colores dependió de los valores obtenidos en el período analizado. Así, las respuestas frente a MG para este período en las diferentes regiones geográficas se pudieron comparar, delimitando las posibles presiones de infección. El valor absoluto de la respuesta humoral fue igualmente considerado para la interpretación correcta de los colores.

Los títulos mayores de 500 se consideraron indicativos de contacto con MG. Como los pollos de engorde en estudio no fueron vacunados frente a MG, los resultados de 2009 indicaron mayor presión de la infección en las granjas de la comarca de "Los Serranos". Las granjas de esta comarca probablemente estuvieron previamente en contacto con MG, tal como indica el resultado promedio de 605, si bien no se reportaron síntomas. En 2010, ninguna de las comarcas estudiadas presentó resultados promedio indicativo de infección. En general, se detectó bajo nivel de presión de infección de MG en las granjas de engorde en el presente estudio.

La edad promedio de los animales muestreados en este estudio fue 41,73 días, con una DE de 7.29, en 2009 y 42 días con una DE de 7.79, en 2010.

La **tabla 17** muestra las comarcas de la Comunidad Valenciana con el número de muestras, título medio de MG y el número de explotaciones.

Tabla 17. Comarcas de la Comunidad Valenciana, número de muestras, título medio y número de explotaciones estudiadas.

Comarca	Número de muestras		Título medio		Número de explotaciones	
	2009	2010	2009	2010	2009	2010
Alcalatén	75	72	205	79	4	4
Alto Maestrazgo	196	166	111	114	11	11
Alto Palancia	15		86		1	
Bajo Maestrazgo	582	588	195	193	34	34
Bajo Segura	15	15	282	328	1	1
Campo de Turia	44	31	226	112	2	1
Canal de Navarrés	16	46	43	450	1	2
Condado de Cocentaina	200	126	116	40	11	9
Costera	30	15	136	110	1	1
Hoya de Alcoy		15		113		1
Hoya de Buñol	35	42	313	77	2	3
Huerta Sur	16	16	90	139	1	1
Los Serranos	167	105	605	117	8	6
Marina Alta	11	40	246	40	1	3
Plana Alta	669	684	179	105	41	43
Plana Baja	60	75	135	275	3	4
Puertos de Morella	75		87		3	
Ribera Alta	153	119	172	72	7	6
Safor	409	294	187	168	22	20
Utiel - Requena	576	665	176	118	9	15
Valle de Albaida	469	436	237	178	26	28

Discusión y conclusiones

El uso de los SIG es importante para determinar los factores de riesgo. La literatura refleja el uso de la tecnología SIG en la prevención de las enfermedades aviares como la gripe aviar en varios países como Italia y China (Chang *et al.*, 2007; Ehlers *et al.*, 2003; Mannelli *et al.*, 2006). Sin embargo, hasta ahora, no estaban disponibles herramientas informáticas en tiempo real aplicadas para mejorar la vigilancia de la enfermedad ocasionada por MG en pollos de engorde de la Comunidad Valenciana.

Los enfoques más eficaces para controlar la propagación de MG incluyen estrictas medidas de bioseguridad, la vigilancia continua y la erradicación de los lotes infectados. La rápida expansión de la industria avícola en todo el mundo en áreas geográficas restringidas y graves pérdidas económicas debido a los brotes de MG (Gharaibeh-Hailat, 2011) llevan a implementar nuevas herramientas de monitoreo.

A tenor de los resultados de este estudio, la presión de la infección de MG en pollos de engorde fue baja, probablemente, por las buenas prácticas de bioseguridad y por el estricto control de los reproductores. En contraste, estudios previos en aves de traspatio de una región de Argentina mostraron una alta prevalencia de MG (Xavier *et al.*, 2011) y también en los pollos de engorde de Egipto (Osman *et al.*, 2009).

En el presente estudio, los animales fueron seleccionados con más de 30 días para evitar la detección de los anticuerpos

maternos en la prueba de ELISA, aunque un estudio reciente indica que los títulos de anticuerpos maternos no se detectan tras 10 días de edad para MG (Gharaibeh-Mahmoud, 2013), con una vida media de 4,9 días y un CV de 13,4%.

Este mapa de seroprevalencia de MG basado en inteligencia de negocio aplicado en pollos de engorde de la Comunidad Valenciana podría ser una herramienta eficaz para el control de esta enfermedad, que puede ayudar a los servicios técnicos veterinarios.

**3.4 CAPÍTULO CUARTO:
CONTROL SEROLÓGICO DE LA
RESPUESTA A LA VACUNACIÓN *IN OVO*
MEDIANTE VACUNAS POR
INMUNOCOMPLEJOS FRENTE A IBD EN
BROILERS.**

3.4. Capítulo cuarto: Control serológico de la respuesta a la vacunación *in ovo* mediante vacunas por inmunocomplejos frente a IBD en *broilers*.

Resumen

La industria avícola necesita conocer de forma sistemática y constante el estado de inmunización de lotes de pollos frente a la Enfermedad de Gumboro (IBD), especialmente cuando se utiliza una sola vacunación *in ovo*.

El objetivo de este estudio fue controlar y representar en un mapa dinámico la respuesta serológica después de una vacunación única *in ovo* frente a IBD, utilizando una vacuna de inmunocomplejos en pollos.

Se analizaron un total de 7576 muestras de suero de 603 lotes de pollos criados 354 granjas españolas durante un período de un año (2012). Se tomaron 10 ó 15 muestras de suero al azar de lotes de pollos de engorde con edad mayor de 35 días, y se analizaron serológicamente utilizando un ELISA disponible comercialmente.

La serología mostró títulos de anticuerpos entre 4000 y 14000 en el 95,7% de los lotes, lo que indicó una inmunización adecuada. La edad media de los pollos de engorde fue de 43 días y el título medio fue 6846 con un coeficiente de variación del 28,3%. Se representaron los datos en un mapa de España que incluyó la información geográfica de la ubicación de la granja para facilitar el seguimiento. No se reportaron clínicos de IBD en los lotes

estudiados.

Los datos de este estudio mostraron una inmunización adecuada frente a IBD en lotes de pollos después de la vacunación *in ovo* única con una vacuna basada en inmunocomplejos, y una novedosa herramienta para fácil monitoreo de la respuesta serológica incluyendo información geográfica.

Introducción

La Bursitis Infecciosa o Enfermedad de Gumboro (IBD) es una infección viral aguda y altamente contagiosa de las aves que tiene como objetivo primario el tejido linfoide, con especial predilección por la bolsa de Fabricio (bolsa cloacal), y afecta especialmente a los pollos. Los primeros casos se observaron en el área de Gumboro (Delaware, EE.UU.), y por esto en 1966 se denominó como la enfermedad de Gumboro (Van den Berg *et al.*, 2000).

El virus de la bursitis infecciosa (IBDV) pertenece a la familia *Birnaviridae* y al género *Avibirnavirus* (Dobos *et al.*, 1979; Müller *et al.*, 1979). IBDV es muy estable y resiste al tratamiento con gran cantidad de desinfectantes (Benton *et al.*, 1967b; Shirai *et al.*, 1994). La robusta naturaleza de este virus es una de las razones para su supervivencia en las explotaciones avícolas, incluso cuando se siguen los procedimientos de limpieza y desinfección rigurosamente (Eterradossi y Saif, 2008). IBDV es muy contagioso. Las explotaciones permanecen contaminadas durante un período

prolongado después de la despoblación y el agua, la alimentación, y sobre todo las heces son fuente de infección durante varias semanas (Benton *et al.*, 1967a; Zhao *et al.*, 2013). El escarabajo de la cama (*Alphitobius diaperinus*) puede actuar como reservorio de IBDV (Skeeles *et al.*, 1979). Además, el IBDV ha sido aislado de mosquitos (*Aedes vexans*) (Howie y Thorsen, 1981).

Con el fin de prevenir la IBD en pollos de engorde, la industria puede utilizar tres tipos de vacunas: vacunas vivas atenuadas aplicadas en el agua potable, y dos vacunas que pueden ser aplicadas vía subcutánea o *in ovo* vacunas basadas en vectores y vacunas por inmunocomplejos

La serología es una herramienta de diagnóstico específico, sensible y de bajo coste para controlar la correcta inmunización con vacunas. Además, la información geográfica de la ubicación de la granja es útil para observar la respuesta serológica a las vacunas en estudios a gran escala, donde pueden confluír diversos factores característicos de una zona geográfica (metereología, densidad de explotaciones, diversas orientaciones productivas, etc.).

Por otra parte, la ubicación de la explotación es de interés debido al potencial altamente contagioso de IBDV.

El objetivo de este trabajo fue evaluar y representar geográficamente la respuesta serológica de pollos de engorde criados en España y vacunados con una vacuna de inmunocomplejos administrada en incubadora *in ovo*, utilizando un kit de IBDV ELISA disponible en el mercado específico y una novedosa herramienta de mapeo sanitario.

Material y métodos

El estudio se llevó a cabo en las granjas de pollos de engorde ubicadas en España en lotes que recibieron vacunación con una sola dosis de vacuna basada en inmunocomplejos (CEVAC® Transmune), el día 18 de incubación. Se evaluó la respuesta serológica en pollos de engorde de más de 35 días.

Se tomaron 10 o 15 muestras de sangre por lote, con un total de 7576 muestras de suero analizadas, a partir de 603 lotes criados en 354 granjas.

La venopunción se realizó con una aguja o bisturí en la vena braquial y la sangre se recogió en un tubo de vidrio de 5 ml (un tubo por animal) para obtener aproximadamente 3 ml de muestra. Los tubos se mantuvieron en posición horizontal a temperatura ambiente hasta la formación del coágulo y posteriormente se refrigeraron hasta su llegada al laboratorio. Una vez en el laboratorio, las muestras se registraron utilizando ORALIMS (Nobel Biocare AB, Gothenburg, Suecia), un programa basado en ORACLE. A cada lote de 15 sueros se le asignó un número de registro para mantener la trazabilidad durante todo el proceso de análisis y evaluación de los resultados. Las muestras se centrifugaron a 2500 revoluciones por minuto (rpm) durante 5 min. Los glóbulos rojos se depositaron en el fondo del tubo y el suero en la parte superior. Se recogieron 250 µl de cada muestra de suero aproximadamente en placas de 96 pocillos, que fueron

identificados con su número de registro correspondiente. Para el análisis, se utilizó BioChek (BioChek Netherlands, ER Reeuwijk, Holanda), que es un inmunoensayo para detectar anticuerpos frente la IBD en sueros. Se siguieron las instrucciones del fabricante en cuanto al método de ensayo (**figura 28**).

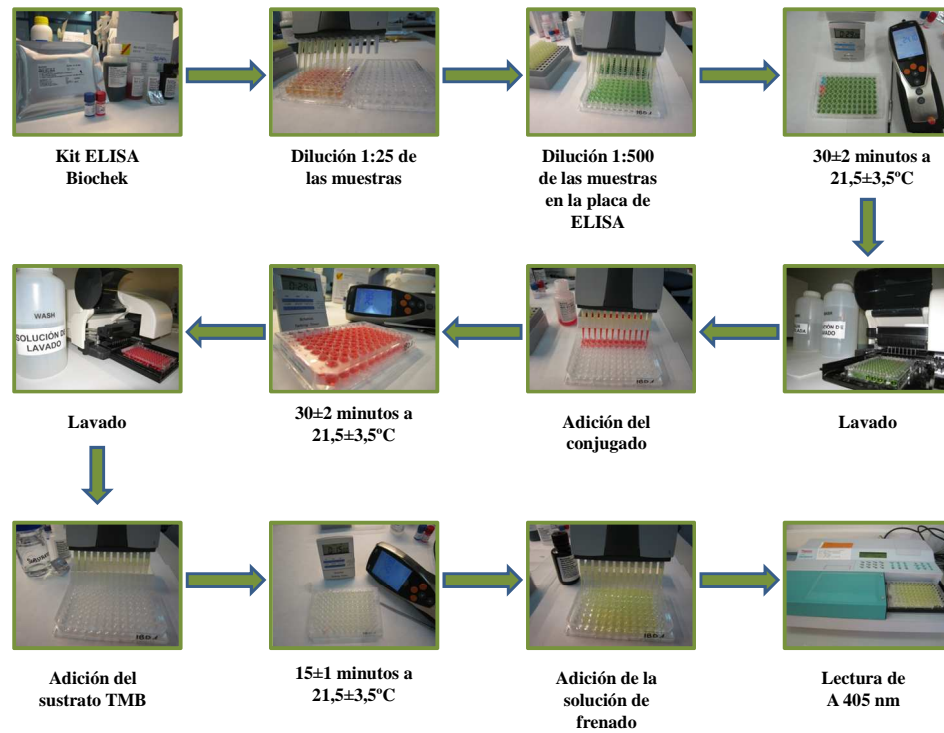


Figura 28. Preparación de las muestras y el procedimiento del ELISA de Biochek.

La herramienta de software empleada figura detallada en el capítulo primero, y aquí únicamente fue optimizada para alimentarse con la información de Biochek.

Resultados

Se muestrearon animales con una edad media de 43 días y una DE de 5. El título medio y el coeficiente medio de variación fueron 6846 y 28,3%, respectivamente.

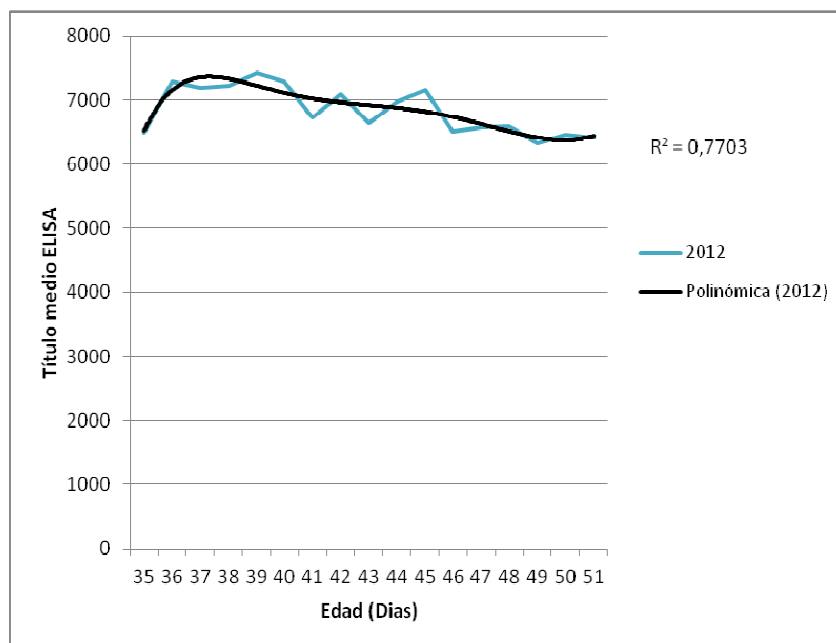


Figura 29. Títulos de ELISA de pollos de engorde frente a la edad, durante 2012.

Estos resultados muestran una inmunización protectora entre 35 y 51 días de edad, con valores medios de titulación que van desde 6331 a 7426. La media de CV fue del 28,3% en este periodo, lo que indicó una inmunización altamente uniforme. La ecuación polinómica de ajuste de título medio frente a edad con mejor valor de R^2 fue:

$$y = -0,003x^6 + 0,2187x^5 - 6,1473x^4 + 84,257x^3 - 589,46x^2 + 1900,8x + 5130,1$$

Donde y es el título medio y x la edad de pollos de engorde en día; R^2 fue 0,7703.

En un mapa de España (**figura 30**), se representó gráficamente la seroprevalencia de anticuerpos frente al virus, teniendo en cuenta la distribución espacial en el periodo de un año (2012).

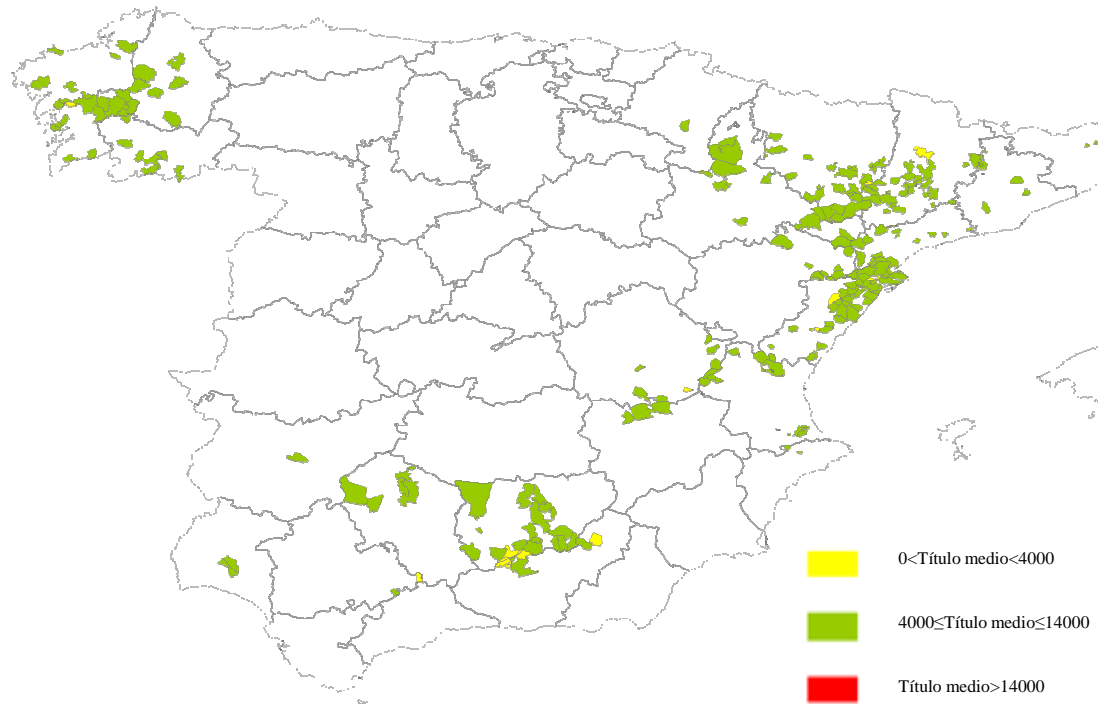


Figura 30. Mapa de seroprevalencia de IBD de pollos de engorde vacunados *in ovo* con dosis única *in ovo* de vacuna frente a IBD basada en inmunocomplejos, en regiones españolas durante 2012.

En la **tabla 18** se detalla el coeficiente de variación (CV), número de muestras analizadas y título medio para cada población.

Tabla 18. Pueblo o ciudad de España, coeficiente de variación (CV), número de muestras y título medio.

Pueblo o ciudad	Coeficiente de variación (CV)	Número de muestras	Título medio
Agolada	20,73	10	9373
Agramunt	18,52	30	8008
Agres	22,37	15	6949
Albalate del Arzobispo	19,92	40	8625
Albalatillo	34,56	20	5678
Albocàsser	21,45	45	7648
Alcalà de Xivert	41,02	15	6194
Alcalá del Obispo	27,45	50	6693
Alcanar	15,58	43	628
Alcanó	28,44	10	6817
Alcarràs	39,69	10	4745
Alcaudete	24,45	30	8717
Alcolea de Cinca	36,33	40	5796
Alcublas	32,05	135	7278
Aldea (L)	14,41	15	6377
Aldover	45,48	80	7040
Aliaguilla	21,75	30	7914
Almacelles	26,66	60	7105

Pueblo o ciudad	Coefficiente de variación (CV)	Número de muestras	Título medio
Almenar	30,56	10	6251
Almunia de San Juan	39,70	30	4973
Altorricón	119,65	10	831
Ames	32,07	25	9647
Amposta	26,97	15	5035
Andilla	39,98	15	7798
Andújar	19,93	40	10906
Anglesola	36,36	10	7666
Añora	24,09	15	12746
Artesa de Lleida	30,85	30	4932
Artesa de Segre	33,62	120	5543
Badolatosa	75,61	68	2121
Baélls	22,60	30	7290
Baltar	23,00	15	6840
Banyeres del Penedès	17,13	30	5734
Barx	42,88	45	6797
Batea	17,45	15	6798
Beas	21,06	30	7230
Bedmar y Garciez	29,57	10	6306
Bellcaire d'Urgell	29,00	80	5201
Bellmunt d'Urgell	16,91	30	6543
Bellvís	20,88	60	6653
Bélmez de la Moraleda	22,17	10	9547
Belver de Cinca	27,69	35	7902
Benalúa de las Villas	33,57	10	1568

Pueblo o ciudad	Coefficiente de variación (CV)	Número de muestras	Título medio
Benavent de Segrià	24,46	50	7612
Benicarló	37,58	30	5810
Benifallet	17,92	14	8266
Berbegal	27,36	20	6632
Bigues i Riells	22,70	10	8164
Biota	20,13	10	4417
Bujaraloz	59,20	25	4812
Cabacés	25,19	30	7415
Calaceite	32,68	50	7115
Camarasa	28,73	20	6338
Camarles	14,99	45	7537
Cambil	9,02	15	6558
Campillo de Arenas	86,67	10	2267
Camporrobles	21,82	60	7030
Candasnos	17,39	10	8257
Canet lo Roig	13,24	15	6210
Cartelle	21,47	80	6516
Casas de Garcimolina	16,51	30	10113
Castejón de Monegros	27,56	10	4450
Castelldans	35,32	30	4180
Castelló de Farfanya	43,51	90	5810
Castilléjar	61,18	40	3457
Castro de Rei	27,53	45	7296
Catí	62,63	45	2926
Caudete de las Fuentes	14,79	15	6446

Pueblo o ciudad	Coefficiente de variación (CV)	Número de muestras	Título medio
Cerdà	12,54	15	7510
Chert/Xert	15,81	45	8992
Ciutadilla	28,90	30	6963
Coirós	31,54	10	5509
Corgo (O)	21,98	15	6424
Cortes de Baza	30,06	45	8485
Costur	41,52	30	3710
Coves de Vinromà (les)	11,48	30	8536
Cubells	44,78	30	4988
Deltebre	27,71	100	5364
Dodro	19,45	15	5216
Dos Torres	23,18	45	8773
Dozón	18,97	80	8637
Ejea de los Caballeros	20,37	10	7719
Estopiñán del Castillo	26,24	50	7357
Estrada (A)	23,89	45	6847
Fabara	18,90	40	8077
Far d'Empordà (El)	21,59	10	7850
Figueroles	22,70	15	6443
Figueruelas	27,13	10	5860
Flix	36,81	20	5040
Forcarei	31,20	80	8194
Fraga	28,96	45	8349
Friol	25,38	110	6448
Fuente Obejuna	17,15	15	7461

Pueblo o ciudad	Coefficiente de variación (CV)	Número de muestras	Título medio
Fuenterrobles	22,87	75	7978
Fuentespalda	20,62	35	6531
Galera (La)	85,46	15	3131
Godall	9,60	10	8569
Gorga	23,64	76	7473
Guadasequies	22,56	60	7153
Herbés	11,52	15	8050
Hontecillas	16,39	30	7744
Horta de Sant Joan	29,80	15	4512
Huelma	29,99	35	8183
Huesa	26,48	165	6497
Isona i Conca Dellà	40,26	30	3937
Iznalloz	30,87	50	6294
Jana (la)	23,95	85	7013
Lalín	24,93	100	6709
Landete	26,90	15	9569
Linyola	27,72	20	5317
Lleida	11,96	30	4925
Llíria	17,59	45	9144
Lloar (El)	9,20	15	5847
Llutxent	21,51	15	8700
Loarre	22,24	50	6259
Lupiñén-Ortilla	31,92	50	6322
Maella	18,71	45	6908
Mallén	19,67	10	7128

