



UNIVERSITAT
POLITÈCNICA
DE VALÈNCIA

Epidemiología y control de las principales enfermedades avícolas de importancia en sanidad animal y salud pública

TESIS DOCTORAL

Verónica Cortés Moñiz

DIRIGIDA POR

Dr. Clara Marín Orenga

Dr. Pablo Catalá Gregori

Valencia, abril, 2022

UNIVERSITAT POLITÈCNICA DE VALÈNCIA

**Epidemiología y control de las
principales enfermedades avícolas de
importancia en sanidad animal y
salud pública**

Tesis Doctoral presentada en la Universitat Politècnica de València en cumplimiento de los requisitos establecidos para obtener el título de Doctor en Filosofía por

Verónica Cortés Moñiz.

Directores de tesis

Dr. Clara Marín Orega

Dr. Pablo Catalá Gregori

Fdo.

Fdo.

AGRADECIMIENTOS

A mis hijas

AGRADECIMIENTOS

«Un viaje de mil millas comienza con un primer paso» (Lao-Tse).

Durante este viaje, son muchas las personas a las que quiero expresar mi agradecimiento, ya que gracias a ellas ha sido posible esta Tesis Doctoral. Directores de tesis, compañeros, familia y todos aquellos que junto a mí han caminado durante las mil millas de esta travesía y que han sido inspiración, apoyo y fortaleza. GRACIAS.

En primer lugar, quiero agradecerles su tiempo, dedicación, paciencia y apoyo a mis dos directores y mi tutor de tesis, la **Dr. Clara Marín Orenga**, el **Dr. Pablo Catalá Gregori** y el **Dr. Francisco Marco Jiménez**. Sin duda, habéis sido compañeros incansables de camino, mis éxitos son vuestros también.

Clara, gracias por tu incansable apoyo, por leer lo poco o mucho que iba escribiendo a mi ritmo, ofreciéndome acertados comentarios, críticas y sugerencias desde el más puro rigor científico y tu gran experiencia investigadora. Gracias por ser luz y motivación en este camino y por ofrecer soluciones siempre que encontré una piedra.

Pablo, gracias por la oportunidad y la confianza que depositaste en mí desde el primer día. Me abriste la puerta, cuando pensé que todas estaban cerradas y me condujiste por la senda de la ciencia hacia un futuro profesional para mi inimaginado. Gracias por ser concienzudo y meticuloso corrector de estilo, argumentos, dobles espacios, cursivas etc. Gracias por tanto saber transmitido de forma transparente, por la positividad que siempre transmites y por tu gran empatía. Gracias por no soltarme de la mano en todo este recorrido y por las inolvidables anécdotas que nos han hecho reír a carcajadas.

Paco, gracias por tu inestimable seguimiento y ayuda con la burocracia en la UPV. Gracias por tu paciencia.

En segundo lugar, quiero agradecer a todas las instituciones y profesionales que me han apoyado en este proyecto, el **Centro de Calidad Avícola y Alimentación Animal de la Comunidad Valenciana (CECAV)**, **Junta Directiva de CECAV**, **Asociación Avícola Valenciana (ASAV)** y **sus comités técnicos**. Quiero agradecerles su apoyo, su financiación, colaboración y sus innumerables iniciativas que han hecho posible los

experimentales de esta tesis. Gracias a las **empresas y profesionales del sector avícola de la Comunidad Valenciana** por su colaboración en la toma de muestras, apoyo y asesoramiento técnico. Gracias.

En tercer lugar, quiero dar las gracias a mis compañer@s de CECAV, quienes me han ayudado y motivado durante este largo camino. A **Cristina García**, por ser una gran asesora profesional, por sus aportaciones inestimables en cuestión de diluciones, normas ISO etc. y por ser un gran apoyo personal. A **Ana Tudón**, por enseñarme todo lo que sé sobre serología, PCR etc., por ayudarme en cualquier proyecto que inicio con su gran capacidad de organización y por ser una gran amiga. Gracias por ayudarme con los ELISAS y PCR de esta tesis. A **Mayte Orenga y Elena Bravo**, por no dudar en venirse varios fines de semana a inocular, sembrar placas y sensitividades, por tantas risas y anécdotas y por siempre estar disponibles para cualquier proyecto que inicie. Gracias por vuestra amistad, abrazos y apoyo en todo momento. A **Sandra Sevilla**, gracias por las aportaciones sobre burocracia en materia de tesis, por tus correcciones y aportaciones valiosas en materia de estadística. Y a **Lorena, Manoli, Rocío, David, Josep, Nerea, Almudena, Marta, Bea, Ana, Merche, Yolanda, Marcia y Pepe...** y otros compañeros que han pasado por CECAV y que han formado parte de mi día a día. Gracias por suplir mis ausencias los últimos meses y por vuestro trabajo incansable.

En último lugar, aunque no menos importante, expresar mi agradecimiento a mi familia, tanto de sangre como política.

A mis padres y mi hermano, **Carmen, Tomás y Alejandro**. Gracias a ellos me he convertido en quien soy. Gracias por preocuparos siempre en darme la mejor educación, por vuestros esfuerzos y sacrificios para que nunca me faltara de nada y por transmitirme los valores del esfuerzo y del trabajo. Gracias por hacer 300 km cuando os necesito. Todo lo que os diga no será suficiente para agradeceros todo lo que haceis por mi.

A mis abuelos, que sé que donde estén se sentirán orgullosos de mi.

A mi familia política, **Inma, José, Alma, Jose Luis, Gala, Jose Jr., Gala Jr.**, por acogerme en su familia como a una más, por querer tanto a mis hijas y cuidar a África tanto estas últimas semanas. Gracias por las paellas de los domingos, las sesiones de tarde de cantajuegos y manualidades, los ratitos de Senia y por cuidarme tanto.

A mi marido, **Dámaso** por ser parte de todas las aventuras que he emprendido en estos 17 años juntos. Gracias por aguantarme, entenderme, ayudarme y por construir esta familia tan bonita conmigo. Te quiero.

Y a mis hijas, **África** y **Alma**, que está en camino, que son y serán el motor y el amor de mi vida. Espero que algún día os sintáis orgullosas de mamá. Os quiero.

RESUMEN

En la actualidad, la avicultura es un pilar económico para diversos países a nivel mundial y sus productos, una pieza clave en la alimentación de muchos consumidores. El constante crecimiento de la industria y una mayor exigencia del consumidor en seguridad y calidad del producto ha llevado al sector avícola a enfrentarse a importantes retos desde el punto de vista tanto de salud pública como sanidad animal.

La avicultura actual busca garantizar los mayores estándares en seguridad y calidad de sus productos alimenticios, ya que para los consumidores los alimentos seguros son una prioridad. Desde el punto de vista de seguridad de los alimentos *Campylobacter* spp. y *Salmonella* spp. son dos de los patógenos zoonóticos con mayor importancia en la salud pública en la Unión Europea, habiendo causado 120.946 y 52.702 casos en humanos, respectivamente en 2020. Una de las principales fuentes de infección gastrointestinal en humanos es el consumo de productos alimenticios de origen animal, siendo uno de ellos los productos avícolas (productos cárnicos, huevos y ovoproductos) (EFSA, 2021). La contaminación cruzada y la manipulación de los alimentos es una de las principales causas de transmisión de estos microorganismos, por lo que uno de los objetivos en avicultura es la disminución de la contaminación en los animales o huevos en la producción primaria.

Otro reto desde el punto de vista de seguridad alimentaria y sanidad animal al que no sólo se enfrenta el sector avícola, sino que es un problema de salud mundial, es la aparición resistencias bacterianas a antibióticos debido a un uso amplio tanto en medicina veterinaria como en humana. En la Unión Europea, es obligatorio que los Estados miembros controlen y notifiquen las resistencias a antimicrobianos de *Salmonella* (EFSA, 2021). En este sentido, en 2014 se implantó en España el Plan Nacional de Resistencias a Antibióticos. Por lo tanto, para proporcionar información útil sobre la influencia de la implementación de este Plan en el sector avícola, es esencial monitorear las tendencias de resistencias antimicrobianas de *Salmonella* spp. a nivel de campo. Por otro lado, la aparición de los microorganismos resistentes y multiresistentes, junto a las restricciones de uso de antibióticos aplicados por la Unión Europea han llevado a la búsqueda de soluciones alternativas a los antimicrobianos, como los compuestos derivados de productos naturales para controlar las infecciones en avicultura, lo que puede ayudar a garantizar el bienestar de los animales y a reducir el

impacto en el desarrollo de resistencias. El ajo (*Allium sativum*) es un agente antibacteriano eficaz tanto para bacterias Gram positivas como para las Gram negativas (Belguith et al., 2010). El ingrediente antimicrobiano del ajo es un compuesto denominado alicina. Esta molécula es un biocida dependiente de la concentración con actividad contra una amplia gama de microorganismos (Curtis et al., 2004). Su utilización de forma aislada o en combinación con otros compuestos puede ser una herramienta útil para la reducción de resistencias y el tratamiento de algunos microorganismos que presentan un desafío en la industria avícola.

Desde el punto de vista de la sanidad animal, la aparición y reaparición de enfermedades aviares es otra de las preocupaciones de la avicultura actual. Está probablemente ligada al incremento en los movimientos comerciales a nivel mundial, la migración de aves silvestres y los cambios en algunos sistemas productivos en detrimento de la bioseguridad, particularmente en la avicultura de puesta. Tanto por su impacto en la salud de los animales, como sobre los resultados productivos y su repercusión económica sobre la actividad ganadera, son importantes algunas enfermedades víricas como la bronquitis infecciosa (Infectious Bronchitis Virus; IBV) y sus cepas variantes, y enfermedades bacterianas como las micoplasmosis por *Mycoplasma synoviae* (*M. synoviae*; MS). La vigilancia y la monitorización de ambas enfermedades es esencial para conocer su prevalencia y cepas variantes circulantes con el fin de ajustar los programas de control apropiados.

Esta tesis doctoral se ha desarrollado íntegramente en el Centro de Calidad Avícola y Alimentación Animal de la Comunidad Valenciana (CECAV) como respuesta a la necesidad de abordar varios de los retos de la avicultura actual.

Dada la relevancia de *Salmonella* spp. y conocida su prevalencia por los Planes Nacionales de Control de *Salmonella*, el **primer objetivo** de esta Tesis Doctoral fue investigar la dinámica de las resistencias de *Salmonella* spp. en 3 orientaciones productivas (pollos, pavos y gallinas ponedoras) y evaluar los patrones de multiresistencia a los antibióticos utilizados actualmente en medicina veterinaria y terapia humana. Los resultados del estudio sugirieron que la reducción en el uso de antibióticos comienza a verse reflejada en la reducción del número de multirresistencias encontradas en las aves, mostrando una tendencia decreciente en las resistencias, especialmente en ponedoras desde que se implementó el PRAN en 2018, junto a las

mejores prácticas de bioseguridad de los avicultores. Sin embargo, el nivel de resistencias detectado en otras orientaciones productivas sugiere la necesidad de seguir trabajando en la reducción del uso de antibióticos en las aves para lograr (al igual que en ponedoras) una disminución significativa en las resistencias.

En línea con el estudio de las resistencias y la búsqueda de nuevas alternativas naturales para reducir el uso de antibióticos, el **segundo objetivo** fue evaluar la interacción del compuesto natural alicina *in vitro* junto a 14 antibióticos frente a algunos de los serotipos más relevantes de *Salmonella* spp. Los resultados obtenidos sugirieron que este compuesto junto a la ciprofloxacina y la gentamicina presentaban un efecto sinérgico estadísticamente significativo con reducción de las resistencias. Así mismo, también se observó una reducción estadísticamente significativa en ciertos serotipos de *Salmonella* (*S. Infantis*, *S. Kentucky*, *S. Mikawasima*, *S. Montevideo* y *S. Typhimurium* (monofásica)) en comparación con otros serotipos estudiados.

Dada la importancia en salud pública de *Campylobacter* spp., el Reglamento (UE) 2017/1495 estableció un criterio de higiene de proceso ≤ 1000 UFC/g en matadero para la vigilancia de *Campylobacter* spp. en canales de pollos de engorde (UE, 2017). En este contexto, el **tercer objetivo** fue investigar la presencia de este microorganismo a nivel de campo y reportar nuevos datos cuantitativos mediante recuentos en heces procedentes de granjas de pollos en edades cercanas a sacrificio durante 12 meses. Este estudio demostró alta presencia de *Campylobacter* spp. en lotes de pollos cercanos a edad de sacrificio, aunque se requieren más estudios para verificar si posteriormente se traducen en recuentos altos a nivel de matadero. Por otro lado, se encontraron diferencias estadísticamente significativas en la presencia de *Campylobacter* spp. durante los diferentes meses del año (junio a diciembre) coincidiendo con las estaciones de verano y otoño.

Desde el marco de la sanidad animal y por su impacto económico en la producción avícola, el **cuarto y quinto objetivo** fueron conocer las prevalencias y seroprevalencias de 2 microorganismos aviarios, *M. synoviae* y el virus de la Bronquitis Infecciosa Aviar en una localización geográfica concreta (Comunidad Valenciana). Con ello, se pretendió evaluar la situación epidemiológica actual y proporcionar información para la toma de decisiones en la instauración de programas de control y estrategias profilácticas. Para ello se muestreó un número representativo de explotaciones de

ponedoras y reproductoras en el caso de *M. synoviae*; y de ponedoras, reproductoras y pollos para IBV. En gallinas ponedoras la seroprevalencia de *M. synoviae* fue del 95% y la prevalencia del 100%. Los genotipos encontrados fueron IZSVE/4504, MSK-1, MGS 1342, MGS 543, PASC 8, WT4 y MS-H. En cuanto a las reproductoras pesadas, la seroprevalencia fue del 74% y la prevalencia del 47%, siendo todas las cepas halladas la cepa vacunal MS-H. En relación con IBV, la seroprevalencia fue del 100% en todas las orientaciones productivas, y la prevalencia fue del 38% en pollos, 44% en ponedoras y el 43% en reproductoras pesadas. En granjas de pollos las cepas detectadas fueron 4/91 y Massachusetts; en ponedoras, se hallaron las variantes Qx, 4/91, Italy-02 y D274; y en reproductoras pesadas solo se encontró la cepa 4/91. Los hallazgos en ambos estudios demuestran la utilidad de la vigilancia y monitoreo de rutina en las manadas de aves para controlar la presencia de ambos microorganismos y sus serotipos emergentes, permitiendo así ajustar los planes de vacunación.

ABSTRACT

Nowadays, the poultry industry is an economic key for many countries worldwide, and poultry products are a basic piece in the diet of many consumers. The industry constant growth and the high consumer demands for safety and quality products has imposed new challenges to poultry sector from the point of view of both public and animal health.

Today's poultry farming seeks to guarantee the highest standards in safety and quality of its food products since safe food is a priority for consumers. From food safety point of view, *Campylobacter* spp. and *Salmonella* spp. are two of the most important zoonotic pathogens in public health in the European Union. These pathogens caused 120,946 and 52,702 cases in humans, respectively, in 2020. One of the main routes of gastrointestinal infection in humans is the consumption of food products of animal origin, being one of them poultry products (meat products, eggs and egg products) (EFSA, 2021). Cross-contamination and food handling are the main causes of acquisition of these microorganisms, so one of the objectives in poultry is reduce the contamination in animals and eggs in primary production.

Another challenge in food safety and animal health is the appearance of bacterial resistance to antibiotics. This is a global health problem that not only affects the poultry sector due the wide use of antibiotics in human and veterinary medicine. In the European Union, it is mandatory for Member States to monitor and report *Salmonella* antimicrobial resistance (EFSA, 2021). In this sense, in 2014 the National Antibiotic Resistance Plan was implemented in Spain. Therefore, to provide useful information on the influence of the implementation of this Plan in the poultry sector, it is essential to monitor the antimicrobial resistance trends of *Salmonella* spp. at field level. On the other hand, the appearance of resistant microorganisms and the restrictions on antibiotics' use applied by the European Union have motivated the research for alternative solutions to antimicrobials, such as natural products to control infections in poultry. These natural compounds can help to ensure animal welfare and reduce the impact in resistance development. Garlic (*Allium sativum*) is an effective antibacterial agent for both Gram-positive and Gram-negative bacteria (Belguith et al., 2010). The antimicrobial ingredient in garlic is a compound called allicin. This molecule is a concentration-dependent biocide with activity against a wide range of microorganisms

(Curtis et al., 2004). Its use alone or in combination with other compounds can be a useful tool for reducing resistance and for the treatment of some microorganisms that present a challenge in the poultry industry.

Another poultry concern from the point of view of animal health is the appearance and recurrence of some avian diseases. This emergence can probably be due to the increase in commercial movements worldwide, the migration of wild birds and changes in some production systems to the detriment of biosecurity, particularly in laying poultry. Due to their impact on the health of the animals, as well as on the productive results and their economic repercussion on the livestock activity, some viral diseases are important, such as infectious bronchitis (Infectious Bronchitis Virus; IBV) and its variant strains, and bacterial diseases such as mycoplasmosis due to *Mycoplasma synoviae* (*M. synoviae*; MS). The surveillance and monitoring of both diseases is essential to know their prevalence and the recirculating variant strains in order to adjust the appropriate control programs.

