

Universidad Nacional de La Plata

Facultad de Ciencias Veterinarias

Trabajo de Tesis realizado como requisito para optar al título de “DOCTOR EN CIENCIAS VETERINARIAS”

Título del Trabajo: Caracterización fenotípica y subtipificación molecular de aislamientos de *Salmonella Gallinarum* de diferentes regiones de la República Argentina y de 5 cepas de vacunas 9R comercializadas en el país.

Autor: Vigo Germán Blás

Director: Pichel Mariana

Codirector: Giacoboni Gabriela

Lugar de Trabajo: Laboratorio de Diagnóstico e Investigaciones Bacteriológicas, FCV-UNLP; Servicio Enterobacterias, INEI-ANLIS Instituto “Dr. C. G. Malbrán”

Miembros del Jurado:

Caffer María Inés

Terzolo Horacio

Ritacco Viviana

Año: 2011

Agradezco profundamente a mis compañeros del LADIB, de la Cátedra de Microbiología, de la Facultad de Ciencias Veterinarias, del Servicio de Enterobacterias del Instituto Malbrán, a la Directora, Codirectora, amigos y a mi familia. Recibí de todas estas personas comprensión, consejos, fuerza y fundamentalmente su compañía para emprender este trabajo y muchas otras cosas de la vida.

ÍNDICE DE CONTENIDOS

1) INTRODUCCIÓN:

Enfermedad tifus aviar

Morbilidad y Mortalidad

Patología

Patogénesis

Agente etiológico: *S. Gallinarum*

Taxonomía

Características culturales

Identificación bioquímica

Epidemiología

Transmisión

Diagnóstico

Aislamiento de *Salmonella Gallinarum*

Tratamiento

Vacunación

Subtipificación de *Salmonella* spp.

A- TÉCNICAS DE TIPIFICACIÓN FENOTÍPICA:

a) Biotipificación

b) Serotipificación

c) Sensibilidad a los antimicrobianos

d) Tipificación por bacteriófagos (fagotipificación)

B- TÉCNICA DE TIPIFICACIÓN GENOTÍPICA:

a) Análisis de ADN plasmídico

b) Análisis convencional con endonucleasas de restricción

c) Ribotipificación

d) Técnicas basadas en la reacción en cadena de la polimerasa

e) Electroforesis en campo pulsado

f) Tipificación de secuencias multilocus

Factores de virulencia en *Salmonella* spp.:

1- Adherencia a células epiteliales

2- Genes de Virulencia codificados en plásmidos

3- Toxinas

4- Islas de patogenicidad y sistemas de secreción

Componentes estructurales del aparato de secreción:

Proteínas secretadas con funciones efectoras; StpP, AvrA, SipA, SopB y SopE

Hipótesis

Objetivos

2) MATERIALES Y MÉTODOS:

Estudios de aislamientos de campo

Cepas de *S. Gallinarum* incluidas en el estudio

Recolección de las muestras

Procesamiento de muestras para el aislamiento de *S. Gallinarum*

Identificación y caracterización fenotípica de los aislamientos de *S. Gallinarum*

Tabla 1: Cepas de *Salmonella* *Gallinarum* aisladas de animales con tifus aviar incluidas en el estudio y los datos correspondientes

Tabla 2: Caracteres bioquímicos y fisiológicos de *Salmonella* *Gallinarum*
Susceptibilidad a antimicrobianos

Factores de virulencia

Estudio de cepas vacunales

Cepas estudiadas

Tabla 3: Cepas de *Salmonella* *Gallinarum* utilizadas para la preparación de las vacunas contra el tifus aviar incluidas en el estudio

Controles de las vacunas

Control de pureza

Control de inocuidad

Subtipificación molecular

Electroforesis en campo pulsado (PFGE)

Captura de imágenes y análisis de resultados

3) RESULTADOS:

Estudio de aislamientos de *S. Gallinarum* de casos de tifus aviar

Caracterización fenotípica

Pruebas bioquímicas y fisiológicas

Tabla 4: Perfiles bioquímicos (pruebas diferenciales) de las 55 cepas estudiadas aisladas de casos de tifus aviar

Figura 1: Distribución de los perfiles bioquímicos de las cepas aisladas

Susceptibilidad a agentes antimicrobianos

Tabla 5: Perfiles de resistencia a antimicrobianos de los 55 aislamientos de casos de tifus aviar (anexo)

Figura 2: Resumen de los perfiles de resistencia a los antimicrobianos de las cepas aisladas de casos de tifus aviar

Figura 3: Sensibilidad por agente antimicrobiano observado en las 55 cepas aisladas de los casos de tifus aviar

Factores de virulencia

Caracterización de cepas vacunales y control de las cinco vacunas 9R comercializadas en la República Argentina y la cepa sudafricana

Caracterización fenotípica

Pruebas bioquímicas y fisiológicas

Tabla 6: Perfiles bioquímicos de las seis cepas vacunales analizadas en el estudio

Control de pureza

Tabla 7: Recuento de colonias e identificación de las cepas vacunales

Prueba de inocuidad

Tabla 7a: Resultados de la prueba de inocuidad de las vacunas 9R comerciales (animales SPF)

Tabla 7b: Resultados de la prueba de inocuidad de las vacunas 9R comerciales (aves convencionales)

Subtipificación genotípica

Figura 4: Dendograma de *XbaI*-PFGE indicando la relación genética entre las cepas vacunales, los aislamientos de la prueba de inocuidad y los aislamientos de campo de *Salmonella Gallinarum*

Figura 5: Dendograma de *XbaI*-PFGE indicando la relación genética entre las cepas vacunales de *Salmonella Gallinarum* y los aislamientos de la prueba de inocuidad

Figura 6: Dendograma de *XbaI*-PFGE indicando la relación genética entre las cepas utilizadas para la elaboración de vacunas contra el tifus aviar

Figura 7: Dendograma de *BlnI*-PFGE indicando la relación genética entre las cepas vacunales y las cepas de campo de *Salmonella Gallinarum*

Figura 8: Dendograma de *BlnI*-PFGE indicando la relación genética entre las cepas vacunales de *Salmonella Gallinarum*

Figura 9: Dendograma indicando la relación genética entre las cepas vacunales y las cepas de campo de *Salmonella Gallinarum* con idéntico perfil obtenidos por *XbaI*-PFGE comparado con el dendograma de estas mismas cepas por *BlnI*-PFGE

4) DISCUSIÓN:

Caracterización de aislamientos de *S. Gallinarum* circulantes en Argentina

Caracterización de cepas vacunales de *S. Gallinarum*

Diversidad genética

5) CONCLUSIONES

6) BIBLIOGRAFÍA

7) ANEXO

ABREVIATURAS Y SÍMBOLOS

TA: tifus aviar
S.: Salmonella
G: guanina
C: citosina
ADN: ácido desoxirribonucleico
°C: grados Celsius
mm: milímetros
PCR: reacción en cadena de la polimerasa
R: fase rugosa
L. fase lisa
R-S: fase intermedia rugosa-lisa
SI: secuencia de inserción
rRNA: ácido ribonucleico ribosómico
REA: análisis con endonucleasa de restricción
RAPD: random amplified polymorphic DNA
REP: repetitive extragenic palindromic
ERIC: enterobacterial repetitive intergenic consensus
PFGE: pulse field gel electrophoresis
MLST: multilocus sequence typing
Pb: pares de bases
Kb: kilobases
IPS: isla de patogenicidad
SST: sistema de secreción
%: porcentaje
SH₂: sulfuro de hidrógeno
NCCLS: National Committee for Control Standard Laboratory
CLSI: Clinical and Laboratory Standard Institute
µg: microgramo
U: unidad
RPM: revoluciones por minuto
mM: milimol
µM: micromol
dNTP: dinucleótidos
µl: microlitro
X: concentración del reactivo
SPF: libre de patógenos específicos
SC: subcutánea
PI: postinoculación
V: voltaje
EDTA: ácido etilendiaminotetracético
CDC: Center for Disease Control
UPGMA: Unweighted Pair Group Method with Arithmetic Averages
ST: estreptomina
CE: cefalotina
TET: tetraciclina

TMS: trimetoprima-sulfometoxazol

CIP: ciprofloxacina

FOS: fosfomicina

NIT: nitrofurantoína

AMP: ampicilina

POL: polimixina

CT: cefotaxima

CMP: cloranfenicol

UFC: unidades formadoras de colonia

TSI: tri sugar iron

MLVA: multilocus variable-number of tandem-repeats analysis

Caracterización fenotípica y subtipificación molecular de aislamientos de *Salmonella* Gallinarum de diferentes regiones de la República Argentina y de 5 cepas de vacunas 9R comercializadas en el país.

Palabras clave: *Salmonella* Gallinarum, PFGE, antimicrobianos, vacunas, tifus aviar

Resumen:

Salmonella Gallinarum es el agente causal del tifus aviar. Esta enfermedad de las aves es un grave problema en la República Argentina. Como medida de profilaxis, se utiliza la vacuna 9R, que es una cepa viva de *S. Gallinarum* en fase rugosa "R". Se evaluaron fenotípica y genotípicamente cinco vacunas 9R comercializadas en nuestro país y la vacuna sudafricana, que es utilizada en otros países y regiones del mundo. Se evaluaron fenotípica y genotípicamente un total de 55 aislamientos de *S. Gallinarum* de casos de tifus aviar detectados en las principales regiones avícolas de Argentina. Se estudió la distribución de cinco genes de virulencia por reacción en cadena de la polimerasa (PCR) del gen *invA* (asociado a la invasión), *sefD* y *pefA* (de adherencia a células epiteliales), *sopE* (estimula el rearrreglo del citoesqueleto celular) y el gen *avrA* (asociado a la atenuación de la virulencia de *Salmonella*). Las 55 cepas de campo presentaron 7 perfiles bioquímicos y 14 patrones de PFGE diferentes, fueron positivas para los genes *invA*, *avrA*, *sefD* y negativas para los genes *pefA* y *sopE*. Se detectó un alto número de cepas resistentes a diferentes antimicrobianos ampliamente utilizados para el tratamiento del tifus aviar y se detectaron algunos aislamientos con resistencia múltiple. Estos datos aportan una información muy valiosa ya que permiten conocer cuales son los antimicrobianos más eficaces para el tratamiento del tifus aviar en nuestro país. Entre las 6 cepas vacunales estudiadas, 2 resultaron no aptas en ensayos de inocuidad y mostraron un mismo perfil de *XbaI*-PFGE entre ellas y con respecto a 13

aislamientos de campo. Este es el primer estudio de epidemiología molecular de aislamientos de *S. Gallinarum* que permitió conocer las cepas circulantes en la República Argentina. También, este es el primer estudio que ha detectado la presencia de genes asociados a la virulencia en aislamientos pertenecientes a este biotipo. Se han utilizado y evaluado diferentes métodos fenotípicos y genotípicos para la subtipificación de *Salmonella* Gallinarum, lo cual aporta datos fundamentales para la vigilancia y control del tifus aviar en la República Argentina.

Fenotypic characterization and molecular subtypification of *Salmonella* Gallinarum isolates from different regions of Argentina Republic and 5 strains of 9R vaccines commercialized in the country.

Key words: *Salmonella* Gallinarum, PFGE, antimicrobials, vaccines, fowl typhoid

Summary:

Salmonella Gallinarum is the causative agent of fowl typhoid. This avian disease is a serious problem in Argentina. As prophylaxis measure, the 9R vaccine is used, consisting of a *S. Gallinarum* live strain in rough “R” phase. Five 9R vaccines commercialized in our country and a South African vaccine that is being used in other countries and world regions were phenotypically and genotypically analyzed. A total of 55 *Salmonella* Gallinarum isolates from fowl typhoid cases detected at the main avian regions of Argentina Republic were phenotypically and genotypically characterized. The distribution of five virulence genes was studied by polymerase chain reaction (PCR), *invA* gene (associated with invasion), *sefD* and

pefA (associated with epithelial cells adherence) *sopE* (stimulates the cytoskeletal rearrangement) and *avrA* gene (associated with *Salmonella* virulence attenuation). 55 field strains showed 7 biochemical profiles and 14 different PFGE patterns, they were positives for *invA*, *avrA*, *sefD* genes and negatives for *pefA* and *sopE* genes. A high number of resistant strains was found, against different antimicrobials widely used for fowl typhoid treatment and some multi-resistant isolates were detected. This information will contribute to know which are the most effective antimicrobial agents for fowl typhoid treatment in our country. Among the 6 studied vaccine strains, 2 turned out no apt in innocuousness assays and showed a same *XbaI*-PFGE profile among them and with respect to 13 field isolates. This is the first study of molecular epidemiology of *Salmonella* Gallinarum isolates that allowed to know the genetic subtypes of strains circulating in Argentina. Also, this is the first study which detected the presence of virulence associated genes in isolates belonging to this biotype. Different phenotypic and genotypic methods for *Salmonella* Gallinarum subtyping were used, which contribute important information for the surveillance and control of fowl typhoid in Argentina.

Introducción:

Enfermedad: tifus aviar

El tifus aviar (TA) es una enfermedad causada por la bacteria *Salmonella enterica* subespecie *enterica* serovar Gallinarum (*S. Gallinarum*). Es una enfermedad septicémica que afecta principalmente a gallinas y pavos, aunque otras especies de aves, tales como pavos, perdices, patos, etc. también son susceptibles. *S. Gallinarum* está altamente adaptada a su hospedador, las aves, y no es patógena para otras especies animales. El TA fue reconocido por primera vez en 1888 por Klein (1). La enfermedad era una seria amenaza para la industria avícola en el año 1900, debido a la gran cantidad de brotes que se producían y la alta mortalidad. Sin embargo, el TA fue erradicado de las aves comerciales en USA, parte de Europa, Japón, etc. pero continúa siendo un serio problema en muchos países del mundo. En la República Argentina se describen 3 períodos:

- A) 1972-1977 con 1.377.600 aves afectadas.
- B) 1978-1993 con un aparente control de la enfermedad.
- C) 1993-2003 con un recrudescimiento zonal (2).

Los signos clínicos del TA en pollitos son: depresión, somnolencia, anorexia, alas caídas, deshidratación, respiración dificultosa, diarrea, plumas hirsutas. El pico de mortalidad usualmente ocurre en aves de 2 a 3 semanas de edad. Las aves sobrevivientes pueden tener bajo peso y un pobre plumaje y no madurar adecuadamente. Planteles que experimentaron un brote severo de la enfermedad pueden tener un alto porcentaje de portadores. Otros signos clínicos incluyen ceguera, inflamación de la articulación tibiotarsiana, humeral, radial y ulnar. En aves en crecimiento y adultas, los signos clínicos pueden pasar desapercibidos, algunas veces no son específicos, puede haber una baja en el consumo alimenticio, plumas hirsutas,

disminución de la postura y de la fertilidad. La muerte puede producirse dentro de los 4 días de la exposición a la enfermedad, pero usualmente ocurre después de los 5 a 10 días. Otros signos incluyen: anorexia, diarrea, depresión, deshidratación y pérdida de peso (3, 4).

Morbilidad y mortalidad: la morbilidad y mortalidad pueden ser muy variables de acuerdo a varios factores como son la edad, la raza, el estado nutricional, el manejo del establecimiento e infecciones concurrentes. La mortalidad puede variar de 0% a 100%, especialmente en pollitos (5). La más alta mortalidad se produce durante la segunda semana después de la incubación, con un rápido declive entre la tercera y cuarta semana de edad. La morbilidad es generalmente más alta que la mortalidad. Las pérdidas económicas debidas al TA pueden ser muy altas. En general, el mayor costo económico del TA en países en desarrollo es el costo de los programas de vigilancia (6).

Patología: las lesiones macroscópicas en casos hiperagudos del TA en pollitos en edad temprana no se suelen presentar. En casos agudos, se observa agrandamiento y congestión del hígado, bazo y riñones. El hígado puede presentar focos blancos de necrosis. El contenido del saco vitelino puede estar coagulado, cremoso o caseoso. Puede haber un exudado fibrinoso en el pericardio, en la cápsula del hígado y el peritoneo. En algunas aves, nódulos blanquecinos pueden observarse en el epicardio y miocardio. Nódulos similares pueden ocasionalmente presentarse en el páncreas, pulmón y en la pared del ciego. Cuerpos caseosos pueden encontrarse en el lumen del ciego. Algunas aves pueden tener articulaciones inflamadas, conteniendo en su interior un fluido cremoso y viscoso (4, 7, 8). La infección por *S. Gallinarum* puede causar anemia (9). En pollos adultos, las lesiones pueden ser mínimas, aunque las aves pueden ser serológicamente positivas. Lesiones mínimas, tales como pequeños nódulos o folículos ováricos regresivos pueden ser encontrados en los ovarios. El oviducto frecuentemente contiene un exudado caseoso en el lumen. La disfunción del ovario y

el oviducto puede llevar a una ovulación abdominal o a una impactación que resulte en una peritonitis extensa y adhesiones al abdomen. Una peritonitis fibrinosa y perihepatitis, con o sin compromiso del tracto reproductivo puede ser observado en algunas ocasiones. Puede producirse una ascitis, especialmente en pavos. Ocasionalmente, el cultivo de *Salmonella Gallinarum* de estas lesiones es dificultoso. Otras lesiones pueden incluir un incremento del fluido pericárdico o una pericarditis fibrinosa, un páncreas moteado y granulomas caseosos en los pulmones y los sacos aéreos (10). En los machos, los testículos pueden presentar focos o nódulos blancos (11).

Patogénesis: poco se conoce sobre la patogénesis del TA, probablemente debido a los exitosos programas de erradicación realizados en los países desarrollados. *S. Gallinarum* sobrevive y se multiplica en varios órganos debido a un desconocido mecanismo de control que involucra al sistema reticuloendotelial (12). Esta observación fue confirmada cuando *S. Gallinarum* fue fagocitada por las células fagocíticas murinas en un experimento *in vitro* (13). Muchos factores, incluyendo la edad, la cepa, la dosis infectante, la ruta de infección, el stress, afectan la susceptibilidad de las aves a la salmonelosis (14). Los factores moleculares de la patogenicidad incluyen plásmidos responsables de la virulencia y factores de virulencia tales como genes de virulencia codificados en plásmidos, genes de invasión y genes fimbriales (15,16, 17, 18, 19, 20).

En un estudio realizado recientemente, se comprobó que los macrófagos de líneas de aves resistentes a la salmonelosis sistémica producían una fuerte respuesta oxidativa, mientras que una débil o ninguna respuesta fue encontrada en los macrófagos de líneas de aves susceptibles. Este hallazgo sugiere que los macrófagos juegan un papel importante en la resistencia a la salmonelosis sistémica en gallinas (21). La importancia de la sobrevivencia de *S. Gallinarum* dentro de los macrófagos de pollos fue demostrada por la completa atenuación de

cepas con una mutación en la isla de patogenicidad 2 con el sistema de secreción tipo III que sobrevivieron pobremente en los macrófagos de pollo (22). Recientemente, la importancia de las células T y del interferón gamma (IFN- γ) en la eliminación primaria de *S. Typhimurium* en la infección sistémica de pollos y también en la eliminación de *S. Gallinarum* de cepas 9R vivas atenuadas fue demostrado (23). Barrow demostró la importancia que tiene un plásmido de alto peso molecular (85 Kb) en la virulencia de *S. Gallinarum* (24).

Agente etiológico: *S. Gallinarum*

Taxonomía: el género *Salmonella* pertenece a la Tribu *Salmonellaceae*, dentro de la familia *Enterobacteriaceae*, que está constituida por un conjunto de microorganismos con las siguientes características: bacilos Gram negativos, no esporulados, no móviles o móviles por flagelos peritricos, crecen en medios de cultivo simples de peptona o extracto de carne, crecen bien en agar Mac Conkey, son aerobios o anaerobios facultivos, fermentan más que oxidan la glucosa con producción de ácido o ácido y gas, son catalasa positivos y oxidasa negativos, reducen nitrato a nitrito y tienen un contenido de G+C del 39-59%.

Estudios de ADN mediante técnicas de hibridación demostraron que el género *Salmonella* está constituido por 2 especies: *Salmonella enterica* y *Salmonella bongori*. *Salmonella enterica* está compuesta por 6 subespecies: *S. enterica* subespecie *enterica*, *S. enterica* subespecie *salamae*, *S. enterica* subespecie *arizonae*, *S. enterica* subespecie *diarizonae*, *S. enterica* subespecie *houtenae* y *S. enterica* subespecie *indica*. A su vez, las subespecies de *Salmonella enterica* y *Salmonella bongori* se dividen en más de 2400 serovariedades que están definidas en función de diferentes asociaciones de factores antigénicos somáticos O y flagelares H. La especie tipo es *Salmonella enterica*, ya que el

99,8% de *Salmonella* aisladas del hombre y de los animales de sangre caliente pertenecen a *Salmonella enterica* subespecie *enterica* y tienen propiedades bioquímicas características. *Salmonella Gallinarum* pertenece a la subespecie *enterica*, serovar *Gallinarum* que involucra dos biotipos: *Gallinarum* y *Pullorum* (25).