Pueblo o ciudad	Coefficiente de variación (CV)	Número de muestras	Título medio
Malpica de Bergantiños	21,98	25	11892
Martín de la Jara	22,38	50	6117
Mas de Barberans	11,14	15	6028
Mas de las Matas	16,06	25	7585
Masdenverge	35,54	15	3737
Mazaricos	27,32	35	5955
Meaño	26,88	30	6429
Meis	39,16	70	6959
Moià	14,29	45	6882
Monfero	21,99	40	7363
Monforte de Lemos	36,77	30	9110
Montejícar	55,39	10	2285
Montgai	8,23	10	8946
Montillana	53,07	10	1370
Montmajor	14,26	10	7830
Monzón	29,12	40	6585
Navas de San Juan	24,25	40	7580
Navès	32,50	10	8019
Neves (As)	30,45	70	7398
Noalejo	36,43	10	1469
Olite/Erriberri	22,28	20	6165
Ordis	27,97	10	9248
Osso de Cinca	41,15	15	5176
Palanques	8,46	15	6088
Palas de Rei	24,65	25	6892

Pueblo o ciudad	Coefficiente de variación (CV)	Número de muestras	Título medio
Pedrola	16,09	10	8563
Peñalba	45,34	10	5351
Peñarroya de Tastavins	11,06	15	7647
Perelló (El)	18,50	120	7119
Piera	24,43	10	8945
Pinet	18,14	105	8562
Piñor	17,61	40	10207
Portomarín	42,37	55	5550
Pozo Alcón	20,82	15	7147
Pozoblanco	24,72	15	8159
Puebla de la Reina	27,91	15	6782
Quatretonda	22,75	15	7032
Quesada	35,86	45	5772
Quintanar del Rey	44,51	45	5948
Rairiz de Veiga	30,20	35	6731
Rianxo	40,02	10	5719
Riudecanyes	12,60	15	6157
Robres	39,38	20	7315
Roda (La)	26,98	60	7455
Rodeiro	30,89	80	5613
Roquetes	31,60	140	5808
Rossell	38,52	95	5786
Sabiote	31,89	15	7585
Salzadella (la)	33,97	30	5979
San Mateo de Gállego	23,34	30	7562

Pueblo o ciudad	Coefficiente de variación (CV)	Número de muestras	Título medio
Sant Mateu	15,70	40	7273
Santa Magdalena de Pulpis	13,04	25	6630
Sanxenxo	28,66	15	5320
Sarreaus	19,49	15	6236
Sástago	17,42	10	8004
Secuita (La)	24,67	10	6410
Selva del Camp (La)	18,24	40	4976
Sénia (La)	24,53	65	7982
Silleda	33,13	230	6145
Sisante	21,51	15	7403
Solsona	22,03	20	7848
Talavera	18,02	10	8019
Tamarite de Litera	36,41	10	6523
Tarazona de la Mancha	22,11	30	8019
Tàrrega	44,96	10	6738
Tauste	22,43	30	6273
Tírig	26,13	30	8135
Titaguas	11,79	15	12570
Tivenys	15,90	20	8648
Torás	57,34	15	6416
Torre de Arcas	8,42	15	6450
Torre-serona	22,56	20	7103
Tortosa	27,44	20	6008
Traiguera	23,10	85	8289
Trigueros	16,41	15	9752

Pueblo o ciudad	Coefficiente de variación (CV)	Número de muestras	Título medio
Tui	16,25	50	6939
Úbeda	28,93	190	6367
Ulldecona	20,14	75	7253
Valdepeñas de Jaén	17,17	15	5960
Valga	124,54	15	551
Vall d'Alba	26,50	45	8149
Vall d'Uixó (la)	23,46	30	6769
Vallfogona de Balaguer	18,23	10	5936
Vedra	30,55	15	6623
Verín	25,35	30	6537
Vila-real	28,18	30	6681
Vilafamés	24,26	30	7721
Vilalba dels Arcs	22,95	30	6229
Vilanova d'Alcolea	24,85	10	6297
Vilavella (la)	21,61	60	8830
Vilches	31,23	15	9670
Villanueva de Huerva	41,56	10	4385
Villanueva del Rey	18,95	30	7418
Villardompardo	11,94	15	7487
Villargordo del Cabriel	14,86	15	6116
Villarta	102,27	30	2756
Vinaròs	16,21	30	6161
Xerta	12,24	10	8324
Xinzo de Limia	42,98	130	6199
Zaidín	32,32	200	6520

Pueblo o ciudad	Coefficiente de variación (CV)	Número de muestras	Título medio
Zorita del Maestrazgo	16,60	60	6934
Zucaina	18,28	30	6947
TOTAL		8036	

Para la interpretación de los resultados se siguieron las instrucciones del fabricante del kit ELISA. El estado de una muestra se evaluó por la relación de muestra a positivo:

$$S/P = \frac{\text{Absorbanci a media muestra} - \text{Absorbanci a media control negativo}}{\text{Absorbanci a media control positivo} - \text{Absorbanci a media control negativo}}$$

En amarillo se representó las zonas con títulos medios inferiores a 4000, lo que indicó una inmunización inadecuada. Las zonas verdes correspondieron a títulos entre 4000 y 14000, que sugieren una adecuada inmunización de los pollos de engorde. Los títulos superiores a 14000 correspondieron a la seroconversión, y se señalaron en color rojo.

La mayoría de las áreas estaban coloreadas en verde, lo que demostró que, en general, se obtuvieron los títulos medios esperados tras la vacunación, teniendo en cuenta la ausencia de signos clínicos reportados de IBD y los datos de interpretación. Se obtuvieron títulos menores de 4000 en las siguientes poblaciones:

Alcanar, Altorricón, Badolatosa, Benalúa de las Villas, Campillo de Arenas, Castelléjar, Catí, Costur, La Galera, Isona i Conca Dellà, Masdenvenge, Montejícar, Montillana, Noalejo, Valga y Villarta. Por lo tanto, probablemente en los lotes criados en estas poblaciones no se vacunó correctamente en la sala de incubación. No se detectó seroconversión en este estudio.

Discusión y conclusiones

El manejo adecuado de la vacuna en la incubadora y su administración eficiente a cada pollo de un día o al huevo embrionado es fundamental para obtener la inmunización del lote eficiente y uniforme, sobre todo cuando se usa una sola dosis de vacuna frente una enfermedad específica.

Este monitoreo serológico de campo ayudó a evaluar la eficiencia y la calidad de la administración de una sola dosis de vacuna de inmunocomplejos *in ovo*, en la incubadora.

El monitoreo de los títulos de anticuerpos, teniendo en cuenta la distribución territorial y evolución temporal es una manera útil de evaluar la vacunación frente IBD en lotes de pollos de engorde en estudios a gran escala.

En el presente estudio, se obtuvieron títulos de anticuerpos considerados como protectores frente a IBD, entre 4000 y 14000, en el rango de 35 a 51 días de edad en pollos de engorde, lo que indica que la vacunación *in ovo* única utilizando una vacuna complejo inmune IBD inmunizó a los animales frente IBDV.

Además, el coeficiente de variación fue bajo (28,3%), lo que indicó que la vacunación fue uniforme.

Por otro lado, la herramienta de mapeo desarrollada en este trabajo permitió analizar fácilmente los resultados de miles de muestras, teniendo en cuenta los datos geográficos.

Los títulos de menos de 4000 podrían deberse a un manejo inadecuado en la aplicación de la vacunación, o una mala calidad de la vacuna. Hay estudios previos de seroprevalencia de IBD (Mushi *et al.*, 1999; Maw *et al.*, 2008; Jenbreie *et al.*, 2012) pero ninguno considera los mapas de seroprevalencia con ELISA y *broilers* aplicando una única dosis de vacuna de inmunocomplejos *in ovo* frente IBD.

El uso de herramientas informáticas similares ha crecido significativamente en los últimos años en el control de varias enfermedades de los animales, incluyendo la lengua azul (Conte *et al.*, 2005; Dall'Acqua *et al.*, 2006; Savini *et al.*, 2003; Calistri *et al.*, 2007), las epidemias de camarón (Bayot *et al.*, 2008) y otros (Savini *et al.*, 2007). La bibliografía refleja el uso de la tecnología GIS en la prevención de enfermedades de las aves como la gripe aviar en varios países como Italia y China (Ehlers *et al.*, 2003; Mannelli *et al.*, 2006; Chang *et al.*, 2007). Sin embargo, hasta ahora, no se disponía de herramientas informáticas en tiempo real aplicadas para mejorar el control de la inmunización IBD en pollos de engorde. Esta herramienta de mapeo podría ser una herramienta eficaz para los servicios veterinarios para controlar y prevenir la IBD.

Los datos de este trabajo mostraron una herramienta de mapeo novedosa que supone método valioso para el monitoreo, en estudios a gran escala, la respuesta serológica a la vacunación en dosis única *in ovo* de pollos de engorde solo contra IBD utilizando una vacuna basada en inmunocomplejos, incluyendo información geográfica. Esta herramienta podría permitir comparar la respuesta humoral en diferentes lugares geográficos durante un período, destacando las posibles diferencias de presión de la infección y la eficiencia y homogeneidad en la administración de la vacuna en la incubadora. Este mapa de seroprevalencia, aplicado a pollos de engorde y sobre la base de inteligencia de negocios (técnicas y herramientas para transformar los datos en información significativa y útil para fines de análisis de negocios), podría ser una herramienta eficaz para los servicios técnicos veterinarios para controlar y prevenir enfermedades, como la IBD.

**3.5 CAPÍTULO QUINTO:
ESTUDIO MICROBIOLÓGICO DE
PREVALENCIA DE *SALMONELLA* SPP. EN
POLLOS DE ENGORDE DE LA
COMUNIDAD VALENCIANA DESDE EL
AÑO 2009 HASTA EL AÑO 2013 USANDO
UNA HERRAMIENTA DE MAPEO
DINÁMICO.**

3.5. Capítulo quinto: Estudio microbiológico de prevalencia de *Salmonella* spp. en pollos de engorde de la Comunidad Valenciana desde el año 2009 hasta el año 2013 usando una herramienta de mapeo dinámico

Resumen

El objetivo de este estudio fue diseñar e implementar un Mapa Dinámico de Prevalencia de *Salmonella* spp. para el monitoreo en pollos de engorde en la Comunidad Valenciana. La herramienta de mapeo desarrollada para este estudio consistió en tres fases principales: recopilación de datos, análisis de datos y representación de datos. Se analizaron 15168 muestras de dos pares de calzas (cuatro calzas) tomadas de pollos de engorde a lo largo de cinco años (2125, 2493, 2812, 3378 y 4360 muestras en 2009, 2010, 2011, 2012 y 2013, provenientes de 420, 416, 421, 437 y 423 granjas, respectivamente). Los datos fueron representados en un mapa de la Comunidad Valenciana, incluyendo la información geográfica de la localización de la granja para facilitar el seguimiento. La prevalencia de *Salmonella* spp fue 2,74% en el período global de estudio. La prevalencia de los serotipos de *S. Enteritidis* y/o *S. Typhimurium* (incluyendo la cepa monofásica *S. Typhimurium*) fue menor del 1%. Gracias a esta herramienta, se detectó una región del territorio estudiado que mostró los niveles más altos de prevalencia de *Salmonella* spp. a lo largo de los cinco años. Esto sugiere que los servicios técnicos veterinarios deben

centrarse en ella para reducir la futura prevalencia de *Salmonella* spp., y demuestra la utilidad de esta herramienta de mapeo.

Introducción

Salmonella ha sido reconocida como un importante patógeno zoonótico transmitido por los alimentos de importancia económica en los animales y en los seres humanos (Hugas y Beloeil, 2014). En la Unión Europea (UE), más de 80000 casos humanos se reportan cada año (82568 casos notificados en 2013; EFSA, 2015).

El seguimiento y control de las enfermedades transmitidas por los alimentos, así como los requisitos de higiene de los mismos y los criterios de seguridad alimentaria están regulados por la legislación de la UE. Se fijaron metas para la reducción de la *Salmonella* en manadas de aves de corral (las gallinas reproductoras y ponedoras, pollos de engorde, pavos) y cerdos. Las restricciones también se impusieron en el comercio de productos procedentes de manadas infectadas. Desde 2009 los estados miembros de la UE se han visto obligados a poner en práctica programas nacionales de control de *Salmonella* en manadas de pollos de engorde, de conformidad con el Reglamento (CE) N° 2160/2003 (Official Journal of the European Union, 2003). El Reglamento exige que se tomen medidas eficaces para prevenir, detectar y controlar la *Salmonella* en todas las fases pertinentes de producción, transformación y distribución, en particular en la

producción primaria, con el fin de reducir la prevalencia de *Salmonella* y el riesgo para la salud pública. El objetivo definitivo de la UE para pollos de engorde se define en el Reglamento (CE) N° 200/2012 (Commission Regulation, 2012), donde el porcentaje máximo de manadas de pollos de engorde que continúan siendo positivas para los serovares *S. Enteritidis* y/o *S. Typhimurium* (incluyendo monofásica *S. Typhimurium*) es del 1% (EFSA, 2015). Los requisitos mínimos de detección en lotes de pollos incluyen el muestreo de las manadas dentro de las tres semanas antes de que las aves sean trasladadas al matadero, tomando al menos dos pares de calzas (4 calzas) por lote.

La información de resultados de prevalencia vinculada al tiempo y el espacio podría integrarse con el fin de crear un Mapa Dinámico de Prevalencia (DPM), lo que permite controlar la presencia, distribución y evolución de las enfermedades animales a lo largo del tiempo y el espacio. Hacer estos DPMs con cierta frecuencia revelará el comportamiento de las enfermedades animales, y podría ser mejorado mediante la adición de información de factores de riesgo tales como el origen y el movimiento de las aves, la evolución de la climatología o de medidas de bioseguridad. El conocimiento de estos parámetros epidemiológicos por los servicios técnicos veterinarios podría ayudar a controlar la enfermedad y minimizar su incidencia. La Organización Mundial de Sanidad Animal (OIE) ofrece "Mapas de Distribución de Enfermedades", incluyendo la salmonelosis (*S. Abortusovis*), por países y por período de seis meses o meses del

año. Sin embargo, esta herramienta sanitaria no tiene factores seleccionables como información en tiempo real, *Salmonella* en aves de corral, tipo de producción avícola y unidades geográficas menores (comunidades, provincias o comarcas). Actualmente no hay herramientas de mapeo similares disponibles incluyendo estas características para los veterinarios para el control de *Salmonella* en España.

El objetivo de este trabajo fue desarrollar un DPM para *Salmonella* en pollos de engorde de la Comunidad Valenciana que fuera una herramienta útil para el control de su incidencia por los servicios técnicos veterinarios.

Material y métodos

El estudio se llevó a cabo en granjas avícolas de pollos de engorde de la Comunidad Valenciana.

La herramienta de software empleada figura detallada en el capítulo primero, y aquí únicamente fue optimizada para alimentarse con la información de Oralims.

En el período de cinco años que abarca el presente estudio, se analizaron un total de 15168 muestras. Fueron analizadas 2125 muestras de 420 granjas de pollos en 2009; 2493 muestras de 416 granjas en 2010; 2812 muestras de 421 granjas en 2011; 3378 muestras de 437 granjas en 2012 y 4360 muestras de 423 granjas en 2013.

Las muestras consistieron en dos pares de calzas de cada lote, tomadas en las tres semanas antes del inicio del traslado a matadero. El área de muestreo se dividió en dos sectores iguales, cada par de calzas cubrió el 50% de la nave. Se utilizó un par de calzas para la recolección de muestras de heces en cada sector con al menos 100 pasos por cada par, asegurando que se tomaron de todas las partes del sector. La prevalencia se calculó como el porcentaje del número de manadas positivas entre el total de manadas sometidas a pruebas. Para la toma de muestra se utilizó un kit listo para usar de Sodibox (<http://www.sodibox.com/>) que incluye dos pares de calzas humedecidas con una solución de 0,8 por ciento de cloruro de sodio y 0,1 por ciento de peptona, cubrebotas de plástico, un par de guantes y una bolsa de plástico estéril para remitir la muestra. Se colocaron los cubrebotas de plástico encima de las botas y sobre éstos, las calzas humedecidas.. Una vez finalizado el muestreo en cada sector, se quitaron las calzas con cuidado para evitar que se desprendiera el material adherido, se invirtieron las calzas para conseguir retenerlo y se colocaron en la bolsa estéril. Se cerró la bolsa y se etiquetó convenientemente con el fin de ser enviada al laboratorio. Los dos pares de calzas se agruparon y se consideró como una muestra por cada lote.

La detección de *Salmonella* consistió en la determinación de la presencia o ausencia de este microorganismo en una masa o volumen de producto. Actualmente, El método de aislamiento e

identificación de *Salmonella* spp. es la norma ISO 6579:2002 y su modificación (Anexo D) (**figuras 31 y 32**).



Figura 31. Preparación de las muestras de calzas.

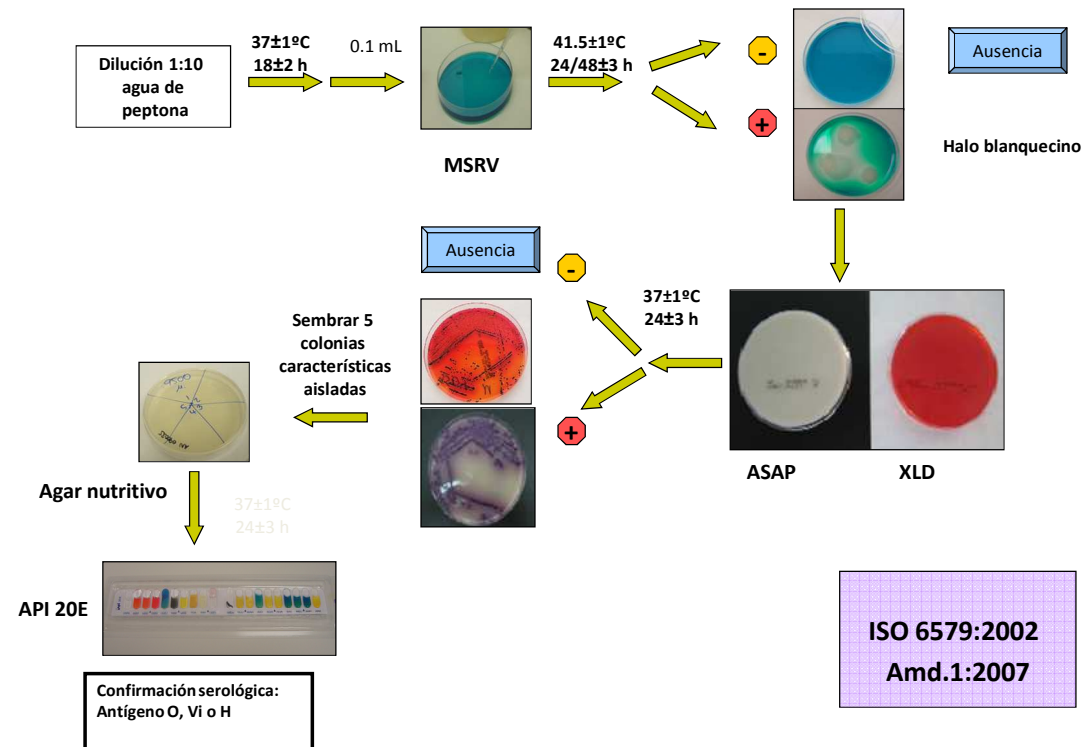


Figura 32. ISO 6579:2002/Amd. 1:2007 (calzas).

La norma ISO 6579:2002 se aplica para alimentos de consumo humano y alimentación animal y el anexo D de esta misma norma a heces de animales y muestras medioambientales en la etapa de producción primaria. Las muestras de calzas se analizaron mediante el anexo D, que utiliza como medio de enriquecimiento selectivo el Rappaport-Vassiliadis semisólido modificado (MSRV). El método consta de cuatro etapas sucesivas: preenriquecimiento en medio líquido no selectivo, enriquecimiento en medio selectivo, siembra e identificación y confirmación de identidad. En primer lugar, se realizó el preenriquecimiento no selectivo de las muestras diluidas 1:10 incubando a 37 ± 1 °C durante 18 ± 2 horas. Para preparar la dilución 1:10 se añadió 225 ml de agua de peptona a la muestra de dos pares de calzas y se homogeneizó. Se transfirió 100 ± 2 µL de la muestra enriquecida, en tres gotas, a una placa de medio Rappaport-Vassiliadis semisólido modificado (MSRV) (Difco, Madrid, España) y se incubó a $41,5\pm 1$ °C durante 24 ± 3 horas. Si la placa era negativa tras 24 horas, se incubó durante otras 24 ± 3 horas. Las placas positivas mostraron una zona en blanco-gris y turbia que se extiende desde el punto de inoculación. La zona turbia se caracteriza por un halo blanco con un borde claramente definido. A partir del cultivo obtenido, se sembraron los dos medios sólidos selectivos: XLD (Xilosa-lisina-desoxicolato) (Oxoid, Madrid, España) y AES *Salmonella* Agar Plate (ASAP) (AES, Terrasa, España), que se incubaron a 37 ± 1 °C durante 24 ± 3 horas. Se seleccionaron 5 colonias sospechosas, que se cultivaron en agar

nutritivo (Scharlau, Madrid, España) a 37 ± 1 °C durante 24 ± 3 horas. Las colonias típicas de *Salmonella* que crecen en el agar XLD tienen un centro negro y una zona ligeramente transparente de color rojizo debido al cambio de color del indicador. Las variantes de *Salmonella* H₂S negativas que crecen en XLD son rosas con un centro rosa más oscuro. Las *Salmonella* lactosa positivas son amarillas con o sin ennegrecimiento. Las colonias típicas de *Salmonella* que crecen en agar ASAP son color rosa-púrpura. Finalmente, la confirmación bioquímica se realizó con tira API 20E (Biomérieux, Madrid, España). De acuerdo con la norma ISO 6579:2002, tras la confirmación bioquímica de las colonias sospechosas de pertenecer al género *Salmonella*, hay que realizar la confirmación serológica y el serotipado con antígenos somáticos (O), flagelares (H) y capsulares (Vi). Para el serotipado se utilizó el esquema de Kauffmann-White-Le-Minor. La serotipificación se realizó utilizando antisueros *Salmonella*, placa de vidrio, asas estériles, placas de agar nutritivo y agar nutriente semisólido, que está compuesto por agua destilada, desoxicolato de sodio (Merck, Cerdanyola del Vallés, España), caldo de soja triptona, dextrosa, extracto de levadura, extracto de carne y agar Bacto (Difco, Madrid, España). A partir de colonias puras se probó por aglutinación en placa las diferentes antisueros. Para descartar cepas autoaglutinantes, se colocó sobre una placa de vidrio una gota de solución salina al 0,85%, se dispersó la colonia a testar con un asa estéril con el fin de obtener una suspensión homogénea y turbia, se

agitó suavemente durante 30-60 segundos y se observó sobre fondo oscuro. No se detectaron cepas autoaglutinantes en este estudio.

Resultados

Se muestrearon animales en las tres últimas semanas antes de ir a matadero con una edad media de 36,45 días con una DE de 9,66 en 2009; 38,82 días con una DE de 3,96 en 2010; 35,24 días con una DE de 9,55 en el 2011; con 29,25 días una DE de 8,23 en 2012 y 29,30 días con una DE de 7,05 en 2013. La herramienta de software mostró el DPM de *Salmonella* spp. en las granjas de engorde en la Comunidad Valenciana durante los años 2009, 2010, 2011, 2012 y 2013 (**figuras 33, 34, 35, 36 y 37**).