This doctoral thesis has been developed entirely at the Center for Poultry Quality and Animal Feeding of the Valencian Community (CECAV) to know several of the challenges of current poultry farming.

Due to the relevance of *Salmonella* spp. and its actual prevalence (provided by the National control Programs of *Salmonella*), the **first objective** of this Doctoral Thesis was to investigate the resistance dynamics of *Salmonella* spp. in 3 productive orientations (chickens, turkeys and laying hens) and evaluate the patterns of multiresistance to antibiotics currently used in veterinary medicine and human therapy. Results shown in the present study suggest that the reduction in the use of antibiotics begins to be reflected in the reduction of the number of multiresistances, especially in layers since the PRAN implementation in 2018. However, the level of resistances found in this study suggests the necessity of continuing working on the limitation of the use of antimicrobials in poultry to achieve (as in layers) the reduction in resistances.

On the other hand, after the resistance rates observed in the previous study and the continuous research for alternatives to reduce the use of antibiotics, the second objective of this Doctoral Thesis was to evaluate the interaction *in vitro* between allicin and 14 antibiotics against some of the most relevant serotypes of *Salmonella* spp. The results obtained suggested that this compound, together with ciprofloxacin and

gentamicin, had a statistically significant synergistic effect with a reduction in resistance. Likewise, a statistically significant reduction was also observed in certain *Salmonella* serotypes (*S. Infantis*, *S. Kentucky*, *S. Mikawasima*, *S. Montevideo* and *S. Typhimurium* (monophasic)) compared to other serotypes studied.

Campylobacter spp. is the most important zoonotic bacteria in public health. For this reason, in 2017, Regulation (UE) 2017/1495 was established, to *Campylobacter* spp. surveillance in broiler carcasses. A process hygiene criterion of >1000 CFU/g was set at slaughterhouse (UE, 2017). In this context, the **third objective** was to investigate the presence of this microorganism at the field level and report new quantitative data through counts in feces from chicken farms at ages close to slaughter during 12 months. This study revealed a high presence of *Campylobacter* spp. in flocks of chickens close to slaughter age, although more studies are required to verify if they subsequently translate into high counts at the slaughterhouse level. On the other hand, statistically significant differences were found in the presence of *Campylobacter* spp. during different months of the year (June to December) coinciding with the summer and autumn seasons.

The **fourth and fifth objectives** were focused on two important diseases in animal health that have an economic impact, *M. synoviae* and IBV in a specific geographical location (Valencian Community). The current epidemiological situation was evaluated through 2 prevalence and seroprevalence studies to provide useful information for the establishment of control programs and prophylactic strategies. For this purpose, a representative number of laying and breeders farms were sampled in *M. synoviae*; for IBV, layers, breeders and broilers farms were sampled. In laying hens, the seroprevalence of *M. synoviae* was 95% and the prevalence 100%. The genotypes found were IZSVE/4504, MSK-1, MGS 1342, MGS 543, PASC 8, WT4 and MS-H. Regarding broiler breeders, the seroprevalence was 74% and the prevalence 47%. All the strains found were MS-H vaccine strain. On the other hand, the seroprevalence of IBV was 100% in all productive orientations, and the prevalence was 38% in broilers, 44% in layers and 43% in broiler breeders. In broiler farms, the detected strains were 4/91 and Massachusetts; in layers, the variants found were Qx, 4/91, Italy-02 and D274. The findings in both studies demonstrate the usefulness of routine surveillance and monitoring in poultry flocks to control the presence of both microorganisms and their emerging serotypes in order to update vaccination plans.

RESUM

En l'actualitat, l'avicultura és un pilar econòmic per a diversos països a nivell mundial i els seus productes, una peça clau en l'alimentació de molts consumidors. El constant creixement de la indústria i una major exigència del consumidor en seguretat i qualitat del producte, ha portat al sector avícola a enfrontar-se a importants reptes des del punt de vista tant de salut pública com sanitat animal.

L'avicultura actual vol garantir els majors estàndards en seguretat i qualitat dels seus productes alimentosos, ja que per als consumidors els aliments segurs són una prioritat. Des del punt de vista de seguretat dels aliments *Campylobacter* spp. i *Salmonella* spp. són dos dels patògens zoonòtics amb major importància en la salut pública a la Unió Europea, havent causat 120.946 i 52.702 casos en humans, respectivament en 2020. Una de les principals fonts d'infecció gastrointestinal en humans és el consum de productes alimentaris d'origen animal, sent un d'ells els productes avícoles (productes carnis, ous i productes derivats de l'ou) (EFSA, 2021). La contaminació creuada i la manipulació dels aliments és una de les principals causes d'adquisició d'aquests microorganismes, per tant un dels objectius en avicultura és la disminució de la contaminació dels animals o ous en la producció primària.

Un altre repte des del punt de vista de seguretat alimentària i sanitat animal al qual no sols s'enfronta el sector avícola, sinó que és un problema de salut mundial, és l'aparició de resistències bacterianes a antibiòtics a causa d'un ús ampli tant en medicina veterinària com humana. En la Unió Europea, és obligatori que els Estats membres controlen i notifiquen las resistències a antimicrobians de *Salmonella* (EFSA, 2021). En aquest sentit, en 2014 es va implantar a Espanya el Pla Nacional de Resistències a Antibiòtics. Per tant, per a proporcionar informació útil sobre la influència de la implementació d'aquest Pla en el sector avícola, és essencial monitorar les tendències de resistències antimicrobianes de *Salmonella* spp. a nivell de camp. D'altra banda, l'aparició dels microorganismes resistents i multiresistents i les restriccions d'ús d'antibiòtics aplicats per la Unió Europea han portat a la cerca de solucions alternatives als antimicrobians. Aquests productes naturals poden ajudar a assegurar el benestar dels animals i reduir l'impacte en el desenvolupament de resistències. L'all (*Allium sativum*) és un agent antibacterià eficaç tant per a bacteris Gram positives com per a les Gram negatives (Belguith et al., 2010). L'ingredient antimicrobià de l'all és un compost

denominat alicina. Aquesta molècula és un biocida dependent de la concentració amb activitat contra una àmplia gamma de microorganismes (Curtis et al., 2004). La seua utilització de forma aïllada o en combinació amb altres compostos pot ser una eina útil per a la reducció de resistències i el tractament d'alguns microorganismes que presenten un desafiament en la indústria avícola.

Des del punt de vista de la sanitat animal, l'aparició i reaparició de malalties aviàries és una altra de les preocupacions de l'avicultura actual. Està probablement lligada a l'increment en els moviments comercials a nivell mundial, la migració d'aus silvestres i els canvis en alguns sistemes productius en detriment de la bioseguretat, particularment en l'avicultura de posta. Tant pel seu impacte en la salut dels animals, com sobre els resultats productius i la seua repercussió econòmica sobre l'activitat ramadera, són importants algunes malalties víriques com la bronquitis infecciosa (Infectious Bronchitis Virus; IBV) i les seues variants, i malalties bacterianes com les micoplasmosis per *Mycoplasma synoviae* (*M. synoviae*; MS). La vigilància i el monitoratge de totes dues malalties és essencial per a conèixer la seua prevalença i les seues variants circulants amb la finalitat d'ajustar els programes de control apropiats.

Aquesta Tesi Doctoral s'ha desenvolupat íntegrament en el Centre de Qualitat Avícola i Alimentació Animal de la Comunitat Valenciana (CECAV) com a resposta a la necessitat d'abordar diversos dels reptes de l'avicultura actual.

Donada la rellevància de *Salmonella* spp. i coneguda la seua prevalença pels Plans Nacionals de Control de *Salmonella*, el **primer objectiu** d'aquesta Tesi Doctoral va ser investigar la dinàmica de les resistències de *Salmonella* spp. en 3 orientacions productives (pollastres, titots i gallines ponedores) i avaluar els patrons de multiresistència als antibiòtics utilitzats actualment en medicina veterinària i teràpia humana. Els resultats de l'estudi van suggerir que la reducció en l'ús d'antibiòtics comença a veure's reflectida en la reducció del nombre de multiresistències trobades en les aus, mostrant una tendència decreixent en les resistències, especialment en ponedores des que es va implementar el Pla Nacional de Resistències Antimicrobianes en 2018, al costat de les millors pràctiques de bioseguretat dels avicultors. No obstant això, el nivell de resistències detectat en altres orientacions productives suggereix la necessitat de continuar treballant en la reducció de l'ús d'antibiòtics en les aus per a aconseguir (igual que en ponedores) una disminució significativa en les resistències.

En línia amb l'estudi de les resistències i la cerca de noves alternatives naturals per a reduir l'ús d'antibiòtics, el **segon objectiu** va ser avaluar la interacció del compost natural alicina *in vitro* al costat de 14 antibiòtics enfront d'alguns dels serotips més rellevants de *Salmonella* spp. Els resultats obtinguts van suggerir que aquest compost al costat de la ciprofloxacina i la gentamicina presentaven un efecte sinèrgic estadísticament significatiu amb reducció de les resistències. Així mateix, també es va observar una reducció estadísticament significativa en certs serotips de *Salmonella* (*S. Infantis*, *S. Kentucky*, *S. Mikawasima*, *S. Montevideo* i *S. Typhimurium* (monofàsica)) en comparació amb altres serotips estudiats.

Donada la importància en salut pública de *Campylobacter* spp., el Reglament (UE) 2017/1495 va establir un criteri d'higiene de procés ≤ 1000 UFC/g en escorxador per a la vigilància de *Campylobacter* spp. en canals de pollastres d'engreixament (UE, 2017). En aquest context, el **tercer objectiu** va ser investigar la presència d'aquest microorganisme a nivell de camp i reportar noves dades quantitatives mitjançant recomptes en femta procedent de granges de pollastres en edats pròximes a sacrifici durant 12 mesos. Aquest estudi va demostrar alta presència de *Campylobacter* spp. en lots de pollastres pròxims a l'edat de sacrifici, encara que es requereixen més estudis per a verificar si posteriorment es tradueixen en recomptes alts a nivell d'escorxador. D'altra banda, es van trobar diferències estadísticament significatives en la presència de *Campylobacter* spp. durant els diferents mesos de l'any (juny a desembre) coincidint amb les estacions d'estiu i tardor.

Des del marc de la sanitat animal i pel seu impacte econòmic en la producció avícola, el **quart i cinqué objectiu** van ser conèixer les prevalences i prevalences serològiques de 2 microorganismes aviaris, *M. synoviae* i el virus de la Bronquitis Infecciosa Aviària en una localització geogràfica concreta (Comunitat Valenciana). Es va pretendre avaluar la situació epidemiològica actual i proporcionar informació per a la presa de decisions en la instauració de programes de control i estratègies profilàctiques. Per a això es va mostrejar un nombre representatiu d'explotacions de ponedores i reproductores en el cas de *M. synoviae*; i de ponedores, reproductores i pollastres per a IBV. En gallines ponedores la prevalença serològica de *M. synoviae* va ser del 95% i la prevalença del 100%. Els genotips trobats van ser IZSVE/4504, MSK-1, MGS 1342, MGS 543, PASC 8, WT4 i MS-H. Quant a les reproductores pesades, la prevalença serològica va ser del 74% i la prevalença del 47%, sent tots els genotips trobats el

genotip vacunal MS-H. En relació amb IBV, la prevalença serològica va ser del 100% en totes les orientacions productives, i la prevalença va ser del 38% en pollastres, 44% en ponedores i el 43% en reproductores pesades. En granges de pollastres les variants detectades van ser 4/91 i Massachusetts; en ponedores, es van trobar les variants Qx, 4/91, Italy-02 i D274; i en reproductores pesades només es va trobar la variant 4/91. Les troballes en tots dos estudis demostren la utilitat de la vigilància i monitoratge de rutina en els aus per a controlar la presència de tots dos microorganismes i els seus serotips emergents, permetent així ajustar els plans de vacunació.

ÍNDICE

LISTA DE FIGURAS	29
LISTA DE TABLAS	31
ABREVIATURAS	33
CAPÍTULO I. INTRODUCCIÓN GENERAL	39
1. INTRODUCCIÓN	41
1.1. Avicultura	41
1.2. Estructura de la producción avícola actual en España	41
1.2.1. Explotaciones de producción de carne	42
1.2.2. Explotaciones de producción para puesta.....	43
1.2.3. Explotaciones de multiplicación.....	44
1.3. Situación actual de la producción avícola.....	45
1.3.1. Producción de carne.....	45
1.3.2. Producción de huevos	48
1.4. Control sanitario en el sector avícola.....	51
1.5. Resistencias a los antibióticos.....	53
1.5.1. Resistencias y salud pública	53
1.5.2. Programas de vigilancia de las resistencias antimicrobianas	55
1.5.3. Actualidad de las resistencias de <i>Salmonella</i> spp. en avicultura.....	55
1.5.4. Estrategias alternativas de reducción de resistencias	58
1.5.4.1. Alicina.....	58
1.6. Enfermedades infecciosas con relevancia en salud pública.....	60
1.6.1. Salmonelosis.....	60
1.6.1.1. Etiología.....	60
1.6.1.2. Salmonelosis en humanos	60
1.6.1.2.1. Epidemiología y situación actual.....	60
1.6.1.2.2. Patogenia y clínica en humanos	62
1.6.1.3. Salmonelosis en el sector avícola	62
1.6.1.3.1. Epidemiología y situación actual.....	62

1.6.1.3.2.	Patogenia y clínica.....	63
1.6.1.3.3.	Programas y medidas de control.....	64
1.6.2.	Campilobacteriosis	66
1.6.2.1.	Etiología.....	66
1.6.2.2.	Campilobacteriosis en humanos	67
1.6.2.2.1.	Epidemiología y situación actual.....	67
1.6.2.2.2.	Patogenia y clínica.....	68
1.6.2.3.	Campilobacteriosis en avicultura.....	68
1.6.2.3.1.	Epidemiología y situación actual.....	68
1.6.2.3.2.	Patogenia y clínica.....	69
1.6.2.3.3.	Programas de control.....	70
1.7.	Enfermedades infecciosas con relevancia en sanidad animal.....	71
1.7.1.	Micoplasmosis	71
1.7.1.1.	Etiología.....	71
1.7.1.2.	Epidemiología y patogenia	72
1.7.1.3.	Síntomas y lesiones.....	72
1.7.1.4.	Medidas de control y prevención.....	73
1.7.2.	Bronquitis infecciosa aviar	75
1.7.2.1.	Etiología.....	75
1.7.2.2.	Epidemiología.....	76
1.7.2.3.	Síntomas y lesiones.....	76
1.7.2.4.	Medidas de control y prevención.....	77
1.8.	Técnicas de análisis	79
1.8.1.	Técnicas de análisis microbiológico.....	79
1.8.1.1.	Método de investigación de <i>Salmonella</i> spp.....	79
1.8.1.2.	Método de investigación y recuento de <i>Campylobacter</i> spp.	83
1.8.1.3.	Evaluación de la susceptibilidad antimicrobiana.....	85
1.8.2.	Técnicas de análisis serológico.....	89
1.8.2.1.	Técnicas inmunoenzimáticas	89
1.8.3.	Técnicas de biología molecular	92
1.8.3.1.	Reacción en cadena de la polimerasa	92
1.8.3.2.	PCR en tiempo real	93
1.8.3.3.	PCR con transcriptasa inversa (RT-PCR).....	94

1.8.3.4.	Secuenciación	95
1.9.	Referencias.....	96
CAPÍTULO II. OBJETIVOS		109
2.	OBJETIVOS	111
CAPÍTULO III. CAPÍTULOS EXPERIMENTALES		113
3.	CAPÍTULOS EXPERIMENTALES	115
3.1.	Patógenos zoonóticos relevantes en salud pública.	117
3.1.1.	Monitorización de las resistencias antimicrobianas de <i>Salmonella</i> spp. en avicultura en el Este de España.	117
3.1.1.1.	Resumen.....	119
3.1.1.2.	Introducción	120
3.1.1.3.	Material y métodos	121
3.1.1.3.1.	Selección de cepas de <i>Salmonella</i> spp.....	121
3.1.1.3.2.	Procedimiento de aislamiento e identificación.....	121
3.1.1.3.3.	Procedimiento de susceptibilidad antimicrobiana	121
3.1.1.3.4.	Análisis estadístico	123
3.1.1.4.	Resultados	123
3.1.1.5.	Discusión	129
3.1.1.6.	Agradecimientos	133
3.1.1.7.	Referencias.....	133
3.1.2.	Evaluación del efecto sinérgico entre alicina y diferentes antibióticos frente a cepas de <i>Salmonella</i> multirresistente.	137
3.1.2.1.	Resumen.....	139
3.1.2.2.	Introducción	139
3.1.2.3.	Material y métodos	140
3.1.2.3.1.	Selección y aislamiento de cepas de <i>Salmonella</i>	140
3.1.2.3.2.	Prueba de sensibilidad a antibióticos.....	141
3.1.2.3.3.	Combinación de alicina con antibióticos.....	141
3.1.2.3.4.	Análisis estadístico	142
3.1.2.4.	Resultados y discusión.....	142
3.1.2.4.1.	Agradecimientos.....	145