El serovar *Gallinarum* pertenece al serogrupo D de acuerdo al esquema de Kauffmann-White. La mayoría de las cepas de *S. Gallinarum* y *S. Pullorum* son muy similares a nivel cromosomal (25). Además, *S. Enteritidis*, otro miembro del serogrupo D, está estrechamente relacionado con *S. Gallinarum* y *S. Pullorum*, de acuerdo al método de multilocus enzyme electrophoresis (26). De acuerdo a un estudio filogenético, el ancestro común más reciente de *S. Gallinarum* y *S. Pullorum* era no móvil (27). *S. Gallinarum* es Gram negativo, no esporulado, no móvil, aerobio facultativo. Es un bacilo delgado midiendo aproximadamente 1 a 2,5 micras de longitud por 0,3 a 1,5 micras de ancho.

Características culturales: *S. Gallinarum* crece adecuadamente en agar tripticasa soya o agar nutritivo. Es aerobia o anaerobia facultativa y crece óptimamente a 37°C. Crece en medios de enriquecimiento selectivos incluyendo caldo selenito y caldo tetrionato y en medios diferenciales como agar Mac Conkey, sulfito de bismuto y verde brillante. Las colonias son pequeñas, lisas, de color gris azuladas o blanco grisáceas, de aspecto brillante, de bordes circulares. La mayoría de las colonias permanecen pequeñas (1 mm o menos), pero colonias aisladas pueden tener un diámetro de 3-4 mm o más. Ocasionalmente, se pueden encontrar colonias morfológicamente anormales. El crecimiento en caldos es turbio con un espeso sedimento floculoso.

Identificación bioquímica: *S. Gallinarum* fermenta la arabinosa, dextrosa, galactosa, manitol, manosa, rhamnosa y xilosa produciendo la acidificación de los mismos con o sin gas (16, 28). No fermenta la lactosa, sucrosa y salicina. Una importante diferencia bioquímica

entre *S. Gallinarum* y *S. Pullorum* es que esta última no fermenta el dulcitol y ocasionalmente fermenta la maltosa. Sin embargo la mayor diferencia es que *S. Pullorum* produce una rápida decarboxilación de la ornitina, mientras que *S. Gallinarum* no lo hace. Además, *S. Gallinarum* utiliza el citrato, sorbitol y tartrato (29).

Epidemiología: el hospedador natural de *S. Gallinarum* son las gallinas. Sin embargo, brotes naturales de TA han sido descritos en pavos, faisanes, codornices, loros, gorriones (30, 31, 32). La susceptibilidad de patos, gansos y palomas a *S. Gallinarum* es variable, pero todas estas especies de aves parecerían ser generalmente resistentes.

Transmisión: el tifus aviar puede ser transmitido por una variedad de medios (33, 34). Las aves infectadas o las portadoras, es el más importante medio de perpetuación y diseminación de la bacteria. Las aves no solo infectan a su propia generación, sino que también a generaciones posteriores a través de los huevos infectados. La contaminación del huevo se puede producir porque el óvulo se infecta en el momento de la ovulación. Otro modo de transmisión incluye la penetración de la bacteria a través de la cáscara, por el alimento, en la incubación, en las jaulas o los pisos, canibalismo, ingestión de huevos contaminados y heridas de la piel (35, 36). La materia fecal de aves infectadas es una importante fuente de contaminación. El alimento contaminado, como el agua y la cama también son fuentes de contaminación. Todas las personas que entran en las granjas de aves pueden diseminar la enfermedad a menos que se tomen ciertas precauciones como la desinfección del calzado, manos y ropas. También camiones, mapas y bolsas de comida contaminadas pueden ser una fuente de infección para las aves. Aves silvestres, mamíferos, moscas y otros insectos pueden ser un importante mecanismo de diseminación del microorganismo. *S. Gallinarum* puede sobrevivir por varios años en un ambiente favorable, pero es menos resistente que *Salmonella* paratifoideas al calor, químicos y factores adversos medioambientales (37). *S. Gallinarum* es

eliminada dentro de los 10 minutos a 60°C, en unos pocos minutos por la exposición directa a los rayos solares, a los 3 minutos por una dilución de 1:1000 de fenol, 1:20000 de dicloridrato de mercurio o 1% de permanganato de potasio (37). La bacteria en las heces de aves infectadas puede mantenerse por 10 días en lugares cerrados y 8 días en lugares abiertos (38). Los compuestos conteniendo fenol fueron los más efectivos desinfectantes para el control de *S. Gallinarum* en pruebas de campo, seguidos por los amonios cuaternarios y por los iodóforos (39).

Diagnóstico: un diagnóstico definitivo de tifus aviar requiere el aislamiento y la identificación de *S. Gallinarum*. Sin embargo, un diagnóstico tentativo puede ser hecho basado en la historia de la granja, los signos clínicos, la mortalidad y las lesiones halladas en los animales. La serología positiva es un hallazgo que puede también ser de gran valor en la detección de la infección. La serología es útil para establecer la presencia y estimar la prevalencia de la infección en una granja avícola. Las reacciones cruzadas con otras salmonellae, tales como *S. Enteritidis* deberían tenerse en cuenta cuando se interpretan los resultados serológicos (40). Existen diferentes pruebas serológicas para el diagnóstico del tifus aviar, entre las cuales se incluyen: aglutinación macroscópica en tubo o en placa, microaglutinación, ELISA, etc. (40, 41, 42).

En la actualidad, se puede realizar un rápido diagnóstico presuntivo de *S. Gallinarum* por medio de una PCR-Multiplex, basada en la detección de los genes *invA* y *spvC*. El gen de invasión *invA* se encuentra distribuido específicamente en todas las especies y subespecie del género *Salmonella*. El gen *spvC* se encuentra en cinco serovares de *Salmonella enterica enterica*: Typhimurium, Cholerasuis, Dublin, Enteritidis y Gallinarum (43).

Aislamiento de *Salmonella Gallinarum*: para poder recuperar el microorganismo, las aves no deberían ser tratadas con antimicrobianos por aproximadamente 2-3 semanas previas a la

toma de muestra. Como el TA es una enfermedad sistémica, esta bacteria puede ser aislada de muchos tejidos del ave. El hígado, bazo, saco vitelino y el ciego son los órganos preferidos para el cultivo. Cuando se encuentran lesiones en corazón, páncreas y pulmones también son adecuados para el cultivo. Lo mismo sucede con los órganos reproductivos, por lo tanto se pueden cultivar folículos ováricos, oviductos y testículos si hay lesiones. Otros sitios como el peritoneo, líquido sinovial y el interior del ojo pueden ser cultivados. Un muy buen sitio de cultivo es la médula ósea de huesos largos como el tarso-metatarso en aves muertas por TA y sobretodo, cuando los órganos parenquimatosos están friables o descompuestos. Todos estos órganos pueden ser cultivados en agar tripticasa soya o agar nutritivo para el aislamiento primario de *S. Gallinarum*. Caldos de enriquecimiento o medios selectivos pueden utilizarse cuando los tejidos se encuentran en descomposición.

Tratamiento: grandes esfuerzos se deben realizar para poder lograr la erradicación del TA, y el tratamiento debería ser la última opción. Varios tipos de sulfonamidas seguidas de nitrofuranos y varios otros antibióticos han sido encontrados de ser efectivos en reducir la mortalidad del TA. Sin embargo, ninguna droga o combinación de drogas han sido encontradas de ser capaces de eliminar la infección en las granjas afectadas. Las sulfonamidas que han sido utilizadas en el tratamiento del TA incluyen: sulfadiazina, sulfameracina, sulfatiazol, sulfametazina (44, 45). Sin embargo, varios estudios demostraron que a pesar del tratamiento, un número significativo de aves infectadas pueden sobrevivir a la infección y convertirse en portadoras (44, 46). Varios antibióticos pueden ser utilizados para el control y el tratamiento del TA, como son: furazolidona, cloranfenicol, biomicina, apramacina, gentamicina, clortetraciclina (37, 47, 48, 49). La resistencia a algunos de estos antibióticos han sido informados (50, 51, 52).

Vacunación: varios investigadores evaluaron bacterinas muertas y vacunas vivas modificadas para la prevención del tifus aviar. Por lo tanto, existen vacunas vivas e inactivadas disponibles en el mercado para el tifus aviar en algunos países. La más comúnmente utilizada es la vacuna viva derivada de una cepa estable rugosa de *S. Gallinarum* conocida como “9R”. La cepa 9R fue desarrollada por Smith en 1956, y se caracteriza por la ausencia de lipopolisacáridos (LPS), estructura que se encuentra en la pared celular de la mayoría de las bacterias Gram negativas. Esta vacuna ha sido empleada solamente en gallinas. La vacuna 9R es la única aprobada por las autoridades sanitarias de la República Argentina para la prevención del TA en gallinas ponedoras. El número de bacterias viables por dosis es importante, este microorganismo puede sobrevivir en aves vacunadas por muchos meses y puede ser transmitida a través de huevos (y tal vez de ave a ave). La vacunación puede reducir las pérdidas en la granja, pero no previene la infección por cepas de campo. Además, la vacunación con la vacuna 9R puede en algunas ocasiones provocar una alta mortalidad en aves infectadas (53). Estudios sobre la utilización de la cepa 9R como vacuna oral viva o inyectable con o sin adyuvantes oleosos han sido realizados y se han informado variables resultados (53, 54, 55, 56). Smith produjo dos tipos de vacunas vivas, una a partir de la cepa original o cepa lisa llamada 9S (S del inglés “smooth”) y otra a partir de la cepa rugosa o cepa 9R (R del inglés “rough”). El autor encontró que la vacuna con la cepa rugosa producía una inmunidad satisfactoria en pollas vacunadas a las siete semanas de edad y que dicha inmunidad empezaba a disminuir a las 12 semanas después de la vacunación. Las aves vacunadas no mostraron producción de aglutininas contra la cepa 9R de *S. Gallinarum* y no produjo mortalidad cuando fue administrada a pollitos de un día de edad. En el mismo estudio, el autor comparó las cepas 9R y 9S y concluyó que aunque la cepa 9S producía una inmunidad superior y más duradera, era altamente patógena, especialmente para pollitos de un

día de edad. A partir de entonces, varios investigadores comenzaron a trabajar y realizar estudios con vacunas producidas con estas dos cepas, evaluando su aplicación en la avicultura. Fue así como Gordon en 1959 concluyó en uno de sus trabajos que la transmisión de las dos cepas ocurría a través del huevo y que aparentemente podía continuar por largos períodos (57). En otro trabajo, el mismo autor, encontró que aves adultas vacunadas con la cepa 9R tenían persistencia de la cepa en el ovario por un tiempo prolongado y que en estas aves se producían niveles de aglutininas detectables, contrario a lo que se había pensado anteriormente. Gordon relacionó la persistencia de la cepa en el ovario con su transmisibilidad a través del huevo y con la producción de aglutininas (58). Harbourne en 1957 evaluó la vacunación con las cepas 9R y 9S en pollos durante brotes de tifus aviar y concluyó que la vacunación debía ser realizada en las aves no mayores de 4 meses y que dicha vacunación parecía ser efectiva si se aplicaba en cualquier momento después de que el ave alcanzara las 8 semanas de edad (59). Smith en 1969 realizó una serie de estudios sobre inmunogenicidad de la cepa 9R en lotes de vacunas liofilizadas y concluyó que existía una relación entre dosis y respuesta inmunológica y sugirió que a nivel de campo el número de organismos vivos de *S. Gallinarum* 9R en vacunas liofilizadas debía ser tan alto como fuera técnicamente posible (60). Las conclusiones obtenidas de los diferentes experimentos con la cepa rugosa y la cepa lisa de *S. Gallinarum* pueden resumirse de la siguiente manera:

- 1) La cepa 9S aunque confiere una inmunidad más efectiva y duradera que la cepa 9R, es altamente patógena, especialmente para pollitos de un día de edad y es transmisible a través del huevo.
- 2) La cepa 9R induce protección contra la mortalidad de las aves. La vacunación debe ser realizada antes de los 4 meses de edad y la inmunidad conferida por esta cepa dura aproximadamente 12 semanas.

- 3) Aves vacunadas transmiten tanto la cepa patógena como la cepa 9R a través del huevo. Sin embargo, existe una reducción significativa de microorganismos presentes en el ovario, hígado y bazo en aves vacunadas, comparadas con las aves controles no vacunadas.
- 4) Aunque existen controversias sobre la detección de aglutininas en aves vacunadas con la cepa 9R, es claro que el número de aves positivas es más bajo en aves vacunadas con la cepa 9R que en las aves vacunadas con la cepa 9S y que en aves infectadas en forma natural. Además, la cepa 9R reduce la eliminación fecal de la cepa patógena.

Vacunas basadas en proteínas de membrana externa de *S. Gallinarum* han sido informadas de ofrecer una mejor protección que la vacuna 9R viva en términos de la eliminación de la cepa patogénica de los órganos internos (61, 62). Más recientemente, la inmunización contra el tifus aviar por el uso de cepas mutantes de *S. Gallinarum* y de una cepa curada del plásmido relacionado a la virulencia parecerían tener resultados promisorios en proteger a las aves desafiadas con *S. Gallinarum* (63, 64, 65, 66).

Debido a que el tifus aviar fue erradicado de granjas aviáreas comerciales en la mayoría de los países desarrollados, el incentivo para la producción de vacunas es escaso.

Aunque no es una vacuna, la administración a pollos parrilleros jóvenes de *S. Enteritidis*, produce una inmunidad mediada por linfoquinas que reduce la transmisión horizontal de *S. Gallinarum* (67). La exclusión competitiva también ha sido intentada para controlar el tifus aviar utilizando *S. Enteritidis* o *S. Gallinarum* (68).

Subtipificación de *Salmonella* spp.

El objetivo de los sistemas de tipificación aplicados al diagnóstico y a las investigaciones epidemiológicas es poder discriminar aislamientos relacionados epidemiológicamente de aquellos no relacionados. La premisa básica inherente a todos los sistemas de tipificación es que los aislamientos epidemiológicamente relacionados derivan de la expansión clonal de un único precursor. Consecuentemente, comparten características comunes que difieren de aquellos aislamientos epidemiológicamente no relacionados.

Las técnicas de subtipificación sirven de complemento a las investigaciones epidemiológicas. Estas técnicas tienen una amplia aplicación en microbiología veterinaria ya que permiten: a) establecer si un animal infectado es parte o no de un brote; b) detectar la vía de transmisión de patógenos; c) identificar la fuente de infección en brotes y casos esporádicos; d) determinar si las cepas aisladas pertenecen a clones previamente reconocidos como virulentos; y e) controlar programas de inmunización.

Las serovariedades de *Salmonella* presentan linajes genéticos divergentes, y esta divergencia evolutiva refleja la acumulación de mutaciones no letales al azar, como sustitución de un par de bases, delección de un gen individual o la adquisición de ADN de otras especies microbianas. Con el desarrollo de técnicas moleculares altamente sensibles, es posible detectar alteraciones genéticas mínimas con precisión, como así también los complejos mecanismos que originan tales variaciones genéticas. Para poder evaluar y comparar las diferentes técnicas de subtipificación bacterianas se tienen en cuenta entre otros, el poder de discriminación, capacidad de tipificación y reproducibilidad.

1) Poder de discriminación: es un índice que representa la probabilidad de que los aislamientos no relacionados puedan ser caracterizados como cepas diferentes, cuando se aplica un determinado sistema de subtipificación.

2) Capacidad de tipificación: se define como la proporción de cepas que son asignadas a un determinado tipo por medio de un sistema de tipificación.

3) Reproducibilidad: es la capacidad de un método de tipificación de asignar el mismo tipo a un aislamiento analizado en diferentes ocasiones, separados en el tiempo y lugar. Es necesario considerar que la reproducibilidad es influenciada por factores biológicos (estabilidad de los marcadores analizados) y técnicos.

A.- Técnicas de tipificación fenotípica

Inicialmente la tipificación bacteriana se realiza mediante la caracterización de uno o varios marcadores fenotípicos. La limitación de estas técnicas es que los microorganismos pueden alterar la expresión de los genes que codifican. Tales cambios pueden ocurrir en forma no predecible, o bien, en respuesta a estímulos del medio ambiente. Además, mutaciones puntuales representando un simple nucleótido en todo el cromosoma, pueden modificar la regulación o la función de los genes responsables para un fenotipo particular. Así, aislamientos que representan la misma cepa y que son genéticamente indistinguibles entre si pueden variar en el fenotipo detectado. Por lo tanto, las técnicas de tipificación fenotípica tienen menor poder de discriminación que las técnicas de tipificación genotípica. Entre las técnicas clásicas de mayor aplicación en el estudio de *Salmonella* spp. se encuentran: biotipificación, serotipificación, sensibilidad a los antimicrobianos y fagotipificación.

a) Biotipificación

Incluye un número de características bioquímicas que son conocidas por variar dentro de un taxón dado. Estas características dependen de la especie. La capacidad de tipificación es excelente. El poder de discriminación es variable de acuerdo a los marcadores bioquímicos y a la especie, pero frecuentemente es baja, a menos que un gran número de bien

seleccionados caracteres sean incluidos en el esquema de pruebas. La estabilidad depende de la especie. El método es fácil de usar e interpretar aún en pequeños laboratorios. Es también técnicamente simple y puede ser realizado a bajo costo. Si la reproducibilidad es demostrada, puede ser usado como un método de tipificación definitivo (69, 70).

b) Serotipificación

La determinación de antígenos de superficie utilizando un conjunto de anticuerpos policlonales o monoclonales es aplicable a una especie o género solamente. La capacidad de tipificación, la frecuencia de reacciones cruzadas y el poder de discriminación de los esquemas de seropificación son variables de acuerdo a la especie, patovar, el número de determinantes antigénicos y la especificidad de los reactivos (71, 72, 73). La estabilidad depende de la especie, pero es frecuentemente buena. La serotipificación es técnicamente simple. Con reactivos adecuados y pruebas de calidad de control, puede ser un método de tipificación reproducible y definitivo de gran aplicabilidad. Sin embargo, solamente en laboratorios de referencia se puede realizar en forma confiable para varios microorganismos, para la cual se utilizan antisueros policlonales o anticuerpos monoclonales estandarizados que mayoritariamente no están disponibles comercialmente. Para *Salmonella* spp. continúa siendo una metodología de referencia para la clasificación y tipificación inicial de aislamientos relacionados.

c) Sensibilidad a los antimicrobianos

La prueba de sensibilidad a un número de agentes antimicrobianos incluyendo drogas y químicos no revelantes para el tratamiento, puede ser realizada por el método de difusión o dilución. El antibiograma, con una selección revelante de marcadores, puede ser aplicado a muchas especies de microorganismos. El poder de discriminación depende de la diversidad y la prevalencia relativa de mecanismos de resistencia adquirida detectable en las cepas

estudiadas. La estabilidad del perfil de resistencia puede ser insuficiente para su uso como marcador clonal, especialmente si la resistencia está determinada por plásmidos, y esta resistencia es expresada bajo control de complejos sistemas de regulación. El antibiograma es uno de los métodos más valiosos en los laboratorios clínicos. Tiene la ventaja de ser fácil de realizar e interpretar aún en pequeños laboratorios. Es técnicamente simple y de bajo costo. Tiene una buena reproducibilidad que permite su uso para la tipificación definitiva si es estandarizado (70, 74, 75, 76). Esta técnica puede no inferir relaciones clonales pero provee información complementaria de gran utilidad para la tipificación bacteriana.

d) Tipificación por bacteriófagos (fagotipificación)

Esta técnica se basa en la producción específica de perfiles líticos de aislamientos expuestos a un conjunto definido de bacteriófagos. Este tradicional sistema de tipificación se encuentra restringido a un número limitado de especies bacterianas. La capacidad de tipificación y el poder de discriminación son variables, de acuerdo a la especie y la cepa en estudio, pero la capacidad de tipificación es frecuentemente incompleta y se debe chequear en el tiempo, especialmente cuando nuevos clones son introducidos al sistema. La estabilidad depende de las especies bacterianas y clones, pero es usualmente suficiente para la investigación de brotes. La fagotipificación es exitosamente aplicada para muchas bacterias patógenas, entre ellas se puede mencionar: *Staphylococcus aureus*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Salmonella* Enteritidis y Typhimurium, etc. (71, 74, 77).

Fagos adicionales pueden ser necesarios de incluir cuando clones no tipificables incrementan su prevalencia. La producción y el control de calidad de los fagos debe ser continua, ya que es un factor muy importante y consume mucho tiempo. Un gran número de aislamientos pueden ser procesados con facilidad. La interpretación de los resultados no es fácil y requiere entrenamiento y experiencia. La fagotipificación puede ser utilizada como un

método de tipificación definitiva en sistemas de vigilancia de largo tiempo y en grandes poblaciones.