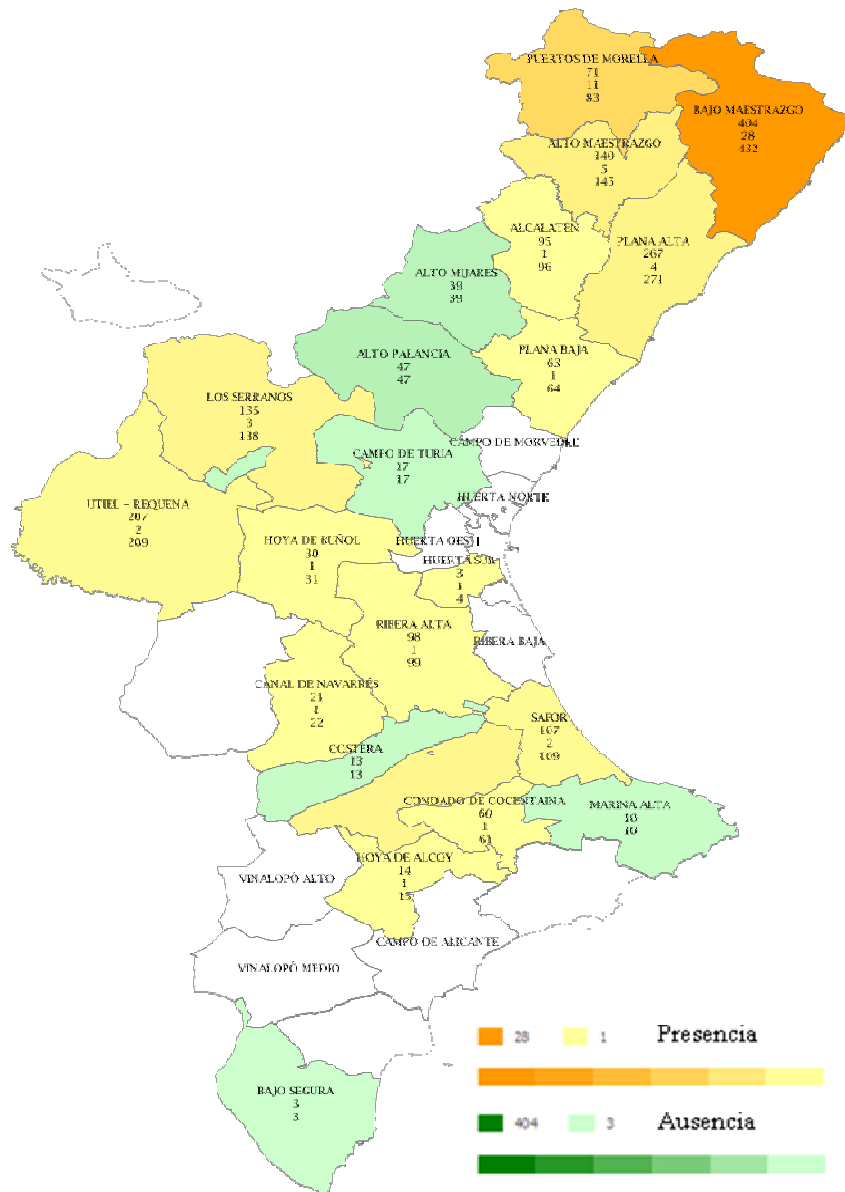


Figura 33. Mapa de prevalencia de *Salmonella* en *broilers* de la Comunidad Valenciana en 2009.

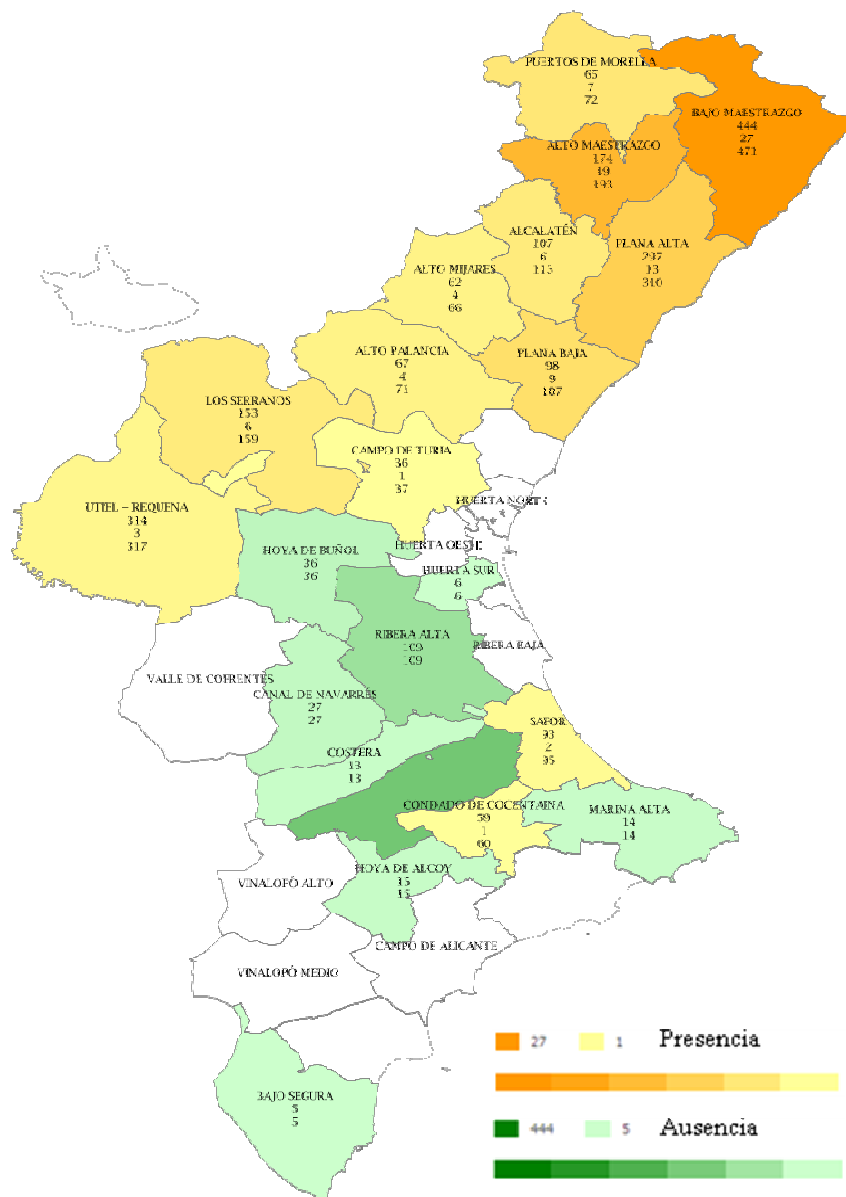


Figura 34. Mapa de prevalencia de *Salmonella* en *broilers* de la Comunidad Valenciana en 2010.

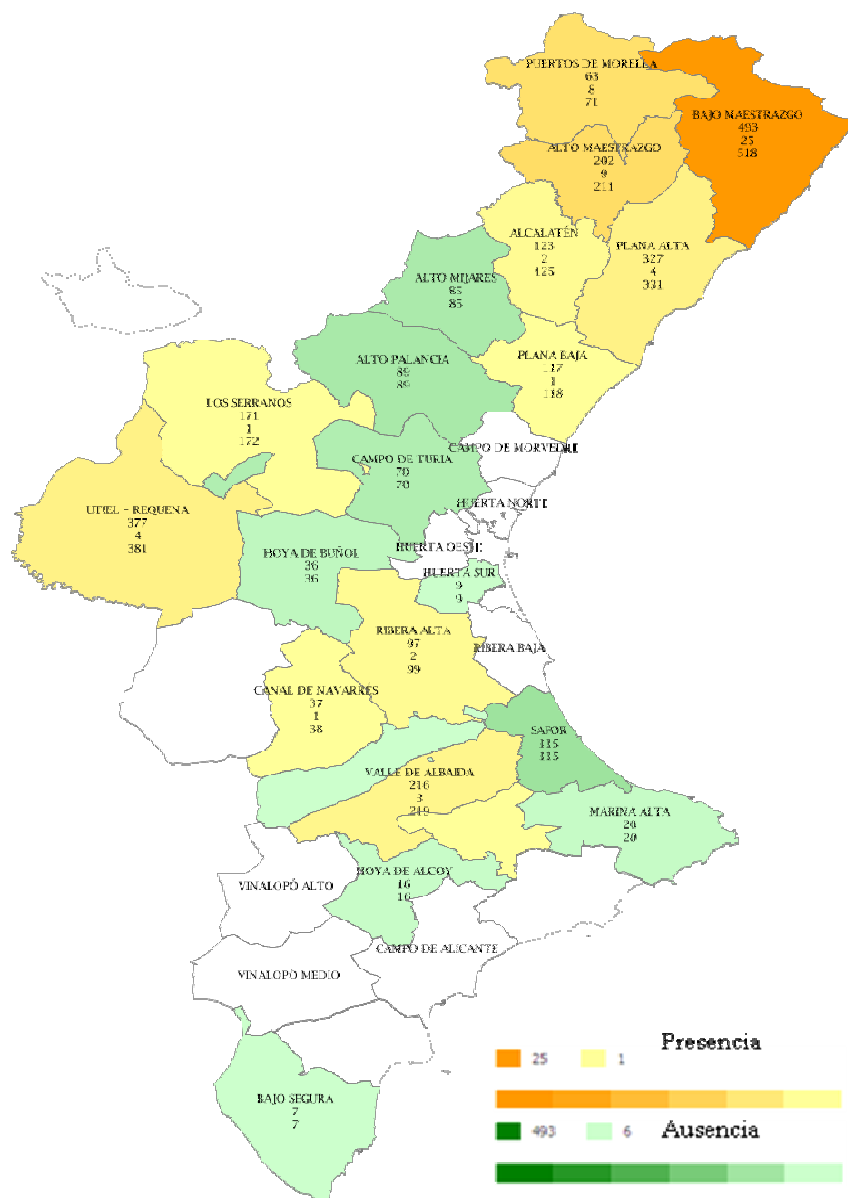


Figura 35. Mapa de prevalencia de *Salmonella* en *broilers* de la Comunidad Valenciana en 2011.

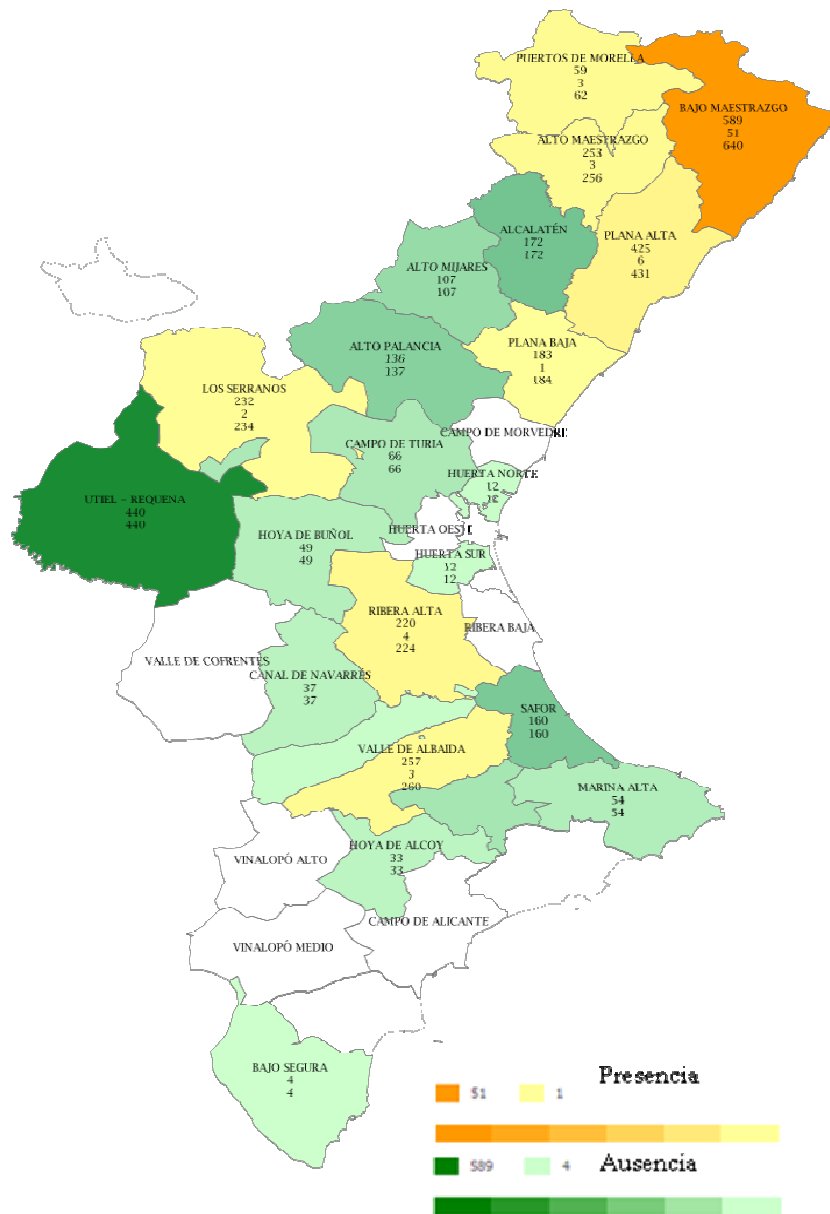


Figura 36. Mapa de prevalencia de *Salmonella* en *broilers* de la Comunidad Valenciana en 2012.

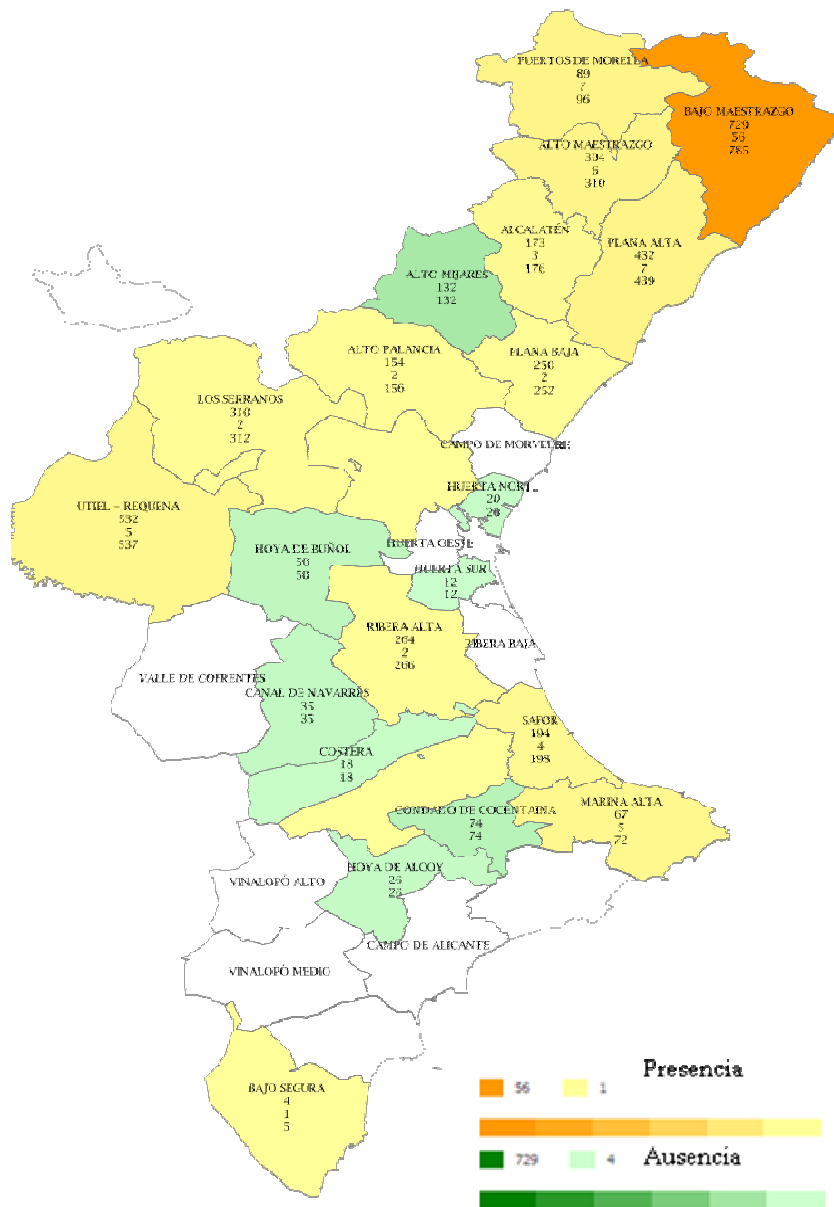


Figura 37. Mapa de prevalencia de *Salmonella* en *broilers* de la Comunidad Valenciana en 2013.

Estos mapas muestran gráficamente los resultados cualitativos (presencia/ausencia), representando en verde las regiones que tenían todos los resultados de ausencia de *Salmonella* spp.. La intensidad del color verde está directamente relacionada con el número de lotes muestreados. Cuando una región tuvo resultados con presencia de *Salmonella* spp. los colores utilizados variaron de amarillo a naranja, de manera que el amarillo representa los valores más bajos y el naranja los más altos. Esta codificación de colores es dependiente de los valores obtenidos en el período analizado. Por lo tanto, los resultados de *Salmonella* pueden ser comparados en diferentes regiones geográficas en este período.

La **tabla 19** muestra manadas de pollos 2009-2013 analizadas en la Comunidad Valenciana y controladas utilizando la herramienta de mapeo dinámico (T: muestras totales analizadas; %P: porcentaje de presencias de *Salmonella* spp.).

Tabla 19. Lotes de pollos de engorde analizados usando la herramienta de mapeo dinámica desde 2009 a 2013.

Comarca	2009		2010		2011		2012		2013	
	T	% P	T	% P	T	% P	T	% P	T	% P
Alcalatén	96	1,04	113	4,88	125	1,60	154	0,00	176	1,70
Alto	145	3,45	193	9,41	211	4,27	234	1,28	310	1,94
Maestrazgo										
Alto Mijares	39	0,00	66	4,71	85	0,00	96	0,00	132	0,00
Alto Palancia	47	0,00	71	4,49	89	0,00	119	0,00	156	1,28
Bajo	432	6,48	471	5,48	518	4,83	592	7,94	785	7,13
Maestrazgo										
Bajo Segura	3	0,00	5	0,00	7	0,00	4	0,00	5	20,00
Campo de	17	0,00	37	1,43	70	0,00	66	0,00	79	1,27
Turia										
Canal de	22	4,55	27	0,00	38	2,63	33	0,00	35	0,00
Navarrés										

Comarca	2009		2010		2011		2012		2013	
	T	% P	T	% P	T	% P	T	% P	T	% P
Condado de Cocentaina	61	1,64	60	1,33	76	1,32	67	0,00	74	0,00
Costera	13	0,00	13	0,00	6	0,00	10	0,00	18	0,00
Hoya de Alcoy	15	6,67	15	0,00	16	0,00	30	0,00	26	0,00
Hoya de Buñol	31	3,23	36	0,00	36	0,00	46	0,00	50	0,00
Huerta Norte							12	0,00	20	0,00
Huerta Sur	4	25,00	6	0,00	9	0,00	10	0,00	12	0,00
Los Serranos	138	2,17	159	3,51	172	0,58	221	0,90	312	0,64
Marina Alta	10	0,00	14	0,00	20	0,00	48	0,00	72	6,94
Plana Alta	271	1,48	310	3,98	331	1,21	390	1,03	439	1,59
Plana Baja	64	1,56	107	7,69	118	0,85	166	0,60	252	0,79

Comarca	2009		2010		2011		2012		2013	
	T	% P	T	% P	T	% P	T	% P	T	% P
Puertos de Morella	83	13,25	72	11,11	71	11,27	62	4,84	96	7,29
Ribera Alta	99	1,01	109	0,00	99	2,02	206	1,46	266	0,75
Safor	109	1,83	95	1,74	115	0,00	159	0,00	198	2,02
Utiel	209	0,96	317	0,80	381	1,05	407	0,00	537	0,93
Requena										
Valle de Albaida	217	1,38	197	0,00	219	1,37	246	1,22	310	0,32
Total	2125	3,11	2493	4,09	2512	2,17	3378	1,95	4360	2,39

La región con mayor número de resultados de presencia de *Salmonella* spp y mayor número de muestreos fue el Bajo Maestrazgo de forma constante en todos los años de este estudio. Los resultados de este DPM sugieren que los servicios técnicos veterinarios deben centrar sus esfuerzos en controlar la región del Bajo Maestrazgo. Los lotes contaminados con los serotipos *S. Enteritidis*, *S. Typhimurium* (incluyendo monofásica *S. Typhimurium*) fueron del 0,19% (4 lotes), 0,04% (1 lote), 0,39% (11 lotes), 0,21% (7 lotes) y 0,23% (10 lotes) en 2009, 2010, 2011, 2012 y 2013, respectivamente, siendo menor del 1%.

Discusión y conclusiones

Se espera que el consumo de carne de aves de corral siga creciendo en los próximos años, con Francia, el Reino Unido, los Países Bajos, Alemania, Italia, Polonia y España como principales países productores dentro de los (entonces) 27 Estados miembros de la Unión Europea (ahora 28) (Soberano *et al.*, 2009). La ley aplicable en el control de *Salmonella* en la Unión Europea es el Reglamento (CE) n ° 2160/2003 (Official Journal of the European Union, 2003). El número de casos notificados de salmonelosis en humanos en la UE disminuyó en 2012, según los últimos datos de 27 Estados miembros publicados en febrero de 2014 en el Informe resumido de la Unión Europea sobre las tendencias y fuentes de las zoonosis, los agentes zoonóticos y brotes de origen alimentario en 2012, y esta disminución es la continuación de una tendencia

decreciente observada en los últimos cinco años. Se supone que la reducción observada en los casos de *Salmonella* es principalmente el resultado exitoso de los programas de control de *Salmonella* de aves de corral. Sin embargo, la *Salmonella* sigue siendo la causa más frecuentemente reportada de brotes de origen alimentario en la UE (22,5% de los brotes totales). Desde 2008 a 2013 el número anual de brotes de *Salmonella* en la UE disminuyó notablemente, un 38,1% (de 1888 a 1168 brotes) (EFSA, 2015). La prevención de la contaminación por *Salmonella* de los productos avícolas requiere un conocimiento detallado de las principales fuentes asociadas a su presencia en el sistema de producción. Los factores de riesgo más importantes de contaminación por *Salmonella* en las explotaciones al final del período de engorde son el estatus sanitario, en cuanto *Salmonella*, de la granja después de la limpieza y desinfección, de los animales de un día de vida y del pienso de los comederos. Por lo tanto, toda la cadena de producción necesita ser controlada para erradicar las bacterias de la producción primaria (Marín *et al.*, 2011).

El DPM desarrollado en nuestro trabajo puede ayudar a dar una visión general de la distribución geográfica de la presencia de *Salmonella* y permite realizar comparaciones en la Comunidad Valenciana, ya que se presentan en tiempo real, en formato sencillo y accesible desde Internet.

El DPM se mostró como una herramienta muy poderosa en la epidemiología descriptiva, ya que se recopilan automáticamente

los datos de ubicación geográfica y los resultados de laboratorio, como parte de la vigilancia de enfermedades.

En un brote de *Salmonella* Typhimurium ocurrido en el suroeste de Inglaterra, en abril-mayo de 2003, se llevó a cabo un estudio de control de casos, junto con una investigación del medio ambiente y se analizó con un sistema de información geográfica (SIG). El autor propuso que deben ser considerados métodos alternativos en apoyo de la investigación epidemiológica tradicional (Boccia *et al.*, 2004), como podría ser el DPM. Otros estudios de prevalencia de *Salmonella* en España podrían mejorarse por medio de los DPM, como el presentado por Vico y Mainar-Jaime (Vico y Mainar-Jaime, 2012) en cerdos.