3.1.2.4.2.	Referencias	145
3.1.3.	Presencia de <i>Campylobacter</i> spp. en avicultura a nivel de campo, dos años después de la entrada en vigor del Reglamento Europeo (EU) 2017/1495. ...	147
3.1.3.1.	Resumen.....	149
3.1.3.2.	Introducción	149
3.1.3.3.	Material y métodos	150
3.1.3.3.1.	Selección de muestras.....	150
3.1.3.3.2.	Aislamiento, identificación y recuento de <i>Campylobacter</i> spp... 150	
3.1.3.3.3.	Análisis estadístico	151
3.1.3.4.	Resultados y discusión.....	151
3.1.3.5.	Agradecimientos	153
3.1.3.6.	Referencias.....	153
3.2.	Patógenos zoonóticos relevantes en sanidad animal.....	155
3.2.1.	Seroprevalencia y Prevalencia de <i>Mycoplasma synoviae</i> en gallinas ponedoras y reproductoras pesadas en España	155
3.2.1.1.	Resumen.....	157
3.2.1.2.	Introducción	157
3.2.1.3.	Material y métodos	158
3.2.1.3.1.	Selección de la población de estudio.....	159
3.2.1.3.2.	Toma de muestras	160
3.2.1.3.3.	Análisis serológico	160
3.2.1.3.4.	Detección de <i>M. synoviae</i> mediante PCR.....	161
3.2.1.3.5.	Procesamiento de las muestras	161
3.2.1.3.6.	Extracción de ADN	161
3.2.1.3.7.	Reacción en cadena de la polimerasa en tiempo real	161
3.2.1.3.8.	Secuenciación de ADN.....	162
3.2.1.4.	Resultados	162
3.2.1.4.1.	Seroprevalencia	162
3.2.1.4.2.	Prevalencia	164
3.2.1.4.3.	Genotipos.....	164
3.2.1.5.	Discusión	165
3.2.1.6.	Agradecimientos	168

3.2.1.7.	Referencias.....	168
3.2.2.	Seroprevalencia y Prevalencia de Bronquitis Infecciosa en pollos, gallinas ponedoras y reproductoras pesadas en España.	173
3.2.2.1.	Resumen.....	175
3.2.2.2.	Introducción	175
3.2.2.3.	Material y métodos	176
3.2.2.3.1.	Selección de la población de estudio.....	177
3.2.2.3.2.	Procedimientos de muestreo.....	178
3.2.2.3.3.	Análisis serológico	178
3.2.2.3.4.	Detección de IBV por RT-PCR.....	179
3.2.2.3.4.1.	Procesamiento de muestras.....	179
3.2.2.3.4.2.	Extracción de ARN.....	179
3.2.2.3.4.3.	Reacción en cadena de la polimerasa con transcriptasa inversa..	180
3.2.2.4.	Resultados	180
3.2.2.4.1.	Seroprevalencia	180
3.2.2.4.2.	Prevalencia	181
3.2.2.4.3.	Cepas variantes de IBV	181
3.2.2.5.	Discusión	182
3.2.2.6.	Agradecimientos	185
3.2.2.7.	Referencias.....	185
CAPÍTULO IV. DISCUSIÓN GENERAL		189
4. DISCUSIÓN GENERAL		191
4.1	Referencias.....	199
CAPÍTULO V. CONCLUSIONES		205
5. CONCLUSIONES		207

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Producción de carne de pollo a nivel mundial (Adaptado AVEC, 2021).....	45
Figura 2. Producción de huevos a nivel mundial (Adaptado Statista, 2022)	48
Figura 3. Biosíntesis de alicina a partir de aliina catalizada por enzimas al cortar el ajo (Reiter, 2020).....	59
Figura 4. Diagrama de Sankey de la distribución de los 5 principales serotipos de <i>Salmonella</i> implicados en casos de salmonelosis humana adquiridos a través de alimentos y animales en la UE (EFSA, 2021)	61
Figura 5. <i>C. jejuni</i> a microscopio electrónico de barrido (Fuente: Agricultural Research Service (ARS), 2008)	66
Figura 6. Número de casos notificado y tasas de notificación de zoonosis humanas confirmadas en la UE durante 2020. (Fuente: EFSA y ECDC, 2021)	67
Figura 7. Colonias de <i>Mycoplasma synoviae</i> cepa 1853 (Fuente: Uriate y col.)	71
Figura 8. Virion de IBV. Preparación teñida en negativo con ácido fosfotúngstico x 3.300.000 aumentos (Fuente: Diseases of Poultry, 2008)	75
Figura 9. Crecimiento de <i>Salmonella</i> spp. en medio semisólido Rappaport-Vassiliadis modificado.	79
Figura 10. Crecimiento de <i>Salmonella</i> spp. en agar XLD (izquierda) y ASAP (derecha).	80
Figura 11. Prueba de confirmación bioquímica (Galería API®).	80
Figura 12. Diagrama del procedimiento para la detección de <i>Salmonella</i> en heces animales y en muestras ambientales de la etapa de producción primaria (Adaptado ISO, 2019).	81
Figura 13. Serotipado. Aglutinacion de cepa de <i>Salmonella</i> spp. frente a diferentes antisueros.	82
Figura 14. Crecimiento de <i>Campylobacter</i> spp. en placa de agar mCCD.....	83

Figura 15. Procedimiento para el recuento de <i>Campylobacter</i> spp. (Adaptado ISO, 2017).....	84
Figura 16. Placa de Mueller Hinton inoculada con <i>Salmonella</i> spp. con discos de antibióticos.	86
Figura 17. Crecimiento bacteriano en placa de Mueller Hinton con tiras Etest® (Fuente: Biomerieux).....	86
Figura 18. Ejemplo de placa de microdilución.....	87
Figura 19. Placa de microdilución inoculada con <i>Salmonella</i> spp. tras 24h de incubación a 37°C.....	88
Figura 20. Test ELISA, reacción colorimétrica tras adición del sustrato.....	89
Figura 21. Tipos de ELISA (Aydin, 2015).....	91
Figura 22. Pasos de un ciclo de PCR (Adaptado Lozano et al., 2005).....	93
Figura 23. Esquema sondas taqman (Adaptado de Lozano et al., 2005).....	93
Figura 24. Curvas de amplificación PCR Real Time.	94
Figura 25. Dendrograma obtenido a partir de secuenciación.	95
Figura 26. Distribución las cepas de <i>Salmonella</i> spp. aisladas en producción avícola (pollos, pavos y ponedoras) de acuerdo al número de antibióticos frente a los que fueron resistentes. El eje X representa el número de antibióticos frente al que las cepas fueron resistentes; el eje Y el número de aislados.	124
Figura 27. Dendrograma de las 20 muestras positivas por PCR a <i>M. synoviae</i> . Las cepas campo aisladas fueron 11 (IZSVE/4504 (1/11), MSK-1 (4/11), MGS 1342 (1/11), MGS 543 (1/11), PASC 8 (3/11), WT4 (1/11))..	165

LISTA DE TABLAS

Tabla 1. Producción de pollo en la Unión Europea y terceros países (producción nacional bruta, tonelada de peso de canal) (Adaptado de AVEC, 2021).	46
Tabla 2. Explotaciones de pollos para carne por clasificación zootécnica y CC.AA. y producción de carne de aves durante 2020 (Adaptado MAPA, 2021).	47
Tabla 3. Producción de huevos en la UE (miles de toneladas) (Adaptado MAPA, 2021).	49
Tabla 4. Explotaciones de gallinas ponedoras por clasificación zootécnica y CC.AA. y producción de huevos durante 2020 (MAPA, 2021).	50
Tabla 5. Sustancias antimicrobianas que deben incluirse en la vigilancia de la AMR, umbrales de resistencia e intervalos de concentración de EUCAST que deben utilizarse para el ensayo con <i>Salmonella</i> spp. (Adaptado UE, 2020).	56
Tabla 6. Tasas de resistencia de aislados de <i>Salmonella</i> en España según antimicrobianos. (Adaptado EFSA, 2021)	57
Tabla 7. Autocontroles en explotaciones avícolas según los Planes Nacionales de Control de <i>Salmonella</i> establecidos en el Reglamento (CE) nº 2160/2003. (Adaptado CECAV, 2021)	65
Tabla 8. Controles de <i>Campylobacter</i> spp. en canales refrigeradas de pollos de engorde establecidos en el Reglamento (CE) nº 1495/2017. (DOUE, 2017).	70
Tabla 9. Panel de concentraciones antimicrobianas de sensititre, después de la adición de 50 µL de caldo inoculado y ECCOFF.	122
Tabla 10. Resumen de resistencias, multirresistencias y número máximo de antibióticos a los que <i>Salmonella</i> fue resistente en pollos, pavos y ponedoras durante 2015-2017. 123	
Tabla 11. Tasas de resistencia de <i>Salmonella</i> aislada de diferentes orientaciones productivas.	125
Tabla 12. Patrones de multirresistencias en cepas de <i>Salmonella</i> spp.	126
Tabla 13. Distribución de la resistencia y multirresistencias de los serotipos de <i>Salmonella</i>	128
Tabla 14. Tasas de resistencia antes y después de la combinación de alicina con antibióticos.	143
Tabla 15. Resistencia de los serotipos de <i>Salmonella</i> antes y después de la aplicación de alicina.	144

Tabla 16. Recuentos de <i>Campylobacter</i> spp. obtenidos en granjas de pollos a partir de heces.	152
Tabla 17. Distribución de la presencia de <i>Campylobacter</i> en granjas de pollos con más de 35 días de vida que exceden los 1.000 UFC/g en función de los meses del año	153
Tabla 18. Tamaño de muestra en ponedoras y reproductoras pesadas de acuerdo a la prevalencia esperada de <i>M. synoviae</i>	159
Tabla 19. Seroprevalencia de <i>M. synoviae</i> de acuerdo a la edad de muestreo.	163
Tabla 20. Títulos medios de <i>M. synoviae</i> de acuerdo al momento de muestreo y orientación productiva.	163
Tabla 21. Porcentaje de muestras positivas a <i>M. synoviae</i> detectadas por ELISA yPCR.	164
Tabla 22. Tamaño de muestra en pollos, ponedoras y reproductoras de acuerdo con la prevalencia esperada de IBV.	177
Tabla 23. Muestras positivas detectadas por ELISA y PCR.	181
Tabla 24. Títulos medios de IBV de acuerdo al momento de muestreo y orientación productiva.	181
Tabla 25. Cepas de IBV detectadas de acuerdo las diferentes orientaciones productivas.	182

ABREVIATURAS

%	Porcentaje
°C	Grados Celsius
ADN	Ácido Desoxirribonucleico
ADNc	Ácido Desoxirribonucleico complementario
AMP	Ampicilina
AMR	Resistencia antimicrobiana (de las siglas en inglés, <i>Antimicrobial resistance</i>)
ARS	Agricultural Research Service
ARP	Aglutinación rápida en placa
ARN	Ácido Ribonucleico
ARNm	Ácido Ribonucleico mensajero
ASAP	Placa de Agar <i>Salmonella</i> AES
ASAV	Asociación Avícola Valenciana
AVEC	Asociación de Productores de Aves de Corral y Comercio de Aves de la Unión Europea
AZI	Azitromicina
Aw	Actividad de agua
BOE	Boletín Oficial del Estado
BPW	Agua de peptona tamponada (de las siglas en inglés, <i>Buffered Peptone Water</i>)
c	Número de unidades de muestreo con valores superiores a m o comprendidos entre m y M
CAV	Virus de la anemia del pollo (de las siglas en inglés, <i>Chicken Anemia Virus</i>)
CC.AA	Comunidad Autónoma
CE	Comisión Europea

CECAV	Centro de Calidad Avícola y de Alimentación Animal de la Comunidad Valenciana
CFSPH	Center for food Security & Public Health
CHL	Cloranfenicol
CMI	Concentración Mínima Inhibitoria
CIP	Ciprofloxacina
CLSI	Instituto de Estándares Clínicos y de Laboratorio
COL	Colistina
CTX	Cefotaxima
DOUE	Diario Oficial de la Unión Europea
EAA	Anomalía del Ápice del Huevo
ECDC	Centro Europeo para la Prevención y Control de enfermedades (de las siglas en inglés, <i>European Center for Disease Prevention and Control</i>)
ECOFF	Punto de corte epidemiológico (de las siglas en inglés, <i>Epidemiological cut-off value</i>)
EEUU	Estados Unidos
EFSA	Autoridad Europea de Seguridad Alimentaria (de las siglas en inglés, <i>European Food Safety Authority</i>)
ELISA	Prueba inmunoenzimática ligada a enzimas (siglas en ingles, <i>Enzyme-Linked Immunosorbent Assay</i>)
EUCAST	Comité Europeo de Pruebas de Susceptibilidad a los Antimicrobianos
FAO	Organización para la Agricultura y la Alimentación
FAV	Hepatitis por cuerpos de inclusión (de las siglas en inglés, <i>Fowl Adenovirus</i>)
FOT	Cefotaxima
FRET	Transferencia de energía de resonancia fluorescente
g	Gramos
GEN	Gentamicina

GSH	Glutation
h	Horas
IBD	Bursitis infecciosa
IBV	Virus de la Bronquitis Infecciosa Aviar
ILT	Laringotraqueítis infecciosa
ISO	Organización Internacional de Normalización (de las siglas en inglés, <i>International Organization of Standardization</i>)
kb	Kilobases
m	Valor mínimo
mm	Milímetros
M	Valor máximo
MAPA	Ministerio de Agricultura, Pesca y Alimentación
MARM	Ministerio de Medio Ambiente, y Medio Rural y Marino (actual MAPA)
MBD	Minima concentración bactericida
mCCD	Desoxicolato-Cefoperazona-Carbón modificado
MDR	Multirresistencia (de las siglas en inglés, <i>Multidrug Resistance</i>)
MERO	Meropenem
Mg	Magnesio
MG	<i>Mycoplasma gallisepticum</i>
min	Minutos
mL	Mililitros
MS	<i>Mycoplasma synoviae</i>
MSRV	Medio Semisólido Modificado Rappaport Vassiliadis (de las siglas en inglés, <i>Modified Semi-Solid Rappaport Vassiliadis</i>)
n	Número de unidades de muestra
NAD	Nicotinamida adenina dinucleótido

NAL	Acido Nalidixico
NC	Nivel de confianza
ND	No disponible
NGS	Next-Generation Sequencing
nm	Nanómetro
OIE	Organización Mundial de sanidad animal.
OMS	Organización mundial de la salud
PBS	Tampón Fosfato salino (siglas en inglés, <i>Phosphate-Buffered Saline</i>)
PCR	Reacción en Cadena de la Polimerasa (de las siglas en inglés, <i>Polimerase Chain reaction</i>)
PCH	Prácticas Correctas de Higiene
PNCS	Plan Nacional de Control de <i>Salmonella</i>
PRAN	Plan Nacional de Resistencias a Antibióticos
RAE	Real Academia de la Lengua Español
REGA	Registro General de Explotaciones Ganaderas
RIA	Radioinmunoensayo
RPM	Revoluciones por minuto
RT-PCR	Reacción en Cadena de la Polimerasa con Retrotranscriptasa Inversa
RVS	Rappaport-Vassiliadis con soja
s.f.	Sin fecha
sec	Segundos
SMX	Sulfametoxazol
Spp.	Especies
TET	Tetraciclina
TAZ	Ceftazidima

TGC	Tigeciclina
TMP	Trimetoprim
TRT	Rinotraqueítis del pavo
TSI	Triple hierro azucar (siglas en inglés, Triple Sugar Iron)
UE	Unión Europea
UFC	Unidades formadoras de colonia
XLD	Xilosa-Lisina-Desoxicolato
XLT4:	Xilosa Lisina Tergitol-4
µg	Microgramos
µL	Microlitros
µm	Micrómetro

CAPÍTULO I. INTRODUCCIÓN GENERAL

1. INTRODUCCIÓN

1.1. Avicultura

La avicultura se encuentra definida por la Real Academia Española (RAE) como la cría de aves y/o el conjunto de técnicas y conocimientos relativos a la cría de las aves. Esta palabra procede del latín *avis* (ave) y el sufijo *-cultura* (cuidado) (RAE, 2022).