B.- Técnicas de tipificación genotípica

Las técnicas de subtipificación molecular revolucionaron la epidemiología. El avance en las técnicas de purificación, separación y amplificación de los ácidos nucleicos desde 1975 y las limitaciones que presentan la mayoría de las técnicas fenotípicas (problemas de tipificación, baja reproducibilidad y bajo poder discriminatorio) estimularon el desarrollo y mejoramiento de las técnicas de tipificación basadas en el estudio del ADN. Entre las técnicas más utilizadas se encuentra el análisis de los perfiles genéticos obtenidos mediante el corte de ADN plasmídico y cromosómico utilizando enzimas de restricción; las técnicas basadas en PCR; y las técnicas combinadas.

a) Análisis de ADN plasmídico

La determinación del número y tamaño de los plásmidos a través de una electroforesis en gel de agarosa permite tipificar muchas especies bacterianas (78). La capacidad de tipificación y el poder de discriminación son variables de acuerdo a las especies bacterianas. La estabilidad de los plásmidos fue evaluada como insuficiente para utilizar esta técnica como marcador clonal en diversas investigaciones. Se recomienda combinar el análisis plasmídico con algún método de tipificación genómica (a nivel cromosomal). La técnica es de particular importancia en estudios de clones que presentan resistencia antimicrobiana.

b) Análisis convencional con endonucleasas de restricción

El método convencional del análisis con endonucleasas de restricción (REA), se basa en que el cromosoma es cortado con enzimas de corte frecuente en varios cientos de fragmentos, los cuales son parcialmente separados en una electroforesis convencional en

complejos perfiles. La resolución de éstos, puede ser mejorada por una cuidadosa selección de la enzima a utilizar o por el uso de una separación específica y condiciones de marcado (PAGE, tinción de plata). El REA es un método rápido y está principalmente limitado a tipificaciones comparativas. Este método es, bajo condiciones estandarizadas, altamente reproducible y cuenta con un buen poder discriminatorio.

c) Ribotipificación

Se utilizan sondas (genes, elementos SI, rRNA) para hibridizar con el ADN genómico separado por la digestión con endonucleasas de restricción en una electroforesis convencional y posteriormente transferido a una membrana. La ribotipificación es un método universalmente aplicable y reproducible, el cual todavía requiere de una guía técnica para su optimización y reglas generales para su interpretación. El nivel de discriminación logrado con esta técnica varía de acuerdo a la especie bacteriana a estudiar, pero es generalmente mas baja en comparación con el REA y la macrorestricción.

d) Técnicas basadas en la reacción en cadena de la polimerasa

La característica esencial de PCR es la habilidad para amplificar rápidamente y en forma exponencial una secuencia particular de ADN. La reacción requiere de una ADN polimerasa, una mínima cantidad de ADN y 2 oligonucleótidos utilizados como cebadores o “*primers*”. Bajo condiciones adecuadas, una cantidad detectable de producto es generado en pocas horas. Originalmente se describió para proveer solo resultados positivos o negativos, por lo cual tuvo que ser mejorada para su utilización en epidemiología molecular.

Amplificación al azar de ADN polimórfico, “Random Amplified Polymorphic DNA” (**RAPD-PCR**): se basa en la utilización de un cebador de secuencia corta, aproximadamente de 10 pares de bases (pb), que reconoce y amplifica secuencias al azar dentro del ADN

genómico. El número y lugar de estos sitios de reconocimiento de secuencias dentro del ADN genómico varían para aislamientos diferentes de una especie bacteriana. Los productos de amplificación se separan mediante electroforesis en gel de agarosa, dando un patrón de bandas que, en teoría, es característico de una cepa bacteriana particular. El número y tamaño de los fragmentos es la base para la subtipificación del aislamiento. Esta técnica presenta ciertas limitaciones como la baja reproducibilidad y la falta de estandarización (79). A pesar de estas limitaciones, puede ser útil como técnica de screening y complementándose con una técnica de mayor poder de discriminación y reproducibilidad como la electroforesis en campo pulsado (PFGE) que ha sido ampliamente utilizada en el estudio de enterobacterias (80, 81, 82).

Se denomina **Rep-PCR** a la amplificación de secuencias de ADN repetitivo dentro del genoma bacteriano. Existen 2 grupos principales de elementos repetitivos que son utilizados para la subtipificación de bacterias, a) los elementos palindrómicos extragénicos repetitivos (REP) que ocupan el 1% del genoma y están representados por 500 a 1.000 secuencias repetidas de ADN con un tamaño de 33 a 44 pb (83), y b) las secuencias repetitivas intergénicas de consenso de las enterobacterias (ERIC) que son otras secuencias utilizadas con éxito para la subtipificación de enterobacterias. Las secuencias ERIC son elementos de 126 bp los cuales contienen una secuencia central altamente conservada que está localizada en regiones extragénicas del genoma bacteriano. Inicialmente fueron definidas sobre las secuencias obtenidas de *E. coli* y *S. Typhimurium* (84).

Como resultado de las Rep-PCR se observan múltiples bandas, que dependen de la distribución y la localización de las secuencias repetidas a lo largo del genoma. Algunas técnicas basadas en PCR, como por ejemplo RAPD y REP-PCR presentan buen poder

discriminatorio para el análisis de *Salmonella*, pero son poco reproducibles entre laboratorios, en especial RAPD (79).

e) Electroforesis en campo pulsado (PFGE)

Esta técnica se basa en la utilización de enzimas de restricción de corte poco frecuente que genera un número relativamente pequeño de fragmentos de ADN de gran tamaño. La separación de estos fragmentos de ADN se logra por la reorientación molecular inducida por cambios periódicos en el campo eléctrico. La duración del campo eléctrico alternado determina el rango de tamaño del ADN que puede ser separado en un gel de agarosa. La técnica de PFGE es aplicada con fines epidemiológicos debido a su sensibilidad (ya que estudia el genoma en su totalidad), reproducibilidad y alto índice discriminatorio cercano al valor ideal de 1 (72). Se considera que PFGE es la “técnica de oro” para la subtipificación bacteriana. Varios autores obtuvieron excelentes resultados al utilizar PFGE en la investigación epidemiológica de una variedad de microorganismos, incluyendo *E. coli* (85), *S. Gallinarum* (86), *Streptococcus bovis* (87) y *Clostridium perfringens* (88). La aplicación de protocolos estandarizados y la alta reproducibilidad de la técnica hacen que sea aplicable para realizar comparaciones de un alto número de aislamientos tanto intralaboratorio como interlaboratorio.

f) Tipificación de secuencias multilocus

El Multilocus Sequence Typing (MLST) identifica las variaciones de la secuencia de ADN entre los alelos (usualmente de 5 a 10) de determinados genes. Es una metodología aceptada y ampliamente utilizada y constituye uno de los mayores éxitos de tipificación de la actualidad (89). Las implicaciones para la genética poblacional y la dinámica de esta, puede ser más significativa que para la epidemiología bacteriana, debido a que el polimorfismo es

muy lento en la evolución de los genes, en el cual se basa esta técnica y por lo tanto, no es útil para realizar una comparación epidemiológica con alto poder discriminatorio.

A pesar del gran número de casos de tifus aviar registrados en los últimos años, no se han realizado hasta el momento, estudios de epidemiología molecular de los aislamientos de *S. Gallinarum*, que permitan conocer la distribución de las cepas circulantes en la República Argentina. Por otra parte, tampoco se ha estudiado la presencia de genes asociados a virulencia en aislamientos de este biotipo.

S. Gallinarum no ha sido sujeta a intensos estudios epidemiológicos como sí se realizaron en serovares más comúnmente encontrados (*Salmonella* Enteritidis, Typhimurium), por lo que no existe un método de referencia para la discriminación por debajo del nivel de serovar.

Factores de virulencia en *Salmonella* spp.

Para desarrollar su potencial patogénico, *Salmonella* debe poseer una serie de atributos llamados factores de virulencia. Estos incluyen una cubierta polisacárida completa, la capacidad de adherirse e invadir células, la habilidad de replicarse intracelularmente y posiblemente la producción y excreción de una toxina. Además, la evasión del sistema inmune del huésped.

1- Adherencia a células epiteliales:

La bacteria puede adherirse a uno o más tipos de células en el tejido intestinal a través de apéndices proteicos denominados fimbrias. Estas posibilitan que la bacteria entre en contacto con la célula huésped y luego permite la interacción de factores que estimulan la migración transepitelial de neutrófilos. Existen cinco tipos de fimbrias descritas, cuatro de las cuales están codificadas en el cromosoma: *fim* (fimbrias de tipo I), *agfA* (fimbrias finas

agregativas), *lpf* (fimbrias largas polares), *sef* (fimbrias de *Salmonella* Enteritidis) y *pef* (fimbrias codificadas en plásmidos), plasmídica (90). La presencia simultánea de diferentes sistemas fimbriales sugiere que la adherencia a superficies sería un paso crítico en la supervivencia del microorganismo en el ambiente. Estos factores de adherencia están distribuidos de forma diferente: los genes *fim* y *agf* se encuentran en todas las serovariedades, por el contrario *sef* y *lpf* exhiben una distribución esporádica. Esto se debe a mecanismos de transferencia génica horizontal y eventos de delección. Cada una de ellas tiene un tropismo específico por cierto tipo de células o huéspedes. Las fimbrias codificadas por el gen *lpf*, llamadas LP, son importantes en la infección por vía oral en el estadio inicial de la enfermedad. *S. Typhi* y *S. Arizonae* carecen de estas fimbrias. La presencia de las fimbrias *agf* produce un fenómeno de autoagregación, lo que favorece la supervivencia de *Salmonella* en ambientes hostiles como el ácido estomacal (91).

2- Genes de virulencia codificados en plásmidos:

La mayoría de la serovariedades no tifoideas contienen un plásmido, que forma parte de algunos de los determinantes de virulencia de *Salmonella* involucrados en la supervivencia y proliferación en la célula huésped. Su tamaño y el contenido genético varían entre las distintas serovariedades. En este plásmido está codificado *spv* (plásmido de virulencia de *Salmonella*), *rck* (resistencia a la actividad del complemento en el suero) y el operón fimbrial *pefBACD* (92). La región *spv* es una zona conservada de 7,8 Kb que contiene un cluster de cinco genes *spvR*, *spvA*, *spvB*, *spvC* y *spvD* que están involucrados en la replicación intracelular en macrófagos durante la infección sistémica. Su expresión es inducida luego de la fagocitosis de *Salmonella* por los macrófagos, células epiteliales intestinales y hepatocitos, y se cree que el ambiente intracelular, privado de nutrientes, es el factor que estimula su expresión. El gen *spvR* codifica para un regulador positivo necesario para la transcripción del

operón *spvABCD*. El gen *spvB* codifica para una enzima ADP ribosilante de actina que inhibe la polimerización de actina en macrófagos y estaría involucrada en la inhibición de la fusión lisosoma-fagosoma. Es posible que los genes *spvC* y *spvD* participen también en este proceso. Sin embargo, no se conoce con precisión la función que cumplen la mayoría de los genes codificados en este operón. La proteína rck actúa previniendo la formación y la inserción del complejo tubular C9 del complemento. El operón fimbrial *pefBACD* favorece la adherencia a las vellosidades intestinales. Está presente sólo en cuatro serotipos: *S. Typhimurium*, *S. Enteritidis*, *S. Cholerasuis* y *S. Paratyphi C*. Es importante destacar que no todas las fimbrias están asociadas con la virulencia, dado que cepas no patógenas pueden contener uno o más de estos operones fimbriales cuya función se asocia a la supervivencia en el medio ambiente (93).

3- Toxinas:

Varios estudios han descripto actividad citotóxica y enterotóxica en *Salmonella* (94, 95, 96). La toxina más estudiada es la de *Salmonella Typhimurium*. Es una proteína termolábil de 29 kda codificada en un gen cromosómico estructural. Esta toxina se produce en bajos niveles, por lo cual su papel en la patogénesis de la enfermedad es cuestionado. Secuencias homólogas de la toxina de *S. Typhimurium* fueron encontradas en todas las serovariedades del género *Salmonella* excepto en *S. bongori*.

Los genes que codifican los factores de virulencia y que regulan su síntesis y secreción, se encuentran en lo que se denominan islas de patogenicidad. El conocimiento molecular de los sistemas de patogenicidad a nivel genotípico (la codificación genética y la síntesis de proteínas) y fenotípicos (su expresión) son de fundamental importancia para entender los circuitos íntimos y las posibles vías de bloqueos de la patogénesis. Esta información tiene gran impacto en Salud Pública tanto humana como animal por su aplicación

al desarrollo de vacunas de mayor eficacia como en tratamientos más efectivos. Para todo esto, es necesario no solo ese conocimiento, sino también cuales de las expresiones de los factores de virulencia tienen que ver con la patogenicidad, a través de su detección por técnicas moleculares más sensibles y específicas como la reacción en cadena de la polimerasa (PCR). A continuación se describen los elementos genéticos más conocidos hasta el momento que participan en la síntesis de factores de virulencia (islas de patogenicidad/sistemas de secreción).

4- Islas de patogenicidad y sistemas de secreción

Salmonella tiene un complejo ciclo de vida y posee ciertas herramientas moleculares que le permiten expresar la virulencia. Entre estas se encuentran las islas de patogenicidad (IPS) y los sistemas de secreción de tipo III (SST III). Las islas de patogenicidad son segmentos de ADN insertos dentro del cromosoma que le confieren a la bacteria una variedad de factores de virulencia. La mayoría de las IPS están ubicadas adyacentemente a genes de ARN de transferencia y tienen una composición de guanina-citosina diferente del resto del cromosoma, sugiriendo que su adquisición se produjo por una transferencia horizontal. Sus extremos contienen secuencias repetidas o elementos de inserción, lo que sugiere que algún evento de recombinación podría producirse. Estas IPS tienen diferentes tamaños que oscilan entre 1,6 Kb y 40 Kb y varían en su distribución entre las distintas serovariedades. Por definición las islas de patogenicidad tienen localización cromosómica, esto resulta arbitrario ya que algunos elementos móviles como plásmidos, transposones y fagos podrían insertarse y ejercer su acción desde el cromosoma. Sin embargo, aún no se conoce completamente su origen y los mecanismos de transferencia de estas islas de patogenicidad. Estas constituyen elementos principales de la evolución de los microorganismos, dado que su incorporación puede, en un único evento, transformar un microorganismo normalmente benigno en un

patógeno. Los sistemas de secreción tipo III se encuentran presentes en varias bacterias Gram negativas patógenas, son sistemas de transporte especializado de proteínas que exportan factores de virulencia hacia las células huésped. Estos factores alteran la función normal de la célula en beneficio de la bacteria invasora y se activan cuando el patógeno entra en contacto con la célula (97). El sistema de secreción de tipo III involucra:

- Proteínas componentes de la maquinaria de secreción, cuya función es exportar proteínas desde la bacteria (Ej: InvA, InvC, InvG y PGR).
- Proteínas involucradas en la translocación de moléculas efectoras dentro de la célula huésped. (chaperonas y otras).
- Reguladores que controlan la transcripción de genes y la secreción de proteínas y chaperones.

Al menos 5 islas de patogenicidad (IPS 1 a 5) han sido descritas en *Salmonella*.

Componentes estructurales del aparato de secreción:

El SST III está presente en todas las serovariedades de *Salmonella*. La maquinaria de secreción de tipo III de la IPS-1 está organizada en una estructura supramolecular constituida por una base similar a un cuerpo basal flagelar con dos anillos superiores e inferiores y una estructura compleja semejante a una aguja. Las proteínas InvA, SpaP, SpaQ y SpaR se localizan en la membrana interna y forman parte de la estructura basal del sistema secretor (98).

Proteínas secretadas con funciones efectoras: StpP, AvrA, SipA, SopB y SopE.

A diferencia de las proteínas secretadas, que son codificadas dentro de IPS-1, la mayoría de las proteínas efectoras están codificadas en elementos móviles en el cromosoma o en islas de patogenicidad. No todas las cepas de *Salmonella* llevan la misma batería de proteínas efectoras. La proteína StpP, tiene como función la fosforilación de proteínas que

actúan inactivando a Rho GTPasas para revertir el proceso de alteración celular inicial. Sop B produce un compuesto que estimula la secreción de cloruro en las células infectadas por *Salmonella* produciendo diarrea por un mecanismo secretorio. Por lo tanto estimularía la secreción de fluidos y la respuesta inflamatoria en el íleo infectado. Se cree que estimula el reclutamiento de polimorfonucleares al sitio de infección. Además estimula el rearreglo de actina y la entrada bacteriana a la célula huésped. La proteína Sop E estimula el ruffling de membrana y el reordenamiento del citoesqueleto necesarios para la internalización de *Salmonella* a células no fagocíticas. SipA es una de las proteínas requeridas para la entrada a la célula huésped de forma eficiente. Modula la actina causando cambios conformacionales en los filamentos. Además induce la trans migración de polimorfonucleares. *Salmonella* codifica para tres proteínas efectoras del SST III que son capaces de estimular las Rho GTPasa directa (SopE o SpoE2) o indirectamente SopB). Esta estimulación dispara una cascada de eventos celulares que producen la reorganización del citoesqueleto y la eventual internalización de la bacteria (99). El gen *invA* se encuentra asociado a la invasión y es un componente de la maquinaria de secreción. El gen *avrA* codifica para una molécula efectora que inhibe la activación de un factor transcripcional pro-inflamatorio, cuya presencia ha sido asociada recientemente a la atenuación de la virulencia en *Salmonella*. El gen *sefD* se encuentra involucrado en la adherencia a células epiteliales.

Hipótesis:

- Las cepas de *Salmonella* Gallinarum que circulan en la República Argentina son diversas fenotípica y genotípicamente.
- Las cepas de *Salmonella* Gallinarum de la República Argentina presentan una alta resistencia a los antibióticos utilizados habitualmente en las producciones avícolas.
- Las cepas de *Salmonella* Gallinarum presentan diversos factores de virulencia

Objetivos:

- Analizar la diversidad genética y distribución de genes de virulencia en aislamientos de *S. Gallinarum* recuperados de aves con tifus aviar en la República Argentina.
- Caracterizar las cepas vacunales 9R de *S. Gallinarum* que se utilizan en nuestro país. Evaluar la diversidad genética de las cepas vacunales y compararlas con los aislamientos autóctonos.
- Evaluar la utilización de métodos fenotípicos y genotípicos para la subtipificación de *S. Gallinarum*.

Materiales y métodos:

Estudio de aislamientos de campo

Cepas de *S. Gallinarum* incluidas en el estudio:

Los aislamientos de campo de *S. Gallinarum* utilizados en el trabajo se detallan en la tabla 1. En total se analizaron 55 aislamientos de casos de tifus aviar, recuperados como se describe a continuación.

Recolección de muestras:

Las muestras fueron tomadas de hígado, hueso tarso-metatarso y materia fecal de gallinas ponedoras, pollos parrileros o reproductores de granjas avícolas comerciales distribuidas en los principales centros de producción avícola del país. Las regiones de la República Argentina donde se recolectaron las muestras fueron las siguientes: Buenos Aires, Santa Fe, Mendoza, Neuquén, Córdoba y Entre Ríos. Las muestras o los animales fueron transportados inmediatamente hasta el laboratorio, en forma refrigerada.

Procesamiento de muestras para el aislamiento de *S. Gallinarum*:

Todas las muestras fueron procesadas inmediatamente de ser recibidas en el laboratorio. Se sembraron directamente en agar entérico Hektoen (Difco, Le point de Claix, France) y fueron incubadas a 37°C por 48 horas. Las colonias sospechosas (SH₂ +) se subcultivaron en agar tripticosa soja (Laboratorios Britania, Buenos Aires, Argentina) a 37°C por 24 horas y fueron conservadas en caldo cerebro corazón (Difco, Le point de Claix, France) con 30% de glicerol (Anedra, Buenos Aires, Argentina) a -70°C. Posteriormente

fueron identificadas bioquímicamente siguiendo la metodología recomendada para este género bacteriano como se describe a continuación (100).

Identificación y caracterización fenotípica de los aislamientos de *S. Gallinarum*

Las pruebas bioquímicas y fisiológicas que se realizaron para la identificación de *S. enterica* subespecie *enterica* serovar Gallinarum biotipo Gallinarum se observan en la tabla 2, junto con el resultado esperado para este biotipo (100).

Tabla 1: Cepas de *Salmonella* Gallinarum aisladas de animales con tifus aviar incluidas en el estudio y los datos correspondientes.