El uso de los SIG es importante para determinar los factores de riesgo (Aung y Chang, 2014; Bosona y Gebresenbet, 2013). La bibliografía refleja el uso de la tecnología SIG en la prevención de enfermedades de las aves como la gripe aviar en varios países como Italia y China (Chang *et al.*, 2007; Ehlers *et al.*, 2003; Mannelli *et al.*, 2006).

Sin embargo, hasta ahora, no se disponía de herramientas informáticas de mapeo en tiempo real implementadas para mejorar la vigilancia de *Salmonella* en pollos de engorde en lotes de la Comunidad Valenciana.

En conclusión, el seguimiento de la situación sanitaria de las explotaciones de engorde es una herramienta para el control de enfermedades por los servicios técnicos veterinarios. Este DPM para *Salmonella* spp., aplicado en lotes de pollos de engorde de la

Comunidad Valenciana, podría ser una herramienta eficaz para este fin.

**3.6 CAPÍTULO SEXTO:
EVALUACIÓN DE *SALMONELLA* SPP. EN
HECES, HISOPOS CLOACALES Y HUEVOS
(CÁSCARA DE HUEVO Y DE CONTENIDO
POR SEPARADO) DE UNA GRANJA DE
GALLINAS PONEDORAS.**

- 3.6. Capítulo sexto:** Evaluación de *Salmonella* spp. en heces, hisopos cloacales y huevos (cáscara de huevo y de contenido por separado) de una granja de gallinas ponedoras.

Resumen

Los patógenos microbianos del género *Salmonella* están entre las principales causas de las enfermedades transmitidas por los alimentos en el mundo. El presente estudio se realizó en una granja de gallinas ponedoras, con resultado de presencia de *Salmonella* Enteritidis de acuerdo con las pruebas especificadas por el reglamento europeo 2160/2003. El objetivo de este estudio fue comparar la contaminación por *Salmonella* en una granja de gallinas ponedoras, con la presencia de *Salmonella* en sus huevos. Las cepas fueron aisladas por la norma ISO 6579: 2002 (método estándar para la detección de *Salmonella* spp en la normativa europea para la alimentación de los alimentos y alimentación animal, heces animales y muestras ambientales en la etapa de producción primaria, incluyendo granjas avícolas) y fueron confirmadas como *S. Enteritidis* por el método de Kauffmann-White-Le-Minor. Además, las cepas se compararon por macrorrestricción genómica seguida de electroforesis en gel de campo pulsado. Cuatro tipos de muestras heces (n = 50), hisopos cloacales (n = 150), cáscara de huevo (n = 50) y el interior del huevo (n = 50), se tomaron de cada una de las 50 jaulas en batería

seleccionadas al azar. Los resultados demostraron que las heces (92%) fueron las muestras con más resultados de presencia, seguido de cáscaras de huevo (34%) e hisopos cloacales (4%). No se detectó *Salmonella* spp. en el contenido del huevo. Nuestros resultados muestran que un resultado de presencia a *S. Enteritidis* en una granja de gallinas ponedoras de acuerdo con lo especificado en el reglamento europeo 2160/2003 no implica la presencia del patógeno en el contenido de los huevos. Además, la digestión del DNA genómico con XbaI de las cepas de *S. Enteritidis* aisladas a partir de varias muestras resultó ser un mismo patrón, por lo que eran probablemente de un mismo origen.

Introducción

Salmonella ha sido reconocida como un importante patógeno zoonótico de importancia económica en los animales y los seres humanos. El género *Salmonella* se divide actualmente en tres especies: *S. enterica* y *S. Bongori*. *S. enterica* se divide en seis subespecies y muchas *Salmonellas* pertenecen a la subespecie *S. enterica* subsp. *enterica*. Existen más de 2500 serotipos de *Salmonella* zoonótica y la prevalencia de los serovares diferentes cambia con en el tiempo. En general en la Unión Europea, *S. enterica* serovar Enteritidis (*Salmonella* Enteritidis) y *S. enterica* serovar Typhimurium (*Salmonella* Typhimurium) son los serotipos más frecuentemente asociados con la enfermedad humana. Los casos humanos de *S. Enteritidis* son más comúnmente asociados

con el consumo de huevos y ovoproductos contaminados (59,9%), mientras que los casos de *S. Typhimurium* son los más frecuentemente asociados con el consumo de carne de cerdo contaminado y productos derivados (46,7%). *S. Enteritidis* y *S. Typhimurium* representaron el 39,5% y el 20,2% del total de casos confirmados de salmonelosis humana en Europa, respectivamente (EFSA, 2015).

El propósito de reglamento europeo 2160/2003 es garantizar que se adopten medidas apropiadas y eficaces para detectar y controlar la *Salmonella* y otros agentes zoonóticos en todas las fases pertinentes de producción, transformación y distribución, en particular a nivel de producción primaria, incluidos los piensos, con el fin de disminuir su prevalencia y el riesgo que suponen para la salud pública. Actualmente, las pruebas se llevan a cabo de acuerdo con la Norma Internacional ISO 6579:2002 para alimentos y alimentación animal o con la ISO 6579:2002 anexo D para las heces de animales y muestras ambientales en la etapa de producción primaria. Una vez que las cepas son aisladas pueden ser serotipificadas según el método de Kauffmann-White-Le-Minor (Patrick *et al.*, 2007). Además, con el fin de estudiar el origen de las cepas aisladas, puede llevarse a cabo la caracterización genética de las colonias para comparar las cepas aisladas a partir de un mismo serovar.

El objetivo de este estudio fue comparar cualitativamente la contaminación por *Salmonella* en una granja de gallinas ponedoras (con resultado de presencia de *S. Enteritidis* de acuerdo con la

normativa europea 2160/2003), con la presencia de *Salmonella* en los huevos puestos por este mismo lote de gallinas.

Materiales y métodos

Se seleccionó una granja de gallinas ponedoras, con resultado de presencia a *Salmonella* de acuerdo con la normativa europea 2160/2003. Había ciento cincuenta mil gallinas comerciales Lohmann Brown de 27 semanas de vida alojadas en cuatro naves. La nave estudiada albergaba 65000 gallinas distribuidas en 12 gallinas por jaula en batería apiladas a seis alturas. Tanto en el muestreo oficial como en el autocontrol a las 24 semanas de edad arrojaron el resultado de presencia de *Salmonella* Enteritidis.

Durante la toma de muestras, la temperatura fue de 22°C con iluminación diaria de 16h. La superficie de la jaula para cada animal, centímetros del comedero e inclinación del suelo eran acordes a la legislación vigente en materia de bienestar animal (Anexo II del RD 3/2002). Los animales fueron vacunados dos veces contra la salmonelosis con vacunas vivas en el agua potable (*Salmonella* Enteritidis, semanas 2 y 8) en la granja de cría convencional.

Antes del sacrificio de las gallinas, 4 tipos de muestras, incluyendo heces (n = 50), hisopos cloacales (n = 150), cáscaras de huevo (n = 50) y el contenido de los huevos (n = 50), se tomaron

simultáneamente de cada una de 50 jaulas en batería seleccionadas al azar.

En primer lugar, una muestra colectiva de al menos 150 g de heces (simulando autocontroles o controles oficiales) fue tomada de la cinta de las heces usando un depresor lingual estéril y un par de guantes para cada jaula para evitar la contaminación cruzada. Cada muestra fue transportada al laboratorio en un frasco estéril de 500 ml (**figura 38**).



Figura 38. Toma de muestra de heces.

En segundo lugar, un hisopo estéril se insertó en la cloaca de cada una de las gallinas seleccionadas, y luego se giró lentamente para tomar la muestra de fluidos, para ser analizado de

forma independiente. El hisopo se mantuvo en un tubo estéril que contenía 10 ml de agua de peptona tamponada hasta la entrega al laboratorio (**figura 39**).



Figura 39. Toma de muestra de hisopos cloacales.

Por último, por cada jaula, 6 huevos de gallina de 1 día desde la fecha de puesta se recogieron de la cinta de los huevos (**figura 40**).



Figura 40. Toma de muestra de huevos.

El contenido del huevo y la superficie externa del huevo se analizaron de forma independiente. Se utilizó un par de guantes diferentes para el muestreo de cada jaula. Todas las muestras fueron transportadas al laboratorio aproximadamente dos horas después de la recogida, almacenadas bajo refrigeración y se procesaron el día del muestreo.

En el caso del interior de los huevos, el método de aislamiento e identificación consistió en un preenriquecimiento no selectivo seguido de un enriquecimiento selectivo, aislamiento y la identificación bioquímica, de acuerdo con la norma ISO 6579: 2002. Los hisopos cloacales, las heces y las muestras de cáscaras de huevo se analizaron mediante una modificación de esta ISO (Anexo D), utilizando el semisólido modificado de Rappaport-

Vassiliadis (MSRV) como medio de enriquecimiento selectivo. En primer lugar, el preenriquecimiento en un medio no selectivo de las muestras se realizó a una dilución 1:10 en agua de peptona tamponada. Esta dilución se incubó a 37 ± 1 °C durante 18 ± 2 horas para todas las muestras. Esta dilución se realizó de forma diferente de acuerdo a la muestra ensayada.

Para las heces, la muestra se homogeneizó y se pesaron 25 g de la mezcla y se añadió a 225 ml de agua de peptona tamponada y, finalmente, la muestra se homogeneizó de nuevo. Para hisopos cloacales, se consideró la dilución 1:10 la muestra en 10 ml de agua de peptona tamponada. Para cáscaras de huevo, se consideró como una muestra la superficie de los 6 huevos. Cada grupo de 6 huevos se mantuvieron en contacto durante 10 minutos con 90 ml de agua de peptona tamponada (**figura 41**).

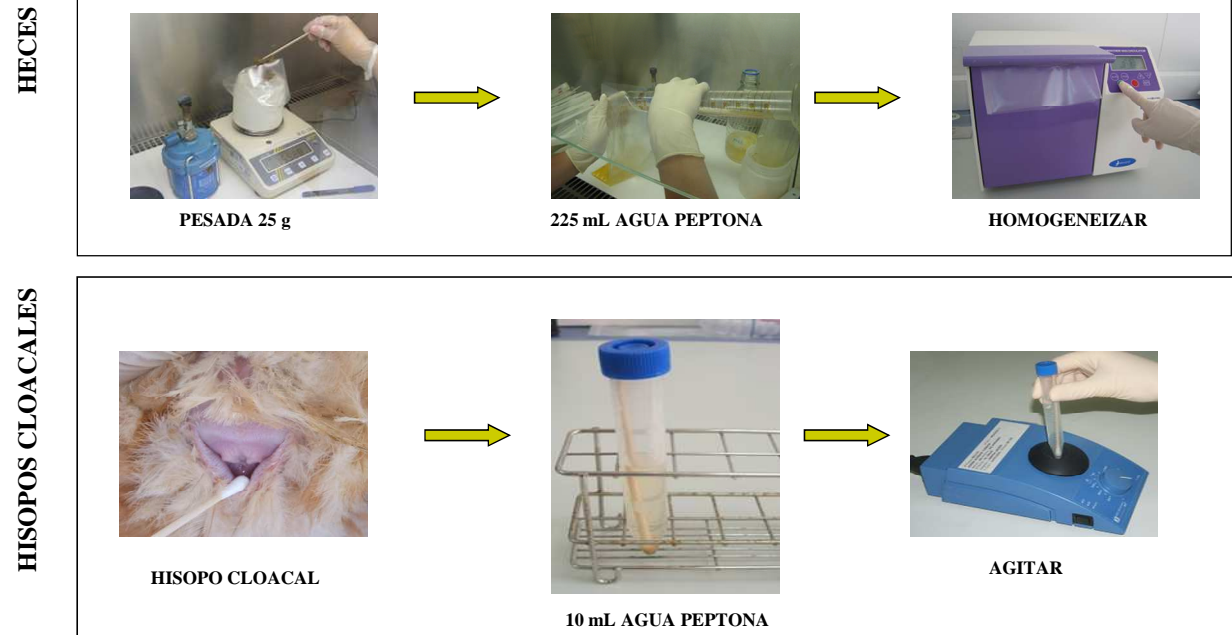


Figura 41. Preparación de las muestras de heces, hisopos cloacales y huevos.

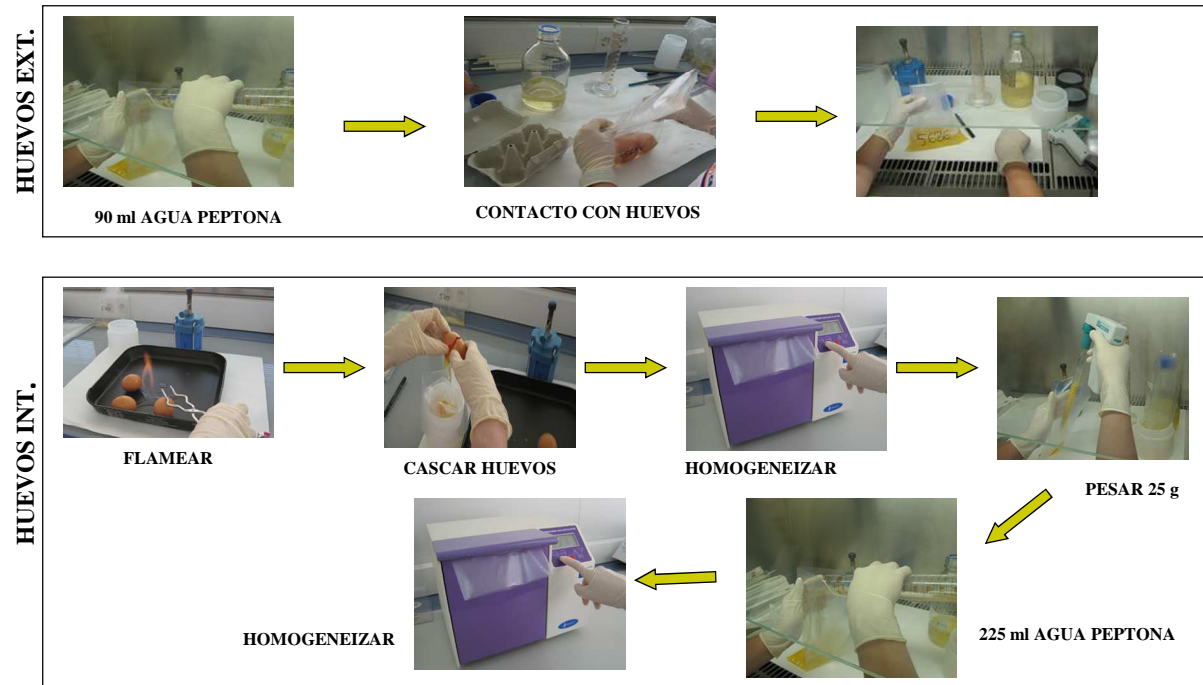


Figura 41. Preparación de las muestras de heces, hisopos cloacales y huevos (continuación).

A partir de estas muestras, 100 μ L del caldo preenriquecido se inoculó en MSR_V (Difco, Madrid, España). El MSR_V se incubó a $41,5 \pm 1$ °C durante 24 ± 3 horas. Si una placa era negativa después de 24 horas, se incubó durante otras 24 ± 3 horas. Las placas positivas mostraron una zona en blanco-gris y turbia que se extiende desde el punto de inoculación. La zona turbia se caracteriza por un halo blanco con un borde claramente definido. Dos medios selectivos sólidos, xilosa lisina desoxicolato agar (XLD) (Oxoid, Madrid, España) y xilosa lisina tergitol-4 agar (XLT4) (Oxoid, Madrid, España), fueron inoculadas e incubadas a 37 ± 1 °C, y luego se examinaron después de 24 ± 3 horas. Para el contenido de los huevos, las superficies de 6 huevos fueron flameadas con etanol (cada huevo se sumergió en etanol al 96% y luego flameado) para evitar la contaminación cruzada. Los huevos flameados se cascaron y se recogió el contenido en una bolsa estéril con el fin de homogeneizar. Se añadieron 225 ml de agua de peptona tamponada a 25 g de contenido del huevo homogeneizado, y finalmente se homogeneizaron de nuevo. En el siguiente paso, las muestras del interior de los huevos se procesaron de manera diferente que las otras muestras. Así, 100 μ L de caldo preenriquecido desde el contenido del huevo se transfirió a un tubo que contenía 10 ml de medio de Rappaport-Vassiliadis con soya (RVS) (Scharlau, Sentmenat, España), y 1 ml a un tubo que contenía 10 ml de Muller-Kauffmann tetracionato / novobiocina (MKTTn) caldo (Biomerieux, Madrid, España). El caldo RVS se incubó a $41,5 \pm 1$ °C y el caldo MKTTn a 37 ± 1 °C durante 24 ± 3

horas. De los cultivos de RVS y caldos MKTTn, se inocularon dos medios sólidos selectivos. Estos medios sólidos eran xilosa lisina desoxicolato agar y xilosa lisina tergitol-4 agar, que se incubaron a 37 ± 1 °C durante 24 ± 3 horas. Más tarde, cinco colonias aisladas como presuntivas *Salmonella* se sembraron desde los medios selectivos a placas de agar nutriente (Scharlau, Sentmenat, España) y se incubaron a 37 ± 1 °C durante 24 ± 3 horas. Por último, la confirmación bioquímica de *Salmonella* spp. se realizó por API 20E (Biomerieux, Madrid, España). En las **figuras 42** y **43** se esquematiza el procedimiento de ensayo.

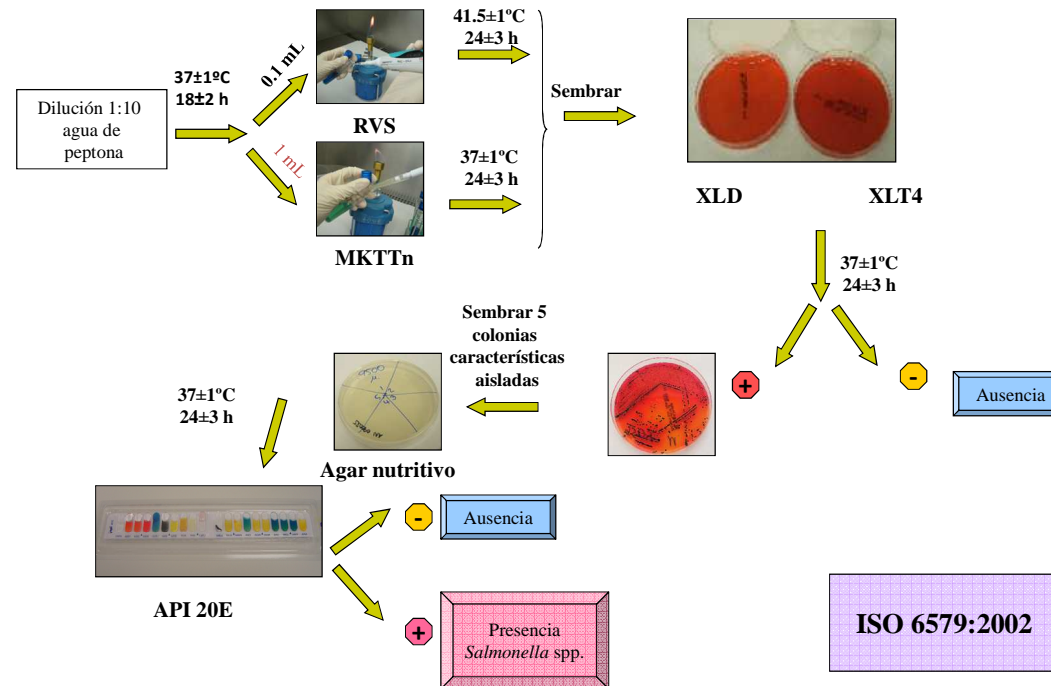


Figura 42. ISO 6579:2002 (contenido del huevo).

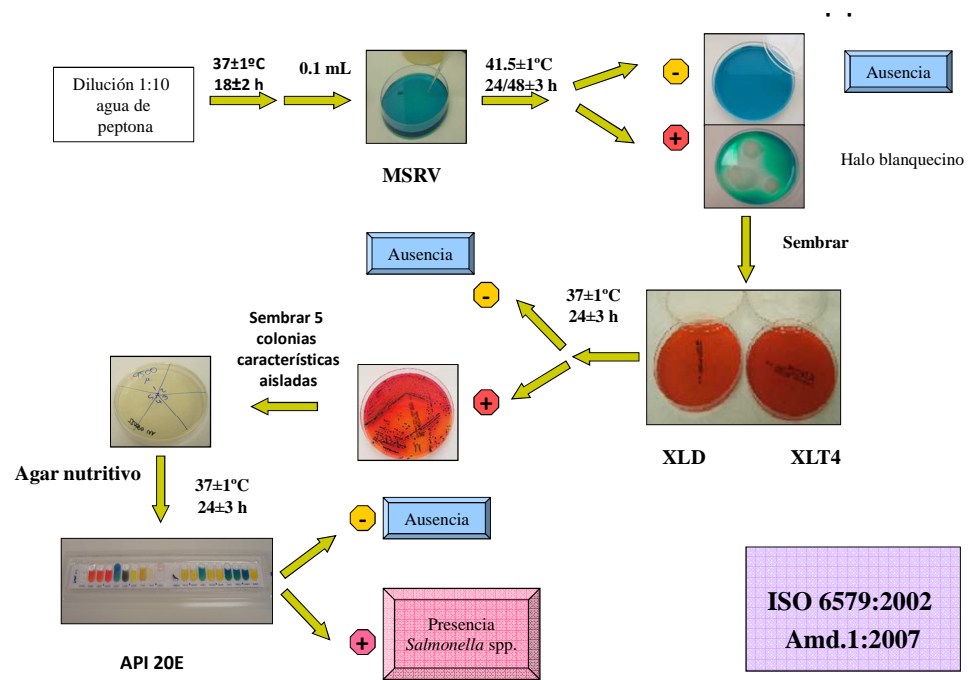


Figura 43. ISO 6579:2002/Amd. 1:2007 (heces, hispos cloacales y cáscara del huevo).

La caracterización de las cepas consistió en la determinación de serotipo y análisis de material genético.

De acuerdo con la norma ISO 6579:2002, tras la confirmación bioquímica de las colonias sospechosas de pertenecer al género *Salmonella*, hay que realizar el serotipado para antígenos somáticos (O), flagelares (H), y capsulares (Vi) mediante la prueba de aglutinación en placa según el esquema de Kauffmann-White-Le-Minor (**figura 44**).

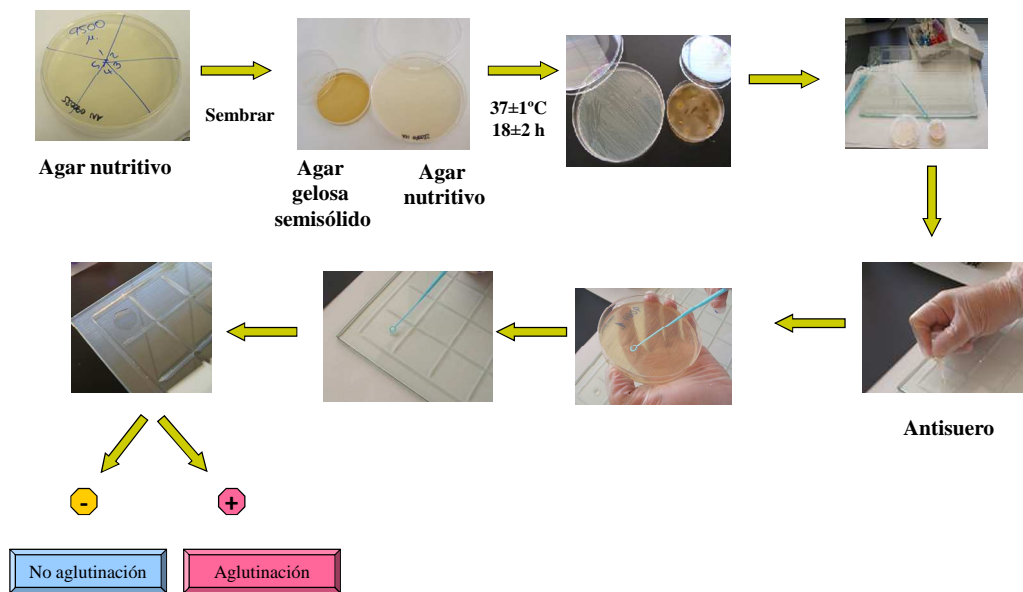


Figura 44. Serotipado *Salmonella* spp.