El origen de la avicultura se remonta a miles de años, ya que evidencias arqueológicas sugieren que las gallinas domésticas (*Gallus gallus*) ya existían en China desde hace 8.000 años y, posteriormente, se expandieron hacia Europa occidental (Alders, 2005). En la península Ibérica los restos más antiguos hallados datan de entre los 800 y 600 a.C. La motivación de la expansión de esta especie radicaba en ritos religiosos (sacrificos), espectáculos (peleas de gallos) y en el consumo (carne, huevos etc.) (Camps i Rabadá, 2015). El origen, por tanto, es asiático, pero debido a su capacidad de adaptación y a la gran cantidad de razas locales existentes, hoy la especie *Gallus gallus* está presente en casi todo el mundo, siendo una de las fuentes de proteínas más completa a través de la carne y el huevo.

Hasta el siglo XX la avicultura en España era una actividad ligada al medio rural fundamentada en la subsistencia y el autoconsumo. Sin embargo, a partir de la década de los 60, junto al desarrollo socioeconómico español, se produjo una demanda de proteína animal haciendo que la ganadería en general se independizara de la tierra y se dirigiera hacia especies de mayor producción y productividad, entre ellas las aves, mediante la selección de razas y la alimentación equilibrada mediante piensos. La avicultura fue pionera en desarrollarse sobre varios pilares fundamentales: genética, nutrición, manejo y sanidad aviar (Tortuero, 2009).

1.2. Estructura de la producción avícola actual en España

El sector avícola es una parte del sector ganadero de gran importancia en España que se ha ido modificando y diversificando con el paso de los años. Esto ha dado lugar al desarrollo de diferentes sistemas productivos tanto en el sector carne como en el de puesta. La clasificación de las explotaciones avícolas de producción se encuentra definida por el apartado 1 del anexo III del Real Decreto 479/2004, de 26 de marzo, donde dependiendo de la actividad o actividades a que se dediquen, se diferenciarán según la siguiente clasificación zootécnica (MAPA, 2004):

- Selección
- Multiplicación
- Recría de aves de cría o reproductoras para carne o para puesta
- Recría de aves de explotación o de producción para carne o para puesta
- Producción para carne
- Producción para puesta
- Producción de especies de caza para suelta o repoblación
- Producción para otros fines
- Cebo de palmípedas grasas
- Incubadoras.

En este contexto, esta tesis se centra en explotaciones de producción para carne (explotaciones de broilers y pavos), explotaciones de producción para puesta (producción de huevos) y explotaciones de multiplicación, es decir, de reproductoras pesadas (producción de huevos para la obtención de pollos).

1.2.1. Explotaciones de producción de carne

El mayor volumen de producción avícola que predomina es el pollo de engorde de alta selección genética, también conocido como “pollo para carne” o “broiler”. Aunque inicialmente el término de broiler se aplicó a animales comercialmente destinados a asadero (“to broil” en inglés significa “asar”), en la actualidad se emplea la palabra broiler para designar, independientemente de su destino comercial, a un ave joven, macho o hembra, procedente de un cruce genéticamente seleccionado, de la especie *Gallus gallus*, para alcanzar una alta velocidad de crecimiento y un buen rendimiento de la canal, con la formación de notables masas musculares. Su rápido ciclo de producción ha sido el factor fundamental que ha contribuido a convertir al broiler en la base principal de la producción masiva de carne de ave, representando así el principal exponente de esta producción (6-7 semanas) (Catalá-Gregori, 2007).

La producción de pavos (*Meleagris gallopavo*), es la segunda producción de importancia económica en nuestro país con una tendencia al crecimiento y con buenas

perspectivas de futuro. El pavo tiene origen en México siendo introducido en Europa en el siglo XVI. Durante siglos ha sido seleccionado para conseguir animales de mayor tamaño, crecimiento vigoroso y carne apetecible para el consumo. Las variedades de granja o los pavos domésticos (*Meleagris gallopavo gallopavo*) son seleccionadas a partir de la especie *Meleagris gallopavo* e hibridaciones con otras subespecies. Tras inicialmente ser un consumo estacional (navidad), su consumo se ha extendido al resto del año por las propiedades nutritivas de la carne. La producción del pavo se divide en tres fases: la cría, que se extiende desde la primera a la cuarta semana; crecimiento, desde la cuarta a la octava semana; y engorde, desde la octava semana hasta su sacrificio. En general, los ciclos productivos del pavo comercial se extienden hasta 18-20 semanas en el caso de las hembras y hasta las 24 semanas en machos (Región de Murcia digital, s.f).

1.2.2. Explotaciones de producción para puesta

Dentro de las explotaciones destinadas a la producción intensiva de huevos, debemos distinguir entre explotaciones de producción en batería, la cría ecológica, la alternativa y las de autoconsumo. En la actualidad, la mayor parte de la producción de huevos en España se realiza en ponedoras criadas en jaulas en batería (76,8%). Aunque la cría en granjas alternativas (camperas y suelo) y ecológicas en la actualidad es más reducida (23,2%), la tendencia es a incrementar en importancia poco a poco, como consecuencia de la demanda creciente por parte de los consumidores (INPROVO, 2019). En el marco en el que está realizada esta tesis, nos centraremos en granjas de producción intensiva en batería.

Las gallinas ponedoras comerciales son la base animal para la producción de huevos de consumo. Las gallinas ponedoras son híbridos de razas ligeras (Leghorn) en el caso de producción de huevo blanco, o semipesadas (Rhode Island, New Hampshire, Plymouth Rock) en huevo moreno (Junta Andalucía, 2008). Estas gallinas son genéticamente seleccionadas para la producción de más y mejores huevos acordes a la demanda del mercado. Son aves con alta capacidad de adaptación, pudiendo llegar a producir un huevo cada 24 horas (AECA-WPSA, 2005). En explotaciones de producción de huevos en batería el proceso comienza con la entrada de las pollitas a una edad aproximada de 17 semanas, iniciándose la puesta entre las 19-20 semanas de edad y se prolonga este periodo entre 385-450 días. Los animales se alojan en jaulas que

siguen la normativa vigente de bienestar animal (MAPA, 2010). Además de este esquema de producción industrial, existe en España un número importante de ponedoras destinadas a autoconsumo.

1.2.3. Explotaciones de multiplicación

Mientras que las gallinas ponedoras de huevos comerciales están seleccionadas para la mayor producción de huevos, las gallinas reproductoras son aves reproductoras seleccionadas con el objetivo de que se produzca el mayor número de pollos vigorosos de un día de edad, combinando un nivel elevado de puesta de huevos con un buen nivel de incubabilidad. Este es un proceso largo, donde la puesta se prolonga durante 9-10 meses, aunque la producción global no es elevada ya que no se suelen superar los 150-160 huevos/ciclo (Callejo Ramos, 2019).

1.3. Situación actual de la producción avícola

La carne de pollo y los huevos son dos de los productos más consumidos por la población mundial según la Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación y Agricultura (FAO). El consumo de los productos de origen avícola, y de alimentos de origen animal en general, ha aumentado rápidamente en las últimas décadas. Este incremento en el consumo es atribuido al crecimiento demográfico, precio asequible, bajo contenido en grasa, alto índice proteico y a pocas restricciones religiosas y culturales (FAO, 2020).

Este aumento en el consumo de alimentos de origen animal ha inducido la implantación y desarrollo de sistemas ganaderos de características tales que se pueda satisfacer de forma rápida esa creciente demanda, conocido como ganadería intensiva industrializada. La ganadería intensiva actual se caracteriza, entre otros aspectos, por la elevada concentración animal en determinadas áreas geográficas, ocupando las granjas unas superficies relativamente reducidas (Generalitat Valenciana, 2008).

1.3.1. Producción de carne

Con respecto a los datos de la avicultura a nivel mundial, la producción de carne de pollo en el año 2021 ascendió a 120 millones de toneladas de peso de canal. Los principales productores de carne de pollo a nivel mundial son EEUU (16,8%), China (12,2%), Brasil (11,5%) y Europa (9,3%) tal y como podemos observar en la **Figura 1**.

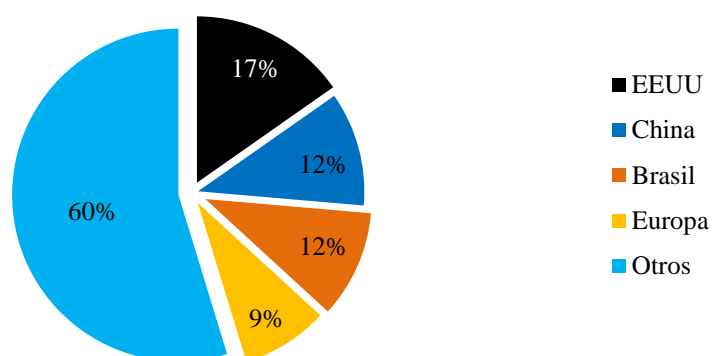


Figura 1. Producción de carne de pollo a nivel mundial (Adaptado AVEC, 2021)

Dentro de los 27 estados miembros de la Unión Europea, España fue el cuarto productor en 2020 y 2019, y el tercero de 2015 a 2018 detrás de Polonia, Alemania y Francia (**Tabla 1**), (AVEC, 2021).

Tabla 1. Producción de pollo en la Unión Europea y terceros países (producción nacional bruta, tonelada de peso de canal) (Adaptado de AVEC, 2021).

	2015	2016	2017	2018	2019	2020
Austria	102	107	110	114	117	118
Bélgica/Luxemburgo	445	453	455	462	440	450
Bulgaria	85	86	87	87	89	90
Chipre	23	24	25	25	27	25
República Checa	160	159	165	170	174	175
Dinamarca	146	155	154	157	167	165
Estonia	20	20	20	19	20	21
Finlandia	108	113	122	127	132	135
Francia	1.139	1.133	1.163	1.185	1.187	1.176
Alemania	1.285	1.290	1.300	1.345	1.340	1.330
Grecia	173	156	151	185	185	185
Hungría	365	394	409	414	136	454
Irlanda	110	160	180	190	205	206
Italia	929	981	1.034	1.101	1.015	1.030
Croacia	69	67	67	69	70	70
Letonia	30	30	33	33	35	36
Lituania	105	105	126	103	97	100
Malta	4	4	4	4	4	4
Países Bajos	986	1.036	1.034	1.038	1.036	1.047
Polonia	1.699	-	2.055	2.116	2.207	2.180
Portugal	271	278	287	289	294	289
Rumanía	350	360	388	415	415	420
Eslovaquia	70	57	80	80	80	80
Eslovenia	54	62	63	64	65	69
España	1.203	1.268	1.250	1.191	1.151	1.147
Suecia	113	136	148	150	54	159
EU-27	10.043	10.511	10.909	11.032	11.142	11.160
Reino Unido	1.456	1.535	1.630	1.750	1.749	.

Durante 2020 se produjeron en España 1,15 millones de toneladas de peso de canal de pollo. La producción de carne de pollo en España se concentra principalmente en cuatro comunidades autónomas: Andalucía (25,5%), Cataluña (21,5%), Galicia (13,3%) y Comunidad Valenciana (10,9%) (MAPA, 2021). La producción avícola de carne, por tanto, se trata de un sector importante para la economía de determinadas zonas ganaderas de nuestro país. La distribución de la producción de carne de aves durante el año 2020 se encuentra reflejada en la **Tabla 2**.

Tabla 2. Explotaciones de pollos para carne por clasificación zootécnica y CC.AA. y producción de carne de aves durante 2020 (Adaptado MAPA, 2021).

CC.AA.	Granjas de Selección	Granjas de Multiplicación	Granjas de Producción	Granjas de cría (aves de cría)	Producción (tm) carne de aves	%
Andalucía	0	27	759	26	438.446	25,5
Aragón	3	21	385	20	1.408	0,1
Principado de Asturias	0	0	9	0	0	0
Illes Balears	0	0	18	0	251	0,01
Canarias	3	1	47	8	14.235	0,8
Cantabria	0	0	8	1	0	0
Castilla La Mancha	4	22	385	13	65.146	3,8
Castilla y León	7	13	442	7	126.614	7,4
Cataluña	6	153	929	18	368.813	21,5
Extremadura	3	1	344	0	78.360	4,6
Galicia	0	46	848	18	227.986	13,3
Madrid	0	0	6	0	52.415	3,1
Región de Murcia	0	3	212	2	DC	-
Comunidad F. Navarra	0	13	109	6	86.930	5,1
País Vasco	5	8	58	4	DC	-
La Rioja	0	1	46	0	DC	-
Comunidad Valenciana	2	16	401	6	187.912	10,9
ESPAÑA	33	325	5.006	129	1.717.880 (1.400.215 Broilers)	

DC: Dato confidencial. (Datos provisionales 2020)

Con relación a la producción de carne de pavo la producción a nivel mundial es menor con una tendencia muy estable, con 5,89 millones de toneladas de peso de canal anualmente. El mayor productor es EE.UU., seguido de Brasil y Europa (FAO, 2021). A nivel europeo se produjeron durante 2020, 1,9 millones de toneladas de peso de canal de carnes de pavo. España ocupa el tercer lugar como productor de carne de pavo, con 238 mil toneladas de peso de canal, por detrás de Alemania y Polonia (AVEC, 2021).

En España, se ha incrementado la producción de carne de pavo un 50% en los últimos 5 años, pasando de 158.000 toneladas a 238.000 toneladas en 2020. A nivel de CC.AA, destacan Andalucía, Cataluña y la Comunidad Valenciana con 109.000, 67.000 y 25.000 toneladas respectivamente (MAPA, 2021).

En la Comunidad Valenciana el 47% de la carne sacrificada perteneció al sector avícola, con 198.682 toneladas, distribuyéndose un 64% en Valencia, 18% en Alicante y 16,8% en Castellón.

1.3.2. Producción de huevos

La producción de huevos continúa experimentando un crecimiento sustancial en la última década. Según los datos publicados por la FAO, la producción total de huevos en el mundo ascendió a 86,67 millones de toneladas en 2020. China es el mayor productor de huevos con un 34% de la producción mundial. Tras China, otros países productores de huevos fueron Europa (9%), EE.UU. (8%), India (7%) y Mexico (4%) (Statista, 2022) (**Figura 2**).

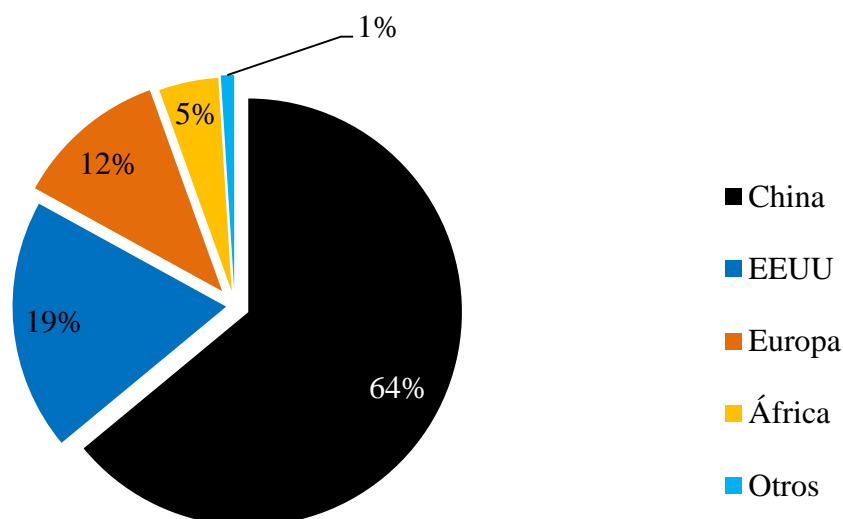


Figura 2. Producción de huevos a nivel mundial (Adaptado Statista, 2022)

A nivel de la Unión Europea, España ocupa el tercer puesto en producción de huevos por detrás de Alemania y Francia, con una producción de 918.000 toneladas de huevos en 2020, representando el 13,1% de producción de huevos en Europa. (MAPA, 2021) (**Tabla 3**).

Tabla 3. Producción de huevos en la UE (miles de toneladas) (Adaptado MAPA, 2021).

	2020	%
Austria	129	1,8
Bélgica/Luxemburgo	205	2,9
Bulgaria	94	1,34
Chipre	11	0,16
República Checa	177	2,5
Dinamarca	92	1,3
Estonia	10	0,14
Finlandia	76	1,1
Francia	943	13,4
Alemania	958	13,7
Grecia	128	1,8
Hungría	138	1,9
Irlanda	65	0,92
Italia	805	11,5
Croacia	45	0,6
Letonia	42	0,6
Lituania	51	0,7
Malta	7	0,1
Países Bajos	703	10,0
Polonia	635	9,1
Portugal	138	2,0
Rumanía	380	5,4
Eslovaquia	71	1,0
Eslovenia	22	0,3
España	918	13,1
Suecia	149	2,1
EU-27	7001	100

El número de explotaciones de aves de puesta en España ha aumentado de manera significativa en los últimos años. En 2021 el número total ascendió a 1.821 explotaciones, lo que supone un incremento del 3,6% respecto 2019. En cuanto a datos productivos a nivel de CC.AA destacan Castilla La Mancha con un 24,9% de la producción, seguido de Castilla y León (16,1%), Aragón (14,3%) y la Comunidad Valenciana (10,3%) (MAPA, 2021).