Cepa N°	Fecha de aislamiento	Lugar de aislamiento	Localidad	Provincia
SG-1	21/2/2004	Hígado	Rosario	Santa Fe
S-G2	21/2/2004	Hígado	Berazategui	Buenos Aires
SG-3	22/2/2004	Tarso-metatarso	Villa Elisa	Buenos Aires
SG-5	13/1/2004	Tarso-metatarso	Mendoza	Mendoza
SG-6	20/11/2003	Tarso-metatarso	Luján	Buenos Aires
SG-7	20/11/2003	Tarso-metatarso	Luján	Buenos Aires
SG-8	4/12/2003	Tarso-metatarso	El Pino	Buenos Aires
SG-10	13/12/2003	Hígado	Los Hornos	Buenos Aires
SG-13	13/1/2004	Hígado	Mendoza	Mendoza
SG-30	17/3/2004	Hígado	Lobos	Buenos Aires
SG-31	17/3/2004	Hígado	Luján	Buenos Aires
SG-33	25/3/2004	Tarso-metatarso	Guerrico	Buenos Aires

SG-39	6/4/2004	Tarso-metatarso	Monte Buey	Córdoba
SG-44	7/4/2004	Hígado	Villa Elisa	Buenos Aires
SG-45	7/4/2004	Hígado	Luján	Buenos Aires
SG-46	7/4/2004	Hígado	Sin datos	Buenos Aires
SG-47	7/4/2004	Tarso-metatarso	Sin datos	Buenos Aires
SG-48	7/4/2004	Hígado	Mendoza	Mendoza
SG-49	7/4/2004	Hígado	Sin datos	Buenos Aires
SG-50	7/4/2004	Tarso-metatarso	El Peligro	Buenos Aires
SG-51	7/4/2004	Tarso-metatarso	Valle Azul	Neuquén
SG-81	28/4/2004	Tarso-metatarso	Mar del Plata	Buenos Aires
SG-85	12/5/2004	Tarso-metatarso	Pilar	Buenos Aires
SG-86	12/5/2004	Tarso-metatarso	El Peligro	Buenos Aires
SG-88	19/5/2004	Hígado	Sin datos	Entre Rios
SG-92	27/5/2004	Hígado	Santa fe	Santa fe
SG-93	27/5/2004	Hígado	Pilar	Buenos Aires
SG-94	27/5/2004	Hígado	Monte Buey	Córdoba
SG-122	7/7/2004	Hígado	El Peligro	Buenos Aires
SG-124	7/7/2004	Hígado	Rosario	Santa fe
SG-127	30/9/2004	Tarso-metatarso	Lima	Buenos Aires
SG-144	10/10/2004	Tarso-metatarso	Neuquén	Neuquén
SG-145	10/10/2004	Tarso-metatarso	Chacabuco	Buenos Aires
SG-159	11/2/2005	Hígado	Pilar	Buenos Aires
SG-171	21/2/2005	Tarso-metatarso	Luján	Buenos Aires

SG-172	3/3/2005	Tarso-metatarso	Zárate	Buenos Aires
SG-175	14/3/2005	Tarso-metatarso	Mar del Plata	Buenos Aires
SG-178	14/3/2005	Tarso-metatarso	Las Heras	Buenos Aires
SG-179	14/3/2005	Tarso-metatarso	General Rodríguez	Buenos Aires
SG-184	2/5/2005	Tarso-metatarso	Sin datos	Córdoba
SG-186	12/6/2005	Tarso-metatarso	Chivilcoy	Buenos Aires
SG-188	17/5/2005	Tarso-metatarso	Pilar	Buenos Aires
SG-189	17/5/2005	Tarso-metatarso	Mendoza	Mendoza
SG-190	25/8/2005	Tarso-metatarso	El Peligro	Buenos Aires
SG-191	6/9/2005	Hígado	Los Cardales	Buenos Aires
SG-256	2005	Sin datos	Balcarce	Buenos Aires
SG-257	2005	Sin datos	Balcarce	Buenos Aires
SG-258	2005	Sin datos	Sin datos	Buenos Aires
SG-259	2005	Sin datos	Sin datos	Buenos Aires
SG-262	10/3/2005	Sin datos	Sin datos	Buenos Aires
SG- 263	2005	Sin datos	Balcarce	Buenos Aires
SG-264	2005	Sin datos	Balcarce	Buenos Aires
SG-269	9/3/2005	Sin datos	Sin datos	Buenos Aires
SG-270	18/5/2005	Materia fecal	Sin datos	Buenos Aires
SG-271	2005	Sin datos	Sin datos	Buenos Aires

Tabla 2: Caracteres bioquímicos y fisiológicos de *Salmonella Gallinarum*.

Pruebas bioquímicas y fisiológicas	<i>Salmonella Gallinarum</i>
Catalasa	+
Oxidasa	-
Indol	-
Rojo de metilo	+
Voges-Proskauer	-
Citrato	-
SH ₂ (TSI)	+ (trazas)
Urea	-
Fenilalanina	-
Lisina	+
Arginina	-
Ornitina	-
Motilidad	-
Nitrato	+
Malonato	-
Glucosa	+
Lactosa	-
Manitol	+
Dulcitol	+
Salicina	-
Adonitol	-

Sorbitol	-
Arabinosa	+
Rhamnosa	-
Maltosa	+
Xilosa	+
Trehalosa	+/-

Susceptibilidad a antimicrobianos

Para determinar los perfiles de resistencia a antimicrobianos se utilizó la técnica de difusión por discos, de acuerdo a las normas del National Committee for Control Standard Laboratory (NCCLS, 2002), actualmente denominado Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI). Los antimicrobianos utilizados fueron: ciprofloxacina (30µg), tetraciclina (30µg), gentamicina (10µg), nitrofuranos (300µg), ampicilina (10µg), cefotaxima (30µg), trimetoprima-sulfametoxazol (1,25/23,75µg), ácido nalidíxico (30µg), polimixina (300 U), fosfomicina (50µg), cloranfenicol (30µg), cefalotina (30µg) (Laboratorios Britania, Buenos Aires, Argentina) y estreptomina (10µg) (Oxoid, Hampshire, England).

Factores de virulencia

Se investigó la presencia de los genes *invA*, *sefD*, *pefA*, *sopE* y *avrA*. La identificación de estos genes asociados a virulencia se realizó por medio de la reacción en cadena de la polimerasa (PCR). A partir de cultivos bacterianos puros desarrollados en agar tripticosa soja (Britania, Buenos Aires, Argentina) se tomaron 3 a 4 colonias y se inocularon en 150 µl de agua tridestilada estéril. Se incubaron los tubos a 100°C durante 1 hora, se centrifugaron por 1 minuto a 5000 RPM, se transfirieron los sobrenadantes a otro tubo y se mantuvieron los

templados a -20°C hasta el momento de su utilización. Gen *invA* : la amplificación de un fragmento específico correspondiente a este gen fue realizada de acuerdo al protocolo diseñado por Malorny (101). Los genes *sefD* y *pefA* fueron identificados siguiendo el protocolo de Bäumlér (92) y Bäumlér (93), respectivamente. La presencia del gen *avrA* se determinó siguiendo el protocolo de Prager (102), y se aplicó un protocolo diseñado en el laboratorio “Bacteriology and Enteric Pathogens Division, National Microbiology Laboratory”, Winnipeg, Canada (Dr. Clifford Clark, comunicación personal) para determinar la presencia del gen *sopE*. La concentración de los reactivos utilizados en esta última reacción de PCR fue: 1X Taq polimerasa buffer, 0,2 mM de cada dNTP, 1 µM de cada primer, 1,5 mM de MgCl₂, 0,05 unidad de Taq polimerasa (Invitrogen, CA 92008, USA); volumen final de reacción 25 µl, incluyendo 2,5 µl de ADN templado. Los cebadores utilizados fueron: Forward: 5'GGCGCGGGCGGTAAAAC3' y Reverse: 5'CCGAGGAAGCGCATCTGAGG3'. Las condiciones de amplificación fueron las siguientes: desnaturalización inicial: 94°C por 5 minutos, 30 ciclos de: 94°C por 1 minuto, 63°C por 1 minuto, 72°C por 1 minuto y extensión final: 72°C por 5 minutos. El tamaño del fragmento ADN esperado es de 855 pb.

Estudio de cepas vacunales

Cepas estudiadas:

Se analizaron cinco cepas correspondientes a formulaciones vacunales 9R contra tifus aviar elaboradas y comercializadas en el país (denominadas en este estudio A, B, C, D y E) y una cepa denominada sudafricana, que se utiliza en otros países para la elaboración de la vacuna (no en la República Argentina) (tabla 3).

Tabla 3: Cepas de *Salmonella Gallinarum* utilizadas para la preparación de las vacunas contra el tifus aviar incluidas en el estudio.

Cepa N°	Identificación de la vacuna	Fecha de incorporación al cepario de la FCV-UNLP
SG-52	A	3/4/2004
SG-53	B	3/4/2004
SG-54	E	3/4/2004
SG-55	C	3/4/2004
SG-56	D	3/4/2004
SG-152	Cepa Sudafricana	24/11/2004

Controles de las vacunas:

Para la evaluación de las vacunas se siguieron las recomendaciones del Manual de Procedimientos de la Oficina Internacional de Epizootias (103).

Control de pureza:

Se realizaron diluciones en base 10 en caldo tripticasa soja de las 5 vacunas comerciales analizadas. Se sembraron 100 µl de las diluciones (10^{-3} , 10^{-4} , 10^{-5} y 10^{-6}) por triplicado en agar base sangre (Laboratorios Bitania SA, Buenos Aires, Argentina) con el agregado de 5% de sangre de carnero y en caldo tioglicolato (Beckton Dickinson, Sparks, USA). Se verificó la ausencia de contaminantes y se confirmó la identificación bioquímica como *S. Gallinarum* a partir de 5 colonias de los cultivos en agar sangre.

Control de inocuidad:

Cada vacuna analizada fue inoculada en 6 pollos libres de patógenos específicos (SPF), machos de 12 semanas de edad, por vía subcutánea (SC) y 15 pollitos convencionales, machos de 2 días de edad, por vía intraperitoneal. Todas las aves fueron inoculadas con 10 dosis vacunales. Por cada categoría de aves, se inoculó un lote control con solución fisiológica estéril. Las aves se observaron diariamente durante una semana. El día 7 postinoculación (PI), se sacrificaron la totalidad de las aves y se les realizó la necropsia. Las vesículas biliares y los hígados de los animales fueron sembrados individualmente en agar entérico Hektoen (Laboratrios Britania SA, Buenos Aires, Argentina), e incubados a 37°C durante 48 horas. Los aislamientos obtenidos fueron caracterizados a través de pruebas bioquímicas. Se observó la morfología de las colonias de las 5 cepas vacunales y de las cepas recuperadas en la prueba de inocuidad y se les realizó la prueba de aglutinación en placa con acriflavina y solución salina al 2%. Estas pruebas se realizan con la finalidad de comprobar que las cepas utilizadas se encuentran en fase rugosa (aglutinan inmediatamente).

Subtipificación molecular**Electroforesis en campo pulsado (PFGE)**

Se aplicó el protocolo estandarizado de la Red PulseNet Internacional, Center for Diseases Control and Prevention (104). Brevemente, los moldes de agarosa conteniendo el ADN bacteriano fueron digeridos con 30 U de *Xba*I (Promega, Madison, Wisconsin, USA). Los fragmentos de ADN fueron separados en un gel de agarosa al 1% (SeaKem Gold, Lonza Rockland, ME., USA) en buffer TRIS-EDTA borato al 0,5X a 14°C en un aparato CHEFF-DR III System (Biorad, Hercules, California, USA). El tiempo de corrida fue de 19 horas, con

un voltaje constante de 200 V, utilizando un pulso lineal de rampeado de 2,2-54,2 segundos. La tinción del gel fue realizada con 0,5 µg/ml de una solución acuosa de bromuro de etidio (Biorad, Hercules, California, USA). La cepa Standard universal de la Red PulseNet, *Salmonella* Braenderup CDC H-9812, fue incluida como control y marcador de peso molecular para analizar los perfiles generados por PFGE. Algunos aislamientos que presentaron patrones de PFGE indistinguibles con la enzima *XbaI* fueron seleccionados y digeridos con 30 U de *BlnI* (Promega, Madison, Winconsin, USA), a fin de confirmar la relación genética observada.

Captura de imágenes y análisis de resultados

Las imágenes de los geles de PFGE fueron obtenidas a través de Gel-Doc System (Biorad, Hercules, California, USA) y fueron analizadas utilizando la versión 3.5 del programa BioNumerics (Applied Maths, Kortrijk, Belgium). La relación entre los perfiles fue estimada por la proporción de bandas compartidas aplicando el coeficiente de Dice con 1,5% de tolerancia y 1,5% de optimización y se generó un dendograma basado en el método: Unweighted Pair Group Method with Arithmetic Averages (UPGMA).

Resultados:

- **Estudio de aislamientos de *S. Gallinarum* de casos de tifus aviar**
- **Caracterización fenotípica**
- **Pruebas Bioquímicas y fisiológicas:**

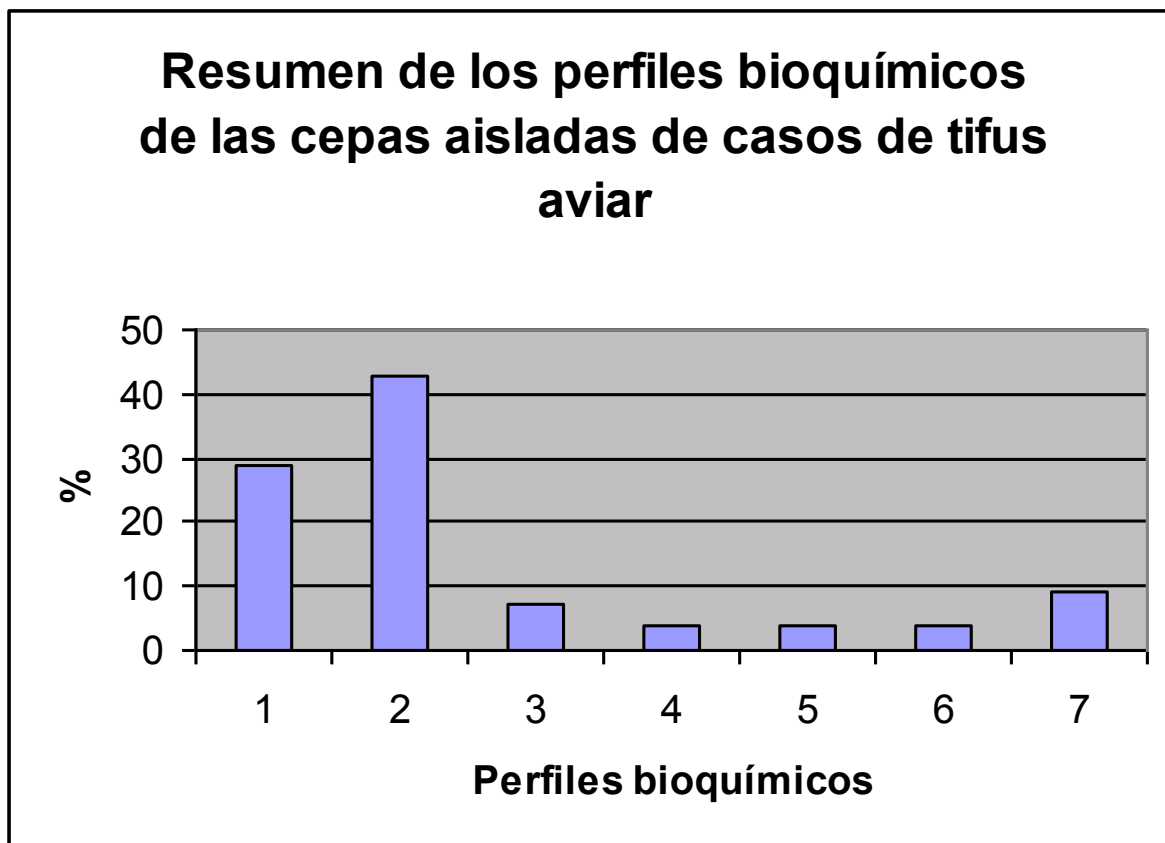
De los 55 aislamientos analizados, 45% fermentó la xilosa, 16% decarboxiló la arginina, y 14,5% utilizó el citrato (tabla 4). El resto de las pruebas bioquímicas y fisiológicas

concordaron con las características fenotípicas descritas para *S. Gallinarum* (tabla 2). Se encontraron en total 7 perfiles bioquímicos para los aislamientos de *S. Gallinarum* de aves con tifus aviar, la mayoría de los aislamientos pertenecieron a los perfiles 1 y 2 (72%), mientras que el resto de los perfiles abarcó un número muy inferior de cepas (28%) (figura 1). Ver anexo para información detallada de cada cepa.

Tabla 4: Perfiles bioquímicos (pruebas diferenciales) de las 55 cepas estudiadas aisladas de casos de tifus aviar.

Perfil bioquímico	Arginina	Xilosa	Citrato	N° de aislamientos (identificación)
1	-	+	-	SG-1, SG-2, SG-3, SG-5, SG-13, SG-44, SG-51, SG-88, SG-190, SG-256, SG-257, SG-259, SG-262, SG-263, SG-264
2	-	-	-	SG-7, SG-8, SG-10, SG-30, SG-31, SG-33, SG-39, SG-45, SG-46, SG-48, SG-50, SG-81, SG-92, SG-144, SG-159, SG-171, SG-172, SG-175, SG-178, SG-179, SG-186, SG-188, SG-189, SG-258
3	-	+	+	SG-47, SG-49, SG-85, SG-184
4	-	-	+	SG-86, SG-145
5	+	-	-	SG-93, SG-94
6	+	-	+	SG-122, SG-124
7	+	+	-	SG-127, SG-191, SG-269, SG-270, SG-271

Figura 1: Distribución de los perfiles bioquímicos de las cepas aisladas de casos de tifus aviar.



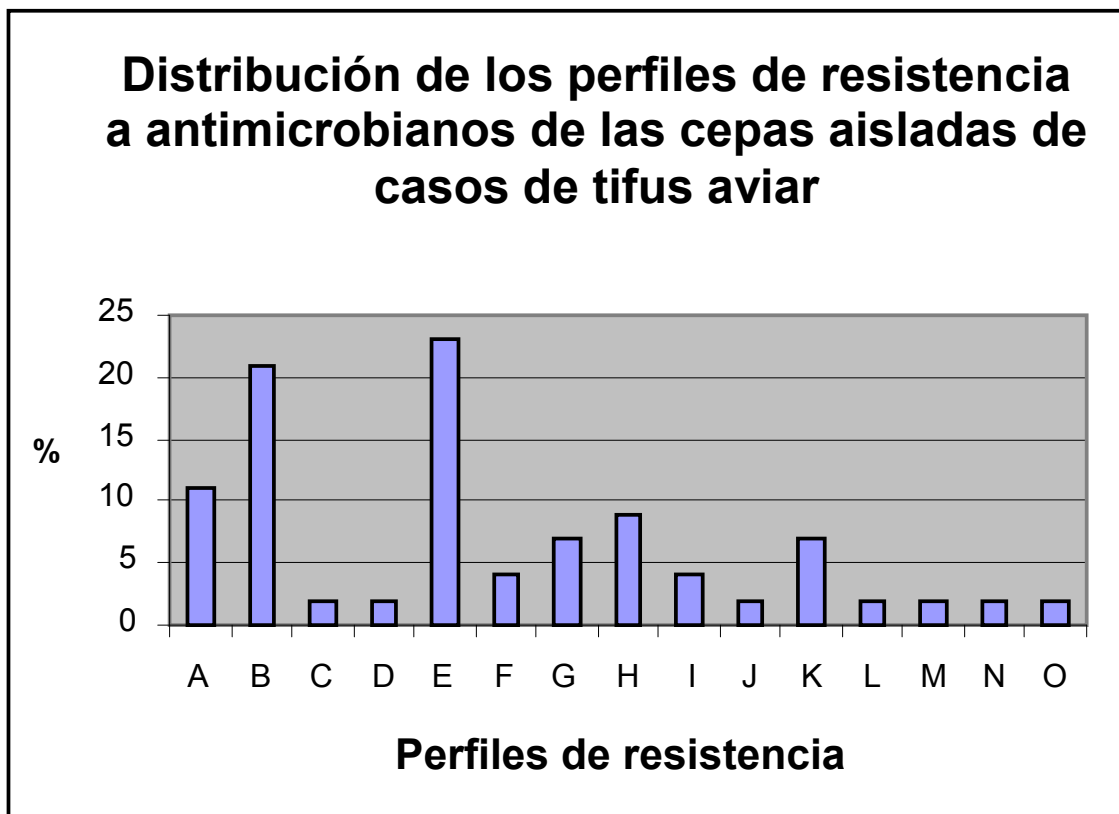
Susceptibilidad a agentes antimicrobianos:

Los perfiles de susceptibilidad a antimicrobianos de los aislamientos de casos de tifus aviar se muestran en la tabla 5 (Anexo).

Se encontraron 15 perfiles de susceptibilidad diferentes (tabla 5). La distribución de dichos perfiles entre los aislamientos se presenta en la figura 2.

Tabla 5: Perfiles de resistencia a antimicrobianos de los 55 aislamientos de casos de tifus aviar (ver anexo).

Figura 2: Resumen de los perfiles de resistencia a los antimicrobianos de las cepas aisladas de casos de tifus aviar.



Perfil A: resistente a ácido nalidíxico

Perfil B: resistente a ácido nalidíxico e intermedio a estreptomicina.

Perfil C: resistente a ácido nalidíxico, estreptomicina, trimetoprima-sulfametoxazol, polimixina, tetraciclina y gentamicina.

Perfil D: resistente a ácido nalidíxico y tetraciclina.

Perfil E: resistente a ácido nalidíxico y estreptomicina.

Perfil F: resistente a ácido nalidíxico, estreptomicina, trimetoprima-sulfametoxazol y tetraciclina.