Las cepas confirmadas como *Salmonella* Enteritidis se compararon mediante macrorrestricción genómica seguida por electroforesis en gel de campo pulsado (PFGE), gracias a la colaboración de la Universidad Autónoma de Barcelona. Las cepas seleccionadas fueron de heces (jaulas 4, 15 y 24) hisopos (jaulas 12 y 48) y cáscaras de huevo (jaulas 16, 41 y 44).

Cada cepa estudiada se cultivó en medio LB y después se incubaron en atmósfera aerobia a 37 °C durante 18 horas. Se extrajo el ADN para los experimentos de PFGE tal y como describe Ribot *et al.* (2006). Se realizó la digestión total de ADN con la enzima XbaI (Roche Diagnostics, Sant Cugat del Vallès, España). PFGE se realizó en el aparato CHEF DR III (BioRad Laboratories, El Prat de Llobregat, España). Se realizó un análisis de la similitud de los perfiles obtenidos utilizando el paquete de software Fingerprinting II (BioRad Laboratories, El Prat de Llobregat, España). Como control de estabilidad y reproducibilidad de la técnica se utilizó una cepa de *Salmonella* Enteritidis (LK5) de la Universidad Autónoma de Barcelona. Se compararon las bandas obtenidas de la digestión de las cepas con XbaI (Roche Diagnostics, Sant Cugat del Vallès, España) con enzimas de restricción y PFGE. Las condiciones de electroforesis, la tinción de geles, y la adquisición de las imágenes digitales se realizó como se describió anteriormente por Shahada *et al.* (2007). El análisis e interpretación de imágenes TIFF de PFGE se llevó a cabo como se ha explicado anteriormente (Shahada *et al.*, 2007) (**figura 45**).

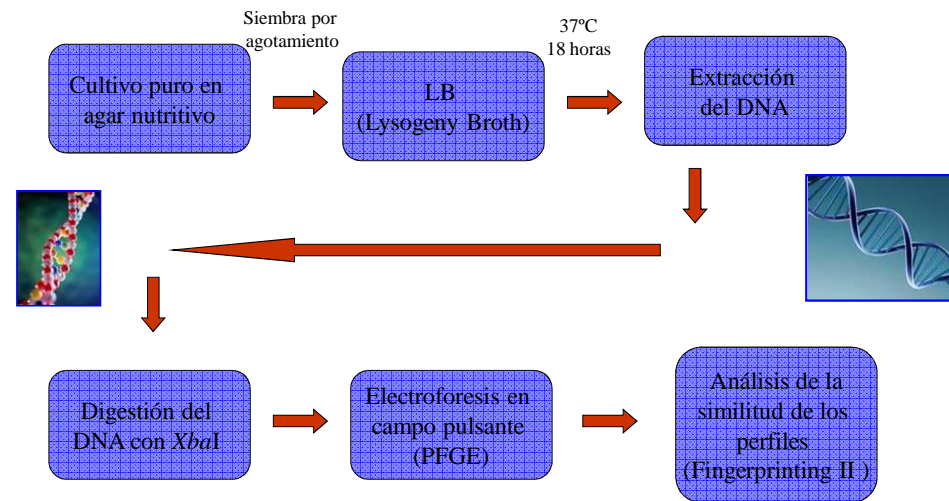


Figura 45. Macrorrestricción (PFGE).

Análisis estadístico: Los datos sobre la detección de *Salmonella* spp. en cada muestra (heces, hisopos, el contenido del huevo y cáscaras de huevo) fueron sometidos a la prueba de Chi-cuadrado con software Statgraphics Plus 5.1 (Manugistics, Inc, Dallas, EEUU).

Resultados

La **tabla 20** muestra los resultados de detección de *Salmonella* spp. en los cuatro tipos diferentes de muestras estudiadas. Se encontraron diferencias significativas ($p < 0,05$) de positividad a *Salmonella* spp. entre las muestras.

Tabla 20. Detección de *Salmonella* spp. en diferentes tipos de muestras (media en % de positividad de *Salmonella* spp.)

Muestra	n	Positividad (%)	Error estándar
Heces	50	92,0 ^a	3,9
Hisopos cloacales	150	4,0 ^b	2,8
Cáscara	50	34,0 ^b	6,8
Contenido huevos	50	0,0 ^c	0,0

^{a, b, c} Media en la misma columna con diferentes superíndices son significativamente diferentes por el test de Chi-cuadrado ($p < 0,05$).

Las heces (92%) fueron la muestra con más resultado de presencia, seguido de cáscaras de huevo (34%) e hisopos cloacales

(4%), mientras que no encontramos ninguna *Salmonella* spp. en el contenido del huevo (tabla 21 y figura 46).

Tabla 21. Resultados de los cultivos en las diferentes matrices estudiadas.

JAULA	HECES	HISOPO	HISOPO	HISOPO	HUEVOS	HUEVOS
		1	2	3	INTERIOR	EXTERIOR
Jaula1	+	-	-	-	-	+
Jaula 2	+	-	-	-	-	-
Jaula 3	+	-	-	-	-	-
Jaula 4	+	-	-	-	-	-
Jaula 5	+	-	-	-	-	-
Jaula 6	+	-	-	-	-	-
Jaula 7	+	-	-	-	-	-
Jaula 8	+	-	-	-	-	-
Jaula 9	+	-	-	-	-	-
Jaula 10	+	-	-	-	-	+
Jaula 11	+	-	-	-	-	+
Jaula 12	+	-	-	+	-	+
Jaula 13	+	-	-	-	-	-
Jaula 14	+	-	-	-	-	-
Jaula 15	+	-	-	-	-	+
Jaula 16	+	-	-	-	-	+
Jaula 17	+	-	-	-	-	-
Jaula 18	+	-	-	-	-	+
Jaula 19	+	-	-	-	-	-
Jaula 20	+	-	-	-	-	-
Jaula 21	+	-	-	-	-	+
Jaula 22	+	-	-	-	-	-
Jaula 23	+	-	-	-	-	-
Jaula 24	+	-	-	-	-	-
Jaula 25	+	-	-	-	-	+
Jaula 26	+	-	-	-	-	-
Jaula 27	+	-	-	-	-	+
Jaula 28	+	-	-	-	-	-

JAULA	HECES	HISOPO			HUEVOS	
		1	2	3	INTERIOR	EXTERIOR
Jaula 29	+	-	-	-	-	-
Jaula 30	+	-	-	-	-	-
Jaula 31	+	-	-	-	-	-
Jaula 32	+	-	-	-	-	-
Jaula 33	+	-	-	-	-	+
Jaula 34	+	-	-	-	-	+
Jaula 35	+	-	-	-	-	-
Jaula 36	-	-	-	-	-	+
Jaula 37	-	-	-	-	-	-
Jaula 38	+	-	-	-	-	-
Jaula 39	-	-	-	-	-	+
Jaula 40	-	-	-	-	-	-
Jaula 41	+	-	-	-	-	+
Jaula 42	+	-	-	-	-	-
Jaula 43	+	-	-	-	-	+
Jaula 44	+	-	-	-	-	+
Jaula 45	+	-	-	-	-	-
Jaula 46	+	-	-	-	-	-
Jaula 47	+	-	-	-	-	-
Jaula 48	+	-	-	+	-	-
Jaula 49	+	-	-	-	-	-
Jaula 50	+	-	-	-	-	-

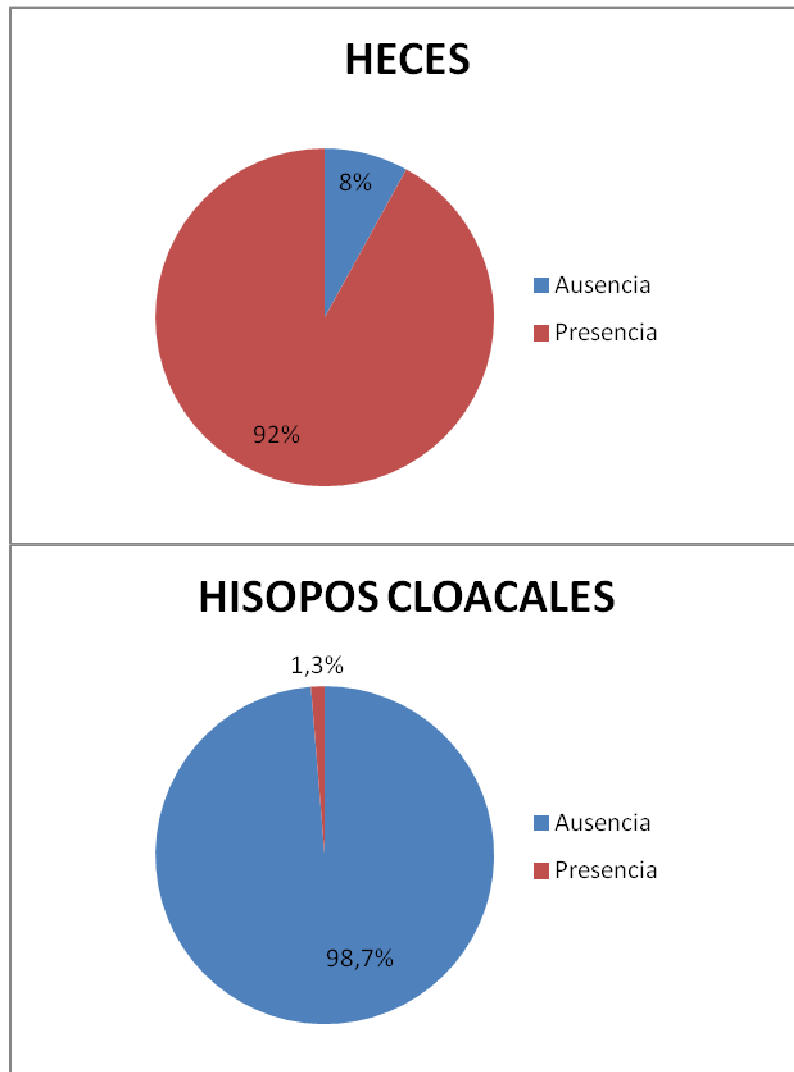


Figura 46. Resultados de *Salmonella* spp. en las diferentes matrices estudiadas.

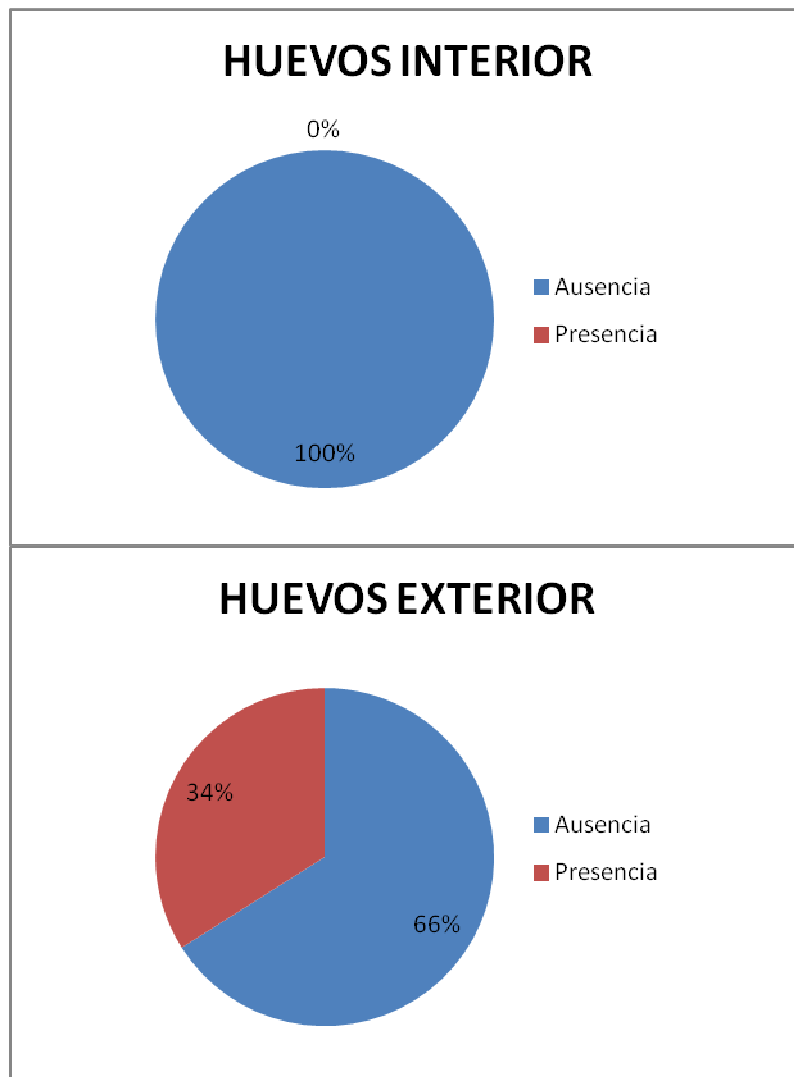


Figura 46. Resultados de *Salmonella* spp. en las diferentes matrices estudiadas.

La digestión del ADN genómico aislado de la *Salmonella* Enteritidis utilizando la enzima XbaI seguido por PFGE permitió la demostración de perfiles idénticos (**figura 47**). Estos resultados

confirman que el ADN genómico digerido con XbaI de cepas de *Salmonella* Enteritidis aisladas a partir de varias muestras en la granja de gallinas ponedoras resultó ser un patrón único (**figura 47**). Según Ribot *et al.* (2006), la técnica de PFGE se ha establecido como el "estándar de oro" en la tipificación de bacterias patógenas transmitidas por los alimentos.

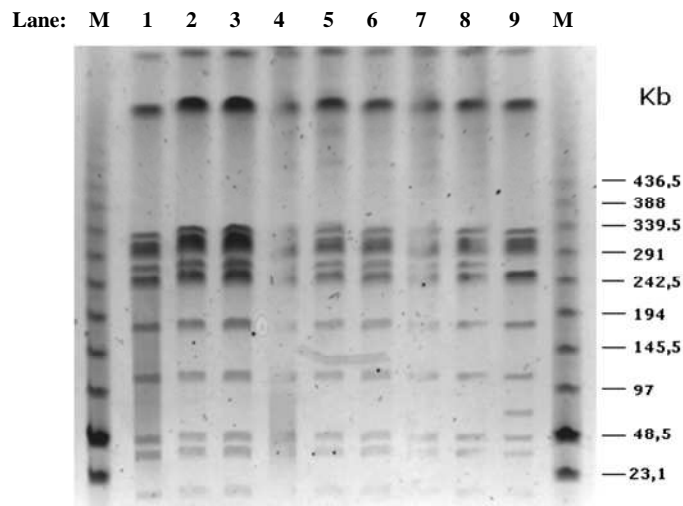


Figura 47. Patrones de electroforesis en gel de campo pulsado (PFGE) por digestión del DN genómica de cepas de *Salmonella* Enteritidis obtenidas de varias muestras en una granja de gallinas ponedoras. Carriles 1-2, *S.* Enteritidis de hisopos cloacales; carriles 3-5, *S.* Enteritidis de la cáscara de huevo; carriles 6-8, *S.* Enteritidis de heces; carril 9 es *S.* Enteritidis (LK5); M, marcador de PFGE.

Discusión y conclusiones

El tamaño del lote, la jaula y el muestreo son algunos factores a considerar en la contaminación por *Salmonella*.

Cuanto mayor es el tamaño del lote, mayor es el número de aves susceptibles (Mollenhorst *et al.*, 2005). Por otra parte, las explotaciones de gran tamaño son las que suelen tener varias naves que están vinculadas a las plantas de clasificación por medio de un transportador de huevos (Namata *et al.*, 2008).

En cuanto a al alojamiento de las gallinas y el procedimiento de toma de muestras, Garber *et al.* (2003) encontraron que la cría de pollitos en suelo en lugar de en jaulas aumentaba el riesgo de infección, mientras que Namata *et al.* (2009) informaron de que el alojamiento en pisos de las gallinas ponedoras parecía tener un efecto protector. Según Valancony *et al.* (2001), las jaulas de aves de corral son difíciles de limpiar y desinfectar. La contaminación por *Salmonella* se ha demostrado que es más persistente en lotes sucesivos alojados en jaulas que en suelo debido a la baja calidad de la limpieza y desinfección de granjas de jaulas (Davies y Breslin, 2003) o en los alrededores de los locales (Davies y Wray, 1996).

Huneau-Salaün, *et al.* (2009) reflejó que las heces son un método de muestreo menos sensible para la detección de *Salmonella* que las muestras de polvo o hisopos, como describió previamente Skov *et al.* (1999b) y Buhr *et al.* (2007) en granjas de pollos de engorde en suelo. La resistencia relativa de *Salmonella* a

la desecación podría explicar la mayor probabilidad de aislamiento de *Salmonella* a partir de muestras de polvo que en muestras de mezcla de heces. En las heces, la flora competitiva parece jugar un papel importante (Davies y Wray, 1996).

Probablemente el mayor riesgo de contaminación en las aves en jaula se debe a una falta de limpieza y desinfección de las naves de las aves de corral. El mayor riesgo de contaminación en las aves de jaula se ha reportado en varios países europeos, como Bélgica (Namata *et al.*, 2008), Dinamarca (Skov *et al.*, 1999a), Francia (Chemaly *et al.*, 2009), Alemania (Methner, 2006), entre otros.

En la cloaca de la gallina, la presencia de *Salmonella* fue menor que en las heces y cáscaras de huevo. Se recuperó menos *Salmonella* a partir de hisopos cloacales probablemente debido a que la *Salmonella* aislada de heces y cáscaras de huevo proviene de naves que no han sido limpiadas y desinfectadas correctamente. El-Tras *et al.* (2010) informó que la cloaca es un lugar importante implicado en la infección del huevo. Thomas *et al.* (2009) inoculó *Salmonella* Enteritidis en gallinas, y estimó en siete días el tiempo medio entre la colonización de una gallina "primaria" y la colonización de las gallinas expuestas. Una nave de 20000 gallinas alcanzaría un nivel máximo de colonización de 92% dentro de los 80 días después de la colonización de la primera gallina. Sin embargo, Van Hoorebeke *et al.* (2009) analizaron muestras cloacales y contenido fecal y observaron que el muestreo fecal subestima la prevalencia real de *Salmonella* en gallinas ponedoras

en base a los resultados del programa oficial de vigilancia. Okamura *et al.* (2001) sugirió que *Salmonella* Enteritidis tiene una ventaja específica sobre los otros serotipos de *Salmonella* por su capacidad para colonizar los tejidos vaginales de gallinas. Esta mayor afinidad de *Salmonella* Enteritidis a la vagina puede jugar un papel significativo en la producción de muchos huevos contaminados por este serotipo.

En cáscaras de huevo, la presencia de *Salmonella* fue del 34% de las muestras estudiadas. El-Tras *et al.* (2010) observaron que el riesgo de contaminación de la cáscara del huevo es altamente probable en gallinas ponedoras infectadas con *Salmonella* Enteritidis con porcentaje de más del 30%. Según De Reu *et al.* (2006), la penetración bacteriana de la cáscara de los huevos se debe a varios factores, incluyendo la gravedad específica y la conductancia. Jones y Curtis (2002), usando huevos enteros y *Salmonella* Enteritidis sugirieron que la contaminación bacteriana de las membranas de la cáscara y el contenido del huevo se logra más fácilmente en huevos de gallinas más viejas que de gallinas más jóvenes.

En el contenido de los huevos, no se detectó el microorganismo estudiado. La incidencia baja y esporádica de la contaminación de los huevos es probablemente debida al efecto protector del complejo sistema de las barreras de membrana del huevo y a la presencia de componentes antibacterianos en la albúmina. Se ha sugerido la penetración de la cáscara por *Salmonella* Enteritidis (Nascimento *et al.*, 1992; Schoeni *et al.*,

1995), y *Salmonella* Enteritidis, *Salmonella* Typhimurium o *Salmonella* Heidelberg presente en las heces podría penetrar en el interior de los huevos y crecer durante el almacenamiento.

En conclusión, la detección cualitativa del patógeno en altos niveles de contaminación (92%) en las heces de gallinas ponedoras no implicaba su presencia en el contenido del huevo. Los resultados de este estudio podrían ayudarnos a evaluar la forma en que la infección por *Salmonella* en la etapa de producción primaria contribuye a la infección por *Salmonella* en los seres humanos, frente a la incorrecta manipulación doméstica de huevos. De acuerdo con estos resultados, sería más útil evaluar cuantitativamente la presencia de *Salmonella* spp. en heces en las gallinas ponedoras (contando el número de bacterias) en lugar de cualitativamente para establecer una correlación real con la presencia del patógeno en el contenido de los huevos.

**3.7 CAPÍTULO SÉPTIMO:
EMPLEO DE BACTERIÓFAGOS FRENTE A
SALMONELLA ENTERITIDIS COMO
HERRAMIENTA DE PREVENCIÓN.**

3.7. Capítulo séptimo: Empleo de bacteriófagos frente a *Salmonella* Enteritidis como herramienta de prevención

Resumen

En este trabajo se evaluó el efecto *in vitro* de bacteriófagos frente a *Salmonella* Enteritidis. Para ello, se realizaron dos pruebas con tres concentraciones de bacteriófagos frente a dos cepas de *Salmonella* Enteritidis inoculadas en muestras de heces frescas de gallinas ponedoras, y el correspondiente control positivo. Así, se testaron cuatro grupos en cada una de las dos pruebas. Cada grupo experimental contó con dos réplicas, y en cada réplica se incubaron tres placas.

Las concentraciones ensayadas fueron tres: solución comercial (5×10^7 pfu/ml), y dos diluciones de la misma (1/10 y 1/30). Una de las cepas testada fue la cepa CECT 4300, cepa certificada de la Colección Española de Cultivo Tipo y la otra una cepa de campo aislada en una explotación de ponedoras sacrificada. Ambas cepas se inocularon en muestras de heces a la dosis de 1.3×10^5 ufc/g de heces en cada uno de los cuatro grupos. Se procedió con el aislamiento e identificación de la bacteria por ISO6579 a varios tiempos desde la inoculación: 1 minuto, 24h y 7 días.

En la primera prueba, con la cepa certificada, se aisló *Salmonella* en todos los grupos a tiempo 1 minuto. A las 24h se aisló *Salmonella* en todos los grupos excepto en una de las réplicas tratada con la dilución 1/10 de bacteriófagos, en una de las placas

de la otra réplica tratada con la dilución 1/10, y en dos placas de cada una de las dos réplicas tratadas con la solución comercial. A partir de los 7 días, ya no se aisló la bacteria de ninguno de los grupos experimentales.

En la segunda prueba, con la cepa de campo, se aisló *Salmonella* en todos los grupos a tiempo 1 minuto. A las 24h se aisló *Salmonella* en todos los grupos excepto en una de las réplicas tratada con la dilución 1/10 de bacteriófagos y en las dos réplicas tratadas con la solución comercial. Al igual que en la prueba primera, a los 7 días tampoco se aisló *Salmonella* en ninguno de los grupos experimentales.