En la Comunidad Valenciana la producción de huevos de gallina fue de 116.288 docenas. El 86% se produjo en la provincia de Valencia, el 9% en Castellón y 5% en Alicante (**Tabla 4**).

CAPÍTULO I. INTRODUCCIÓN GENERAL

Tabla 4. Explotaciones de gallinas ponedoras por clasificación zootécnica y CC.AA. y producción de huevos durante 2020 (MAPA, 2021).

CC.AA.	Granjas de Selección	Granjas de Multiplicación	Granjas de Producción	Granjas de cría (aves de cría)	Producción (miles de docenas, 2019)	%
Andalucía	2	1	1733	0	56.115	5,2
Aragón	0	0	59	43	155.591	14,3
Principado de Asturias	0	2	19	0	3.364	0,3
Illes Balears	0	0	30	6	6.534	0,6
Canarias	0	1	167	51	29.753	2,7
Cantabria	0	0	28	1	1.574	0,1
Castilla La Mancha	0	0	110	54	270.603	24,9
Castilla y León	6	7	138	25	174.846	16,1
Cataluña	1	27	271	63	95.791	8,8
Extremadura	0	0	52	2	31.730	2,9
Galicia	2	8	84	57	40.132	3,7
Madrid	0	0	30	2	16.307	1,5
Región de Murcia	0	1	23	3	30.871	2,8
Comunidad F. Navarra	0	0	57	8	28.455	2,6
País Vasco	3	0	90	4	31.085	2,9
La Rioja	1	1	14	3	3.723	0,34
Comunidad Valenciana	0	2	71	17	111.653	10,3
ESPAÑA	15	50	1417	339	1.088.127	100

1.4. Control sanitario en el sector avícola

Algunos de los retos a los que se enfrenta la avicultura intensiva se encuentran enmarcados en el ámbito de la sanidad animal y salud pública. Para evitar la introducción y diseminación de enfermedades que pueden producir una alteración sanitaria, del bienestar animal, pérdidas económicas y repercusiones sobre la salud pública (MAPA, 2021) es necesario implantar programas sanitarios y medidas de bioseguridad en las explotaciones del sector. Estos van encaminados a la prevención y control de procesos infectocontagiosos y parasitarios desde el punto de vista tanto de sanidad animal como de salud pública.

En la actualidad existen diferentes normativas tanto comunitarias como nacionales que regulan las explotaciones avícolas desde el punto de vista sanitario y de salud pública, como son entre otras:

- Real Decreto 1888/2000, de 22 de noviembre, por el que se establecen las condiciones de sanidad animal aplicables a los intercambios intracomunitarios y las importaciones de aves de corral y de huevos para incubar procedentes de países terceros.
- Real Decreto 640/2006, de 26 de mayo, por el que se regulan determinadas condiciones de aplicación de las disposiciones comunitarias en materia de higiene, de la producción y comercialización de los productos alimenticios.
- Real Decreto 479/2004, de 26 de marzo, por el que se establece y regula el Registro general de explotaciones ganaderas.
- Real Decreto 1940/2004, de 27 de septiembre, sobre la vigilancia de las zoonosis y los agentes zoonóticos.
- Real Decreto 637/2021, de 27 de julio, por el que se establecen las normas básicas de ordenación de las granjas avícolas.

En la actualidad se desarrollan los siguientes programas nacionales que conllevan una vigilancia y control oficial: Programas Nacionales de *Salmonella* spp. en manadas de *Gallus gallus* de reproducción, de puesta, broilers y manadas de pavos de reproducción y de engorde y el Programa de vigilancia de la **Influenza Aviar** (MAPA, 2021).

Sin embargo, debido al constante crecimiento de la industria y a la exigencia del consumidor desde el punto de vista de calidad y seguridad de los productos avícolas, el sector asume importantes retos desde el punto de vista tanto de salud pública como de sanidad animal de otros patógenos que deben tenerse en cuenta en los programas de control sanitarios en las explotaciones.

Desde el punto de vista de salud pública destacamos dos de los patógenos zoonóticos con mayor importancia, *Salmonella* spp. y *Campylobacter* spp.

Por otro lado, por su importancia en la salud de los animales, como por su impacto en los resultados productivos y su repercusión económica sobre la actividad ganadera, son importantes algunas enfermedades víricas como la bronquitis infecciosa (Infectious Bronchitis Virus; IBV) y sus cepas variantes; la enfermedad de Gumboro (Infectious Bursal Disease; IBD), la anemia infecciosa (Chicken Anemia Virus; CAV), la laringotraqueítis infecciosa (Infectious Laryngotracheitis; ILT), la rinotraqueítis (Turkey Rhinotracheitis; TRT) o la hepatitis por cuerpos de inclusión (Fowl Adenovirus; FAV); y enfermedades bacterianas como las micoplasmosis por *Mycoplasma gallisepticum* (MG), *Mycoplasma synoviae* (*M. synoviae*; MS).

La vigilancia y la monitorización de estas enfermedades es esencial para conocer su prevalencia y cepas variantes circulantes con el fin de ajustar los programas sanitarios de control apropiados. En este contexto, por su importancia a nivel de salud pública y sanidad animal 4 de estos patógenos con gran impacto en el sector avícola fueron objeto de esta tesis, *Salmonella* spp., *Campylobacter* spp., *M. synoviae* e IBV.

1.5. Resistencias a los antibióticos

La resistencia a los antimicrobianos (AMR, de las siglas en inglés *antimicrobial resistance*) surge cuando algunos microorganismos como bacterias, virus, hongos y parásitos se adaptan a lo largo del tiempo y dejan de responder a los tratamientos comunes (antibióticos, desinfectantes etc.), lo que complica el tratamiento de las infecciones, incrementando su propagación, aparición de formas más graves y mayores tasas de muerte. Como consecuencia de la aparición de resistencias, los antibióticos y otros medicamentos antimicrobianos se vuelven ineficaces, por lo que las infecciones son cada vez más difíciles o imposibles de tratar (OMS, 2020).

Existen dos tipos de resistencia:

- Resistencia natural o intrínseca, por carecer de la diana sobre la que actúa el antibiótico en cuestión.
- Resistencia adquirida, por modificación de la carga genética de la bacteria que puede aparecer por mutación cromosómica o por mecanismos de transferencia genética (vertical u horizontal). La resistencia transmisible es la más relevante, puede estar mediada por plásmidos, transposones o integrones, que pueden pasar de una bacteria a otra (García Rodríguez et al., 1997).

Los mecanismos de desarrollo de resistencias de las bacterias son 3, la inactivación del antibiótico por enzimas, modificaciones bacterianas que impiden la llegada del antibiótico al punto diana y alteración por parte de la bacteria de su punto diana. Una misma bacteria puede desarrollar varios mecanismos de resistencia frente a uno o varios antimicrobianos, del mismo modo que un antimicrobiano puede ser inactivado por diferentes mecanismos de diferentes especies bacterianas (Daza, 1998). A su vez, con frecuencia, las cepas resistentes a una familia de antimicrobianos suelen ser resistentes también a otras familias de compuestos que no están relacionados por sus mecanismos de acción o de resistencia (Alekhshun et al., 2007).

1.5.1. Resistencias y salud pública

El fenómeno de la resistencia no es nuevo. En un principio se reconoció como una curiosidad científica para posteriormente convertirse en una amenaza a la eficacia de los tratamientos (OMS, 2001). El desarrollo de la resistencia puede desencadenarse por diferentes factores, como el uso inadecuado de antimicrobianos en medicina

humana a nivel de atención primaria y hospitalaria, el uso de antibióticos inadecuados en veterinaria, condiciones y prácticas de higiene deficientes en la cadena alimentaria que propician la transmisión de microorganismos resistentes (EFSA, 2021). Se trata entonces de un problema que debe enfocarse desde la perspectiva del “One Health” que integre tanto la salud humana y la sanidad animal, ya que este problema causa 33.000 muertes al año en Europa y genera un gasto sanitario adicional de 1.500 millones de euros anuales (PRAN, 2018).

Los agentes antimicrobianos utilizados en veterinaria y medicina humana en Europa son los mismos o pertenecen a las mismas familias, aunque la vía de administración y la dosificación difiere entre humanos y animales. Las resistencias producidas en los animales destinados a la producción de alimentos podrían propagarse a través de los alimentos a los seres humanos, convirtiéndose en un problema de salud mundial cuando estas bacterias resistentes son agentes zoonóticos como *Salmonella* spp., *Campylobacter* spp. y algunas cepas de *Escherichia coli* (EFSA, 2021). En el caso particular de la medicina veterinaria, los antibióticos en el pasado fueron ampliamente utilizados tanto terapéutica y profilácticamente y como promotores de crecimiento en muchas especies de producción (Usera et al., 2002). Sin embargo, tras la toma de conciencia del problema, el consumo de antibióticos en veterinaria en España registró una reducción del 58,8% entre 2014-2019, con un cambio de tendencia a la baja muy significativo (PRAN, 2018).

En relación a la transmisión de microorganismos resistentes a través de los alimentos, datos del PRAN revelaron que analizando globalmente el consumo de antibióticos y de resistencias (consumo comparado con resistencia), tanto en personas comparadas con personas, como en animales comparado con animales y en animales comparado con personas, se demostró la existencia de correlación positiva entre el consumo de antibióticos y las tasas de resistencia, máxima en el caso animal comparado con animal y mínima entre animal comparado con personas. Por tanto, la reducción en el consumo de antibióticos tendría su mayor repercusión en la reducción de resistencias del mismo conjunto poblacional, personas o animales, aunque se espera que la reducción del uso de antibióticos en veterinaria tenga efectos beneficiosos sobre los porcentajes de resistencias en bacterias aisladas de personas (PRAN, 2018).

1.5.2. Programas de vigilancia de las resistencias antimicrobianas

La aparición y evolución de las cepas resistentes se ha convertido en un problema mundial que preocupa tanto en medicina veterinaria como en salud pública, por lo que monitorizar las resistencias a antibióticos de las cepas de microorganismos zoonóticos, es esencial para proporcionar información sobre la magnitud del problema y las tendencias de resistencias.

Debido a ello, en la UE se estableció en 2014 la Decisión de Ejecución 2013/652/UE de la Comisión modificada en 2020 por la Decisión de ejecución (UE) 2020/1729 de la Comisión, donde el monitoreo de AMR es obligatorio en *Salmonella* spp., *C. jejuni* y el indicador comensal *E. coli* en las principales poblaciones animales de producción nacional y su carne derivada, correspondientes a diferentes tipos de producción para recopilar datos que podrían combinarse con los de exposición a antimicrobianos (CE, 2013). El seguimiento se realiza de forma rotativa, teniendo como objetivo los cerdos de engorde y los bovinos menores de 1 año y su carne derivada en los años impares y las poblaciones de aves de corral y su carne derivada en los años pares, tal y como establece la legislación. En esta directiva se describe el grupo de sustancias antimicrobianas que deben incluirse en la vigilancia de la AMR, umbrales de resistencia a intervalos de concentración de EUCAST que deben utilizarse para el ensayo con los diferentes microorganismos.

Por otro lado, a nivel nacional en 2014 se implantó en España el Plan Nacional de Resistencias a Antibióticos (PRAN) para el periodo 2014-2018, y recientemente prorrogado hasta 2021 (MAPA, 2018). Así mismo el sector avícola español ha accedido voluntariamente a adherirse al programa nacional REDUCE en 2020. El principal objetivo de este convenio es el uso racional de los antibióticos y proponer planes preventivos de salud gracias al desarrollo de nuevas medidas terapéuticas más eficaces que permitan reducir el uso de antibióticos.

1.5.3. Actualidad de las resistencias de *Salmonella* spp. en avicultura

En cuanto a *Salmonella* spp., la relevancia del agente zoonótico aumenta con la aparición de las cepas resistentes. Aunque la mayoría de los casos de salmonelosis en humanos son autolimitantes y suelen resolverse sin necesidad de tratamiento con antibióticos, en casos graves o pacientes inmunocomprometidos puede ser necesaria la antibioterapia con ciprofloxacina en adultos y ceftriaxona en niños (Berrang et al.,

2009). Las consecuencias de la aparición de multirresistencias son la mayor frecuencia de fracasos de tratamiento, mayor gravedad de la infección y mayor tasa de mortalidad tras infección con estas cepas (PRAN, 2018). Por ello, este microorganismo se encuentra bajo la vigilancia de AMR establecida en la UE, quien estableció el grupo de sustancias antimicrobianas y los umbrales de resistencia a intervalos de concentración de EUCAST que deben utilizarse ((Tabla 5).

Tabla 5. Sustancias antimicrobianas que deben incluirse en la vigilancia de la AMR, umbrales de resistencia e intervalos de concentración de EUCAST que deben utilizarse para el ensayo con *Salmonella* spp. (Adaptado UE, 2020).

Antimicrobiano	Tipo de antimicrobiano	Umbrales interpretativos de la AMR (mg/ l)		Intervalos de concentración (mg/ L)(número de pocillos)
		Valor de corte epidemiológico	Valor crítico	
Amicacina	Aminoglucósido	> 4 *	> 16	4-128 (6)
Ampicilina	Penicilina	> 8	> 8	1-32 (6)
Azitromicina	Macrólido	ND	ND	2-64 (6)
Cefotaxima	Cefalosporina	> 0,5	> 2	0,25-4 (5)
Ceftazidima	Cefalosporina	> 2	> 4	0,25-8 (6)
Cloranfenicol	Fenicol	> 16	> 8	8-64 (4)
Ciprofloxacina	Fluoroquinolona	> 0,06	> 0,06	0,015-8 (10)
Colistina	Polimixina	ND	> 2	1-16 (5)
Gentamicina	Aminoglucósido	> 2	> 4	0,5-16 (6)
Meropenem	Carbapenem	> 0,125	> 8	0,03-16 (10)
Ácido nalidíxico	Quinolona	> 8	ND	4-64 (5)
Sulfametoxazol	Antifolato	ND	ND	8-512 (7)
Tetraciclina	Tetraciclina	> 8	ND	2-32 (5)
Tigeciclina	Gliciliclina	ND	ND	0,25-8 (6)
Trimetoprim	Antifolato	> 2	> 4	0,25-16 (7)

ND: no disponible. *umbral provisional de EUCAST.

Según últimos datos aportados por la EFSA en 2018, acerca de las resistencias de *Salmonella* spp. a los antimicrobianos utilizados en veterinaria de forma común, señalaron que se encontraron datos de resistencia del 59,5% en canales de pollo, con un 32,7% de multirresistencia (MDR, de las siglas en inglés), considerando multirresistencia la resistencia a 3 o más familias de antibióticos. Con relación a las canales de pavos, la resistencia fue del 71,2%, siendo el 15,1% de los aislados MDR. En

España, la tasa de resistencias en canales de broilers fue del 48,9%, con un 15,9% de multirresistencias. Con respecto los pavos, el 100% de los aislados fue resistente y un 27,3% presentó MDR.

Por otro lado, también se dispone de datos de resistencia de *Salmonella* spp. de muestras aisladas a nivel de granja. Los datos reportados a nivel de la UE mostraron que el 61% de las aislados en broilers presentó resistencia, siendo el 38,2% MDR. En los pavos, se presentaron tasas del 72,9% de AMR y 38,8% MDR. A nivel de gallinas ponedoras los niveles fueron menores, la tasa de resistencia fue del 23,6% y la de multirresistencia del 6,5%. En España a nivel de granja, los aislados de *Salmonella* spp. en broilers presentaron el 51,8% de AMR y un 31,8% fue MDR. En granjas de pavos, la AMR fue del 80,6% y la MDR del 54,7%. Por el contrario, los aislados de *Salmonella* spp. en granjas de gallinas ponedoras únicamente presentaron una tasa de AMR el 17,8% con un 4,1% de MDR. (EFSA, 2021)

De forma general en España las mayores tasas de resistencia a antibióticos se encontraron en broilers, pavos y ponedoras a ácido nalidíxico, ciprofloxacina, sulfometoxazol, trimetoprim y tetraciclinas (**Tabla 6**).

Debido a la relevancia de la evolución de las resistencias en avicultura, en uno de los capítulos de esta Tesis Doctoral se evaluó la resistencia de cepas de *Salmonella* spp. y su evolución en tres orientaciones productivas en avicultura en la Comunidad Valenciana durante 3 años consecutivos (2015-2018).

Tabla 6. Tasas de resistencia de aislados de *Salmonella* en España según antimicrobianos. (Adaptado EFSA, 2021)

Tipo de animal	GEN	CHL	AMP	CTX	TAZ	MERO	TGC	NAL	CIP	AZI	COL	SMX	TMP	TET
Granjas broilers	2,6	0	0	0	0	0	0	69,2	69,2	0	0	64,1	48,7	64,1
Granjas pavos	0	0	0	0	0	0	0	91,7	91,7	0	0	25	25	25
Granjas ponedoras	0	0	0	0	0	0	0	14,3	14,3	0	0	9,5	4,8	9,5

GEN: gentamicina; CHL: cloramfenicol; AMP: ampicilina; CTX: cefotaxima; TAZ: Ceftazidima; MERO: meropenem; TGC: tigecline, NAL: ácido nalidixico; CIP: ciprofloxacina; AZI: azitromicina; COL: colistin; SMX: sulfamethoxazole; TMP: trimetoprim; TET: tetracycline.