Perfil G: resistente a estreptomicina.

Perfil H: resistente a ácido nalidíxico, intermedio a estreptomicina y ciprofloxacina.

Perfil I: resistente a ácido nalidíxico, estreptomicina, tetraciclina y gentamicina.

Perfil J: resistente a ácido nalidíxico, estreptomicina e intermedio a ciprofloxacina.

Perfil K: sensible a todos los antimicrobianos

Perfil L: resistente a ácido nalidíxico, estreptomicina, ampicilina y tetraciclina.

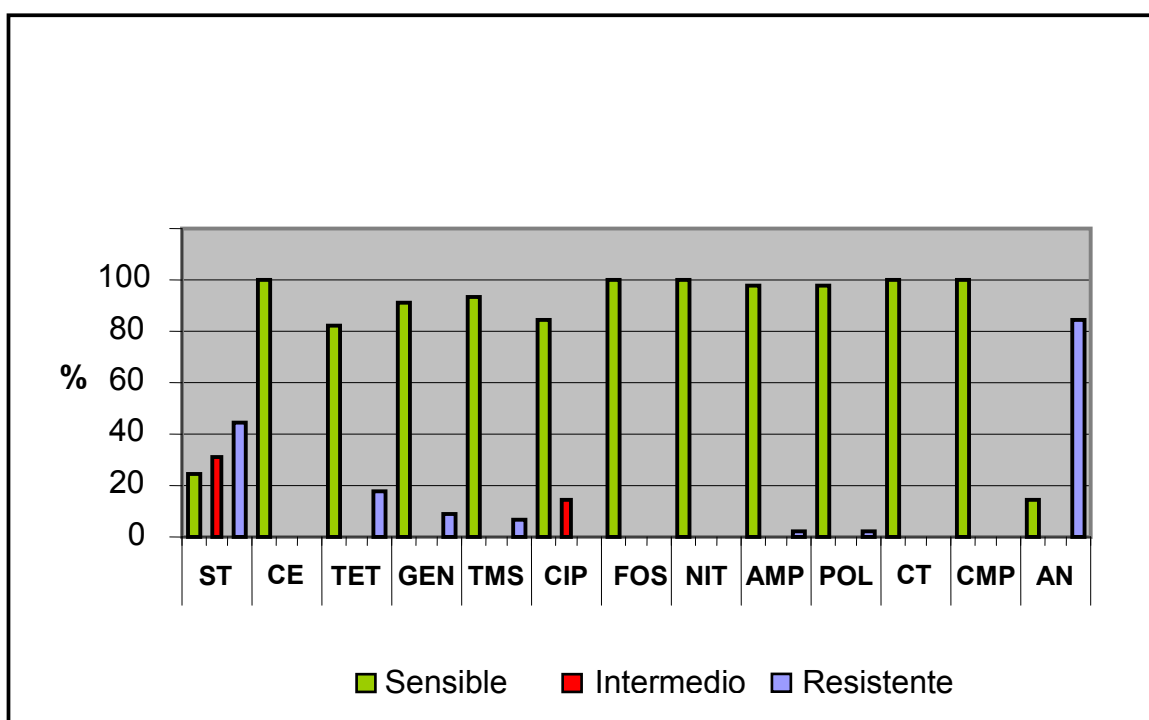
Perfil M: resistente a ácido nalidíxico, estreptomicina, gentamicina e intermedio a ciprofloxacina.

Perfil N: resistente a ácido nalidíxico, trimetoprima-sulfametoxazol y tetraciclina.

Perfil O: resistente a ácido nalidíxico, gentamicina y tetraciclina.

De los aislamientos estudiados, 27 cepas (49%) presentaron resistencia a un antibiótico, 15 cepas (27%) fueron resistentes a dos antimicrobianos, dos aislamientos (4%) resistentes a tres antibióticos, seis cepas (11%) a cuatro antimicrobianos y un aislamiento (2%) a seis antibióticos. Solamente cuatro cepas (7%) fueron sensibles a los 13 antimicrobianos utilizados en el estudio. El porcentaje de resistencia a cada droga se resume en la figura 3.

Figura 3: Sensibilidad por agente antimicrobiano observado en las 55 cepas aisladas de los casos de tifus aviar.



ST: estreptomicina; **CE:** cefalotina, **TET:** tetraciclina; **GEN:** gentamicina; **TMS:** trimetoprima-sulfametoxazol; **CIP:** ciprofloxacina; **FOS:** fosfomicina; **NIT:** nitrofurantoína;

AMP: ampicilina; **POL:** polimixina; **CT:** cefotaxima; **CMP:** cloranfenicol; **AN:** ácido nalidíxico.

Factores de virulencia:

Todas las cepas (100%) fueron positivas para el gen *invA* y negativas para los genes *sopE* y *pefA*. La mayoría de los aislamientos fue portador del gen *sefD* (87%) y sólo dos cepas (4%) resultaron negativas para el gen *avrA*.

- **Caracterización de cepas vacunales y control de las cinco vacunas 9R comercializadas en la República Argentina y la cepa sudafricana.**
- **Caracterización fenotípica**
- **Pruebas bioquímicas y fisiológicas:**

Se identificaron tres perfiles diferentes entre las seis cepas vacunales: el perfil 1 abarcó dos cepas (33%), el perfil 3, tres cepas (50%), el perfil 4, una cepa (17%). (tabla 6).

Tabla 6: Perfiles bioquímicos de las seis cepas vacunales analizadas en el estudio

Identificación	Arginina	Xilosa	Citrato	Perfil bioquímico
Vacuna A	-	+	-	1
Vacuna B	-	+	-	1
Vacuna C	-	+	+	3
Vacuna D	-	+	+	3
Vacuna E	-	+	+	3
Cepa Sudafricana	-	-	+	4

Control de pureza:

No se hallaron microorganismos contaminantes en ninguna de las vacunas evaluadas. El máximo recuento de colonias fue de $5,3 \times 10^{-7}$ ufc/ml y el mínimo $1,4 \times 10^{-6}$ ufc/ml. Todas las cepas vacunales fueron identificadas como *Salmonella Gallinarum*. Los resultados del control de pureza se muestran en la tabla 7

Tabla 7: Recuento de colonias e identificación de las cepas vacunales.

Vacuna	UFC/ml	Identificación por P. bioquímicas	Aglutinación por acriflavina
A	$5,3 \times 10^{-7}$	<i>S. Gallinarum</i>	Rugosa
B	5×10^{-7}	<i>S. Gallinarum</i>	Rugosa
C	$1,4 \times 10^{-6}$	<i>S. Gallinarum</i>	Rugosa
D	$3,3 \times 10^{-7}$	<i>S. Gallinarum</i>	Rugosa
E	$2,2 \times 10^{-7}$	<i>S. Gallinarum</i>	Rugosa

Prueba de inocuidad:

Los resultados de la prueba de inocuidad se muestran en las tablas 7a y 7b.

Tabla 7a: Resultados de la prueba de inocuidad de las vacunas 9R comerciales.

Pollos SPF sacrificados el día 7 PI (N=6)	Vacunas					Lote control*
	A	B	C	D	E	
Muertos	-	-	-	-	-	-
Sintomatología clínica de tifus aviar	-	-	-	-	-	-
Lesiones en el sitio de inoculación	1	-	-	5	3	-
Lesiones sistémicas	-	-	-	1	-	-

Aislamiento de <i>S. Gallinarum</i> en fase lisa “S” de hígado y vesícula	-	-	-	1	-	-
Aislamiento de <i>S. Gallinarum</i> en fase rugosa “R” de hígado y vesícula	-	-	-	-	1	-

SPF: Specific Pathogens Free **PI:** Postinoculación *inoculadas con solución fisiológica

Tabla 7b: Resultados de la prueba de inocuidad de las vacunas 9R comerciales.

Aves convencionales	Vacunas					Lote control*
	A	B	C	D	E	
Muertos antes del día 7 PI	-	-	-	5	4	-
Sintomatología clínica de tifus aviar	-	-	-	4	2	-
Lesiones en el sitio de inoculación	-	-	-	4	4	-
Lesiones sistémicas	-	-	-	5	4	-
Aislamiento de <i>S. Gallinarum</i> en fase “S” de hígado y vesícula	-	-	-	3	-	-
Aislamiento de <i>S. Gallinarum</i> en fase “R” de hígado y vesícula	-	-	-	6	5	-

PI: Postinoculación *inoculadas con solución fisiológica

Subtipificación genotípica:

Los resultados del análisis por PFGE con la enzima *XbaI* de las cepas de campo, las cepas utilizadas para la elaboración de vacunas contra el tifus aviar y los aislamientos recuperados de la prueba de inocuidad se muestran en la figura 4. De las 66 cepas analizadas, se obtuvieron 14 perfiles diferentes, con un promedio de 13 bandas cada uno, con fragmentos de ADN entre 20 Kb y 1100 Kb. Estos perfiles de PFGE fueron incorporados a la Base de Datos Nacional de Subtipos Genéticos de *Salmonella* spp. y se les asignó a cada uno un código basado en la nomenclatura de la Red PulseNet (105). Se encontraron 2 clusters o grupos principales de aislamientos que presentaron perfiles genéticos idénticos dentro de cada grupo. El cluster I abarcó 24 aislamientos de aves con tifus aviar, y el cluster II agrupó 13 aislamientos de aves con tifus aviar, las vacunas D y E y los aislamientos de las aves muertas en la prueba de inocuidad correspondientes a estas dos vacunas. Entre los perfiles de PFGE de los dos clusters existió una diferencia de cuatro fragmentos de ADN. Las vacunas A, B y C presentaron el mismo perfil genómico entre ellos, pero fueron diferentes al resto de las cepas analizadas, presentando su perfil de PFGE una banda de diferencia con respecto al patrón del cluster II. La cepa sudafricana, presentó un perfil genómico propio y fue diferente al resto de las cepas estudiadas.

Figura 5: Dendograma de *Xba*I-PFGE indicando la relación genética entre las cepas vacunales de *Salmonella Gallinarum* y los aislamientos de la prueba de inocuidad.

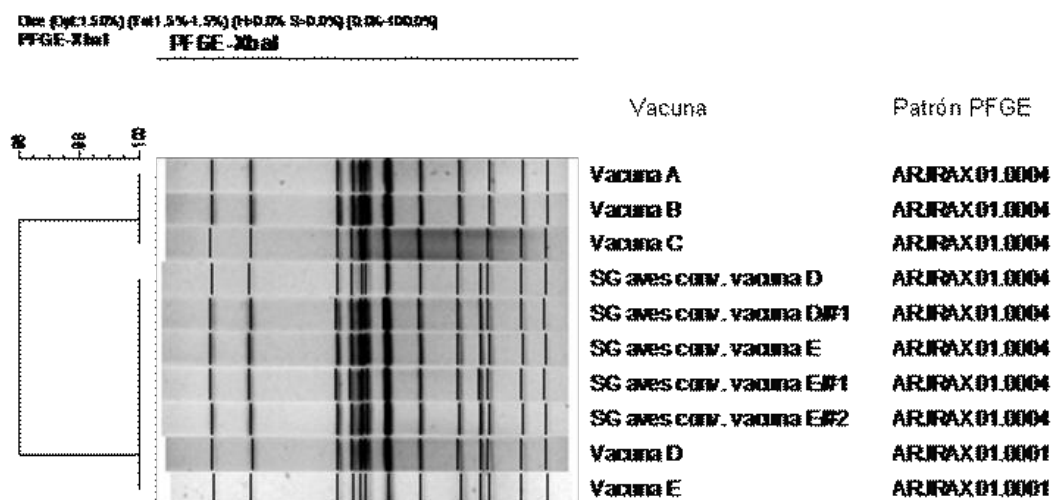
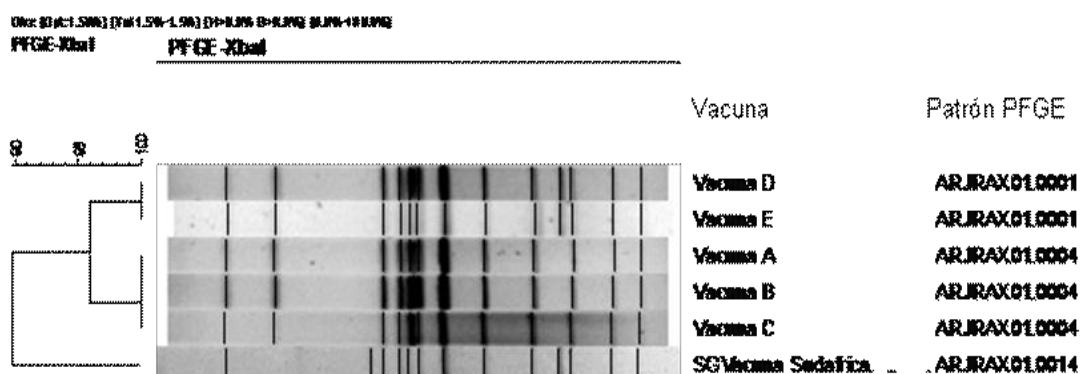


Figura 6: Dendograma de *Xba*I-PFGE indicando la relación genética entre las cepas utilizadas para la elaboración de vacunas contra el tifus aviar.



Como segunda enzima de restricción se utilizó la enzima *BlnI*, en una selección de 22 aislamientos que fueron agrupados con *XbaI*. Debido al alto costo de esta enzima, se decidió solamente utilizar este número restringido para este ensayo. Se analizaron las 5 cepas vacunales utilizadas en la República Argentina (A, B, C, D y E); la cepa sudafricana y 16 cepas de campo representativas de todos los diferentes perfiles obtenidos por *XbaI*-PFGE (figura 7). La relación entre los aislamientos, evidenciado por *BlnI*-PFGE fue la misma que la observada con la enzima *XbaI*, con la excepción de que las vacunas D y E difirieron en cuatro fragmentos del perfil genómico de las cinco cepas de campo que habían presentado el mismo perfil *XbaI*-PFGE (figura 7). Estas dos vacunas presentaron un mismo perfil de PFGE con *BlnI* entre si, con una banda de diferencia con respecto a la vacuna A, B y C, al igual que lo observado con *XbaI*.

Figura 7: Dendograma de *BlnI*-PFGE indicando la relación genética entre las cepas vacunales y las cepas de campo de *Salmonella Gallinarum*. El recuadro en color rojo indica las 5 cepas de campo relacionadas con las vacunas D y E por *XbaI* PFGE.

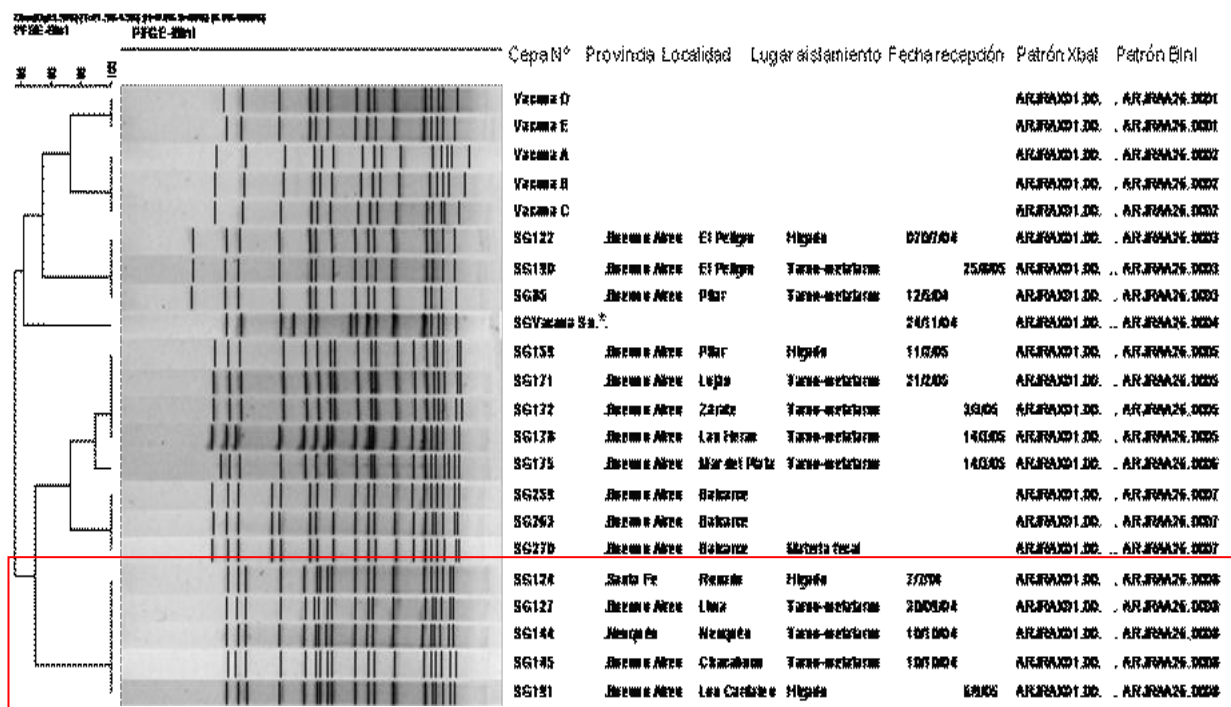


Figura 8: Dendograma de *BlnI*-PFGE indicando la relación genética entre las cepas vacunales de *Salmonella Gallinarum*.

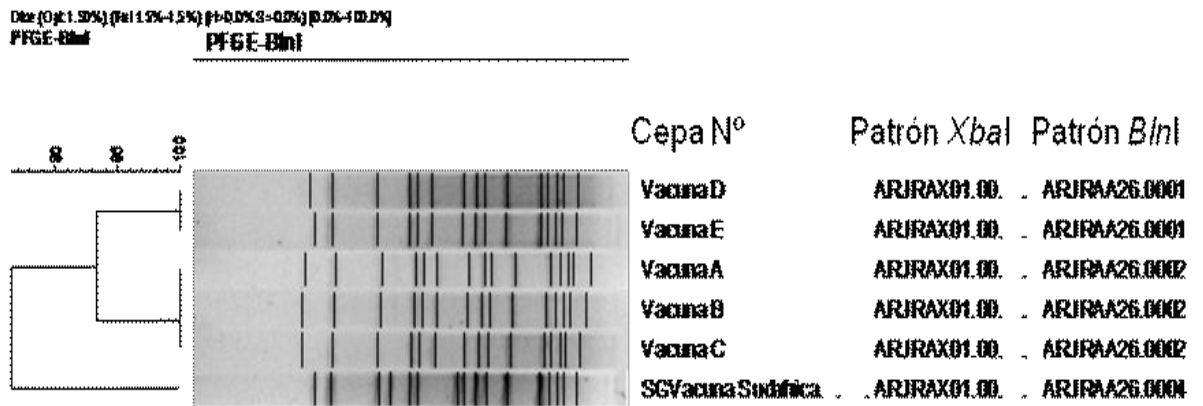


Figura 9: Dendograma indicando la relación genética entre las cepas vacunales y las cepas de campo de *Salmonella Gallinarum* con idéntico perfil obtenido por *XbaI*-PFGE comparado con el dendograma de estas mismas cepas por *BlnI*-PFGE.

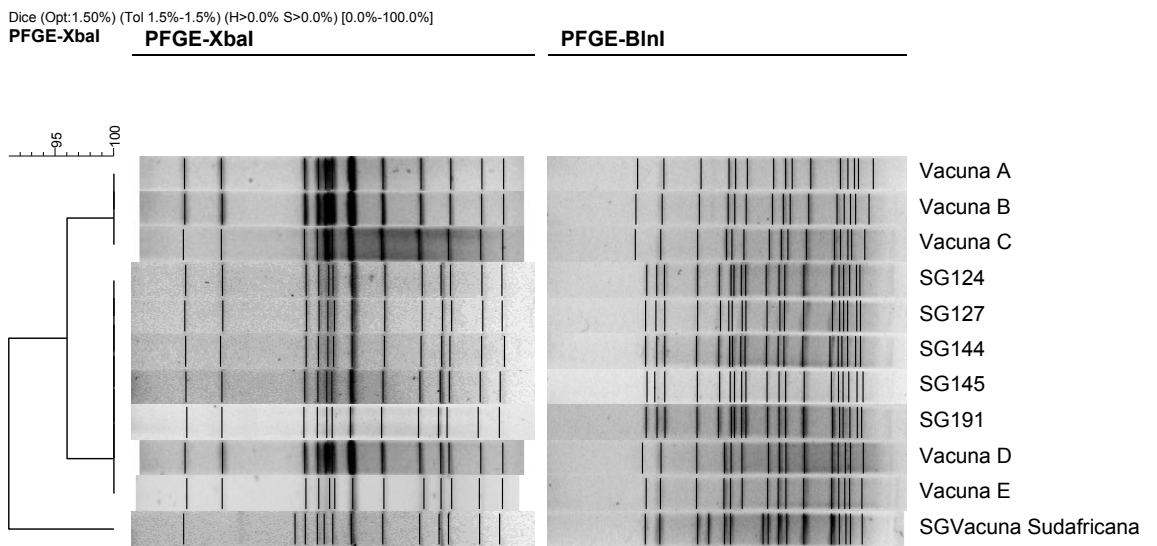


Tabla 8: Resultados del perfil bioquímico, perfil de resistencia, genes de virulencia y perfil de PFGE de todas las cepas analizadas.