Como conclusión, el empleo de bacteriófagos contribuyó a reducir los aislamientos de *Salmonella* Enteritidis en las muestras de heces a las 24h de su aplicación, por lo que podría ser considerado una herramienta de prevención. A los 7 días tras la inoculación de la bacteria, no se aisló la misma en ninguno de los grupos experimentales.

Introducción

La salmonelosis humana presenta una destacada prevalencia (Mølbak y Neimann, 2002) y forma parte del grupo de enfermedades de transmisión alimentaria con graves consecuencias económicas, sociales y sanitarias. Los principales factores de riesgo de intoxicación alimentaria causada por *Salmonella* están relacionadas con las aves de corral tales como carne de pollo o

huevos poco cocinados. Entre las salmonellas más importantes asociadas con el pollo y huevos se encuentra la *Salmonella* entérica serovar Enteritidis (*S. Enteritidis*). Éste es un serotipo que ha entrado en la industria avícola intensiva y puede causar la infección y la contaminación de los productos avícolas, con ausencia de la enfermedad clínica. El control de salmonellas en la etapa de producción primaria es de importancia primordial. Se puede prevenir la introducción de esta bacteria en la cadena alimentaria y por tanto, reducir la intoxicación entre los consumidores (Fiorentin *et al.*, 2005). Una de las prácticas utilizadas en las explotaciones para controlar la *Salmonella* es el uso de antibióticos. Sin embargo, el elevado grado de resistencia de la bacteria plantea limitaciones graves en las posibilidades del tratamiento eficaz.

Los bacteriófagos (fagos) son virus que matan bacterias (Huff *et al.*, 2013). Los fagos han sido propuestos como alternativa al uso de antibióticos basado en su capacidad para invadir y perturbar el metabolismo bacteriano, que causa la lisis de las bacterias (Oliveira *et al.*, 2010).

Los bacteriófagos son específicos para cada bacteria previniendo la destrucción de la flora circundante; se adhieren a la pared bacteriana contribuyendo a atenuar factores de virulencia; no inducen fenómenos alérgicos; no se han detectado efectos secundarios (son inofensivos para los animales, las plantas y para el medio ambiente); pueden ser usados como tratamiento preventivo y para higienización; continúan multiplicándose hasta que la infección con el huésped se mantenga (terminan su acción cuando

ya no hay bacteria huésped); se utilizan en una única aplicación y no tienen intervalo de seguridad (Serenó, 2013).

En este trabajo se evaluó el efecto *in vitro* de bacteriófagos frente a *Salmonella* Enteritidis. Para ello, se realizaron dos pruebas con tres concentraciones de bacteriófagos frente a dos cepas de *Salmonella* Enteritidis (una cepa de referencia y una cepa aislada en campo) inoculadas en muestras de heces frescas de gallinas ponedoras, y el correspondiente control positivo. Así, se testaron cuatro grupos en cada una de las dos pruebas.

Material y métodos

En este trabajo se evaluó el efecto *in vitro* de bacteriófagos frente a *Salmonella* Enteritidis, inoculada en muestras de heces frescas de gallinas ponedoras. Para ello, se realizaron dos pruebas con dos cepas de *Salmonella* Enteritidis. Las cepas inoculadas fueron: cepa CECT 4300, cepa certificada de la Colección Española de Cultivo Tipo y cepa de campo aislada en una explotación de ponedoras sacrificada. Se emplearon dos cepas con orígenes diferentes para evaluar posibles diferencias en cuanto a la resistencia a la acción del tratamiento o la viabilidad de la cepa inoculada en heces y mantenida a 25°C. Esquemáticamente, la metodología de trabajo ha sido la indicada en la **figura 48**.

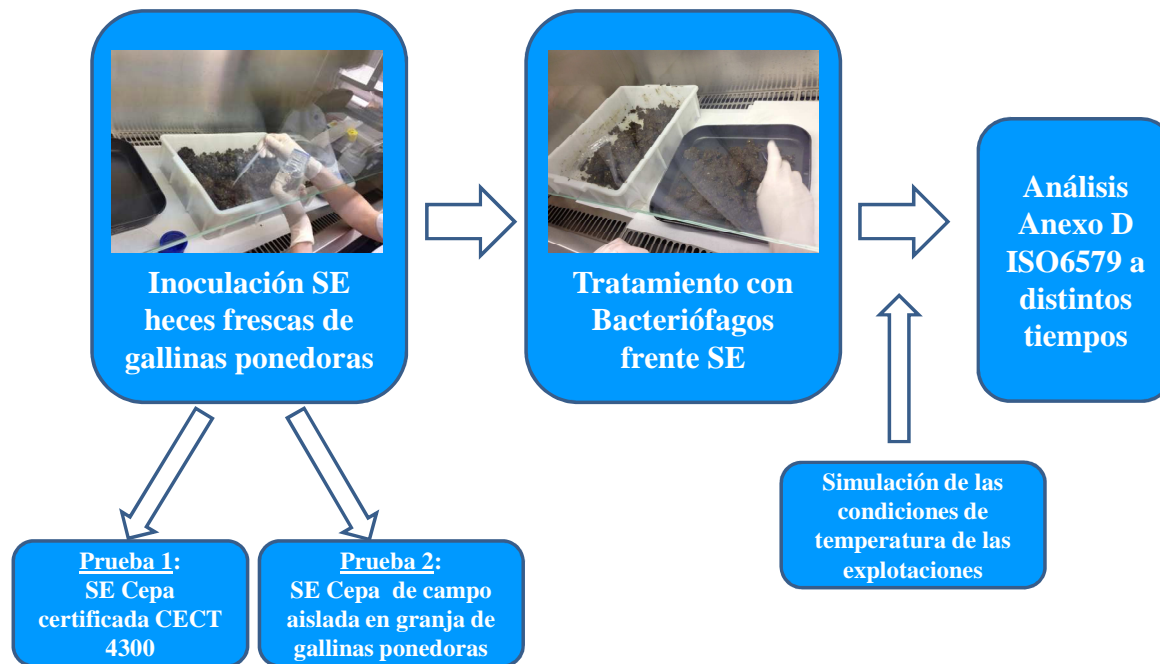


Figura 48. Metodología de trabajo empleada en la prueba de fagos.

La inoculación se realizó sobre heces de gallinas ponedoras libres de *Salmonella* spp. Para garantizar la ausencia de este microorganismo se analizaron las heces 10 veces por el método ISO 6579:2002/Amd. 1:2007, con resultado de ausencia de *Salmonella* spp. Posteriormente, se adicionó 100 ml de una solución de 10^6 ufc/ml de cada una de las cepas sobre 2 kg de estas heces (equivalente a $0,4 \text{ m}^2$ de la cinta). Por tanto, ambas cepas se inocularon en muestras de heces a la dosis de $1,3 \times 10^5$ ufc/g de heces.

Para cada prueba, la mezcla de heces inoculada se repartió en 4 porciones de 500 g. Cada porción constituye la muestra de análisis de un grupo experimental. Una de las porciones se pulverizó con 2 ml de una solución comercial de bacteriófagos Bio-S107 de Controvet Genetics (5×10^7 pfu/ml), otra con 2 ml de una dilución 1/10 (5×10^6 pfu/ml) y otra con 2 ml de una dilución 1/30 ($1,6 \times 10^6$ pfu/ml), de la misma. La última porción es el control positivo y no fue tratada con bacteriófagos.

Las cuatro porciones de heces se repartieron en dos subporciones.

Por tanto, en cada prueba se testaron tres concentraciones de bacteriófagos y el correspondiente control. Se realizaron dos réplicas (una réplica de cada subporción) de cada grupo experimental

Se tomaron 25 g de cada subporción y se analizaron según la ISO 6579:2002/Amd. 1:2007, teniendo en cuenta que se sembraron tres placas de Rappaport-Vassiliadis semisólido

modificado (MSRV) de cada submuestra. El ensayo se realizó a distintos tiempos desde la incubación: 1 minuto, 24h y 7 días.

Las submuestras se mantuvieron a $25\pm 2^{\circ}\text{C}$ entre cada análisis, controlando la temperatura con sondas calibradas.

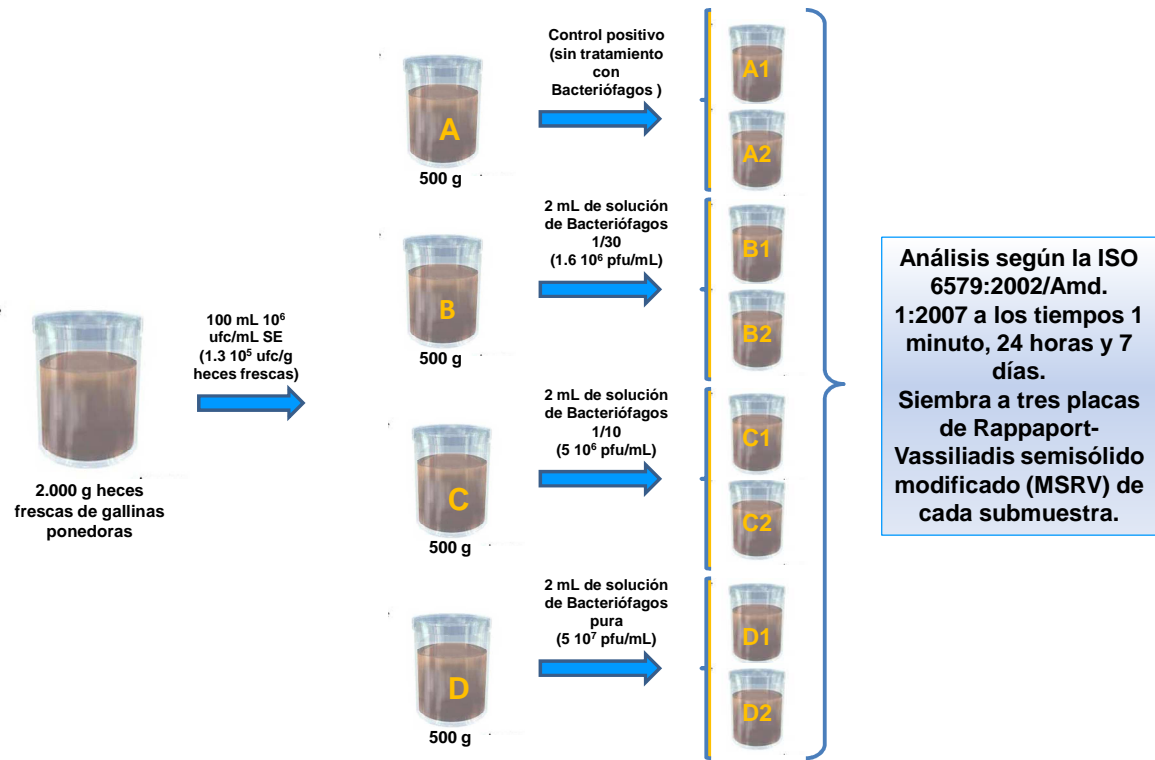


Figura 49. Subporciones analizadas.

Resultados

En la primera prueba, con la cepa certificada, se aisló *Salmonella* en todos los grupos a tiempo 1 minuto. A las 24h se aisló *Salmonella* en todos los grupos excepto en una de las réplicas tratada con la dilución 1/10 de bacteriófagos, en una de las placas de la otra réplica tratada con la dilución 1/10, y en dos placas de cada una de las dos réplicas tratadas con la solución comercial de bacteriófagos.

En la segunda prueba, con la cepa de campo, se aisló *Salmonella* en todos los grupos a tiempo 1 minuto. A las 24h se aisló *Salmonella* en todos los grupos excepto en una de las réplicas tratada con la dilución 1/10 de bacteriófagos y en las dos réplicas tratadas con la solución comercial de bacteriófagos. A los 7 días, no se aisló *Salmonella* en ninguno de los grupos experimentales de las dos pruebas.

Los resultados se presentan en la **tabla 22**.

Tabla 22. Resultados prueba de fagos.

	Tiempo análisis	N° presencias Cepa certificada	N° presencias Cepa de campo
Heces ponedoras + SE (A1)		3/3	3/3
Heces ponedoras + SE (A2)		3/3	3/3
Heces ponedoras + SE + dilución 1/30 Bacteriófagos (B1)		3/3	3/3
Heces ponedoras + SE + dilución 1/30 Bacteriófagos (B2)	0	3/3	3/3
Heces ponedoras + SE + dilución 1/10 Bacteriófagos (C1)		3/3	3/3
Heces ponedoras + SE + dilución 1/10 Bacteriófagos (C2)		3/3	3/3
Heces ponedoras + SE + Puro Bacteriófagos (D1)		3/3	3/3
Heces ponedoras + SE + Puro Bacteriófagos (D1))		3/3	3/3
Heces ponedoras + SE (A1)		3/3	3/3
Heces ponedoras + SE (A2)		3/3	3/3
Heces ponedoras + SE + dilución 1/30 Bacteriófagos (B1)		3/3	3/3
Heces ponedoras + SE + dilución 1/30 Bacteriófagos (B2)	24h	3/3	3/3
Heces ponedoras + SE + dilución 1/10 Bacteriófagos (C1)		2/3	3/3
Heces ponedoras + SE + dilución 1/10 Bacteriófagos (C2)		0/3	0/3
Heces ponedoras + SE + Puro Bacteriófagos (D1)		1/3	0/3

	Tiempo análisis	N° presencias Ceba certificada	N° presencias Ceba de campo
Heces ponedoras + SE + Puro Bacteriófagos (D1))		1/3	0/3
Heces ponedoras + SE (A1)		0/3	0/3
Heces ponedoras + SE (A2)		0/3	0/3
Heces ponedoras + SE + dilución 1/30 Bacteriófagos (B1)		0/3	0/3
Heces ponedoras + SE + dilución 1/30 Bacteriófagos (B2)	7d	0/3	0/3
Heces ponedoras + SE + dilución 1/10 Bacteriófagos (C1)		0/3	0/3
Heces ponedoras + SE + dilución 1/10 Bacteriófagos (C2)		0/3	0/3
Heces ponedoras + SE + Puro Bacteriófagos (D1)		0/3	0/3
Heces ponedoras + SE + Puro Bacteriófagos (D1))		0/3	0/3

Discusión y conclusiones

Comparando los resultados obtenidos con ambas cepas, no se han detectado diferencias a excepción de los resultados a las 24 horas en las muestras tratadas con la dilución 1/10 y dilución pura de bacteriófagos, donde parece que el efecto es ligeramente mayor frente a la cepa de campo.

Algunos estudios han demostrado que matrices con a_w menor o igual a 0,93 no sustentan el crecimiento de *Salmonella* (D'Aoust, 1989). La deshidratación de las heces a 25 °C podría ser el motivo por el cual no se ha aislado *Salmonella* a los 7 días en los controles positivos en ambas pruebas.

Como conclusión, el empleo de bacteriófagos contribuyó a reducir los aislamientos de *Salmonella* Enteritidis en las muestras de heces a las 24h de su aplicación, por lo que podría ser considerado una herramienta de prevención. Por otro lado, la solución de bacteriófagos resultó ligeramente más eficaz frente a la cepa de campo, que frente a la cepa certificada. Teniendo en cuenta los resultados obtenidos, este estudio podría complementarse reduciendo los tiempos entre los análisis, es decir, realizando el ensayo de *Salmonella* al minuto 1, a las 24 horas, a las 48 horas, a las 72 horas, etc. desde la inoculación. De esta forma, se evaluaría la reducción de los aislamientos de *Salmonella* Enteritidis por acción de los bacteriófagos en función del tiempo durante el periodo en el que el control positivo es viable en las condiciones experimentales.

4. DISCUSIÓN GENERAL

4. DISCUSIÓN GENERAL

Se espera que el consumo de carne de aves de corral siga creciendo en los próximos años, con Francia, el Reino Unido, los Países Bajos, Alemania, Italia, Polonia y España como principales países productores dentro de los (entonces) 27 Estados miembros de la Unión Europea (ahora 28) (Van Horne, 2007).

Las infecciones por MG, NCD e IA deben notificarse ante la OIE según la lista única de enfermedades de declaración obligatoria para animales terrestres y acuáticos. La rápida expansión de la industria avícola en todo el mundo en áreas geográficas restringidas y las graves pérdidas económicas debidas a estas enfermedades conducen a la puesta en marcha de nuevas herramientas de seguimiento (OIE, 2009). Por otra parte, las principales herramientas de prevención frente a IBD son las medidas de bioseguridad y la vacunación.

La ley aplicable en el control de *Salmonella* en la Unión Europea es el Reglamento (CE) n ° 2160/2003 (Official Journal of the European Union, 2003). El número de casos notificados de salmonelosis en humanos en la UE disminuyó en 2012, según los últimos datos de 27 Estados miembros publicados en febrero de 2014 en el Informe resumido de la Unión Europea sobre las tendencias y fuentes de las zoonosis, los agentes zoonóticos y brotes de origen alimentario en 2012, y esta disminución es la continuación de una tendencia decreciente observada en los últimos cinco años. La reducción observada en los casos de *Salmonella* en

humanos es principalmente atribuida al resultado exitoso de los programas de control de *Salmonella* de aves de corral. Sin embargo, la *Salmonella* sigue siendo la causa más frecuentemente reportada de brotes de origen alimentario en la UE (22,5% de los brotes totales). Desde 2008 a 2013 el número anual de brotes de *Salmonella* en la UE disminuyó notablemente en un 38,1% (de 1888 a 1168 brotes) (EFSA, 2015).

La combinación de análisis en las explotaciones y las medidas de prevención, junto con el desarrollo de mapas de prevalencia y seroprevalencia son herramientas vitales en la tarea de mantener las aves de corral seguras. En esta Tesis Doctoral se ha obtenido e integrado la información sanitaria de las explotaciones avícolas estudiadas y se ha diseñado e implementado los mapas de seroprevalencia para el control de IANBP (influenza aviar de baja patogenicidad de declaración obligatoria), NCD, MG y IBD y el mapa de prevalencia para *Salmonella* spp. Además, se ha controlado y representado en un mapa dinámico la respuesta serológica después de una vacunación única *in ovo* frente a IBD, utilizando una vacuna de inmunocomplejos en pollos.

El uso de los SIG (sistema de información geográfica) es muy importante en la determinación de los factores de riesgo. La literatura refleja el uso de la tecnología SIG en la prevención de enfermedades de las aves en países como Italia y China. Ehlers *et al.* (Ehlers *et al.*, 2003) aplicaron esta tecnología en el marco de un plan de contingencia implementado durante la epidemia de 1999 a 2001 de la gripe aviar en Italia. Los brotes en 1999-2000 en

Lombardía y Véneto fueron asignados, utilizando la interfaz entre la tasa de incidencia de la infección y el sistema de información geográfica denominada GRASS 5.0 (Chang *et al.*, 2007). En China, Chang *et al.* (2007) desarrollaron la herramienta IV Sequence Distribution Tool (IVDT), similar a los SIG, que busca en los datos de coordenadas y después dibuja el mapa de distribución. A nivel mundial, Boulos y Burden (Boulos *et al.*, 2007) aplicaron una Web-Based Really Simple Syndication (RSS). El precursor de este sistema fue diseñado por la Organización de Alimentación y Agricultura de las Naciones Unidas (Food and Agriculture Organization, FAO), que, en 1994, desarrolló un sistema de información sanitaria mundial basado en la web llamada EMPRES-i, que se aplicó a la IAAP, entre otras enfermedades (Martin *et al.*, 2007). Este sistema fue desarrollado utilizando diversas fuentes de información, como los sitios web oficiales de la OIE, la Organización Mundial de la Salud, Comisión Europea, los Gobiernos y los Ministerios de Agricultura. Vietnam, en colaboración con el Centro de Investigación Agronómica para el Desarrollo (French Agricultural Research Centre for Development, CIRAD), desarrolló el SIG y Agent-based Modelling Architecture (GAMA) plataforma de simulación (Amouroux *et al.*, 2009). En un brote de *Salmonella* Typhimurium ocurrido en el suroeste de Inglaterra, en abril-mayo de 2003, se llevó a cabo un estudio de control de casos, junto con una investigación del medio ambiente y se analizó con un SIG. El autor propone que deben ser considerados métodos alternativos en apoyo de la investigación

epidemiológica tradicional (Boccia *et al.*, 2004), como podría ser la elaboración de DPM. Otros estudios de prevalencia de *Salmonella* en España podrían mejorarse por DPM, como el presentado por Vico y Mainar-Jaime (Vico y Mainar-Jaime, 2012) en cerdos.

El uso de herramientas informáticas similares ha crecido significativamente en los últimos años en el control de varias enfermedades de los animales, incluyendo la lengua azul (Conte *et al.*, 2005; Dall'Acqua *et al.*, 2006; Savini *et al.*, 2003; Calistri *et al.*, 2007), las epidemias de camarón (Bayot *et al.*, 2008) y otros (Savini *et al.*, 2007), además de las descritas anteriormente para IA. Sin embargo, hasta ahora, no había disponible herramientas informáticas en tiempo real aplicadas para mejorar la vigilancia de enfermedades como la IA, MG, NCD, *Salmonella* spp. o para mejorar el control de la inmunización IBD, en pollos de engorde de la Comunidad Valenciana y España. Los mapas de prevalencia y seroprevalencia desarrollados en el presente estudio pueden filtrar los resultados por varias métricas, como el tiempo (año, trimestre, mes o día) o geografía (provincia, región o ciudad).

En cuanto al estudio de seroprevalencia de IBD en animales vacunados, el manejo adecuado de la vacuna en la incubadora y su administración eficiente a cada pollo de un día o al huevo embrionado es fundamental para obtener la inmunización del lote eficiente y uniforme sobre todo cuando se usa una sola dosis de vacuna frente una enfermedad específica. Este monitoreo serológico, teniendo en cuenta la distribución territorial y evolución temporal ayudó a evaluar la eficiencia y la calidad de la

administración de una sola dosis de vacuno de inmunocomplejos *in ovo*, en la incubadora. Hay estudios previos de seroprevalencia de IBD (Mushi *et al.*, 1999; Maw *et al.*, 2008; Jenbreie *et al.*, 2012) pero ninguno considera los mapas de seroprevalencia con ELISA y broliers aplicando una única dosis de vacuna de inmunocomplejos *in ovo* frente IBD. Esta herramienta podría permitir comparar la respuesta humoral en diferentes lugares geográficos durante un período, destacando las posibles diferencias de presión de la infección y la eficiencia y homogeneidad en la administración de la vacuna en la incubadora.

En conclusión, el monitoreo de la situación sanitaria de las explotaciones de engorde puede constituir una herramienta útil para los servicios técnicos veterinarios para el control de enfermedades y de la respuesta serológica a la vacunación en dosis única *in ovo* de pollos de engorde frente a IBD utilizando una vacuna basada en inmunocomplejos. Estos DPM basados en BI aplicados en pollos de engorde de la Comunidad Valenciana podría ser una herramienta eficaz para el control, lo que puede ayudar a los veterinarios y Servicios Veterinarios Oficiales a estar mejor preparados para combatir estas enfermedades.

En este trabajo, los datos fueron categorizados en diferentes áreas e identificados por colores. En los mapas de IA se integraron resultados cualitativos. En los mapas se representaron en verde las zonas en las que S/P era menor o igual de 0,5 (animales no vacunados y infectados) y en amarillo las de S/P mayor de 0,5 (animales vacunados, seroconversión o desafío de campo). Todos

los resultados fueron negativos (verde), indicando que no existió infección en las explotaciones analizadas durante este periodo.