1.5.4. Estrategias alternativas de reducción de resistencias

Las alternativas a los antibióticos seguras y eficaces pueden ayudar a minimizar la necesidad del uso de antibióticos para prevenir y controlar las enfermedades en producción animal. En la actualidad, la Organización Mundial de la Salud (OMS) recomienda a los productores que apliquen métodos alternativos a los antibióticos para prevenir y tratar enfermedades infecciosas (Lowenthal et al., 1999). Existen múltiples medidas alternativas para minimizar el uso de antibióticos que incluyen desde cambios en el manejo, bioseguridad, vacunación, alternativas biológicas como la fagoterapia (Sevilla et al., 2020) y el uso estratégico de modificadores de la flora entérica como: acidificantes, probióticos, enzimas, algas, productos derivados de plantas, potenciadores de la microflora e inmunomoduladores (Salim et al., 2018).

Recientemente, ha aumentado el interés en investigar nuevas sustancias naturales con propiedades antimicrobianas tanto para terapia como para su uso en microbiología alimentaria (Belguith et al., 2010). Desde la antigüedad, el hombre ha utilizado plantas para tratar enfermedades infecciosas comunes durante años, como la melisa (*Melissa officinalis*), el ajo (*Allium sativum*) y el árbol del té (*Melaleuca alternifolia*) que se han descrito en manuales de fitoterapia como agentes antimicrobianos de amplio espectro (Heinrich et al., 2004).

Debido al amplio abanico de sustancias naturales, la presente tesis se centró en la efectividad terapéutica del principio activo del ajo (*Allium sativum*), la alicina.

1.5.4.1. Alicina

La alicina es el compuesto organosulfurado responsable de la actividad antibacteriana del ajo caracterizado por primera vez como alicina (tiosulfonato de dialilo) por Cavallito y Bailey (1944).

La alicina se produce a partir del aminoácido aliina (sulfóxido de alilcisteína) por la enzima alinasa. En los dientes de ajo intactos, la aliina y la alinasa se compartimentan en el citoplasma y la vacuola, respectivamente. La alicina se produce tras el daño tisular, cuando la enzima y el sustrato se mezclan (Borlinghaus et al., 2014) (**Figura 3**). A ella se debe el olor característico del ajo recién cortado.

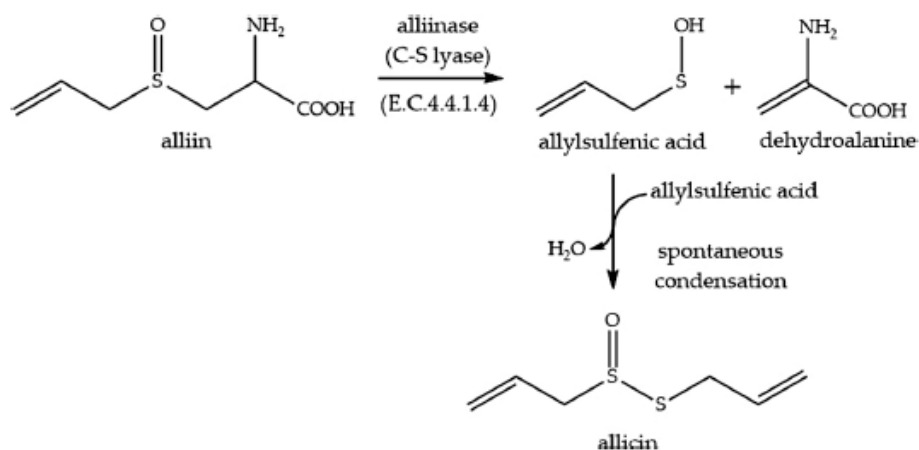


Figura 3. Biosíntesis de alicina a partir de aliina catalizada por enzimas al cortar el ajo (Reiter, 2020)

Entre las propiedades del ajo que se han demostrado en animales están efectos hipolipidémicos, hipotensores, hipoglucémicos, hipotrombóticos e hipoaterogénicos (Shoetan et al., 1984). A su vez también se han demostrado propiedades antivirales (Ankri y Mirelman, 1999), antibacterianas (Sivam, 2001), actividades antifúngicas y antiparasitarias (Ankri y Mirelman, 1999).

La actividad antimicrobiana de la alicina se debe a que es un compuesto químico a base de azufre que reacciona con grupos tiol libres como los que se encuentran en las cisteínas o el glutatión (GSH) (Gruhlke et al., 2019). La reacción con grupos tiol disminuye las reservas celulares de GSH y provoca estrés oxidativo en las células (Rabinkov et al., 2000). Por otro lado, la alicina reacciona también con las cisteínas accesibles de las proteínas (Müller et al., 2016). La S-tioalilación de la cisteína puede inhibir enzimas esenciales o interrumpir la transducción de señales cambiando la conformación tridimensional de las proteínas o evitando la unión del cofactor metálico (Brandes et al., 2009).

Varios autores han descrito la efectividad *in vitro* de la alicina mediante la inhibición y retraso del crecimiento de algunos microorganismos como *Salmonella* spp. (Belguith et al., 2010). Así, en uno de los capítulos de esta Tesis Doctoral se evaluó el efecto *in vitro* de la alicina en combinación con 14 antibióticos frente a los serotipos de *Salmonella* spp. más importantes de origen avícola.

1.6. Enfermedades infecciosas con relevancia en salud pública

1.6.1. Salmonelosis

1.6.1.1. Etiología

Salmonella spp. es un microorganismo perteneciente a la familia Enterobacteriaceae. Los microorganismos del género *Salmonella* spp. son bacilos, gram negativos, anaerobios facultativos y su tamaño oscila de 0,3 a 1 µm x 1,0 a 6,0 µm. Poseen un metabolismo oxidativo y fermentativo, produciendo ácido y a menudo gas durante la fermentación de la glucosa u otros hidratos de carbono, son catalasa positivos y oxidasa negativos (Linder, 1995). La temperatura óptima para *Salmonella* spp. es 37°C, pero podemos observar su crecimiento en un rango de temperaturas que oscila de 5°C a 45°C (Bierer et al., 1961). El pH óptimo para estas bacterias oscila entre 6,6 y 8,2 (Linder, 1995). El valor óptimo de actividad de agua (a_w) para su multiplicación es 0,995, aunque también presenta una gran resistencia a la baja a_w por lo que puede sobrevivir en ambientes secos hasta varias semanas. Incluso se ha descrito la supervivencia de *Salmonella* spp. en agua congelada durante periodos prolongados (Jawetz et al., 2014).

Con excepción de los serotipos gallinarum y pullorum, los demás serotipos son móviles por medio de flagelos peritricos (Popoff, 1992). El género *Salmonella* incluye solo dos especies: *S. enterica* y *S. bongori*. Las serovariedades más comunes que causan infección en humanos y en animales de abasto pertenecen a la subespecie enterica (Grimont y Weill, 2007).

1.6.1.2. Salmonelosis en humanos

1.6.1.2.1. Epidemiología y situación actual

La salmonelosis es la segunda infección gastrointestinal transmitida por lo alimentos con relevancia en la UE tras la campilobacteriosis. Durante 2020 se notificaron 52.702 casos confirmados en la UE, con una tasa del 13,7% por 100.000 habitantes, produciéndose en España 3.526 casos procedentes de 56 brotes de los 694 detectados. Durante este año se registró una disminución de casos frente a 2019 donde se reportó el 19,5% (UE 28). Sin embargo, esta disminución es debida a dos acontecimientos excepcionales ocurridos durante 2020, como fue la salida de Reino Unido de la UE y la pandemia de Covid-19. A nivel estadístico, la tendencia de la

salmonelosis en los últimos 5 años no presentó ni aumento ni disminución estadísticamente significativos (EFSA, 2021).

Una de las principales fuentes de infección de *Salmonella* spp. en humanos es el consumo de productos alimenticios de origen animal, siendo uno de ellos los productos avícolas (productos cárnicos, huevos y ovoproductos). Durante 2020, los alimentos comúnmente involucrados con evidencias en los brotes de salmonelosis fueron los huevos y los ovoproductos (37 brotes), carne de cerdo y productos derivados (11 brotes) y productos de panadería (9 brotes) (EFSA, 2021). Debido a ello, los productos y subproductos del sector avícola son considerados como uno de los principales transmisores de *Salmonella* spp. a través de los alimentos.

Teniendo en cuenta los 5 serotipos principales de *Salmonella* más frecuentes en brotes alimentarios, *Salmonella* Enteritidis (*S. Enteritidis* (1,9,12:g,m:-)), *Salmonella* Infantis (*S. Infantis* (6,7,14:r:1,5), *Salmonella* Typhimurim (*S. Typhimurium* (1,4,[5],12:i:1,2)), *Salmonella* Typhimurim monofásica (*S. Typhimurium* monofásica (1,4,[5],12:i:-)) y *Salmonella* Derby (*S. Derby* (1,4,[5],12:f,g: [1,2]) y las principales fuentes avícolas de transmisión de este agente, se encontró que durante 2020 la transmisión de *S. Enteritidis* se relacionó con pollos, gallinas ponedoras y huevos. Así mismo, *S. Typhimurium* y *S. Infantis* se vincularon a los pollos, mientras que *S. Typhimurium* monofásica se relacionó de forma secundaria tras los cerdos. Con relación a *S. Derby*, se asoció en mayor medida a los cerdos y una pequeña parte a pavos y ponedoras (**Figura 4**).

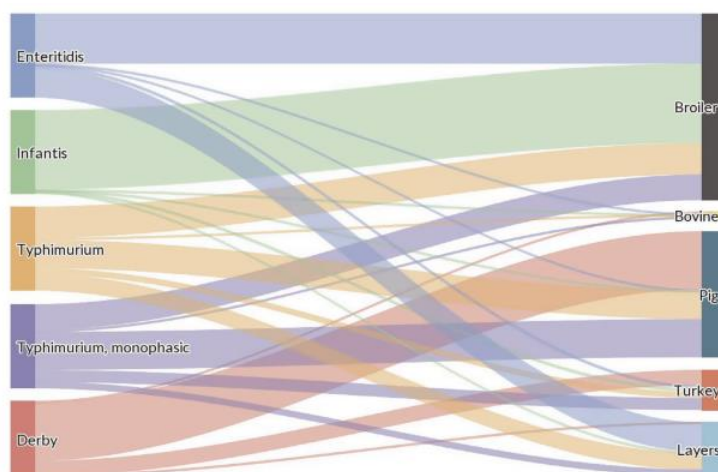


Figura 4. Diagrama de Sankey de la distribución de los 5 principales serotipos de *Salmonella* implicados en casos de salmonelosis humana adquiridos a través de alimentos y animales en la UE (EFSA, 2021)

1.6.1.2.2. Patogenia y clínica en humanos

Las infecciones por *Salmonella* spp. se producen por la entrada del microorganismo por vía oral, por lo general con alimentos o bebidas contaminados. La dosis infecciosa media para producir infección manifiesta o asintomática en el ser humano es de 10^5 a 10^8 salmonelas (pero tal vez un mínimo de 10^3 microorganismos de la especie *S. Typhi*) (Jawetz et al., 2014). La patogenia de las infecciones por *Salmonella* spp. varían según el tipo de *Salmonella* involucrado. Las infecciones causadas por salmonelas tifoideas (*S. Typhi*), conocido como “fiebres entéricas o fiebres tifoideas” causan cuadros de fiebre, malestar, cefaleas, estreñimiento, bradicardia, mialgia y septicemia, requiriendo tratamiento con antibióticos (Jawetz et al., 2014). Por otro lado, la infección por *Salmonella* no tifoidea tras 8 a 48 h de la ingestión de la bacteria produce náuseas, cefaleas, vómitos y diarreas abundantes (Jawetz et al., 2014) y la enfermedad dura de 2 a 7 días. Los síntomas de la salmonelosis son relativamente leves y, en la mayoría de los casos, los pacientes se recuperarán sin un tratamiento específico (OMS, 2018).

1.6.1.3. Salmonelosis en el sector avícola

1.6.1.3.1. Epidemiología y situación actual

Debido a la relevancia de *Salmonella* spp. en salud pública, se estableció el Reglamento (CE) n° 2160/2003 y sus posteriores modificaciones, donde los estados miembros de la UE debían establecer programas nacionales de control para el control de este patógeno con el objetivo de reducir la prevalencia de los serotipos relevantes para la salud pública cuyo origen son las aves de corral.

Como resultado de estos planes de control, según los últimos datos registrados por la EFSA a nivel europeo, en 2020 el 2,0% de las manadas de reproductoras analizadas fueron positivas a *Salmonella* spp. siendo el 0,52% alguno de los cinco serotipos objetivo (*S. Enteritidis*, *S. Typhimurium*, *S. Typhimurium* monofásica, *S. Virchow*, *S. Infantis* y *S. Hadar*) (EFSA y ECDC, 2021). En el caso de las gallinas ponedoras, el 4% de las manadas fueron positivas a *Salmonella*; sin embargo, la prevalencia de los dos serotipos objetivo (*S. Enteritidis* y *S. Typhimurium*) fue del 1,3%. Teniendo en cuenta las manadas positivas a *Salmonella* spp., el 32,4% de ellas fueron serotipos objetivo. En cuanto a la presencia de *Salmonella* spp. en granjas de broilers, se encontró en el 3,9% de las manadas; sin embargo, la prevalencia de los

serotipos objetivo (*S. Enteritidis* y *S. Typhimurium*) fue del 0,25%, siendo positivas a estos serotipos el 6,4% del total de manadas positivas. La prevalencia fue similar tanto para *S. Typhimurium* como para *S. Enteritidis* con el 53,2% y 46,8% respectivamente. Por último, en granjas de pavos la tasa de positivos a *Salmonella* spp. fue del 8,8%, mayor que la de años anteriores (5,8% en 2019 y 6,3% en 2018). Con relación a los serotipos objetivo (*S. Enteritidis* y *S. Typhimurium*), la prevalencia fue del 0,38%, es decir, el 4,4% de las granjas positivas lo fueron a serotipos objetivo (EFSA y ECDC, 2021).

La prevalencia conjunta (resultados de autocontroles más controles oficiales) de *Salmonella* spp. en España, en 2020, en reproductoras pesadas fue del 0,7%, siendo la prevalencia reportada más alta desde 2014. En gallinas ponedoras, la prevalencia conjunta fue del 1,4%. Según la tipología de las explotaciones, se reportaron prevalencias del 0,6% en gallinas en jaula, el 0,1% en suelo, el 0,51% en camperas, y el 0,13% en ecológicas (MAPA, 2021). En los broilers y los pavos, la prevalencia conjunta reportada fue del 2,8% y el 3,9% respectivamente (EFSA y ECDC, 2021).

1.6.1.3.2. Patogenia y clínica

En general, las infecciones de *Salmonella* spp. en las aves no suelen cursar con signos clínicos, sino que son las aves las que actúan de reservorio de este patógeno. Sin embargo, dos biovariedades de *Salmonella enterica* serovariedad *Gallinarum* biovariedad *Pullorum* (*S. Pullorum*) y biovariedad *Gallinarum* (*S. Gallinarum*) causan patología en las aves, conocidas como pullorosis y tifosis aviar (Térzolo, 2004). Los pollos son los huéspedes naturales para *S. Gallinarum* y *S. Pullorum*, pero otras aves también pueden infectarse. La tifosis aviar y la pullorosis son comunes en algunos países de América Central, Sudamérica, África y Asia sin embargo, estas enfermedades fueron erradicadas en muchos países desarrollados, tales como los EE.UU., Canadá, Nueva Zelanda, Australia, Japón y la mayoría de los países europeos.

En animales infectados desde el nacimiento, los signos clínicos no son específicos presentando depresión, debilidad, somnolencia, pérdida del apetito, alas caídas, deshidratación y plumas erizadas. Puede observarse respiración dificultosa o jadeo, y también diarrea con adherencia de las plumas alrededor de la cloaca. En infecciones cuando las aves son adultas, la clínica puede ser subaguda y es posible que se observe cojera e inflamación de las articulaciones, incluso ceguera. En aves que se

infectan en la edad adulta las infecciones pueden pasar desapercibidas y algunos de los síntomas clínicos que se pueden encontrar son la disminución del apetito, depresión, deshidratación, pérdida de peso, plumas erizadas y diarrea acuosa mucoide (CFSPH, 2010).