Cepa N°	Perfil bioquímico	Perfil de resistencia	<i>invA</i>	<i>sefD</i>	<i>pefA</i>	<i>sopE</i>	<i>avrA</i>	Perfil de <i>Xba</i> I-PFGE
SG-1	1	A	+	+	-	-	+	AR JR AX01 0005
SG-2	1	B	+	+	-	-	+	AR JR AX01 0003
SG-3	1	C	+	+	-	-	+	AR JR AX01 0003
SG-5	1	D	+	+	-	-	+	AR JR AX01 0003
SG-6	1	E	+	+	-	-	+	AR JR AX01 00012
SG-7	2	B	+	+	-	-	+	AR JR AX01 0003
SG-8	2	E	+	+	-	-	+	AR JR AX01 0003
SG-10	2	E	+	+	-	-	+	AR JR AX01 0003
SG-13	1	E	+	+	-	-	+	AR JR AX01 0006
SG-30	2	F	+	+	-	-	+	AR JR AX01 0003
SG-31	2	F	+	+	-	-	+	AR JR AX01 0003
SG-33	2	G	+	+	-	-	+	AR JR AX01 0002
SG-39	2	E	+	+	-	-	+	AR JR AX01 0005
SG-44	1	G	+	-	-	-	+	AR JR AX01 0001
SG-45	2	E	+	+	-	-	+	AR JR AX01 0003
SG-46	2	B	+	+	-	-	+	AR JR AX01 0003
SG-47	3	G	+	-	-	-	+	AR JR AX01 0001
SG-48	2	B	+	+	-	-	+	AR JR AX01 0003
SG-49	3	G	+	-	-	-	+	AR JR AX01 0001
SG-50	2	E	+	+	-	-	+	AR JR AX01 0003
SG-51	1	H	+	+	-	-	+	AR JR AX01 0005
SG-81	2	E	+	+	-	-	+	AR JR AX01 0003
SG-85	3	I	+	+	-	-	+	AR JR AX01 00011
SG-86	4	-	+	+	-	-	+	AR JR AX01 0001
SG-88	1	B	+	+	-	-	+	AR JR AX01 00013
SG-92	2	E	+	+	-	-	+	AR JR AX01 00013

Vacuna B	1							AR JR AX01 0004
Vacuna C	3							AR JR AX01 0004
Vacuna D	3							AR JR AX01 0001
Vacuna E	3							AR JR AX01 0001
Vacuna sudafri- cana	4							AR JR AX01 00014

Discusión:

El tifus aviar, enfermedad causada por *S. Gallinarum* biotipo Pullorum ha ocasionado graves pérdidas económicas en la República Argentina. Según el informe del Plan Nacional de Sanidad Avícola (2003), las epizootias de tifus aviar que afectaron a la avicultura nacional se debieron a la importación de reproductores contaminados, a la negación de la enfermedad con fines comerciales, al indiscriminado uso de antibióticos, al retraso en implementar medidas de bioseguridad y a la utilización de vacunas ineficaces. En contraste, los esfuerzos para controlar este agente infeccioso a través de la aplicación de correctas medidas higiénicas, junto con la realización de pruebas serológicas y el subsecuente sacrificio de los reactores positivos, han llevado a la erradicación de *S. Gallinarum* en muchos países desarrollados (106).

Uno de los objetivos del presente trabajo fue evaluar las características y diversidad genética de las cepas vacunales 9R de *S. Gallinarum* que se utilizan en nuestro país y compararlas con aislamientos autóctonos de casos clínicos de tifus aviar aplicando la tipificación genotípica por electroforesis en campo pulsado. También, se propuso caracterizar los aislamientos de aves con tifus aviar, incluyendo la determinación de perfiles de resistencia a antimicrobianos.

Caracterización de aislamientos de *S. Gallinarum* circulantes en Argentina

Para la vigilancia de infecciones causadas por miembros del género *Salmonella*, es un requisito indispensable la aplicación de técnicas de tipificación que permitan diferenciar aislamientos inter- e intra-serovariedad (107, 108). Una de las técnicas de tipificación fenotípica utilizada en este estudio fue la biotipificación. El poder discriminatorio de esta técnica es relativamente bajo comparado con los métodos basados en el ADN o tipificación genotípica (16). Sin embargo, la clasificación en biotipos continua aplicándose y ha permitido evidenciar diversidad entre aislamientos de *S. Gallinarum*, como en el estudio de Mgedela *et al.* realizado en África, donde se agrupó a aislamientos de *S. Gallinarum* en 4 tipos sobre la base de la utilización del citrato y la fermentación de la rhamnosa (109). En un trabajo realizado en Corea sobre 258 aislamientos de *S. Gallinarum* se observaron variaciones en la fermentación de sorbitol (59%) y en la hidrólisis de arginina (27%) (110), mientras que otra investigación realizada en India sobre 92 cepas mostró que el 40% de los aislamientos decarboxiló ornitina y el 89% fermentó la rhamnosa (111). Por otra parte, Christensen y col. estudiaron 43 cepas aisladas en diferentes regiones de Europa, África y Estados Unidos, observando diferencias en la hidrólisis de arginina (21%), utilización de citrato (79%) y fermentación de xilosa (70%) (29). En el presente estudio las características que mostraron diferencias entre los aislamientos analizados fueron la utilización de citrato (14,5%),

fermentación de xilosa (45%) e hidrólisis de arginina (16%). Las restantes pruebas realizadas estuvieron en concordancia con las características bioquímicas tradicionales de *S. Gallinarum* (tabla 1). Se encontraron 7 perfiles bioquímicos diferentes, aunque la mayoría de los aislamientos (72%) pertenecieron a los perfiles 1 y 2, que sólo se diferenciaron por la fermentación de xilosa, lo que sugiere que existió poca diversidad en los aislamientos circulantes en la República Argentina entre los años 2003-2005. No se observó relación entre la distribución de los biotipos identificados y el origen geográfico o el momento de aislamiento de las cepas estudiadas. Analizando los resultados de los diferentes estudios de biotipificación realizados sobre *S. Gallinarum*, se concluye que hay variaciones en las pruebas bioquímicas que resultaron informativas para diferenciación entre aislamientos como citrato, arginina, ornitina, producción de ácido sulfídrico en TSI, dulcitol, xilosa, rhamnosa, maltosa, sorbitol y trehalosa. Esto podría deberse a diferencias entre los aislamientos encontrados en distintas regiones pero también podría estar asociado a limitaciones inherentes a este método fenotípico, por diferencias en la calidad de los medios de cultivo o las condiciones utilizadas en los ensayos, que dificultan la comparación inter-laboratorio. De acuerdo a nuestros resultados, esta técnica fue la que tuvo el menor poder de discriminación de los métodos utilizados para subtipificación.

Otra prueba fenotípica incluida en el estudio fue la evaluación de sensibilidad a agentes antimicrobianos por la prueba de difusión en agar. Los resultados obtenidos son muy relevantes para la prevención y control de *S. Gallinarum* en el país, ya que no existían hasta ahora informes sobre la resistencia a antimicrobianos en aislamientos de Argentina, a pesar del amplio uso de estos agentes en aves. Por otra parte, la presencia y selección de aislamientos de *S. Gallinarum* resistentes a antimicrobianos en el ambiente de la producción aviar tiene impacto más allá del aumento en la incidencia y diseminación de cepas no

susceptibles al tratamiento dentro de esta especie. Esto se debe a que en el tracto intestinal, donde la diversidad bacteriana es muy alta, *Salmonella* puede mediar la transferencia horizontal de determinantes de resistencia a la microbiota normal. Estos microorganismos pueden actuar como patógenos oportunistas para las aves y también para el hombre y propagar a su vez la resistencia a otros patógenos que interaccionen con ellos. Los resultados de las pruebas de sensibilidad a agentes antimicrobianos demostraron que existe una alta resistencia antimicrobiana en los aislamientos de *S. Gallinarum* analizados, ya que solamente 4 cepas (7 %) fueron sensibles a todos los antibióticos utilizados en el estudio. La mayoría de los aislamientos fueron resistentes a 1 o 2 antimicrobianos y un aislamiento fue resistente a 6 antibióticos. Este resultado demuestra que hay una fuerte presión de selección probablemente asociada al uso indebido y el abuso en la utilización de antimicrobianos en las granjas de producción avícola de la República Argentina. El porcentaje más elevado de resistencia fue encontrado para el ácido nalidíxico, antimicrobiano que actúa sobre la girasa A, al igual que la enrofloxacin. Esta última droga es una quinolona utilizada intensivamente en la producción avícola, lo que explicaría la elevada resistencia de las cepas de *S. Gallinarum* al ácido nalidíxico. Asimismo, la susceptibilidad reducida a la ciprofloxacina, también se explicaría por actuar a través del mismo mecanismo. También se encontró una alta resistencia a la estreptomicina, un aminoglucósido utilizado usualmente en medicina veterinaria. Existió una baja resistencia a tetraciclina, gentamicina y trimetoprima-sulfametoxazol; estas dos últimas drogas son antimicrobianas que están recomendadas para ser utilizadas en brotes de tifo aviar, y considerando estos resultados sigue siendo útil su indicación para estos cuadros en la República Argentina. No se encontraron aislamientos resistentes a fosfomicina, a pesar de ser un antimicrobiano ampliamente utilizado en la avicultura. Para los antibióticos que no son utilizados rutinariamente en la avicultura en el país (cefalotina, cefotaxima, cloranfenicol,

nitrofuranos), las cepas no presentaron resistencia. Comparando los resultados de la resistencia antimicrobiana hallados en los aislamientos de *S. Gallinarum* de la República Argentina, se observan coincidencias con dos estudios realizados en un período de tiempo cercano desarrollados en Corea e India. En el primer estudio, obtuvieron una alta resistencia a las quinolonas norfloxacin y ofloxacin, una muy baja resistencia a los beta-lactámicos y un porcentaje mayor de resistencia para gentamicina y tetraciclina, mientras que todas las cepas fueron sensibles a trimetoprima-sulfametoxazol (110). En la investigación realizada en la India, se observó alta resistencia al ácido nalidíxico, aunque los aislamientos presentaron además un porcentaje mayor de resistencia para gentamicina y tetraciclina que en la República Argentina. También se encontró un muy bajo porcentaje de cepas resistentes al cloranfenicol, y 26% de aislamientos resistentes a los nitrofuranos (111), mientras que, en nuestro estudio las cepas fueron sensibles a este antimicrobiano. Esta diferencia se puede atribuir a que los nitrofuranos no son utilizados en la República Argentina, debido a que esta droga fue prohibida en el país a partir del año 1995. En nuestro país, a partir del año 2009, se ha detectado la resistencia emergente al ácido nalidíxico en cepas de *Salmonella* spp. aisladas de infecciones humanas (112).

El tratamiento del tifus aviar con drogas antibióticas debería ser la última opción, ya que se debe intentar la erradicación de la enfermedad mediante el correcto manejo de las aves, la administración de flora competitiva y la vacunación. Ninguna droga o combinación de drogas es capaz de eliminar la infección de los lotes tratados y debe considerarse que el tratamiento de las aves causa la selección de aislamientos resistentes a las drogas empleadas, como fue demostrado por los resultados obtenidos en este estudio.

El género *Salmonella* causa diferentes enfermedades en los humanos y los animales, pero los mecanismos y factores de virulencia responsables de la inducción de gastroenteritis e

infecciones sistemáticas son complejos y todavía pobremente entendidos. Además, las diferentes subespecies y serovares difieren en la presentación clínica de los cuadros observados en humanos y en animales. Más allá de estas diferencias, algunos mecanismos de virulencia se encuentran ampliamente distribuidos dentro del género, como el sistema de secreción de proteínas tipo III (TTSS) involucrado en la etapa temprana en la infección por *Salmonella* spp. Este sistema contribuye a la patogénesis, ya que dirige la secreción y la translocación de varias proteínas asociadas a la virulencia (proteínas efectoras) directamente dentro del citoplasma de las células hospedadoras. Una clase de proteínas efectoras son las denominadas proteínas de membrana externa de *Salmonella* o “*Salmonella* outer membrane protein” (sop). Estas proteínas están codificadas en los genes *sop* y varios polimorfismos de los mismos han sido identificados (*sopA-E*) (113). El gen *sopE* está localizado por fuera de la Isla de Patogenicidad de *Salmonella* tipo I (IPS-I) y es codificado por un fago temperado. La proteína *sopE*, fue inicialmente identificada en *Salmonella* Dublin, pero fueron escasos los estudios para determinar la prevalencia de este gen entre las serovariedades de *Salmonella*. En un trabajo llevado a cabo por Rahman *et al.*, 11 serovariedades de *Salmonella* fueron analizadas con el objetivo de determinar la presencia del gen *sopE* (114). En dicho estudio, detectaron que 7 (100%) cepas de *S. Gallinarum* contenían este gen de virulencia, lo cual contrasta con los resultados obtenidos en este estudio, en el cual no se detectó este factor de virulencia en ningún aislamiento. Esto podría deberse a que existen diferentes alelos del gen *sopE* y los cebadores de la PCR utilizados en los dos ensayos no fueron los mismos.

Uno de los primeros pasos en el ciclo patogénico de *Salmonella* spp. es la invasión de las células del epitelio intestinal. El proceso involucra la interacción de determinantes localizados en la superficie de la bacteria con la célula hospedadora, disparando un mecanismo que se parece al proceso de la fagocitosis. Las microvellosidades del epitelio

sufren dramáticos cambios después que *Salmonella* spp. llega a tener contacto con el ribete en cepillo de la célula epitelial. Estos cambios, localizados en el punto de contacto con la bacteria, son transitorios, y luego de la internalización del microorganismo, las microvellosidades recuperan la arquitectura normal. Las bases moleculares de este fenómeno, que lo produce solamente el género *Salmonella*, están dados por 4 genes denominados: *invA*, *B*, *C* y *D* y se encuentran presentes y son funcionales en todos los serovares (115). En este estudio, todas las cepas de *S. Gallinarum* aisladas de casos de tifus aviar presentaron el gen *invA* tal cual era lo esperado, ya que se trata de una secuencia muy conservada entre los aislamientos de *Salmonella* spp. (101).

Algunas proteínas efectoras secretadas por organismos procariotes evolucionaron con la finalidad de modular las funciones celulares de los hospedadores eucariotas específicos. Generalmente, estas proteínas son consideradas factores de virulencia que facilitan el parasitismo. La proteína *avrA* de *Salmonella* Typhimurium, es una molécula efectora que inhibe la activación del factor de transcripción proinflamatorio NF- κ B y aumenta la apoptosis en células epiteliales humanas. La proteína *avrA* puede limitar la virulencia en vertebrados, de una manera análoga como los factores de avirulencia en plantas, y debido a esto, este es el primer efector bacteriano de un patógeno para mamíferos en el que se ha propuesto dicha función (116). En este estudio, prácticamente todas las cepas analizadas presentaron el gen *avrA*. Según la bibliografía consultada, este es el primer trabajo en que se estudió y se encontró este gen en aislamientos de *S. Gallinarum*, serovariedad que al igual que *S. Typhimurium* en diferentes especies y *S. Typhi* en humanos, también es capaz de causar cuadros extra-intestinales y por lo tanto, tendría una ventaja para la supervivencia a nivel sistémico, asociada a la presencia de *avrA*.

El locus *pef* (fimbria codificada en un plásmido), contiene 4 genes denominados *pefBACDI*. En *Escherichia coli* y *S. Typhimurium*, los genes *pef* son transportados en un plásmido y producen la formación de estructuras filamentosas en la superficie celular. Ensayos *in vivo*, demostraron que los genes *pef* son expresados por *S. Enteritidis* y *Typhimurium*. Bäumler demostró que *pef* media la adhesión al intestino delgado de ratón y que son necesarios, pero no suficientes, para inducir una secreción fluida en el modelo murino (92). El operón *pef* se encuentra presente en un número muy reducido de serovariedades del género *Salmonella* (93). Ninguna de las cepas estudiadas en este trabajo presentó el gen *pefA*, por lo tanto se concluye que *S. Gallinarum* no contiene este gen de virulencia.

Las fimbrias cumplen un rol crítico en la virulencia ya que le permiten a las bacterias interactuar con las células hospedadoras y con otros sustratos sólidos (117). La distribución de los operones fimbriales entre las bacterias entéricas sugiere que las fimbrias cumplen un rol en la patogénesis, los operones fimbriales que se encuentran distribuidos ampliamente pueden proveer funciones adhesivas en general, pero aquellos cuya distribución es limitada, pueden proveer funciones específicas que se requieren en la virulencia. En todos los sistemas fimbriales que fueron estudiados, los genes que codifican las proteínas chaperonas e introductorias están localizadas en el mismo operón que las subunidad mayor. El operón *sef* está localizado en una pequeña isla de patogenicidad (118). El operón contiene 4 genes estructurales (*sefABCD*) requeridos para la translocación y biogénesis de las fimbrias. El *sefA* codifica la subunidad mayor, *sefB* codifica la proteína chaperona, *sefC* la proteína introductoria y el *sefD* codifica una adhesina putativa. La translocación del *sefD* es un prerrequisito para la exportación del *sefA* a lo largo de la membrana externa. La proteína *sefD* se une a un receptor de superficie del macrófago y altera la fagocitosis dentro de la célula de modo tal que la bacteria puede sobrevivir en el medioambiente intracelular. Esta es la primera

fimbria del género *Salmonella* que ha sido demostrada que tiene un rol esencial en la interacción con los macrófagos. Todas las otras fimbrias involucradas en la virulencia están comprometidas en la unión a la superficie epitelial (118). De acuerdo a los resultados obtenidos en este estudio, la mayoría de los aislamientos de *S. Gallinarum* contienen el gen *sefD*, las cepas negativas no lo tendrían o podrían contenerlo con variaciones en las secuencias nucleotídicas, responsables de la ausencia de amplificación por PCR con los cebadores utilizados en el ensayo.

Los genes fimbriales *pef* y *sef* fueron adquiridos recientemente por el género *Salmonella*, ya que fueron encontrados solamente en ciertas cepas relacionadas filogenéticamente (119). Cada adquisición puede haber ocurrido en un evento independiente de transferencia horizontal, como indicó el contenido de G + C de *pef* y *sef* (este tiene un contenido de 35,2% y *pef* de 52%). Los loci *sef* y *pef* comparten un alto grado de homología y una organización similar. La adquisición de estos tipos relacionados de fimbria pueden haberle permitido a *Salmonella* adaptarse a diferentes situaciones de colonización. La adquisición de diferentes operones fimbriales puede haber sido uno de los mecanismos por los cuales los serovares de *Salmonella* fueron capaces de expandir su rango de hospedadores para incluir muchos animales domésticos (93). El proceso de adaptación también puede haber involucrado la selección de mutantes que hayan perdido algunos determinantes de virulencia.

Las conclusiones de este estudio y de otros realizados sobre *S. Gallinarum* fueron que los mecanismos de virulencia de este microorganismo pueden ser diferentes de otros serovares que fueron estudiados ampliamente tales como Typhimurium y Typhi. Sin embargo, nuestro conocimiento sobre el preciso rol de los factores de virulencia y sus implicancias en establecer o mantener la infección de este patógeno es relativamente escaso (120). Por lo tanto, es importante continuar estudiando este tema, para poder dilucidar las

bases moleculares de la virulencia de *S. Gallinarum* en relación a las interacciones tempranas patógeno-hospedador que puedan influenciar en el éxito de la infección en las aves.

Caracterización de cepas vacunales de *S. Gallinarum*

La vacuna atenuada, cepa 9R, desarrollada por Smith (121) fue ampliamente utilizada en la avicultura. La vacunación con la cepa 9R produce una infección sistémica suave en las aves. Esto induce una respuesta de tipo celular y humoral, produciéndose el pico inmediatamente después de la eliminación de la bacteria del hígado y del bazo. La respuesta de anticuerpos es inicialmente de Ig M seguida de Ig G en una clásica respuesta primaria. El papel de la inmunidad humoral y celular no está aún bien estudiada, aunque se cree que *S. Gallinarum* sobrevive y se multiplica dentro de los macrófagos (12, 22) y parecería ser más probable que la respuesta celular mediada por los linfocitos T helper (Th1) tiene un rol importante en la eliminación de la bacteria. Más estudios se necesitan para determinar la función relativa de la respuesta celular y humoral en la protección de la vacuna 9R en las aves (23).