En los mapas de NCD los resultados fueron cuantitativos de los títulos de IHA de APMV-1 (paramixovirus aviar del tipo 1). Se representaron los títulos más bajos en verde, los más altos en rojo y los valores intermedios en amarillo. Este código de colores depende de los valores obtenidos en el periodo analizado. Así, se puede comparar respuestas humorales frente a NCD para ese periodo en regiones geográficas diferentes, delimitando posibles presiones de infección. Se debe considerar el valor absoluto para la interpretación correcta. El único resultado positivo durante el periodo en estudio fue en el Bajo Segura en 2009, sin sintomatología reportada. Se determinó como un falso positivo mediante técnicas moleculares (Reacción en Cadena de la Polimerasa, PCR).

En el caso de MG se representa los títulos de ELISA más bajos en verde, los más altos en rojo y los valores intermedios en amarillo. Los títulos mayores de 500 se consideran indicativos de contacto con MG. Como los pollos de engorde en estudio no fueron vacunados frente a MG, los resultados de 2009 indicaron mayor presión de la infección en las granjas de la comarca de "Los Serranos". En 2010, ninguna de las comarcas estudiadas presentó resultados promedio indicativo de infección. En general, se detectó bajo nivel de presión de infección de MG en las granjas de engorde en el presente estudio.

Los mapas de prevelencia de *Salmonella* spp. muestran gráficamente los resultados cualitativos (presencia/ausencia), representando en verde las regiones que tenían todos los resultados de ausencia de *Salmonella* spp.. La intensidad del color verde está directamente relacionada con el número de lotes muestreados. Cuando una región tuvo resultados con presencia de *Salmonella* spp. los colores utilizados variaron de amarillo a naranja, de manera que el amarillo representa los valores más bajos y el naranja los más altos. Esta codificación de colores es dependiente de los valores obtenidos en el período analizado. Por lo tanto, los resultados de *Salmonella* pueden ser comparados en diferentes regiones geográficas en este período.

La región con mayor número de resultados de presencia de *Salmonella* spp y mayor número de muestreos fue el Bajo Maestrazgo de forma constante en todos los años de este estudio.

Debido a la importancia que tiene la *Salmonella* en el sector avícola, además del mapa de prevalencia antes mencionado, se han realizado dos estudios más dedicados a este patógeno. En el primero de los estudios adicionales se realizó una comparación de presencia de *Salmonella* spp. en heces y en huevo en una explotación de gallinas ponedoras en las que se había detectado la presencia de *Salmonella* Enteritidis.

El tamaño del lote, la jaula y el muestreo son algunos factores a considerar en la contaminación por *Salmonella*. (Mollenhorst *et al.*, 2005; Namata *et al.*, 20086; Garber *et al.*, 2003; Namata *et al.* 2009; Valancony *et al.*, 2001; Davies y

Breslin, 2003; Davies y Wray, 1996). Huneau-Salaün, *et al.* (2009) reflejó que las heces son un método de muestreo menos sensible para la detección de *Salmonella* que las muestras de polvo o hisopos, como describió previamente Skov *et al.* (1999b) y Buhr *et al.* (2007) en granjas de pollos de engorde en suelo. La resistencia relativa de *Salmonella* a la desecación podría explicar la mayor probabilidad de aislamiento de *Salmonella* a partir de muestras de polvo que de muestras de mezcla de heces. En las heces, la flora competitiva parece jugar un papel importante (Davies y Wray, 1996). Probablemente el mayor riesgo de contaminación en las aves en jaula se debe a una falta de limpieza y desinfección de las naves de las aves de corral. En la cloaca de la gallina, la presencia de *Salmonella* fue menor que en las heces y cáscaras de huevo. Se recuperó menos *Salmonella* a partir de hisopos cloacales probablemente debido a que la *Salmonella* aislada de heces y cáscaras de huevo proviene de naves que no han sido limpiadas y desinfectadas correctamente. El-Tras *et al.* (2010) informó que la cloaca es un lugar importante implicado en la infección del huevo. En cáscaras de huevo, la presencia de *Salmonella* fue del 34% de las muestras estudiadas. El-Tras *et al.* (2010) observaron que el riesgo de contaminación de la cáscara del huevo es altamente probable en gallinas ponedoras infectadas con *Salmonella* Enteritidis con porcentaje de más del 30%. Según De Reu *et al.* (2006), la penetración bacteriana de la cáscara de los huevos se debe a varios factores, incluyendo la gravedad específica y la conductancia. En el contenido de los huevos, no hemos detectado el

microorganismo estudiado. La incidencia baja y esporádica de la contaminación de los huevos es probablemente debida al efecto protector del complejo sistema del huevo de las barreras de membrana y componentes antibacterianos en la albúmina. Se ha sugerido la penetración de la cáscara por *Salmonella* Enteritidis (Nascimento *et al.*, 1992; Schoeni *et al.*, 1995), y *Salmonella* Enteritidis, *Salmonella* Typhimurium o *Salmonella* Heidelberg presente en las heces podría penetrar en el interior de los huevos y crecer durante el almacenamiento. Así, la detección cualitativa del patógeno en altos niveles de contaminación (92%) en las heces de gallinas ponedoras no implicó su presencia en el contenido del huevo. Los resultados de este estudio podrían ayudarnos a evaluar la forma en que la infección por *Salmonella* en la etapa de producción primaria contribuye a la infección por *Salmonella* en los seres humanos, frente a la incorrecta manipulación doméstica de huevos. De acuerdo con estos resultados, sería más útil evaluar cuantitativamente la presencia de *Salmonella* spp. en heces en las gallinas ponedoras (contando el número de bacterias) en lugar de cualitativamente para establecer una correlación real con la presencia del patógeno en el contenido de los huevos.

El segundo trabajo adicional relacionado con *Salmonella* consistió en un estudio *in vitro* del efecto de los bacteriófagos sobre la *Salmonella* en heces. Comparando los resultados obtenidos con ambas cepas (cepa de referencia y cepa de campo), no se detectaron diferencias a excepción de los resultados a las 24 horas en las muestras tratadas con la dilución 1/10 y dilución pura de

bacteriófagos, donde parece que el efecto es ligeramente mayor frente a la cepa de campo.

Algunos estudios han demostrado que matrices con a_w menor o igual a 0.93 no sustentan el crecimiento de *Salmonella* (D'Aoust, 1989). La deshidratación de las heces a 25 °C podría ser el motivo por el cual no se ha aislado *Salmonella* a los 7 días en los controles positivos en ambas pruebas.

Como conclusión, el empleo de bacteriófagos contribuyó a reducir los aislamientos de *Salmonella* Enteritidis en las muestras de heces a las 24h de su aplicación, por lo que podría ser considerado una herramienta de prevención. Por otro lado, la solución de bacteriófagos resulta ligeramente más eficaz frente a la cepa de campo que frente a la cepa certificada. Teniendo en cuenta los resultados obtenidos, este estudio podría complementarse reduciendo los tiempos entre los análisis, es decir, realizando el ensayo de *Salmonella* al minuto¹, a las 24 horas, a las 48 horas, a las 72 horas, etc. desde la inoculación. De esta forma, se evaluaría la reducción de los aislamientos de *Salmonella* Enteritidis por acción de los bacteriófagos en función del tiempo durante el periodo en el que el control positivo es viable en las condiciones experimentales.

5. CONCLUSIONES

5. CONCLUSIONES

1. La elaboración de mapas dinámicos de prevalencia y seroprevalencia permitió monitorizar la presencia, la distribución y la evolución de patógenos como *Salmonella*, IA, NCD y MG a lo largo del tiempo y el espacio. La elaboración automatizada de estos mapas puede ayudar a controlar estas enfermedades en el sector avícola.
2. Durante los periodos estudiados, no se detectó la presencia de respuesta humoral frente a IA, NCD ni MG en las explotaciones de pollos de engorde de la Comunidad Valenciana. Únicamente se detectó una comarca con valores medios ligeramente superiores al límite indicativo de infección para MG en el año 2009, pero sin sintomatología reportada.
3. La elaboración de mapas de seroprevalencia permitió controlar la respuesta humoral a la vacuna por inmunocomplejos contra la IBD aplicada *in ovo*, y por lo tanto determinar el grado de protección frente a la enfermedad en estudios a gran escala.
4. La región con mayor número de resultado de presencia de *Salmonella* spp en manadas de pollos de engorde y mayor número de muestreos fue el Bajo Maestrazgo de forma constante en todos los años de este estudio. El número de manadas contaminadas con los serotipos zoonóticos fue inferior al 1%, cumpliendo con los objetivos comunitarios a nivel de todo el territorio de la Comunidad Valenciana.

5. La detección cualitativa de *Salmonella* a altos niveles (92,0%) en las heces de gallina ponedora no implicó su presencia en el interior del huevo. De estos resultados se desprende la necesidad de evaluar cuantitativamente la presencia de *Salmonella* spp. en las heces para poder establecer una correlación real con la presencia del patógeno en el interior del huevo.
6. El empleo de bacteriófagos contribuyó a reducir los aislamientos de *Salmonella* Enteritidis en las muestras de heces a las 24h de su aplicación, por lo que podría ser considerado una herramienta de prevención.

6. REFERENCIAS

6. REFERENCIAS

- Adelantado C, Arosemena EL, Calvo MA, Manteca L, Martín MA, Ordóñez G, Ponsa F, Pontes M, Rodríguez EF, Secarúa D. La Salmonella de actualidad desde siempre. 2008 20-21.
- Alexander DJ, Brown IH. Recent zoonoses caused by influenza A viruses. *Revue scientifique et technique (International Office of Epizootics)*. 2000 19 (1): 197-225.
- Alexander DJ, Senne DA. *Diseases of Poultry*. 12 th edition. 2008 Chapter 3 75-100.
- Alexander DJ. Newcastle disease and other avian paramyxoviruses. *Revue scientifique et technique (International Office of Epizootics)*. 2000b 19: 443-62.
- Alexander DJ. A review of avian influenza in different bird species. *Veterinary Microbiology*. 2000a 74: 3-13.
- Alexander DJ. Newcastle disease in the European Union 2000 to 2009. *Avian Pathology*. 2011 40(6): 547-58.
- Al-Garib SO, Gruys E, Gielkens AL, Koch G. Detection of antibody-forming cells directed against Newcastle disease virus and their immunoglobulin class by double immunoenzyme histochemistry. *Avian Diseases*. 2003 47: 453-7.
- Amouroux E, Chu TQ, Boucher A, Drogoul A. GAMA: an environment for implementing and running spatially explicit multi-agent simulations. *Lecture Notes in Computer Science*. 2009 5044: 359–371.

- Arias E. Éxito en la implantación de un sistema *Business Intelligence* (en línea). Consultado 4 de Abril de 2014 en <http://www.monografias.com/trabajos29/sistema-business-intelligence/sistema-business-intelligence.shtml>
- Arteaga Rodríguez A, Pilar Izquierdo M, Sierra Moros MJ, Amela Heras C. Surveillance and control measures of avian influenza in birds. Implications for public health. *Revista Española de Salud Pública*. 2006 80 (6): 621–630.
- Aung MM, Chang YS. Traceability in a food supply chain: Safety and quality perspectives. *Food Control*. 2014 39: 172-184.
- AVEC. Annual report 2014. Association of Poultry Processors and Poultry Trade in the EU (AVEC). 2014.
- Banks J, Speidel E, Alexander DJ. Characterisation of an avian influenza A virus isolated from a human-is an intermediate host necessary for the emergence of pandemic influenza viruses?. *Arch. Virol*. 1998 143 (4): 781-787.
- Banks J, Speidel E, Alexander DJ. Characterisation of an avian influenza A virus isolated from a human – is an intermediate host necessary for the emergence of pandemic influenza viruses?. *Archives of Virology*. 1998 143 (4): 781–787.
- Bano S, Naeem K, Malik SA. Evaluation of pathogenic potential of avian influenza virus serotype H9N2 in chickens. *Avian Diseases*. 2003 47 (Suppl. 3): 817-822.
- Bayot B, Sonnenholzner S, Ochoa X, Guerrero J, Vera T, Calderon J, de Blasé I, del Pilar Cornejo-Grunauer M, Stern S, Ollevier F. An online operational alert system for the early detection of

shrimp epidemics at the regional level based on real-time production. *Aquaculture*. 2008 277: 164-173.

Beard CW, Villegas P, Glisson JR. Comparative efficacy of the B-1 and VG/GA vaccine strains against velogenic viscerotropic Newcastle disease virus in chickens. *Avian Diseases*. 1993 37: 222-5.

Benton WJ, Cover MS, Rosenberger JK, Lake RS. Physicochemical properties of the infectious bursal agent (IBA). *Avian Diseases*. 1967b 11: 438-445.

Benton WJ, Cover MS, Rosenberger JK. Studies on the transmission of the infectious bursal agent (IBA) of chickens. *Avian Diseases*. 1967a 11:430-438.

Bierer BW, Barnett BD, Valentine HD. Experimentally killing *Salmonella* Typhimurium on egg shells by washing. *Poultry Science*. 1961 40: 1009-1014.

Booth IR. Regulation of cytoplasmic pH in bacteria. *Microbiological Reviews*. 1985 49:359-378.

Bosona T, Gebresenbet G. Food traceability as an integral part of logistics management in food and agricultural supply chain. *Food Control*. 2013 33: 32-48.

Boulos MN, Burden D. Web GIS in practice V: 3-D interactive and real-time mapping in Second Life. *International Journal of Health Geographics*. 2007 6: 51.

Bradbury JM, Levisohn S. Experimental infections in poultry. J. G. Tully *Molecular and Diagnostic Procedures in*

- Mycoplasma. Volum II- Diagnostic Procedures, San Diego, CA: Academic Press. 1996 361-370.
- Bradbury JM. Avian mycoplasmas. En: Poultry Diseases, Fifth Edition, Jordan F., Pattison M. 2001.
- Brown F. The classification and nomenclature of viruses. Summary of results of meetings of the International Committee on Taxonomy of Viruses in Sendai. Intervirology. 1986 25:141-143.
- Calistri P, Savini L, Ippoliti C, Conte A. Web-based geographic information system tools and international surveillance network for bluetongue in the Balkans and south-east Europe (East-BTNet). Veterinaria Italiana. 2007 43:739-744.
- Calnek BW. Enfermedades de las aves. Ed. Manual Moderno. 2000 1000.
- Capua I, Alexander DJ. Avian influenza: recent developments. Avian Pathology. 2004 33 (4): 393–404.
- Catalá-Gregori P. Nuevos retos en la alimentación del broiler: medioambiente, producción sin antibióticos promotores del crecimiento e inclusión de materias primas alternativas. Tesis Doctoral. 2007.
- Catalá-Gregori, Mateo D. Curso básico de producción de broiler. 2012.
- Chang S, Zhang J, Liao X, Zhu X, Wang D, Zhu J, Feng T, Zhu B, Gao GF, Wang J, Yang H, Yu J, Wang J. Influenza Virus Database (IVDB): an integrated information resource and

- analysis platform for influenza virus research. *Nucleic Acids Research*. 2007 35 (Suppl. 1): D376-D380.
- Chang S, Zhang J, Liao X, Zhu X, Wang D, Zhu J, Feng T, Zhu B, Gao GF, Wang J, Yang H, Yu J, Wang J. Influenza Virus Database (IVDB): an integrated information resource and analysis platform for influenza virus research. *Nucleic Acids Research*. 2007 35 (Suppl. 1): D376–D380.
- Chemaly M, Huneau-Salaun A, Labbe A, Houdayer C, Petetin I, Fravallo P. Isolation of *Salmonella enterica* in layinghen flocks and assessment of eggshell contamination in France. *Journal of Food Protection*. 2009 72:2071–2077.
- Commission Regulation (EU) N° 200/2012 DE LA COMISIÓN, of 8 March 2012 concerning a Union target for the reduction of *Salmonella enteritidis* and *Salmonella typhimurium* in flocks of broilers, as provided for in Regulation (EC) N° 2160/2003 of the European Parliament and of the Council. L 71/31.
- Conte A, Colangeli P, Ippoliti C, Paladini C, Ambrosini M, Savini L, Dall'Acqua F, Calistri P. The use of a Web-based interactive Geographical Information System for the surveillance of bluetongue in Italy. *Revue scientifique et technique (International Office of Epizootics)*. 2005 24: 857-868.
- Cortey M, Bertran K, Toskano J, Majó N, Dolz R. Phylogeographic distribution of very virulent infectious bursal disease virus isolates in the Iberian Peninsula. *Avian Pathology*. 2012 41(3): 277-84.

- Council Directive 82/894/EEC of 21 December 1982 on the notification of animal diseases within the Community. Official Journal L 378, 31/12/1982 0058 – 0062.
- Curso de serotipado de *Salmonella* spp. de acuerdo al esquema de Kauffmann White. 12 horas. Laboratorio Central de Veterinaria de Algete. 2010.
- D'Aoust JY. *Salmonella*. in: Food Microbiology Fundamentals and Frontiers. (Doyle, M.P., Beuchat, L.R. and Montville, T.J., eds). ASM Press, Washington, DC. 1997 129-158.
- D'Aoust JY. *Salmonella*. In: M. P. Doyle (Ed.) Foodborne Bacterial Pathogens. Marcel Dekker, Inc., New York. 1989 327-445.
- Dall'Acqua F, Paladini C, Meiswinkel R, Savini L, Calistri P. Description and implementation of a surveillance network for bluetongue in the Balkans and in adjoining areas of south-eastern Europe. *Veterinaria Italiana*. 2006 42: 103-118.
- David H Ley. Diseases of Poultry. 12 th edition. Chapter 21. 2008 807-834.
- Davies, RH, Breslin MF. Observations on the distribution and persistence of *Salmonella enterica* serovar Enteritidis phage type 29 on a cage layer farm before and after the use of competitive exclusion treatment. *British Poultry Science*. 2003 44: 551–557.
- Davies, RH, Wray C. Persistence of *Salmonella* Enteritidis in poultry units and poultry food. *Br British Poultry Science*. 1996 37: 589–596.

- De Reu, K, Grijspeerdt K, Messens W, Heyndrickx M, Uyttendaele M, Debevere J, Herman L. Eggshell factors influencing eggshell penetration and whole egg contamination by different bacteria, including *Salmonella* Enteritidis. International Journal of Food Microbiology. 2006 112: 253–260.
- De Wit JJ, Mekkes DR, Kouwenhoven B, Verheijden HM. Sensitivity and specificity of serological tests for detection of infectious bronchitis virus induced antibodies in broilers. Avian Pathology. 1997 26: 105-118.
- Desmidt M, Ducatelle R, Haesebrouck F. Pathogenesis of *Salmonella* Enteritidis phage type four after experimental infection of young chickens. Veterinary Microbiology. 1997 56: 99-109.
- Dimitrov KM, Manvell RJ, Goujgoulova GV. Status of wild birds in Bulgarian zoos with regard to orthomyxovirus and paramyxovirus type 1 infections. Avian Diseases. 2010 54(1 Suppl): 361-364.
- Dingfelder RS, Ley DH, McLaren JM, Brownie C. Experimental infection of turkeys with *Mycoplasma gallisepticum* of low virulence, transmissibility and immunogenicity. Avian Diseases. 1991 35: 910-919.
- Directiva 2005/94/EC del Consejo, de 20 de diciembre de 2005 relativa a medidas comunitarias de lucha contra la influenza aviar.
- Directiva 92/66/CEE del Consejo, de 14 de julio de 1992, por la que se establecen medidas comunitarias para la lucha contra la enfermedad de Newcastle.

- Dobos P, Hill BJ, Hallett R, Kells DT, Becht H, Teninges D. Biophysical and biochemical characterization of five animal viruses with bisegmented double-stranded RNA genomes. *Journal of Virology*. 1979 32: 593-605.
- Ebako G. Exotic Newcastle Disease: Nebraska Poultry Producers Quick Reference. Nebraska University, Lincoln, NE. Consultado 4 de Junio de 2013 en <http://www.ianr.unl.edu/pubs/animaldisease/nf565.htm>. 2003.
- Ehlers M, Möller M, Marangon S, Ferre N. The use of Geographic Information System (GIS) in the frame of the contingency plan implemented during the 1999–2001 Avian Influenza (AI) epidemic in Italy. *Avian Diseases*. 2003 47 (Suppl. 3): 1010-1014.
- Ehlers M, Möller M, Marangon S, Ferre N. The use of Geographic Information System (GIS) in the frame of the contingency plan implemented during the 1999–2001 avian influenza (AI) epidemic in Italy. *Avian Diseases*. 2003 47 (Suppl. 3): 1010–1014.
- El-Tras WF, Tayel AA, Samir A. Potential zoonotic pathways of *Salmonella* Enteritidis in laying farms. *Vector- Borne and Zoonotic Diseases*. 2010 10: 739–742.
- Enfermedades, infecciones e infestaciones de la Lista de la OIE en vigor. Consultado 16 de Septiembre de 2013 en <http://www.oie.int/es/sanidad-animal-en-el-mundo/enfermedades-de-la-lista-de-la-oie-2013/>. 2013.

- Etteradossi N, Saif YM. Diseases of Poultry. 12 th edition. Chapter 7. 2008 185-208.
- European Commission (EC) Avian influenza in Emilia-Romagna, Italy: Commission endorses Italian control measures. EC MEMO/13/753 27/08/2013. Consultado 10 de Septiembre de 2013 en europa.eu/rapid/press-release_MEMO-13-753_en.htm.
- Fabricant J, Levine PP. 1962. Experimental production of complicated chronic respiratory disease infection (“air sac” disease). Avian Diseases. 1962 6: 13-23.
- Fiorentin L, Vieira ND, Barioni WJr. Oral treatment with bacteriophages reduces the concentration of *Salmonella* Enteritidis PT4 in caecal contents of broilers. Avian Pathology 2005 34: 258-63.
- Fischer JR, Stallknecht DE, Luttrell P, A.A. Dhondt, Converse KA. Mycoplasmal conjunctivitis in wild songbirds: the spread of a new contagious disease in a mobile host population. Emerging Infectious Diseases Journal. 1997 3: 69-72.
- Food and Agriculture Organization of the United Nations (FAO) (2013). – Understanding avian influenza. Chapter 2. In Current state of knowledge on highly pathogenic avian influenza. Animal Production and Health Division. Consultado 10 de Septiembre de 2013 en www.fao.org/avianflu/documents/key_ai/key_book_ch2.htm.
- Fookes M, Schroeder GN, Langridge GC, Blondel CJ, Mammina C, Connor TR, Seth-Smith H, Vernikos GS, Robinson KS,

Sanders M, Petty NK, Kingsley RA, Bäumlér AJ, Nuccio SP, Contreras I, Santiviago CA, Maskell D, Barrow P, Humphrey T, Nastasi A, Roberts M, Frankel G, Parkhill J, Dougan G, Thomson NR. *Salmonella bongori* provides insights into the evolution of the Salmonellae. PLoS Pathog. 2011 Aug;7(8):e1002191. doi: 10.1371/journal.ppat.1002191. Epub 2011 Aug 18.

Fouchier RA, Munster V, Wallensten A, Bestebroer TM, Herfst S, Smith D, Rimmelzwaan GF, Olsen B, Osterhaus AD. Characterization of a novel influenza A virus hemagglutinin subtype (H16) obtained from black-headed gulls. Journal of Virology. 2005 79 (5): 2814–2822.

Garber L, Smeltzer M, Fedorka-Cray P, Ladely S, Ferris K. *Salmonella enterica* serotype Enteritidis in table egg layer house environments and in mice in U.S. layer houses and associated risk factors. Avian Diseases. 2003 47:134–142.

Gast RK, Beard CW. Isolation of *Salmonella* Enteritidis infected eggs by experimentally infected hens. Avian Diseases. 1990 34:438-446.

Gharaibeh S, Hailat A. *Mycoplasma gallisepticum* experimental infection and tissue distribution in chickens, sparrows and pigeons. Avian Pathology. 2011 40(4): 349-54.

Gharaibeh S, Mahmoud K. Decay of maternal antibodies in broiler chickens. Poultry Science. 2013 92(9): 2333-6. .