1.6.1.3.3. Programas y medidas de control

El control de la presencia de *Salmonella* spp. se encuentra regulada por el Reglamento (CE) n° 2160/2003 donde se establecen programas Nacionales de Control de *Salmonella*, anteriormente citados que se resumen en la **Tabla 7**. Además, la prevención de la infección se basará en la implementación de medidas de bioseguridad e higiene, la vacunación de los reproductores y el análisis periódico de las manadas mediante autocontroles.

Tabla 7. Autocontroles en explotaciones avícolas según los Planes Nacionales de Control de *Salmonella* establecidos en el Reglamento (CE) n° 2160/2003. (Adaptado CECAV, 2021)

TIPO DE ANIMAL	EDAD	ORIGEN MUESTRA	TIPO MUESTRA	Nº MUESTRA	Análisis	TÉCNICA
REPRODUCTORAS	Previo a la entrada de animales (durante vacío sanitario)	Verificación L+D	Paños	2	1 cultivo microbiológico de <i>Salmonella</i>	ISO6579-1
	1 día de vida	Autocontrol <i>Salmonella</i>	Papel, meconios, pollitas	1 pool (10, 250, 60)		
	2 semanas antes de traslado a nave de puesta (o del comienzo de puesta)	Autocontrol <i>Salmonella</i>	Heces, calzas	2 botes ≥ 30 g (10 puntos) o 5 pares de calzas	2 cultivos microbiológicos de <i>Salmonella</i>	
	Cada 15d o 3 semanas*	Autocontrol <i>Salmonella</i>	Heces, calzas	2 botes ≥ 30 g (10 puntos) o 5 pares de calzas	2 cultivos microbiológicos de <i>Salmonella</i>	
PONEDORAS	Previo a la entrada de animales (durante vacío sanitario)	Verificación L+D	Paños	2	1 cultivo microbiológico de <i>Salmonella</i>	ISO6579-1
	Cada 15s *	Autocontrol <i>Salmonella</i>	Heces, calzas	2 botes 150g o 2 pares de calzas	1 cultivo microbiológico de <i>Salmonella</i>	
BROILERS	Previo a la entrada de animales (durante vacío sanitario)	Verificación L+D	Paños	2 o 1	1 cultivo microbiológico de <i>Salmonella</i>	ISO6579-1
	Dentro de las 3 últimas semanas (dentro de las 6 últimas semanas si ciclo >81d o producción ecológica)	Autocontrol <i>Salmonella</i>	Calzas	2 pares	1 cultivo microbiológico de <i>Salmonella</i>	
PAVOS	Previo a la entrada de Animales (durante vacío sanitario)	Verificación L+D	Paños	2 o 1	1 cultivo microbiológico de <i>Salmonella</i>	ISO6579-1
	Dentro de las 3 últimas semanas (dentro de las 6 últimas semanas si ciclo >100d o producción ecológica)	Autocontrol <i>Salmonella</i>	Calzas	2 pares	1 cultivo microbiológico de <i>Salmonella</i>	

*: la autoridad competente podrá autorizar el muestreo cada 3 semanas

1.6.2. Campilobacteriosis

1.6.2.1. Etiología

El género *Campylobacter* contiene al menos 30 especies y subespecies. La familia *Campylobacteraceae* representa un grupo diverso pero filogenéticamente distinto dentro del grupo de bacterias Gram negativas. *Campylobacter* spp. crece de manera óptima a una temperatura de 37°C-42°C en medios de cultivo, no observándose crecimiento a temperaturas inferiores a 31°C. Son microorganismos de crecimiento lento que además requieren una atmósfera de microaerofilia. Son sensibles a la presencia de oxígeno, desecación, estrés osmótico, pH bajo y temperaturas altas (Lastovica et al., 2014).

Morfológicamente las bacterias del género *Campylobacter* spp. son bastones curvados en espiral en forma de S (**Figura 5**) con un tamaño de 0,2 a 0,8 µm de ancho y de 0,5 a 6,0 µm de largo, aunque las células pueden transformarse en formas esféricas o cocoides en respuesta al estrés o condiciones perjudiciales. Estos microorganismos no forman esporas y poseen un solo flagelo bipolar que les aporta un movimiento característico similar a un sacacorchos (Bird et al., 2007; Lastovica et al., 2014). Son incapaces de fermentar u oxidar los carbohidratos y su fuente de energía proviene de la degradación de los aminoácidos (Kelly et al., 2001).

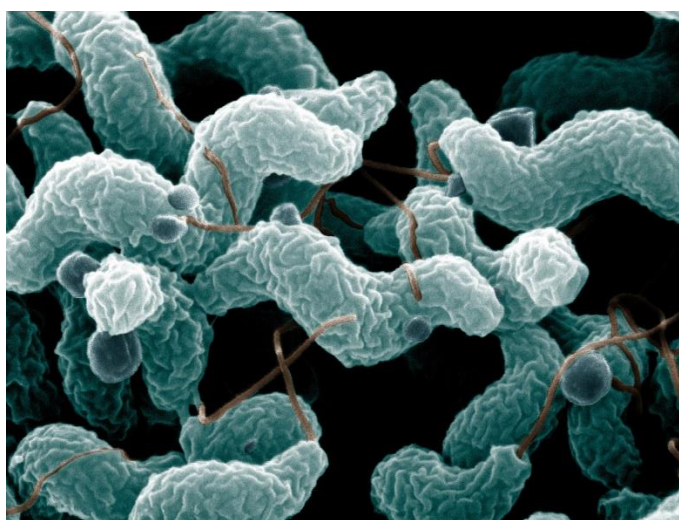


Figura 5. *C. jejuni* a microscopio electrónico de barrido (Fuente: Agricultural Research Service (ARS), 2008)

Los miembros del género *Campylobacter* están asociados con una amplia variedad de enfermedades en humanos y animales, siendo comensales en aves de corral

como pollos, pavos, patos y gansos generalmente. Aunque *Campylobacter* spp. no es un patógeno significativo en aves, se ha convertido en un microorganismo relevante para la seguridad alimentaria y salud pública a nivel mundial (Golz et al., 2014). Dentro del género existen 3 especies (*Campylobacter jejuni* (*C. jejuni*), *Campylobacter coli* (*C. coli*) y *Campylobacter lari* (*C. lari*)) conocidas como *Campylobacter* termofílico. Este grupo está formado por las especies de importancia clínica, ya que son la causa principal de la campilobacteriosis humana (Hermans et al., 2012).

1.6.2.2. Campilobacteriosis en humanos

1.6.2.2.1. Epidemiología y situación actual

Campylobacter spp. es el principal causante de infecciones gastrointestinales en humanos transmitidas por los alimentos en la UE. En 2020 se notificaron 120.946 casos de campilobacteriosis humana en la UE, con una tasa del 40,3% por 100.000 habitantes (Figura 6). Con respecto años anteriores, se ha detectado un descenso en los casos tal y como se observaba en los casos de salmonelosis, con tasas anteriores del 60%. Sin embargo, esta disminución no puede achacarse a un descenso en la incidencia, sino que se deben a los hechos acontecidos durante 2020 (Brexit y pandemia Covid-19). La tendencia general de la campilobacteriosis en los últimos 5 años (2016-2020) permanece estable (EFSA, 2021).

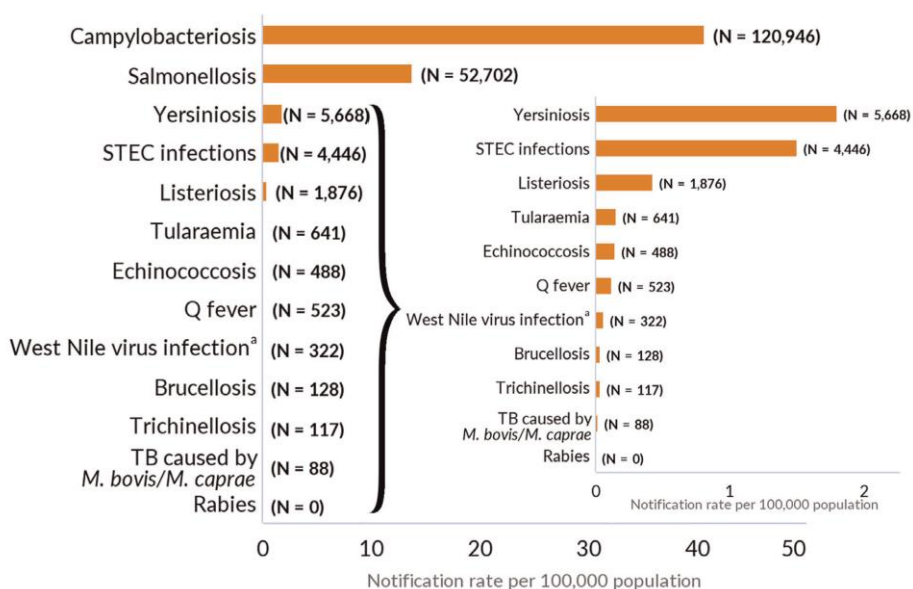


Figura 6. Número de casos notificados y tasas de notificación de zoonosis humanas confirmadas en la UE durante 2020. (Fuente: EFSA y ECDC, 2021)

Los vehículos alimentarios más comunes asociados a los brotes de campilobacteriosis son los productos de origen animal, entre ellos los de origen avícola (canales de pollo, pavo etc.). Durante 2020 en la UE, los brotes se debieron a alimentos de origen “carne de pollo” (4 brotes) y “leche cruda” (4 brotes). Debido a ello, los productos alimentarios de origen avícola requieren especial vigilancia a nivel de salud pública (EFSA, 2021).

En las especies de *Campylobacter* spp. implicadas en los casos de infección de origen alimentario, se detectó que el 88,1% correspondía a *C. jejuni*, el 10,6% a *C. coli*, el 0,16% a *Campylobacter fetus*, el 0,11% a *Campylobacter upsaliensis* y el 0,09% a *C. lari*. No se disponen de datos relativos a las especies de *Campylobacter* spp. transmitidos en brotes cuyo vehículo fueron los productos avícolas ya que en la mayoría de los brotes no se notificó la especie del microorganismo aislado (EFSA, 2021).

1.6.2.2. Patogenia y clínica

La vía principal de transmisión de *Campylobacter* spp. son los alimentos, a través de carne y productos cárnicos poco cocidos, así como la leche sin hervir o contaminada. El agua o el hielo contaminados son también una fuente de infección. Algunos casos ocurren tras el contacto con agua contaminada durante actividades recreativas. Los síntomas clínicos se inician de 2 a 5 días post infección pero pueden oscilar de 1 a 10. Los síntomas más frecuentes de las infecciones por *Campylobacter* spp. son diarrea (frecuentemente sanguinolenta), dolor abdominal, fiebre, dolor de cabeza, náuseas y/o vómitos, y duran por lo general de 3 a 6 días. En ocasiones se ha observado septicemia, hepatitis, pancreatitis y abortos. La muerte por campilobacteriosis es poco frecuente y sólo se ha descrito en pacientes muy jóvenes o de edad avanzada, y en pacientes con enfermedades graves previas. Generalmente no es necesario tratamiento, excepto la reposición de líquidos y electrolitos. El tratamiento antimicrobiano está recomendado en casos de septicemia (OMS, 2020).

1.6.2.3. Campilobacteriosis en avicultura

1.6.2.3.1. Epidemiología y situación actual

Para *Campylobacter* spp. no existen programas de vigilancia y control a nivel de granja. En la UE, 17 Estados miembros y no miembros comunicaron datos de *Campylobacter* spp. en animales durante 2020. La mayoría de las muestras procedieron

de pollos (65,2%) seguidas de ganado bovino, pavos, gatos y perros y cerdos. La mayor positividad se detectó en los pavos con un 62,1%. Le sigue el ganado porcino con un 58,5% y los pollos 24,5% (EFSA, 2021).

Los datos sobre la prevalencia de *Campylobacter* spp. a nivel de granja en avicultura están desactualizados, ya que los últimos datos aportados por la EFSA a nivel Europeo son del 2008 (EFSA, 2010). Aunque estos datos son posteriores a las principales iniciativas de control, son los datos más recientes de un estudio global a nivel Europeo. Se encontró que la prevalencia de *Campylobacter* spp. en granjas de broilers fue del 71%, aunque se encontraron diferencias notables entre los diferentes estados miembros que variaron entre el 3,5% en Noruega (Borck Høg et al., 2016) al 71,9% en Francia (Allain et al., 2008). Torralbo et al. (2014) reportaron tasas del 62,5% durante 2012 en España (EFSA, 2020).

En las tasas de *Campylobacter* spp. encontradas en alimentos, en la UE, en 2019, la carne fresca de pollos y pavos de engorde fue el alimento con mayor presencia de la bacteria. Los porcentajes de positividad fueron del 33% en los pavos y del 29,6% en los pollos de engorde. En España, la categoría de alimento con mayor porcentaje de positivos fueron de nuevo las carnes, en concreto la carne de pavo (44,8%) y la carne de pollo (36,9%) (MAPA, 2020).

1.6.2.3.2. Patogenia y clínica

Tanto *C. jejuni* y *C. coli* se adaptan bien al huésped aviar residiendo en el tracto intestinal de las aves. A pesar de la extensa colonización, las infecciones por *Campylobacter* producen pocas o ninguna enfermedad clínica en las aves de corral (Sahin et al., 2015). La infección por *Campylobacter* spp. ocurre por la vía fecal oral, siendo la vía de transmisión más común, (Sahin et al., 2015) la horizontal a través del ambiente (cama, agua, equipos de trabajo, vehículos, trabajadores y otros animales en la granja como ratones, mascotas, aves silvestres, moscas, insectos) (Sahin et al., 2015). La vía vertical ha sido tema de controversia durante muchos años, aunque parece que se ha descartado ya que los pollitos de 1 día de vida están libres de la bacteria, aunque provengan de manadas positivas a *Campylobacter* spp. hasta aproximadamente las 2 o 3 semanas de vida. Por otro lado, se ha observado que con frecuencia las cepas con las que se infectan las manadas de pollos son diferentes a las de las manadas de reproductores positivos (Petersen et al., 2001).

Las infecciones de *Campylobacter* spp. en aves de corral generalmente no producen síntomas clínicos en condiciones naturales. Sin embargo, se han descrito casos de hepatitis vibriónicas o “síndrome del hígado manchado” con mortalidad de hasta el 11%, reducción en la producción de huevos (10%-25%) y heces blandas en gallinas ponedoras asociado a especies de reciente caracterización (*C. hepaticus* y *C. bilis*) (Crawshaw et al., 2015; Van et al., 2017).

1.6.2.3.3. Programas de control

Así como en *Salmonella* spp. existe legislación que establece el monitoreo y control durante el periodo de crianza de las manadas destinadas a producción avícola, en *Campylobacter* spp. no existen planes de control a nivel de granja, sino que la vigilancia está dirigida al establecimiento de medidas de higiene y seguridad alimentaria a nivel de matadero.

Dada la alta implicación de *Campylobacter* spp. en los casos de infecciones gastrointestinales en humanos, se estableció por el Reglamento (UE) n° 1495/2017 que modifica el Reglamento (CE) 2073/2005 (punto 2.1.9 del Capítulo 2 del Anexo I, un nuevo criterio de higiene del proceso microbiológico (PCH)) de 1.000 UFC/g de *Campylobacter* spp. en la piel del cuello de las canales refrigeradas de pollos de engorde. Este límite se fijó para estimular la adopción de medidas para reducir los recuentos de *Campylobacter* spp. en las canales de pollos y como consecuencia, reducir el número de casos de campilobacteriosis humana causados por el consumo o la manipulación de carne de pollo contaminada (**Tabla 8**).

Tabla 8. Controles de *Campylobacter* spp. en canales refrigeradas de pollos de engorde establecidos en el Reglamento (CE) n° 1495/2017. (DOUE, 2017)

Alimento	Plan de muestreo		Límites		Técnica de análisis	Fase de aplicación del criterio
	n	c	m	M		
Canales de pollos de engorde	50(5)	A partir del 1.1.2020, c = 15; A partir del 1.1.2025, c = 10	1 000 ufc/g		EN ISO 10272-2	Canales tras la refrigeración

n = número de unidades que componen la muestra; c = número de unidades de muestreo con valores superiores a m o comprendidos entre m y M; m: valor mínimo; M: valor máximo.

1.7. Enfermedades infecciosas con relevancia en sanidad animal

1.7.1. Micoplasmosis

1.7.1.1. Etiología

Los micoplasmas son miembros de la clase *Mollicutes*, orden *Mycoplasmatales*. Estos son organismos proariotas, caracterizados por su tamaño muy pequeño, genoma de tamaño de 580–1350 kb y ausencia total de paredes celulares que le da la morfología típica de colonia de “huevo frito” (**Figura 7**) (Domermuth et al., 1967). A examen microscópico en campo oscuro, *M. gallisepticum*, *M. synoviae*, *Mycoplasma meleagridis* (*M. meleagridis*) y *Mycoplasma iowae* (*M. iowae*) presentan una forma de cocos o cocobacilos pleomórficos de 0,2 a 0,5 μm de diámetro (Farmer et al., 2005). Son microorganismos de crecimiento lento, la temperatura óptima para su desarrollo son 37-38°C, requiriendo un medio rico en proteínas (Lauerman et al., 1988) incluso colesterol para su multiplicación (Domermuth et al., 1967). El crecimiento de *M. synoviae* requiere la adición de nicotinamida adenina dinucleótido (NAD) (Chalquest et al., 1962).