Con respecto a los resultados de las pruebas de inocuidad de las vacunas comercializadas en la República Argentina contra el tifus aviar, las vacunas A, B y C se encontraron en fase rugosa y, por lo tanto, no causaron mortalidad en el ensayo de inocuidad al desafiarse pollitos tanto SPF como convencionales. Por el contrario, las vacunas D y E causaron la mortalidad del 33% y 26% de los pollitos convencionales inoculados con estas vacunas respectivamente. En el caso de la vacuna D, se aislaron colonias de *S. Gallinarum* en fase lisa (S) del hígado y la vesícula biliar de pollitos inoculados. En la vacuna E también se aislaron del hígado y la vesícula biliar de pollitos inoculados con esta vacuna, pero en este caso sólo se recuperaron *in vitro* aislamientos en fase rugosa (R). Debido a que esta vacuna

también causó mortalidad en las aves inoculadas, se estima que probablemente la cepa se encontraba en fase R-S (una fase intermedia entre la fase rugosa y lisa, que presenta poder patógeno). Teniendo en cuenta estos resultados, se demostró que las vacunas D y E no presentaron las características descritas por Smith para las cepas vacunales 9R (121) y no cumplieron con los parámetros que tiene en cuenta la OIE (103). El análisis fenotípico realizado mediante pruebas bioquímicas de las seis cepas vacunales utilizadas en el estudio demostró que hubo una gran heterogeneidad entre ellas, ya que se encontraron 4 perfiles bioquímicos diferentes.

El análisis genotípico realizado por PFGE demostró diversidad entre las cepas vacunales estudiadas. Las cepas vacunales A, B y C mostraron un mismo perfil de PFGE y la cepa Sudafricana tuvo un perfil único que no compartió con ninguna otra cepa vacunal ni con cepas de campo. Las cepas vacunales D y E que produjeron mortandad en la prueba de inocuidad en pollitos, presentaron un mismo perfil fenotípico por pruebas bioquímicas y un mismo perfil genómico con las dos enzimas de restricción utilizadas en la electroforesis en campo pulsado. Las vacunas D y E tuvieron el mismo perfil bioquímico que la vacuna C y presentaron diferente perfil que el resto de las cepas vacunales analizadas. Por PFGE, las vacunas D y E presentaron un mismo perfil genómico pero fueron diferentes del resto de las cepas vacunales estudiadas. Por otra parte, las vacunas D y E presentaron el mismo perfil genómico con la enzima de restricción *XbaI* que 13 aislamientos de *S. Gallinarum* de aves muertas por tifus aviar y que las cepas recuperadas de aves muertas luego de la inoculación con estas dos vacunas en el ensayo de inocuidad. Este resultado sugiere que estas dos vacunas podrían haber sido la causa de los brotes de tifus aviar en los establecimientos avícolas que inmunizaron los animales con estos productos. Al utilizar la segunda enzima de restricción *BlnI*, las vacunas D y E mostraron un mismo perfil entre ellas, confirmando la relación

genética evidenciada con *XbaI*. Sorpresivamente, cinco aislamientos seleccionados para PFGE con *BlnI* entre los 13 de aves con tifus aviar que compartieron el mismo perfil *XbaI*-PFGE que las cepas vacunales D y E, presentaron un mismo perfil entre ellos con la segunda enzima, pero dicho perfil electroforético fue diferente en 4 bandas al presentado por las vacunas D y E. Una posible explicación para este resultado podría ser que las cepas vacunales habrían sufrido mutaciones u otros cambios genéticos durante su diseminación entre las aves. Este tipo de cambios durante la transmisión de un patógeno se ha observado en miembros de la familia *Enterobacteraceae*, como *Shigella sonnei* (122). Otra posibilidad para explicar este hallazgo podría ser que los brotes de tifus aviar hubiesen sido causados por otra cepa, derivada de una fuente distinta a las formulaciones vacunales D y E, aunque la alta similitud observada por *XbaI* PFGE y los resultados de las pruebas de inocuidad respaldan la primera hipótesis. Para valorar con mayor precisión la relación observada con la enzima *XbaI* y las diferencias encontradas con *BlnI*, deberían compararse las vacunas y las cepas de casos de tifus aviar con un número mayor de aislamientos anteriores y posteriores a los años 2003-2005 que fue el período que abarcó este estudio. Lamentablemente, esto no es posible de realizar en nuestro país ya que no hay disponibles aislamientos conservados de estos períodos de tiempo. Mediante estudios epidemiológicos continuos y la implementación de técnicas de epidemiología molecular, se podría monitorear y controlar uno de los factores de riesgo del tifus aviar como es la utilización de vacunas no aptas.

Diversidad genética

La técnica del Pulsed-Field Gel Electrophoresis (PFGE), se basa en la utilización de enzimas de restricción de corte poco frecuente y por lo tanto, genera grandes fragmentos del genoma completo de la bacteria que son separados en la electroforesis en un gel de agarosa, resultando en perfiles que son altamente específicos para los aislamientos (123, 124, 125).

Tenover propuso un sistema de estandarización para la interpretación de los perfiles de PFGE para determinar la relación entre cepas. En su esquema, los aislamientos bacterianos que presentan el mismo perfil en la PFGE son considerados la misma cepa. Los aislamientos que difieren por un único evento genético, reflejado como una diferencia de uno a tres bandas, están estrechamente relacionados. Los aislamientos que difieren por 4 a 6 bandas, representan 2 cambios genéticos independientes, están posiblemente relacionados. Los aislamientos que contienen 6 o más bandas de diferencia, representan 3 o más cambios genéticos, son considerados no relacionados (126). La técnica de PFGE ha sido poco utilizada para subtipificar los aislamientos de *Salmonella Gallinarum*; de acuerdo a la bibliografía consultada, solamente se realizaron 5 trabajos. En uno de ellos, se obtuvieron 2 perfiles diferentes con la enzima *XbaI*, separados por solamente dos fragmentos: un grupo comprendió aislamientos realizados en Dinamarca (14 cepas de un brote de tifus aviar) y el otro, aislamientos de Alemania (5 cepas aisladas en diferentes años) (29). Los aislamientos de Alemania mostraron que el mismo clon causó tifus aviar en este país en los años 1988, 1989, 1990 y 1992. Además, en ese estudio se utilizó la ribotipificación con 3 enzimas diferentes, pero no se observaron diferencias entre los aislamientos daneses y alemanes. El mismo resultado fue obtenido con la técnica del perfil plasmídico. Una de las conclusiones de la investigación fue que la PFGE fue el único método de subtipificación utilizado en la investigación que pudo discriminar entre las cepas de los dos países. Un estudio realizado en Corea, en donde se examinaron 36 aislamientos obtenidos en 29 regiones desde 1992 al 2001, incluyó además la cepa de la vacuna 9R. El PFGE produjo 12 perfiles diferentes con *XbaI*. La cepa vacunal 9R fue diferente a las cepas aisladas de aves con tifus aviar. Como conclusión, determinaron que una baja heterogeneidad genética fue observada en ese estudio (127). Una investigación realizada por Olsen y col. utilizó 3 métodos genotípicos para caracterizar 24

aislamientos de *S. Gallinarum* obtenidos en diferentes años y en distintos países y continentes (128). Llegaron a las siguientes conclusiones: los aislamientos de *S. Gallinarum* están estrechamente relacionados y han compartido mucho de su evolución con otro importante serotipo asociado a aves como es Enteritidis. Utilizando la técnica de IS200 encontraron 2 perfiles; por ribotipificación con la enzima *SmaI* obtuvieron un único perfil y PFGE con la enzima *NotI* generó 13 perfiles diferentes. En el año 2009, 68 aislamientos de *S. Gallinarum* aislados en el periodo 2001 al 2007 en cinco provincias de Corea y una cepa vacunal 9R fueron estudiados por PFGE utilizando la enzima *XbaI*. Obtuvieron 7 perfiles diferentes, los aislamientos pertenecientes a un mismo grupo no mostraron una clara relación geográfica o de crianza. Una de las conclusiones del trabajo fue que se observó una baja heterogeneidad fenotípica y genotípica entre los aislamientos de *S. Gallinarum* de casos clínicos de tifus aviar de Corea y la vacuna viva 9R (129). Recientemente, fue realizado un trabajo en donde se comparó la metodología de PFGE con la técnica denominada multilocus variable-number of tandem-repeats analysis (MLVA). Este último método, ha surgido recientemente y es sumamente efectivo para la genotipificación de muchas bacterias patógenas, demostrando un alto poder de discriminación y robustez. La PFGE fue realizada con 3 enzimas de restricción: *XbaI*, *SpeI* y *NotI*. Entre las conclusiones del estudio, establecieron que MLVA tiene un alto poder de discriminación equivalente a la PFGE. No observaron un incremento en la resolución de la PFGE realizando la combinación de las 3 enzimas. De los 50 aislamientos identificaron 18 perfiles diferentes combinando las 3 enzimas (130).

En nuestro estudio también se observó baja heterogeneidad entre los aislamientos de *S. Gallinarum*, con 14 perfiles diferentes por *XbaI*-PFGE y *BlnI*-PFGE que incluyeron fragmentos de ADN entre 20,5 kb y 1100 kb y fueron incorporados a la Base de Datos Nacional de Subtipos Genéticos de *Salmonella* spp. Lamentablemente, los resultados

obtenidos en este estudio y los 5 mencionados anteriormente que utilizaron PFGE no se pueden comparar entre ellos ya que los protocolos de las técnicas utilizadas fueron diferentes. En este estudio se aplicó protocolo de la Red Internacional PulseNet, con el fin de mejorar esta condición, mediante el uso de un protocolo estandarizado y reconocido internacionalmente (105).

Salmonella Enteritidis es una serovariedad muy clonal (131), teniendo en cuenta que *S. Gallinarum* deriva de un ancestro común con este serovar y de acuerdo a los resultados de este y otros trabajos utilizando la técnica de PFGE, se concluye que *S. Gallinarum* podría tener esta misma característica, con baja heterogeneidad entre aislamientos.

El presente estudio es el primero en proveer información de la genotipificación de *Salmonella* Gallinarum en la República Argentina. El PFGE descrito en este trabajo proveerá de una herramienta epidemiológica útil para monitorear y poder comparar futuros brotes de tifus aviar.

Comparando los resultados de las 3 técnicas de subtipificación empleadas, la biotipificación resultó ser la de menor poder de discriminación, como se ha descrito antes junto a su baja reproducibilidad (132). Sin embargo, la biotificación es una técnica de gran utilidad, ya que permite determinar el biotipo Gallinarum sin tener que recurrir a la técnica de serotipificación que solamente se realiza en laboratorios de referencia. El perfil de susceptibilidad y el PFGE tuvieron un poder de discriminación muy similar entre ellos.

En muchos casos, los perfiles de susceptibilidad son relativamente estables y se correlacionan bien con los resultados de otros sistemas de tipificación. Sin embargo, la presión de selección y la codificación plasmídica de algunos determinantes puede causar que las bacterias ganen o pierdan determinadas resistencias rápidamente. En esta circunstancia, la

susceptibilidad es una característica inestable y, por lo tanto, no es aplicable como método de subtipificación (132). En concordancia con este postulado, no se observó correlación entre el agrupamiento por perfiles de resistencia y aquel basado en la relación clonal demostrada por PFGE. El PFGE ha comprobado ser superior a muchos otros métodos de subtipificación bioquímica y molecular para su aplicación como herramienta de epidemiología molecular (108).

Los resultados obtenidos con diferentes sistemas de tipificación no siempre se correlacionan completamente, ya que sistemas diferentes evalúan características diferentes (132). Los resultados de los tres sistemas de tipificación llevados a cabo en este trabajo no fueron concordantes completamente, pero resultaron complementarios para lograr una amplia caracterización de los aislamientos de *S. Gallinarum* circulantes en el país, demostrar sus características fenotípicas, de resistencia a antimicrobianos y diversidad genética, incluyendo la relación con cepas vacunales.

Conclusiones:

- Se determinó la diversidad bioquímica de las cepas vacunales y de aislamientos de campo de *S. Gallinarum* de la República Argentina.
- Se detectó un alto número de aislamientos resistentes a diferentes antimicrobianos ampliamente utilizados para el tratamiento de tifus aviar.
- Se investigó por primera vez la presencia de cinco genes de virulencia en aislamientos de *S. Gallinarum* de casos de tifus aviar.
- Se encontró el gen *avrA* en aislamientos de *S. Gallinarum*, cuya presencia no fue investigada anteriormente en esta serovariedad.

- Se demostró falta de inocuidad en dos formulaciones vacunales de *S. Gallinarum* comercializadas en Argentina.
- Se determinó la diversidad genética de las cepas vacunales 9R analizadas y su relación con aislamientos de campo circulantes en la República Argentina.
- Se propuso un protocolo estandarizado a nivel internacional para la técnica de electroforesis en campo pulsado (PFGE) para ser aplicado en el estudio de aislamientos de *S. Gallinarum* de cualquier región del mundo, para que de este modo puedan ser comparables los resultados de las investigaciones.

Bibliografía:

- 1- Klein E. Über eine epidemische Krankheit der Hühner, verursacht durch einer Bacillus-Bacillus gallinarum. Zentralbl Bakteriol Parasitenkd Abt I Orig. 1889; 5:689-693.
- 2- Plan Nacional de Sanidad Avícola. Dirección de Luchas Sanitarias, Dirección Nacional de Sanidad Animal, Servicio Nacional de Sanidad y Calidad Agroalimentaria. Secretaría de Agricultura, Ganadería, Pesca y Alimentos. 2003.
- 3- Komarov A. Fowl typhoid in baby chicks. Vet Rec. 1932; 12:1455-1457.
- 4- Evans WM, Bruner DW, Peckham MC. Blindness in chicks associated with salmonellosis. Cornell Vet. 1955; 45:239-247.
- 5- Hall WJ, Legenhausen DH, McDonald AD. Studies on fowl typhoid. 1: Nature and dissemination. Poult Sci. 1949; 28:344-362.
- 6- Shivaprasad HL. Fowl typhoid and pullorum disease. Rev sci tech Off Int Epiz. 2000; 19:405-424.
- 7- Ferguson AE, Connell MC, Truscott B. Isolation of *Salmonella* Pullorum from the joints of broiler chicks. Can Vet J. 1961; 2:143-145.

- 8- Johnson DC, David M, Goldsmith S. Epizootiological investigation of an outbreak of pullorum disease in an integrated broiler operation. *Avian Dis.* 1992; 36:770-775.
- 9- Christensen JP, Barrow PA, Olsen JE, Poulsen JS, Bisgaard M. Correlation between viable counts of *Salmonella Gallinarum* in spleen and liver and the development of anaemia in chickens as seen in experimental fowl typhoid. *Avian Pathol.* 1996; 25:769-783.
- 10- Erbeck DH, McLaughling BG, Singh SN. Pullorum disease with unusual signs in two backyard chicken flocks. *Avian Dis.* 1993; 37:895-897.
- 11- Gauger HC. A chronic carrier of fowl typhoid with testicular localization. *J Am Vet Med Assoc.* 1934; 84:807-811.
- 12- Barrow PA, Huggings MB, Lovell MA. Host specificity of *Salmonella* infection in chickens and mice is expressed *in vivo* primarily at the level of the reticuloendothelial system. *Infect Immun.* 1994; 62:4602-4610.
- 13- Pascopella L, Raupach B, Ghori N, Monack D, Falkow S, Small PL. Host restriction phenotypes of *Salmonella Typhi* and *Salmonella Gallinarum*. *Infect Immun.* 1995; 63:4329-4335.
- 14- Bumstead N, Barrow PA. Genetics of resistance to *Salmonella Typhimurium* in newly hatched chicks. *Br Poul Sci.* 1988; 29:521-529.

- 15- Barrow PA, Berchieri A Jr., Al-Haddad O. Serological response of chickens to infection with *Salmonella* Gallinarum-S. Pullorum detected by enzyme-linked immunosorbent assay. *Avian Dis.* 1992; 36:227-236.
- 16- Christensen JP, Olsen JE, Hansen HC, Bisgaard M. Characterization of *Salmonella enterica* serovar Gallinarum biovars Gallinarum and Pullorum by plasmid profiling and biochemical analysis. *Avian Pathol.* 1992; 21:461-470.
- 17- Altmeyer RM, McNem JK, Bossio JC, Rosenshine I, Finlay BB, Galan JE. Cloning and molecular characterization of a gene involved in *Salmonella* adherence and invasion of cultured epithelial cells. *Molec Microbiol.* 1993; 7:89-98.
- 18- Ou JT, Lin MY, Chao HL. Presence of F-like OriT base-pair sequence on the virulence plasmids of *Salmonella* serovars Gallinarum, Enteritidis and Typhimurium, but absent in those of Cholerasuis and Dublin. *Microb Pathogen.* 1994; 17:13-21.
- 19- Rychlik I, Lovell MA, Barrow PA. The presence of genes homologous to the K88 genes faeH and faeI on the virulence plasmid of *S. Gallinarum*. *FEMS Microbiol Lett.* 1998; 159:255-260.
- 20- Dodson SV, Maurer JJ, Holt PS, Lee MD. Temporal changes in the population genetics of *Salmonella* Pullorum. *Avian Dis.* 1999; 43:685-695.

- 21- Wigley P, Hulme S, Rothwell L, Bumstead N, Kaiser P, Barrow P. Macrophages isolated from chickens genetically resistant or susceptible to systemic Salmonellosis show magnitudinal and temporal differential expression of cytokines and chemokines following *Salmonella enterica* challenge. *Infect Immun.* 2006; 74:1425-1430.
- 22- Jones MA, Wigley P, Page KL, Hulme SD, Barrow PA. *Salmonella enterica* serovar Gallinarum requires the *Salmonella* pathogenicity island 2 type III secretion system but not the *Salmonella* pathogenicity island 1 type III secretion system for virulence in chickens. *Infect Immun.* 2001; 69:5471-5476.
- 23- Wigley P, Hulme SD, Powers C, Beal R, Smith A, Barrow P. Oral infection with the *Salmonella enterica* serovar Gallinarum 9R attenuated live vaccine as a model to characterize immunity to fowl typhoid in the chicken. *Vet Res.* 2005; 125:531-532.
- 24- Barrow PA, Simpson J, Lovell M, Binns M. Contribution of *Salmonella* Gallinarum large plasmid toward virulence in fowl typhoid. *Infect Immun.* 1987; 55:388-392.
- 25- Olsen JE, Skov MN, Christensen JP, Bisgaard M. Genomic lineage of *Salmonella enterica* serotype Gallinarum. *J Med Microbiol.* 1996; 45:413-418.
- 26- Stanley J, Baquar N. Phylogenetics of *Salmonella* Enteritidis. *Int J Food Microbiol.* 1994; 21:79-87.

- 27- Li J, Smith NH, Nelson K, Crichton PB, Old DC, Whittam TS et al. Evolutionary origin and radiation of the avian-adapted non-motile salmonellae. *J Med Microbiol.* 1993; 38:129-139.
- 28- Blaxland JD, Sojka WJ, Smither AM. A study of *Salmonella Pullorum* and *Salmonella Gallinarum* strains isolated from field outbreaks of disease. *J Comp Pathol.* 1956; 270-277.
- 29- Christensen JP, Skov MN, Hinz KH, Bisgaard M. *Salmonella enterica* serovar Gallinarum biovar Gallinarum in layers: epidemiological investigations of a recent outbreak in Denmark. *Avian Pathol.* 1994; 23:489-501.
- 30- Pomeroy BS, Nagajara KV.. Fowl typhoid. *In Diseases of poultry, 9th Ed.* (B.W. Calnek, H.J. Barnes, C.W. beard, W.M. Reed and H.W. Yoder Jr, eds). Iowa State University Press, Ames. 1991. p. 87-99.
- 31- Snoeyenbos G.H. Pullorum disease. *In Diseases of poultry, 9th Ed.* (B.W. Calnek, H.J. Barnes, C.W. Beard, W.M. Reed and H.W. Yoder Jr, eds). Iowa State University Press, Ames. 1991. p. 73-86.
- 32- Shivaprasad HL. Pullorum disease and fowl typhoid. *In Diseases of poultry, 10th Ed.* (B.W. Calnek with H.J. Barnes, C.W. Beard, L.R. McDougald and Y.M. Saif, eds). Iowa State University Press, Ames. 1997. p. 82-96.

- 33- Beaudette FR. The possible transmission of fowl typhoid through the egg. J Am Vet Med Assoc. 1925; 67:741-745.
- 34- Beach JR, Davis D.E. Acute infection in chicks and chronic infection of the ovaries of hens caused by the fowl typhoid organisms. Hilgardia. 1927; 2:411-424.
- 35- Hinshaw WR, Upp CW, Moore JM. Studies on transmission of bacillary white diarrhea in incubators. J Am, Vet Assoc. 1926; 68:631-641.
- 36- Williams JE, Dillard LH, Hall GO. The penetration patterns of *Salmonella* Typhimurium through the outer structures of chickens eggs. Avian Dis. 1968; 12:445-466.
- 37- Pomeroy BS, Nagajara KV. Fowl typhoid. In Diseases of poultry, 9th Ed. (B.W. Calnek, H.J. Barnes, C.W. Beard, W.M. Reed and H.W. Yoder Jr, eds). Iowa State University Press, Ames. 1984. p. 87-99.
- 38- Smith HW. The longevity of Salmonellarum in the faeces of infected chickens. J Comp Pathol Ther. 1955; 65:267-270.
- 39- Berchieri A, Barrow P. The effects of chemical disinfectants and sanitizers on *Salmonella* Gallinarum. Rev Microbiol. 1995; 26:246-252.
- 40- Gast RK, Beard CW. Serological detection of experimental *Salmonella* Enteritidis infections in laying hens. Avian Dis. 1990; 34:721-728.