Gonzales JL, Elbers AR, Bouma A, Koch G, De Wit JJ, Stegeman JA. Low-pathogenic notifiable avian influenza serosurveillance

and the risk of infection in poultry: a critical review of the European Union active surveillance programme (2005–2007). *Influenza other respir. Viruses*. 2010 4 (2): 91–99.

González C, Balaguer JL. Bioseguridad en la sala de incubación. *Selecciones Avícolas*. 2011: 7-11.

Gross WB. 1990. Factors affecting the development of respiratory disease complex in chickens. *Avian Diseases*. 1990 34: 607-610.

Gross WB. The development of “air sac disease”. *Avian Diseases*. 1961 5: 431-439.

Hatta M, Kawaoka Y. The continued pandemic threat posed by avian influenza viruses in Hong Kong. *Trends in Microbiology*. 2002 10: 340-344.

Henzler DJ, Kradel DC, Davison S, Ziegler AF, Singletary D, DeBok P, Castro AE, Lu H, Eckroade R, Swayne D, Lagoda W, Schmucker B, Nesselrodt A. Epidemiology, production losses, and control measures associated with an outbreak of avian influenza subtype H7N2 in Pennsylvania (1996–1998). *Avian Diseases*. 2003 47 (Suppl. 3): 1022–1036.

Horimoto T, Kawaoka Y. Influenza: lessons from past pandemics, warnings from current incidents. *Nature Reviews Microbiology*. 2005 3 (8): 591-600.

Horimoto T, Kawaoka Y. Influenza: lessons from past pandemics, warnings from current incidents. *Nature Reviews Microbiology*. 2005 3 (8): 591–600.

- Howie RI, Thorsen J. Identification of a strain of infectious bursal disease virus isolated from mosquitoes. *Canadian Journal of Veterinary Research*. 1981 45: 315-320.
- Huff W E, Huff G R, Rath NC, Donoghue AM. The potential and limitations of the development of bacteriophage therapeutics for the poultry industry. *Poultry Science*. 2013 92: 930-934.
- Huneau-Salaun A, Marianne C, Sophie B, Françoise L, Isabelle P, Sandra R, Virginie M, Philippe F, Nicolas R. Risk factors for *Salmonella enterica* ssp. *enterica* contamination in 519 French laying hen flocks at the end of the laying period. *Preventive Veterinary Medicine*. 2009 89: 51–58.
- Islam MT, Samad MA. Outbreaks of infectious bursal disease in vaccinated and unvaccinated commercial cockerel farms in Bangladesh. *Bangladesh Journal of Veterinary Medicine*. 2003 1(1): 21-24.
- ISO 6579:2002. Microbiology of food and animal feeding stuffs. Horizontal method for the detection of *Salmonella* spp.
- ISO 6579:2002/Amd. 1:2007. Microbiology of food and animal feeding stuffs. Horizontal method for the detection of *Salmonella* spp. Amendment 1: Annex D: Detection of *Salmonella* spp. in animal faeces and in environmental samples from the primary production stage.
- Jackwood DJ, Saif YM. Prevalence of antibodies to infectious bursal disease virus serotypes I and II in 75 Ohio chicken flocks. *Avian Diseases*. 1983 27: 850-854.

- Jenbreie S, Ayelet G, Gelaye E, Kebede F, Lynch SE, Negussie H. Infectious bursal disease: seroprevalence and associated risk factors in major poultry rearing areas of Ethiopia. *Tropical Animal Health and Production*. 2012 45(1): 75-9.
- Joerger RD, Sartori CA, Kniel KE. Comparison of genetic and physiological properties of *Salmonella enterica* isolates from chickens reveals one major difference between serovar Kentucky and other serovars: response to acid. *Foodborne and Pathogen Disease*. 2009 6: 503-512.
- Jones, DR, Curtis PA. Microbial contamination in inoculated shell eggs: I. Effects of layer strain and hen age. *Poultry Science*. 2002 81: 715–720.
- Karaca K Naqi S. A monoclonal antibody-based ELISA to detect serotype-specific infectious bronchitis virus antibodies. *Veterinary Microbiology*. 1993 34: 249-257.
- Keller LH, Benson CE, Krotec K, Eckroade RJ. *Salmonella* Enteritidis colonization of the reproductive tract and forming and freshly laid eggs of chickens. *Infection and Immunity*. 1995 63: 2443-2449.
- Kibenge FSB, Dhillon AS, Russell RG. Biochemistry and immunology of infectious bursal disease virus. *Journal of General Virology*. 1988 69: 1757-1775.
- Kinde H, Shivaprasad KI, Daft BM, Read DH, Ardans A, Breitmeyer R, Rajasher G, Nagaraja KV, Gardner IA. Pathologic and bacteriologic findings in 27-week-old commercial laying hens

- experimentally infected with *Salmonella enteritidis*, phage type 4. *Avian Diseases*. 2000 44(2): 239-48.
- King D. Newcastle Disease: Worldwide Situation and Control. In *Décimo Seminario Internacional de Patología y Producción Aviar*, Athens, GA. 2002.
- Kleven SH. Mycoplasmas in the etiology of multifactorial respiratory disease. *Poultry Science*. 1998 77(8): 1146-9. Review.
- Kuiken T, Rimmelzwaan G, Van Amerongen G, Baars M, Fouchier R, Osterhaus A. Avian H5N1 influenza in cats. *Science*. 2004 306: 241.
- Landgraf HE, Vielitz E, Kirsch R. Occurrence of an infectious disease affecting the bursa of Fabricius (Gumboro disease). *Dtsch Tierarztl Wochenschr*. 1967 74: 6-10.
- Ley DH y Yoder HW. Infección por *Mycoplasma gallicepticum*. En CALNEK, B. W. y COL. *Enfermedades de las Aves*. 2 ed El Manual Moderno. México, D. F., México. 2000 198 – 207.
- Maldonado A, Arenas A, Tarradas MC, Carranza J, Luque I, Miranda A, Perea A. Prevalence of antibodies to avian paramyxoviruses 1, 2 and 3 in wild and domestic birds in southern Spain. *Avian Pathology*. 1994 23(1): 145-52.
- Mannelli A, Ferrè N, Marangon S. Analysis of the 1999–2000 highly pathogenic avian influenza (H7N1) epidemic in the main poultry-production area in northern Italy. *Preventive Veterinary Medicine*. 2006 73(4): 273-285.
- Manual of Diagnostic Tests and Vaccines for Terrestrial Animals. 2008. OIE. 2008.

- Marín C, Balasch S, Vega S, Lainez M. Sources of *Salmonella* contamination during broiler production in Eastern Spain. *Preventive Veterinary Medicine*. 2011 98(1): 39-45.
- Marois C, Dufour-Gesbert F, Kempf I. Polymerase chain reaction for detection of *Mycoplasma gallisepticum* in environmental samples. *Avian Pathology*. 2002 31: 163–168.
- Martin V, von Dobschuetz S, Lemenach A, Rass N, Schoustra W, DeSimone L. Early warning, database, and information systems for avian influenza surveillance. *Journal of Wildlife Diseases*. 2007 43 (Suppl. 3): S71–S76.
- Maw MT, Yamaguchi T, Ohya K, Fukushi H. Detection of vaccine-like infectious bursal disease (IBD) virus in IBD vaccine-free chickens in Japan. *The Journal of Veterinary Medical Science*. 2008 70(8): 833-5.
- McFerran JB, McNulty MS, McKillop ER, Conner TJ, McCrackan RM, Collins DS, Allan GM. Isolation and serological studies with infectious bursal disease viruses from fowl, turkey and duck: Demonstration of a second serotype. *Avian Pathology*. 1980 9: 395-404.
- Methner, U. Situation of bovine salmonellosis in Germany from 1995–2003 according to the data from the National Animal Disease Reporting System. *Berliner und Münchener tierärztliche Wochenschrift Journal*. 2005 118: 449–455.
- Ministerio de Agricultura, Alimentación y Medio Ambiente. Caracterización del sector avícola de puesta año 2013. 2013. Consultado 07 de Agosto de 2014_ en

http://www.magrama.gob.es/es/ganaderia/temas/produccion-y-mercados-ganaderos/Caracterizaci%C3%B3n_del_sector_av%C3%ADcola_de_puesta_tcm7-311014.pdf

Ministerio de Medio Ambiente y Medio Rural y Marino. Manual práctico de operaciones en la lucha contra la Enfermedad de Newcastle. 2009.

Mølbak K, Neimann J. Risk factors for sporadic infection with *Salmonella* enteritidis, Denmark, 1997-1999. *Am J Epidemiol* 2002 156: 654-61. Mollenhorst H, van Woudenberg CJ, Bokkers EG, and de Boer IJ. Risk factors for *Salmonella* Enteritidis infections in laying hens. *Poultry Science*. 2005 84: 1308-1313.

Müller H, Scholtissek C, Becht H. The genome of infectious bursal disease virus consists of two segments of double-stranded RNA. *Journal of Virology*. 1979 31: 584-589.

Müller HC, Scholtissek H, Becht H. 1979. Genome of infectious bursal disease virus consists of two segments of double-stranded RNA. *Journal Virology*. 1979 31: 584-589.

Mushi EZ, Binta MG, Chabo RG, Ndebele RT. Seroprevalence of infectious bursal disease in non-vaccinated indigenous and exotic chickens on selected farms around Gaborone, Botswana. *Onderstepoort Journal of Veterinary Research*. 1999 66(2): 135-7.

Namata, H, Welby S, Aerts M, Faes C, Abrahantes JC, Imberechts H, Vermeersch K, Hooyberghs J, Meroc E, Mintiens K.

Identification of risk factors for the prevalence and persistence of *Salmonella* in Belgian broiler chicken flocks.. 2009 90: 211–222.

Namata, H., E. Meroc, M. Aerts, C. Faes, J. C. Abrahantes, H. Imberechts, and K. Mintiens. 2008. *Salmonella* in Belgian laying hens: An identification of risk factors. *Prev. Vet. Med.* 83: 323–336.

Nascimento, VP, Cranstoun S, Solomon SE. Relationship between shell structure and movement of *Salmonella* Enteritidis across the eggshell wall. *British Poultry Science.* 1992 33: 37–48.

Nicholson KG, Wood JM, Zambon M. Influenza. *The Lancet.* 2003 362: 1733-1745.

Official Journal of the European Union, 2003. Regulation (EC) N° 2160/2003 of the European Parliament and of the Council, of 17 November 2003, on the control of *Salmonella* and other food-borne zoonotic agents. L 325/1.

Okamura MT, Miyamoto T, Kamijima Y, Tani H, Sasai K, Baba E. Differences in abilities to colonize reproductive organs and to contaminate eggs in intravaginally inoculated hens and *in vitro* adherences to vaginal explants between *Salmonella* Enteritidis and other *Salmonella* serovars. *Avian Diseases.* 2001 45: 962–971.

Oliveira A, Sereno R, Azeredo J. 2010. In vivo efficiency evaluation of a phage cocktail in controlling severe colibacillosis in confined conditions and experimental poultry houses. *Veterinary Microbiology.* 2010 146(3-4): 303-8.

- Orden ARM/831/2009, de 27 de marzo, por la que se modifican los anexos I y II del Real Decreto 617/2007, de 16 de mayo, por el que se establece la lista de las enfermedades de los animales de declaración obligatoria y se regula su notificación.
- Osman KM, Aly MM, Amin ZM, Hasan BS. *Mycoplasma gallisepticum*: an emerging challenge to the poultry industry in Egypt. *Revue scientifique et technique (International Office of Epizootics)*. 2009 28(3): 1015-23.
- Padan E, Schuldiner S. Intracellular pH and membrane potential as regulators in the prokaryotic cell. *Journal of Membrane Biology*. 1987 95: 189-198.
- Palmer SR. Zoonoses. Ed. Oxford University. 1998 191-207.
- Patrick AD. Antigenic formulae of the *Salmonella* serovars. 9th edition. Institut Pasteur. 2007.
- Pillai SR, Mays HL Jr, Ley DH, Luttrell P, Panangala VS, Farmer KL, Roberts SR. Molecular variability of house finch *Mycoplasma gallisepticum* isolates as revealed by sequencing and restriction fragment length polymorphism analysis of the *pvpA* gene. *Avian Diseases*. 2003 47: 640-648.
- Programas Nacionales para la vigilancia y control de determinados serotipos de *Salmonella* en pollos de carne de la especie *Gallus gallus*.
- Programas Nacionales para la vigilancia y control de determinados serotipos de *Salmonella* en gallinas ponedoras de especie *Gallus gallus*.

- Real Decreto 3/2002, de 11 de enero, por el que se establecen las normas mínimas de protección de las gallinas ponedoras. BOE del 15 de enero de 2002. 13: 1660-1663.
- Real Decreto 328/2003, de 14 de marzo, por el que se establece y regula el plan sanitario avícola.
- Reglamento (CE) nº 1028/2006 del Consejo, de 19 de junio de 2006, sobre las normas de comercialización de los huevos. DOUE. Diario Oficial de la Unión Europea del 7 de Julio 2006. L186: 1-5.
- Reglamento (CE) nº 1774/2002 del Parlamento Europeo y del Consejo, de 3 de octubre de 2002 por el que se establecen las normas sanitarias aplicables a los subproductos animales no destinados al consumo humano. DOUE. Diario Oficial de la Unión Europea del 13 de Mayo 2003. L177: 1-161.
- Reglamento (CE) Nº 2160/2003 del Parlamento Europeo y del Consejo, de 17 de noviembre de 2003 sobre el control de la salmonela y otros agentes zoonóticos específicos transmitidos por los alimentos.
- Ribot EM, Fair MA, Gautom R, Cameron DN, Hunter SB, Swaminathan B, Barrett TJ. 2006. Standardization of pulsed-field gel electrophoresis protocols for the subtyping of *Escherichia coli* O157:H7, *Salmonella*, and *Shigella* for PulseNet. Foodborne Pathogen and Diseases 3: 59-67.
- Rosenberger JK, Cloud S. Isolation and characterization of variant infectious bursal disease viruses [abs]. Journal of the American Veterinary Medical Association. 1986 189:357.

- Saif YM. Infectious bursal disease virus types. Proc 19th Natl Meet Poulth Health Condemn: Ocean City, MD. 1984 105-107.
- Sanchez-Vizcaino F, Perez A, Lainez M, Sanchez-Vizcaino JM. Quantification of the risk for introduction of virulent Newcastle disease virus into Spain through legal trade of live poultry from European Union countries. Avian Pathology. 2010 39(6): 459-65.
- Sasipreeyajan J, Halvorson DA, Newman JA. Effect of *Mycoplasma gallisepticum* bacterin on egg-transmission and egg production. Avian Diseases. 1987 31(4): 776-81.
- Savini L, Ippoliti C, Conte A, Parisse M, Dall'Acqua F, Calistri P. Development of a web-based geographic information system for the epidemiological surveillance of bluetongue in the Balkans and eastern Mediterranean countries. Veterinaria Italiana. 2003 42: 201-207.
- Savini L, Weiss C, Colangeli P, Conte A, Ippoliti C, Lelli R, Santucci U. A Web-based geographic information system for the management of animal disease epidemics. Veterinaria Italiana. 2007 43: 761-772.
- Schoeni JL, Glass KA, McDermott JL, Wong AC. Growth and penetration of *Salmonella* Enteritidis, *Salmonella* Heidelberg and *Salmonella* Typhimurium in eggs. International Journal of Food Food Microbiology. 1995 24: 385-396.
- Sereno R. Fagoterapia en Avicultura Industrial en Portugal. Controlvet Genetics. 2013. IV Jornada de Sanidad Avícola CECAV.

- Shahada F, Amamoto A, Chuma T, Shirai A, Okamoto K. Antimicrobial susceptibility phenotypes, resistance determinants and DNA fingerprints of *Salmonella enterica* serotype Typhimurium isolated from bovine in Japan. *International Journal of Antimicrobial Agents*. 2007 30: 150–156.
- Sheffield CL, Crippen TL, Andrews K, Bongaerts RJ, Nisbet DJ. Characterization of planktonic and biofilm communities of day-of-hatch chicks cecal microflora and their resistance to *Salmonella* colonization. *Journal of Food Protection*. 2009 72: 959-65.
- Shirai JR, Seki R, Kamimura R, Mitsubayashi S. Effects of invert soap with 0,05% sodium hydroxide on infectious bursal disease virus. *Avian Diseases*. 1994 38: 240-243.
- Shivaprasad HL, Timoney JF, Morales S, Lucio B, Baker RC. Pathogenesis of *Salmonella* Enteritidis infection in laying chickens. I. Studies on egg transmission, clinical signs, fecal shedding, and serologic responses. *Avian Diseases*. 1990 34: 548-557.
- Shivaprasad HL. Patología de las Aves – Una Revisión. California Animal Health y Food Safety Laboratory System, Tulare Branch. School of Veterinary Medicine, University of California, Davis. 2013.
- Shulman ST, Phair JP, Peterson. Warren. *Enfermedades Infecciosas*. Ed.McGraw-Hill. 1999 265-275. Slavec B, Krapez U, Racnik AJ, Hari A, Wernig JM, Dovc A, Zadavec M, Lindtner-Knific

- R, Marhold C, Zorman-Rojs O. Surveillance of influenza A viruses in wild birds in Slovenia from 2006 to 2010. *Avian Diseases*. 2012 56(4 Suppl): 999-1005.
- Skeeles JK, Lukert PD, De Buysscher EV, Fletcher OJ, Brown J. Infectious bursal disease viral infections. II. The relationship of age, complement levels, virus-neutralizing antibody, clotting, and lesions. *Avian Diseases*. 1979 23: 107-117.
- Skov, MN, Angen O, Chriel M, Olsen JE, Bisgaard M. Risk factors associated with *Salmonella enterica* serovar Typhimurium infection in Danish broiler flocks. *Poultry Science*. 1999a 78: 848–854.
- Skov, MN, Carstensen B, Tornøe N, Madsen M. Evaluation of sampling methods for the detection of *Salmonella* in broiler flocks. *Journal of Applied Microbiology*. 1999 b 86: 695–700.
- Smith J. Control de bronquitis Infecciosa. *Plumazos*. 2007. 31:4-18.
- Snedeker C, Wills FK, Moulthrop IM. Some studies on the infectious bursal agent. *Avian Diseases*. 1967 11: 519-528.
- Soberano G, Carpenter AT, Cardona C, Charlton B. Spatial distribution of free-of-charge pathology submissions to the California Animal Health and Food Safety laboratories during the exotic Newcastle outbreak in 2002-2003. *Avian Diseases*. 2009 53(1): 2-6.
- Subbarao K, Shaw MW. Molecular aspects of avian influenza (H5N1) isolated from humans. *Reviews in Medical Virology*. 2000 10(5): 337-48.

- Swayne DE, Havorson DA. Diseases of Poultry. 12 th edition. Chapter 6. 2008:153-184.
- Swayne DE, Suárez DL, Sims LD. Influenza. In Diseases of poultry, 13th Ed. Wiley-Blackwell, Hoboken, New Jersey. 2013 181–218.
- The European Union Summary Report on Trends and Sources of Zoonoses, Zoonotic Agents and Food-borne Outbreaks in 2013 European Food Safety Authority. European Centre for Disease Prevention and Control. EFSA (European Food Safety Authority) Journal 2015 13(1): 3991.
- Thomas ME, Bouma A, Ekker HM, Fonken AJ, Stegeman JA, Nielen M. Risk factors for the introduction of high pathogenicity avian influenza virus into poultry farms during the epidemic in the Netherlands in 2003. Preventive Veterinary Medicine. 2005;69 (1–2), 1–11. E-pub.: 25 April 2005.
- Thomas, ME, Klinkenberg D, Ejeta G, Van Knapen F, Bergwerff AA, Stegeman JA, Bouma A. Quantification of horizontal transmission of *Salmonella enterica* serovar Enteritidis bacteria in pair-housed groups of laying hens. Applied and Environmental Microbiology. 2009 75: 6361–6366.
- Tienson T, Chaitaweesub P, Songserm T, Chaisingh A, Hoonsuwan W, Buranathai C, Parakamawongsa T, Premashthira S, Amonsin A, Gilbert M, Nielen M, Stegeman A. Highly pathogenic avian influenza H5N1, Thailand, 2004. Emerging Infectious Diseases Journal. 2005 11: 1664-1672.

- Valancony H, Fourier G, Drouin P, Toux JY, Colin P. Disinfection of cage layer houses contaminated with *Salmonella* Enteritidis. *British Poultry Science* . 2001 42: S39–S40.
- Van den Berg TP, Eterradossi N, Toquin D, Meulemans G. Infectious bursal disease (Gumboro disease). *Revue scientifique et technique (International Office of Epizootics)*. 2000 19(2): 509.
- Van Hoorebeke, S, Van Immerseel F, De Vylder J, Ducatelle R, Haesebrouck F, Pasmans F, de Kruif A, Dewulf J. Faecal sampling underestimates the actual prevalence of *Salmonella* in laying hen flocks. *Zoonoses Public Health* 2009 56: 471–476.
- Van Horne P.L.M. Production and consumption of poultry meat and eggs in the European Union. Consultado 31 de Agosto de 2013 en www.healthy-poultry.org/Results%20of%20the%20project/chapter3.pdf. 2007.
- Van Immerseel F, Meulemans G, De Buck J, Pasmans F, Celge P, Bottreau E, Haesebrouck F, Ducatelle R. Bacteria host interactions of *Salmonella* Paratyphi B dT+ in poultry. *Epidemiology Infection*. 2004 132: 239-243.
- Vico JP, Mainar-Jaime RC. Serological survey of *Salmonella* spp. infection in finishing pigs from northeastern Spain and associated risk factors. *Spanish Journal of Agricultural Research*. 2012 10(2): 372-382.

- Webster RG, Peiris M, Chen H, Guan Y. H5N1 outbreaks and enzootic influenza. *Emerging Infectious Diseases Journal*. 2006 12: 3-8.
- Westergaard JM. Contingency planning: preparation of contingency plans. *Zoonoses Public Health*. 2008 55(1): 42-9.
- World Organisation for Animal Health (OIE). Consultado 16 de Septiembre de 2013 en http://www.oie.int/wahis_2/public/wahid.php/Diseaseinformation/Diseasedistributionmap/index/newlang/en. 2009.
- World Organization for Animal Health (Office International des Epizooties OIE). *Manual de las Pruebas de Diagnóstico y de las Vacunas para los Animales Terrestres 2013*. Capítulo 2,3,14. Enfermedad de Newcastle. 2012. Consultado 30 de Abril de 2014. Disponible en http://www.oie.int/fileadmin/Home/esp/Health_standards/tahm/2,03,14_Enfermedad_Newcastle.pdf
- Wright PF, Webster RG. Orthomyxoviruses. En: Knipe DM, Howley PM. Eds. *Fields Virology*. Philadelphia: Lippincott-Williams & Wilkins. Publishers. 2001 1533-1579.
- Xavier J, Pascal D, Crespo E, Schell HL, Trinidad JA, Bueno DJ. Seroprevalence of *Salmonella* and *Mycoplasma* infection in backyard chickens in the state of Entre Rios in Argentina. *Poultry Science*. 2011 90(4): 746-51.
- Zhao Y, Aarnink, AJ, Cambra-Lopez M, Fabrid T. Viral shedding and emission of airborne infectious bursal disease virus from a broiler room. *British Poultry Science*. 2013: 54:87-95.

Zwadyk P. Enterobacteriaceae: *Salmonella*, *Shigella*, intestinal pathogens. En: Zinser Microbiology. W. K. Joklik, H. P. Willet, D. B. Amos, and C. M. Wilfert, ed. 20th ed. Appleton and Lange, Norwalk, CT. 1992 556–565.