- 41- Jones FS. The value of the macroscopic agglutination test in detecting fowls that are harboring *Bacterium pullorum*. J Med Res. 1913; 481-495.
- 42- Minga UM, Wray C. A disc ELISA for the detection of *Salmonella* group D antibodies in poultry. Res Vet Sci. 1992; 52:384-386.
- 43- Chiu C, Ou J. Rapid identification of *Salmonella* serovars in feces by specific detection of virulence genes, *invA* and *spvC*, by an enrichment broth culture-multiplex PCR combination assay. J Clin Microbiol. 1996; 34:2619-2622.
- 44- Bottorff CA, Kiser JS. The use of sulfonamides in the control of pullorum disease. Poult Sci. 1947; 26:335-339.
- 45- Anderson GW, Cooper JB, Jones JC, Morgan CL. Sulfonamides in the control of pullorum disease. Poult Sci. 1948; 27:172-175.
- 46- Pomeroy BS, Fenstermacher R, Roepke MH. Sulfonamides in the control of salmonellosis of chicks and poults. J Am Vet Med Assoc. 1948; 112:296-303.
- 47- Smith HW. The treatment of *Salmonella* Pullorum infection in chicks with furazolidone, sulphamerazine and chloramphenicol. Vet Rec. 1954; 66:493-496.

- 48- Wilson JE. The treatment of carriers of *Salmonella Pullorum* and *Salmonella Gallinarum* with furazolidone. *Vet Res.* 1956; 68:748-751).
- 49- Francis DW. Treatment of natural infection of *Salmonella Pullorum* in day-old chicks with furazolidone. *Avian Dis.* 1960; 4:63-73.
- 50- Hall CF, Cartrite HT. Observations on strains of *Salmonella Gallinarum* apparently resistant to furazolidone. *Avian Dis.* 1961; 5:382-392.
- 51- Stuart EE, Keenum RD, Bruins HW. The emergence of a furazolidone-resistant strain of *Salmonella Gallinarum*. *Avian Dis.* 1967, 11:139-145.
- 52- Smith HW, Tucker JF, Lovell M. Furazolidone resistance in *Salmonella Gallinarum*: the relationship between *in vitro* and *in vivo* determinations of resistance. *J Hyg.* 1981; 87:71-81.
- 53- Silva EN, Snoeyenbos GH, Weinack OM, Smyer CF. Studies on the use of 9R strain of *Salmonella Gallinarum* as a vaccine in chickens. *Avian Dis.* 1981; 25:38-52.
- 54- Gupta BR, Mallick BB. Immunization against fowl typhoid. 1:live oral vaccine. *Indian J Anim Sci.* 1976; 46:502-505.
- 55- Gupta BR, Mallick BB. Use of 9R strain of *Salmonella Gallinarum* as vaccine against *S. Pullorum* infection in chicks. *Indian Vet J.* 1977; 54:331-333.

- 56- Padmanaban VD, Mittal KR, Gupta BR. Cross protection against fowl typhoid: immunization trials and humoral immune response. *Dev Comp Immunol.* 1981; 5:301-312.
- 57- Gordon RF, Garside JS, Tucker JR. The use of living attenuated vaccines in the control of fowl typhoid. *Vet Rec.* 1959; 71:300-305.
- 58- Gordon WA, Luck D. A note on the use of the 9R fowl typhoid vaccine in poultry breeding flocks. *Vet Rec.* 1959; 71:926-927.
- 59- Harbourne JF. The control of fowl typhoid in the field by the use of live vaccines. *Vet Rec.* 1957; 69:1102-1107.
- 60- Smith HW. Protection against experimental fowl typhoid by vaccination with strain 9R reconstituted from the freeze-dried state. *J Comp Path.* 1969; 197-295.
- 61- Bouzoubaa K. Membrane proteins from *Salmonella Gallinarum* for protection against fowl typhoid. PhD Thesis. Institute of Agronomy and Veterinary Medicine, Hassan II, Rabat, Morocco. 1990.
- 62- Bouzoubaa K, Nagaraja KV, Newman JA, Pomeroy BS. Use of membrane proteins from *Salmonella Gallinarum* for prevention of fowl typhoid infection in chickens. *Avian Dis.* 1987; 31:699-704.

- 63- Barrow PA. Immunity to experimental fowl typhoid in chickens induced by a virulence plasmid-cured derivative of *Salmonella* Gallinarum. *Infect Immun.* 1990; 58: 2283-2288.
- 64- Barrow PA. *In vitro* and *in vivo* characteristic of TnpHoA mutant strains of *Salmonella* serotype Gallinarum not invasive for tissue culture cells. *J Med Microbiol.* 1992; 36:389-397.
- 65- Griffin HG, Barrow PA. Construction of an *aroA* mutant of *Salmonella* serotype Gallinarum: its effectiveness in immunization against experimental fowl typhoid. *Vaccine.* 1993; 11:457-462.
- 66- Zhang-Barber L, Turner AK, Dougan G, Barrow PA. Protection of chickens against experimental fowl typhoid using a *nuoG* mutant of *Salmonella* serotype Gallinarum. *Vaccine.* 1998; 16:899-903.
- 67- Kogut MH, Tellez G, McGruder ED, Wong RA, Isibasi A, Ortiz VN, Hargis BM, DeLoach JR. Evaluation of *Salmonella* Enteritidis-immune lymphokines on host resistance to *Salmonella enterica* serotype Gallinarum infection in broiler chicks. *Avian Pathol.* 1996; 25:737-749.
- 68- De Icaza MD, Tellez Isaias G, Garcia Espinosa G, Hargis BM. Competitive exclusion between *Salmonella* Enteritidis and *Salmonella* Gallinarum in one day-old broiler chicken challenged consecutive or simultaneously. *Vet Méx.* 1996; 27:295-298.

- 69- Kuhn J, Tullus K, Burman LG. The use of PhP-KE biochemical fingerprinting system in epidemiological studies of faecal *Enterobacter cloacae* strains from infants in Swedish neonatal wards. *Epidemiol Infect.* 1991; 107:311-319.
- 70- Diskshoorn L, Aucken HM, Gerner-Smith P, Kaufman ME, Ursing J, Pitt TL. Correlation of typing methods for *Acinetobacter* isolates from hospital outbreaks. *J Clin Microbiol.* 1993; 31:702-705.
- 71- Rabkin C, Jarvis W, Anderson R. *Pseudomonas cepacia* typing systems: collaborative study to assess their potential in epidemiologic investigations. *Rev Infect Dis.* 1989; 11:600-607.
- 72- Maslow JN, Ellis Mulligan M, Arbeit R. Molecular epidemiology application of contemporary techniques to the typing of microorganisms. *Clin Infect Dis.* 1993; 17:153-164.
- 73- The International *Pseudomonas aeruginosa* typing Study Group. A multicenter comparison of methods for typing strains of *Pseudomonas aeruginosa* predominantly from patients with cystic fibrosis. *J Infect Dis.* 1994; 169:134-142.
- 74- Tenover F, Arbeit R, Archer G. Comparison of traditional and molecular methods of typing isolates of *Staphylococcus aureus*. *J Clin Microbiol.* 1994; 32:407-415.

- 75- Blane DS, Lugeon C, Wenger A, Siegrist HH, Francioli P. Quantitative antibiogram typing using inhibition zone diameters compared with ribotyping for epidemiological typing of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. J Clin Microbiol. 1994; 32:2505-2509.
- 76- Struelens MJ. and the Members of the European Study Group on Epidemiological markers (ESGEM), of the European Society for Clinical microbiology and Infectious Diseases (ESCMID). Consensus guidelines for appropriate use and evaluation of microbial epidemiologic typing systems. Clin Microbiol Infect. 1996; 1:2-11.
- 77- Popoff M, Bockemuhl J, McWorther-Murlin A. Supplement 1990 (n°34) to the Kauffmann-White scheme. Res. Microbiol. (Inst. Pasteur) 142:1029-1033.
- 78- Mayer LW. Use of plasmid profiles in epidemiological surveillance of disease outbreaks and in tracing the transmission of antibiotic resistance. Clin Microbiol Rev. 1988; 1:228-243.
- 79- Blackall PJ, Miflin JK. Identification and typing of *Pasteurella multocida*: a review. Avian Pathol 2000; 29:271-87.
- 80- Lin AW, Usera MA, Barrett TJ, Goldsby RA. Application of random amplified polymorphic DNA analysis to differentiate strains of *Salmonella Enteritidis*. J Clin Microbiol. 1996; 34:870-876.

- 81- Hilton AC, Banks JG, Penn CW. Random amplification of polymorphic DNA (RAPD) of *Salmonella*: strain differentiation and characterization of amplified sequences. J Appl Bacteriol. 1996; 81:575-584.
- 82- García García MI, Delgado Ronda N, Serrano Heranz R, Sáenz González MC, Muñoz Bellido JL, Muñoz Criado S. Epidemiología molecular de *Salmonella Typhimurium* multirresistente en España. Revista Española de Quimioterapia. 2006; 19:152-160.
- 83- Stern MJ, Ames GF, Smith NH, Robinson EC, Higgins CF. Repetitive extragenic palindromic sequences: a major component of the bacterial genome. Cell 1984; 37:1015-26.
- 84- Versalovic J, Koeuth T, Lupski JR. Distribution of repetitive DNA sequences in eubacteria and application to fingerprinting of bacterial genomes. Nucleic Acids Res 1991; 19:6823-31.
- 85- Chinen I, Rivas M, Soriano V, Miliwebsky E, Galvez GF, Chillemi G et al. *Escherichia coli* eh11 gene-positive serotype O18ac:H31 associated with an outbreak of diarrhea in a neonatal nursery in Neuquén City, Argentina. J Clin Microbiol 2002; 40:1225-9.
- 86- Leotta GA, Vigo G, Salve A, Pichel M, Pecoraro M, Binsztein N. Análisis de vacunas “9R” contra tifus aviar utilizadas en Argentina. XV Reunión Científico Técnica. Asociación Argentina de Veterinarios de Laboratorios de Diagnóstico; 2004.

- 87- Pedersen K, Jorgensen JC, Dietz HH, Andersen TH. Verrucous endocarditis associated with *Streptococcus bovis* in mink (*Mustela vison*). Vet Rec. 2003; 153: 264-8.
- 88- Nauerby B, Madsen M. Analysis by pulsed-field gel electrophoresis of the genetic diversity among *Clostridium perfringens* isolates from chickens. Vet Microbiol. 2003; 94:257-66.
- 89- Maiden MCJ, Bygraves JA, Feil E. Multilocus sequence typing : a portable approach to the identification of clones within populations of pathogenic microorganisms. Proc Natl Acad Sci USA. 1998; 95:3140-3145.
- 90- Darwin KH, Miller VL. Molecular basis of the interaction of *Salmonella* with the intestinal mucosa. Clin Microbiol Rev. 1999; 12:405-428.
- 91- Kingsley RA, Bäümle AJ. Host adaptation and the emergence of infectious diseases: the *Salmonella* paradigm. Molec Microbiol. 2000; 36:1006-1014.
- 92- Bäümle A, Tsolis R, Bowe F, Kusters J, Hoffmann S, Heffron F. The *pef* fimbrial operon of *Salmonella* Typhimurium mediates adhesion to murine small intestine and is necessary for fluid accumulation in the infant mouse. Infect Immun. 1996; 64:61-68.
- 93- Bäümle A, Gilde A, Tsolis R, van der Velden A, Ahmer B, Heffron F. Contribution of horizontal gene transfer and deletion events to development of distinctive patterns of fimbrial operons during evolution of *Salmonella* serovars. J Bacteriol. 1997; 197:317-322.

- 94- Baloda SB, Faris A, Krovacek K, Wadström T. Cytotoxic enterotoxins and cytotoxic factors produced by *Salmonella* Typhimurium. *Vet Microbiol.* 1983; 21:785-796.
- 95- Koo FC, Peterson JW. Cell-free extracts of *Salmonella* inhibit protein synthesis and cause cytotoxicity in eukaryotic cells. *Vet Microbiol.* 1983; 21:309-320.
- 96- Wallis TS, Starkey WG, Stephen J, Haddon SJ, Osborne MP, Candy DC. Enterotoxin production by *Salmonella* Typhimurium strains of different virulence. *J Med Microbiol.* 1986; 21:19-23.
- 97- Blanc-Potard AB, Groisman EA. The SPI-3 pathogenicity island of *Salmonella enterica*. *J Bacteriol.* 1999; 181:998-1004.
- 98- Swamy SC, Dreesen DW. Virulence determinants *invA* and *spvC* in *Salmonellae* isolated from poultry products, wastewater, and human sources. *Appl Environ Microbiol.* 1996; 62:3768-3771.
- 99- Bashki CS, Galyov E. Molecular basis of *Salmonella*-induced enteritis. *Molec Microbiol.* 2000; 36:997-1005.
- 100- Koneman EW, Stephen DA, Williams MJ, Schrenberger PC, Washington CW. *Diagnóstico Microbiológico.* 5th ed. Buenos Aires, Argentina: Editorial Médica Panamericana; 1999. p. 171-250.

- 101- Malorny B, Hoorfar J, Bunge C, Helmuth R. Multicenter validation of the analytical accuracy of *Salmonella* PCR: towards an international standard. *Appl Environm Microbiol.* 2003; 69:290-96.
- 102- Prager R, Rabsch W, Streckel W, Voigt W, Tietze E, Tschäpe H. Molecular properties of *Salmonella enterica* serotype Paratyphi B distinguish between its systemic and its enteric pathovars. *J Clin Microbiol.* 2003; 41:4270-4278.
- 103- Manual de Procedimientos de la OIE. Fowl typhoid and pullorum disease, Chapter 2.7.5 <http://.oie.int> (2002).
- 104- Ribot E, Fair M, Gautom R, Cameron D, Hunter S, Swaminathan B et al. Standarization of Pulse-Field Gel Electrophoresis protocols for the subtyping of *Escherichia coli* O157:H7, *Salmonella*, and *Shigella* for PulseNet. *Foodborne Path Dis.* 2006; 3:59-67.
- 105- Swaminathan B, Gerner-Smidt P, Lai-Kin Ng, Lutinmaa S, Kam K, Rolando S et al. Building PulseNet International: an interconnected system of laboratory networks to facilitate timely public health recognition and response to foodborne disease outbreaks and emerging foodborne diseases. *Foodborne Path Dis.* 2006; 3:36-50.
- 106- Barrow PA. *Salmonella* control-past, present, and future. *Avian Pathol.* 1993; 22:651-669.

- 107- Olsen JE, Brown DJ, Skov MN, Christensen JP. Bacterial typing methods suitable for epidemiological analysis: applications in investigations of salmonellosis among livestock. *Vet Quart.* 1993; 15:125-135.
- 108- Olive D, Bean P. Principles and applications of methods for DNA-based typing of microbial organisms. *J Clin Microbiol.* 1999; 37:1661-1669.
- 109- Mgedela R, Yongolo M, Minga U, Olsen J. Molecular epidemiology of *Salmonella* Gallinarum in chicken in Tanzania. *Avian Pathol.* 2000; 29:457-463.
- 110- Lee Y, Kim K, Kwon Y, Tak R. Biochemical characteristics and antimicrobials susceptibility of *Salmonella* Gallinarum isolated in Korea. *J Vet Sci.* 2003; 4:161-166.
- 111- Shah DH, Roy A, Purohit JH. Characterization of *Salmonella* Gallinarum avian strains isolated from Gujarat State. *Indian J Comp Microbiol Immunol Infect Dis.* 2001; 22:131-133.
- 112- Comunicación del Servicio Antimicrobianos, INEI - ANLIS “Dr. Carlos G. Malbrán” en el III Curso avanzado WHO Global Foodborne Infections Network, 2010
- 113- Wallis TS, Galvoy EE. Molecular basis of *Salmonella*-induced enteritidis. *Molec Microbiol.* 2000; 36:997-1005.

- 114- Rahman H, Streckel W, Prager R, Tschape H. Presence of *sopE* gene and its phenotypic expression among different serovars of *Salmonella* isolated from man and animals. *Indian J Med Res.* 2004; 120:35-38.
- 115- Ginocchio C, Pace J, Galán J. Identification and molecular characterization of a *Salmonella* Typhimurium gene involved in triggering the internalization of salmonellae into cultured epithelial cells. *Proc Natl Acad Sci USA.* 1992; 89:5976-5980.
- 116- Collier-Hyams L, Zeng H, Sun J, Tomlinson A, Bao Z, Chen H et al. Cutting edge: *Salmonella* AvrA effector inhibits the key proinflammatory, anti-apoptotic NF- κ B pathway. *J Immunol.* 2002; 169:2846-2850.
- 117- Edwards R, Puente J. Fimbrial expression in enteric bacteria: a critical step in intestinal pathogenesis. *Trends Microbiol.* 1998; 6:282-287.
- 118- Edwards R, Schifferli D, Maloy S. A role for *Salmonella* fimbriae in intraperitoneal infections. *Proc Natl Acad Sci USA.* 2000; 97:1258-1262.
- 119- Rotger R, Casadesús J. The virulence plasmids of *Salmonella*. *Internatl Microbiol.* 1999; 2:177-184.
- 120- Shah D, Lee M, Park J, Lee J, Eo S, Kwon J, Chae J. Identification of *Salmonella* Gallinarum virulence genes in a chicken infection model using PCR-based signature-tagged mutagenesis. *Microbiol.* 2005; 151:3957-3968.

- 121- Smith HW. The use of live vaccines in experimental *Salmonella* Gallinarum infection in chickens with observations on their interference effect. J Hyg Camb. 1956; 54:419-432.
- 122- Barrett T, Gerner-Smidt P, Swaminathan B. Interpretation of Pulse Field Gel Electrophoresis patterns in foodborne disease investigations and surveillance. Foodborne Path Dis. 2006; 3:20-31.
- 123- Guerra B, Schoers P, Mendoza M. Application of PFGE with *Xba*I to an epidemiological and phylogenetic study of *Salmonella* serotype Typhimurium. Relationships between genetic types and phage types. New microbiol.2000; 23:11-20.
- 124- Laconcha I, Baggesen D, Rementeria A, Garaizar J. Genotypic characterization by PFGE of *Salmonella enterica* serotype Enteritidis phage types 1, 4, 6 and 8, isolated from animal and human sources in three European countries. Vet Microbiol. 2000; 75:155-165.
- 125- Ling J, Koo I, Cheng A. Epidemiological analysis of *Salmonella enterica* serotype Typhimurium from Hong Kong by ribotyping and pulsed-field gel electrophoresis. J Clin Microbiol, 1998; 36:1693-1699.
- 126- Tenover F, Arbeit R, Goering R, Mickelsen P, Murray B, Persing D, Swaminathan B. Interpreting chromosomal DNA restriction patterns produced by pulsed-field electrophoresis: criteria for bacterial strain typing. J Clin Microbiol. 1995; 33:2233-2239.

- 127- Seo Y, Lee S, Shin E, Kim S, Jung R, Hahn T. Pulsed-field gel electrophoresis genotyping of *Salmonella* Gallinarum and comparison with random amplified polymorphic DNA. *Vet Microbiol.* 2006; 115:349-357.
- 128- Olsen JE, Skov MN, Christensen JP, Bisgaard M. Genomic lineage of *Salmonella enterica* serotype Gallinarum. *J Med Microbiol.* 1996; 45:413-418.
- 129- Kwon YK, Kim A, Kang MS, Her M, Jung BY, Lee KM et al. Prevalence and characterization of *Salmonella* Gallinarum in the chicken in Korea during 2000 to 2008. *Poult Science.* 2010; 89:236-242.
- 130- Bergamini F, Iori A, Massi P, Pongolini S. Multilocus variable of tandem-repeats analysis of *Salmonella enterica* serotype Gallinarum and comparison with pulsed-field gel electrophoresis genotyping. *Vet Microbiol.* 2011; 149:430-436.
- 131- Ahmed RG, Soule G, Demczuk W, Khakhria R, Ratnam S, Marshall S et al. Epidemiological typing of *Salmonella* enteritidis in a Canada-wide outbreak of gastroenteritis due to contaminated cheese. *J Clin Microbiol.* 2000; 38:2403-2406.
- 132- Maslow J, Mulligan M. Epidemiologic typing systems. *Infect Control Hosp Epidemiol.* 1996; 17:595-604.

SG-263	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	K
SG-264	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	K
SG-269	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	R	A
SG-270	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	R	A
SG-271	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	R	A

ST: estreptomicina, **CEF:** cefalotina, **TET:** tetraciclina, **GEN:** gentamicina, **TMS:** trimetoprima-sulfametoxazol, **CIP:** ciprofloxacina, **FOS:** fosfomicina, **NIT:** nitrofurantoína, **AMP:** ampicilina, **POL:** polimixina, **CTX:** cefotaxima, **CMP:** cloranfenicol, **AN:** ácido nalidíxico, **PR:** perfil de resistencia.