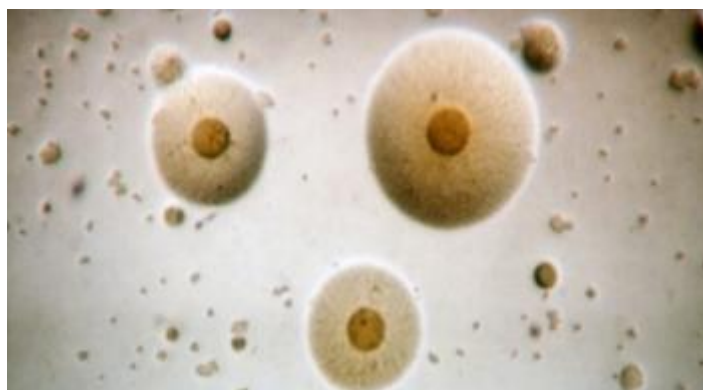


Figura 7. Colonias de *Mycoplasma synoviae* cepa 1853 (Fuente: Uriate y col.)

Los micoplasmas tienden a ser bastante específicos del huésped; algunos infectan solo a una sola especie de animal, mientras que otros pueden tener la capacidad de infectar a varias especies de huéspedes diferentes. En general, los micoplasmas colonizan las mucosas y la mayoría de las especies no son invasivas. Sin embargo, algunas especies, como *M. gallisepticum* (Feberwe et al., 2009) y *M. synoviae* (Bradbury et al., 1994) tienen la capacidad de penetrar en las células. Los principales patógenos aviares de *Mycoplasma* que preocupan en aves de corral incluyen *M. gallisepticum*, *M. synoviae*, *M. iowae* y *M. meleagridis*.

M. synoviae es la segunda especie más importante desde el punto de vista clínico y económico (Feberwee et al., 2009). Por ello, esta Tesis Doctoral se centró en el estudio de la especie *M. synoviae*. Así, en uno de los capítulos, se investigó la seroprevalencia y prevalencia de *M. synoviae* en gallinas ponedoras y reproductoras pesadas en el este de España con el objetivo de aportar datos de la situación actual que ayuden en el establecimiento de planes de control en las granjas avícolas.

1.7.1.2. Epidemiología y patogenia

M. synoviae tiene una distribución mundial. La sinovitis infecciosa causada por esta bacteria fue descrita en la década de los 50-60 en broilers en crecimiento de 4 a 12 semanas de edad (Mohamed et al., 1986). Sin embargo, no es hasta los años 70 cuando se observó la variante respiratoria (Rosales, 1991).

La vía de infección de la *M. synoviae* desempeña un papel importante en la enfermedad que desarrollarán los animales. El contagio con *M. synoviae* se puede producir horizontalmente por propagación por el aire y entrar a través de las vías respiratorias. Por lo general, el 100% de las aves se infectan, aunque es posible que no todos los animales desarrollen signos clínicos. La infección también puede ocurrir por contacto directo por contaminación ambiental o fómites (Marois et al., 2005). Por otro lado, la transmisión vertical “*in ovo*” juega un papel importante en la propagación de *M. synoviae* en pollos y pavos; sin embargo, los animales nacidos de reproductoras infectadas pueden permanecer libres de infección (Vardaman et al., 1976). Las aves se infectan siendo portadoras de por vida (Weinack et al., 1983).

El periodo de incubación después de la exposición por contacto puede variar de 1 a 21 días variando según la vía de contacto, la carga microbiana y la patogenicidad de la cepa (Kleven et al., 1972).

1.7.1.3. Síntomas y lesiones

La micoplasmosis por *M. synoviae* puede cursar con diferentes cuadros. La forma aguda en broilers cursa con crestas pálidas o de tono rojo azulado, cojeras y retraso en el crecimiento, plumas erizadas, apatía y deshidratación. Tras esto los animales suelen recuperarse lentamente, aunque la sinovitis puede permanecer durante toda la vida de los animales. En algunos casos esta fase aguda es asintomática y se ven pocos animales afectados de forma crónica (Landmand et al., 2001). La forma

respiratoria de *M. synoviae* cursa con estertores durante 4 o 6 días, aerosaculitis o pueden permanecer asintomáticos. En el caso de gallinas ponedoras y reproductoras en recría se observa retraso en el crecimiento e inmadurez del sistema reproductor. En el caso de animales adultos se han reportado caídas de la puesta y anomalías en el ápice de los huevos (Kume, 1977). También se ha descrito, una forma clínica que da lugar a una alta tasa de rotura de las cáscaras y a una baja producción de huevos en gallinas ponedoras (Feberwee et al., 2009a; 2009b; Catania et al., 2010).

En cuanto a las lesiones, en pollos se puede observar exudado viscoso que afecta a la zona de las membranas sinoviales de los tendones, articulaciones, la bursa de la quilla y hepatoesplenomegalia. Los riñones suelen estar hinchados, con moteado y pálidos. A medida que la enfermedad avanza el exudado pueden variar a caseoso, extendiéndose a músculos y sacos aéreos. En la forma respiratoria es raro observar lesiones macroscópicas en el tracto respiratorio superior pudiendo aparecer aerosaculitis (Kleven et al., 2008). En el cuadro reproductor las lesiones parecen restringirse al ápice de la cáscara y consisten en zonas rugosas oscuras de unos 2 cm de diámetro con bordes claros; además, se ha descrito un descenso en la producción de huevos (Catania et al., 2010).

La morbilidad en pollos con sinovitis varía del 2 al 75%, siendo lo más común del 5 al 15%. Las formas respiratorias pueden cursar de forma asintomática, pero estar infectadas del 90-100% de las aves. La mortalidad está entre el 1-10% (Kleven et al., 2008)

1.7.1.4. Medidas de control y prevención

El diagnóstico de *M. synoviae* se realiza a partir de los síntomas y lesiones, con posterior confirmación laboratorial a partir de pruebas serológicas: ARP (aglutinación rápida en placa) o ELISA (Enzyme-linked immunosorbent assay) (Patten et al., 1984). Se puede realizar una confirmación adicional de los resultados serológicos mediante la detección de *M. synoviae* en vías respiratorias superiores mediante reacción en cadena de la polimerasa (PCR, de las siglas en inglés) (Sahu et al., 1976).

M. synoviae se trata principalmente con antibióticos, como las oxitetracilinas (Landman et al., 2008). Sin embargo, debido al efecto temporal del tratamiento con antibióticos, la aparición de resistencias y el riesgo de residuos en el huevo, se deben

considerar estrategias alternativas como la vigilancia y la vacunación para el control de *M. synoviae* (Feberwee et al., 2009). La vacunación es una herramienta de uso común para controlar esta infección en manadas comerciales en muchos países con importantes industrias avícolas (Zhu et al., 2018), pero el éxito de estos programas de control depende del diagnóstico preciso y oportuno de las granjas infectadas (Gharibi et al., 2018).

Las estrategias de prevención constan de procedimientos específicos de manejo, como la elección de animales de manadas de reproductores libres junto a la combinación de medidas de bioseguridad en granja para evitar la introducción de la infección. Para el control de esta bacteria en reproductoras y gallinas ponedoras la vacunación con la cepa MS-H (Bioproperties Ltd., Ringwood, Victoria, Australia) parece ser una medida eficaz (Kleven et al., 2008).

1.7.2. Bronquitis infecciosa aviar

1.7.2.1. Etiología

El virus de la bronquitis infecciosa (IBV, de las siglas en inglés Infectious Bronchitis Virus) pertenece al orden *Nidovirales* familia *Coronaviridae*, subfamilia *Coronaviridae*. Dentro de la subfamilia existen 4 géneros, *Alfacoronavirus*, *Betacoronavirus*, *Gammacoronavirus* y *Deltacoronavirus* (de reciente definición). Dentro de los *Alfa* y *Betacoronavirus* se localizan especies que afectan a mamíferos y humanos. El IBV se ubica en el género *Gammacoronavirus* que incluye solo especies que afectan a aves (Woo et al. 2010). Este virus tiene forma redondeada o pleomórfica. Posee una envoltura de 120 nm de diámetro con unas proyecciones en forma de espículas de 20 nm de longitud que le dan al virus la imagen de corona, de donde procede el nombre de la familia (**Figura 8**). La partícula viral está formada por una nucleocápside rodeada de una envoltura lipídica que tiene ancladas 3 tipos de proteínas, la espícula (S), la proteína de membrana (M) y la proteína de envoltura (E). Dentro de la nucleocápside encontramos una copia del ácido ribonucleico (ARN, de las siglas en inglés) genómico viral asociada a múltiples copias de la proteína de nucleocápside (N) formando una estructura helicoidal, larga y flexible de 7-16 nm de diámetro y hasta 0,32 mm de longitud (King et al., 1985).

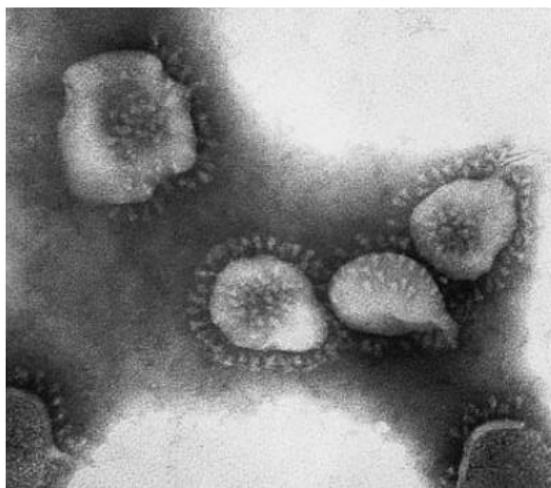


Figura 8. Virion de IBV. Preparación teñida en negativo con ácido fosfotúngstico x 3.300.000 aumentos (Fuente: Diseases of Poultry, 2008)

La replicación del virus tiene lugar dentro de las células diana del hospedador. El virus se une a ellas mediante la glicoproteína S que parece ser específica de las células huésped (Villareal et al., 2010). El virus se replica en el citoplasma, apareciendo

las nuevas copias de 3 a 4 horas después de la infección. La producción máxima por célula se alcanza en 12 horas a 37°C.

1.7.2.2. Epidemiología

La bronquitis infecciosa es una enfermedad respiratoria aguda altamente contagiosa descrita por primera vez en 1931 (Schalk et al., 1931). Su distribución es mundial, considerándose una de las enfermedades virales de mayor impacto en la industria avícola, afectando desde broilers hasta aves ponedoras de líneas ligeras y pesadas. Continuamente emergen nuevos serotipos/genotipos del virus (para el caso del IBV los términos genotipos y serotipos se usan indistintamente, ya que existe alta correlación entre ellos en un porcentaje alto de los casos (Cavanagh et al., 2003; Cook et al., 2012)), causando fallos en los programas de control. Debido a esta capacidad de mutación del virus se han descrito en la actualidad cientos de serotipos o variantes en el mundo (Cavanagh et al., 2003).

El virus es altamente infeccioso, se disemina horizontalmente a través de aerosoles, material orgánico, agua de bebida y equipos contaminados. Hasta el momento no se ha demostrado que exista transmisión vertical. No obstante, la contaminación de la superficie de los huevos puede ser una posible vía de diseminación del virus en incubadoras (Cavanagh et al., 2007). Por vía aérea el virus se propaga rápidamente, siendo altamente contagioso y con un periodo de incubación muy corto de 24-48 horas tras la exposición al aerosol del virus (Hofstad et al., 1996). Las células diana del virus son las células del tracto respiratorio superior, el tracto reproductor femenino y las células tubulares del riñón. El curso de la infección en pollos está entre 7 a 21 días, aunque puede llegar a excretarse el virus en heces durante varios meses (Acevedo-Beiras, 2017). Varios serotipos pueden coexistir en el mismo área al mismo tiempo (Acevedo-Beiras, 2017) y en los mismo animales estando demostrada la cocirculación de serotipos (Capua et al., 1999).

1.7.2.3. Síntomas y lesiones

IBV causa infección respiratoria de vías altas en pollos jóvenes en crecimiento. Los síntomas más característicos son tos, coriza, estornudos, estertores traqueales, ojos acuosos, letargo, descargas nasales y oculares. A nivel productivo se observa una reducción de la ganancia de peso y de índices de conversión. La enfermedad puede

complicarse con infecciones secundarias cursando con aerosaculitis, pericarditis y perihepatitis cursando con una mortalidad del 30% en estos casos, en animales menores de 6 semanas. La mortalidad es menor (<1%) y la recuperación rápida si la cepa es leve, los animales superan las 6 semanas de edad o no existen complicaciones secundarias (Cavanagh et al., 2003). Las manadas de pollos infectadas con cepas nefropatógenas, pueden cursar con una fase inicial respiratoria y cuando comienzan a mejorar muestran síntomas como depresión, plumas erizadas, diarrea, mayor ingesta de agua y mortalidad (del 0,5% a 1%) (Cumming, 1963).

En gallinas de puesta se observa una disminución de la producción y de la calidad de los huevos (cáscara blanda, deformes, rugosos y con escasa pigmentación de huevos) y sintomatología respiratoria (que puede o no estar presente) (Acevedo-Beiras, 2017). La duración e intensidad de la disminución de la producción puede variar dependiendo del momento de la puesta en que se encuentren los animales (Eck, 1983) y de la virulencia del virus (Hopkins et al., 1985). Si la infección se produce en pollitas jóvenes en desarrollo pueden producirse daños permanentes en los oviductos que afectarán a la producción de huevos (Chew et al., 1997). En general la morbilidad suele ser del 100% infectándose toda la manada cuando el virus está presente, sin embargo, la mortalidad variará dependiendo de la virulencia del serotipo, la edad, el estado inmunitario (vacunación o maternal) y presencia de infecciones secundarias (Cumming, 1963).

Las lesiones causadas por IBV se producen generalmente cuando la infección ocurre en animales jóvenes, observándose inflamación del tracto respiratorio superior con inflamación de cornetes, senos nasales y tráquea. Puede observarse material caseoso amarillento en sacos aéreos y tráquea (Hofstad et al., 1996). Las lesiones por variantes nefropáticas cursan con riñones hinchados y sin brillo, y uréteres con cristales de uratos (Cumming, 1963). En gallinas ponedoras pueden aparecer lesiones en el oviducto (Acevedo-Beiras, 2017).

1.7.2.4. Medidas de control y prevención

El control de la bronquitis infecciosa se ha implementado desde la década de los años 50 mediante vacunación con vacunas vivas atenuadas e inactivadas. Las vacunas de elección en los programas vacunales dependen de los serotipos presentes en la región y de la protección cruzada que exista entre las vacunas disponibles y los virus de campo.

Por ello la vigilancia de los serotipos circulantes es crucial para el control de los brotes de campo y para la protección de las manadas (Acevedo-Beiras, 2017).

Además de la vacunación existen otras medidas fundamentales para la prevención y el control como las buenas prácticas de manejo de aves, el control de factores inmunodepresores y el establecimiento de medidas de bioseguridad eficientes (Acevedo-Beiras, 2017).

Por el impacto que causa en la industria avícola tanto a nivel sanitario como a nivel económico uno de los capítulos desarrollados en esta Tesis Doctoral se elaboró un estudio de seroprevalencia y prevalencia de IBV en broilers, gallinas ponedoras y reproductoras pesadas en el este de España con el objetivo de aportar datos de la situación actual de prevalencia e información sobre las variantes circulantes para ayudar en el establecimiento o actualización de planes de control en las explotaciones avícolas.

1.8. Técnicas de análisis

1.8.1. Técnicas de análisis microbiológico

1.8.1.1. Método de investigación de *Salmonella* spp.

En el capítulo 3.1.1 se realizó la investigación de *Salmonella* spp. en muestras de calzas provenientes de granjas del sector avícola. Para ello se siguió la norma EN/ISO 6579-1:2017 denominada “*Microbiología de la cadena alimentaria. Método horizontal para la detección, enumeración y serotipado de Salmonella. Parte 1: Detección de Salmonella spp.*”

La detección de *Salmonella* spp. requiere los siguientes pasos de forma sucesiva:

- Preenriquecimiento en medio no selectivo, en la que se introducen las muestras en agua de peptona tamponada en la proporción adecuada y se incuba a una temperatura entre $37\pm 1^{\circ}\text{C}$ durante 18 ± 2 horas.
- Enriquecimiento en medios selectivos, se inocula la muestra incubada en el medio Rappaport-Vassiliadis con soja (caldo RVS) o agar semisólido modificado Rappaport-Vassiliadis (MSRV) y se incuba a $41,5\pm 1^{\circ}\text{C}$ durante 24-48 horas (**Figura 9**).

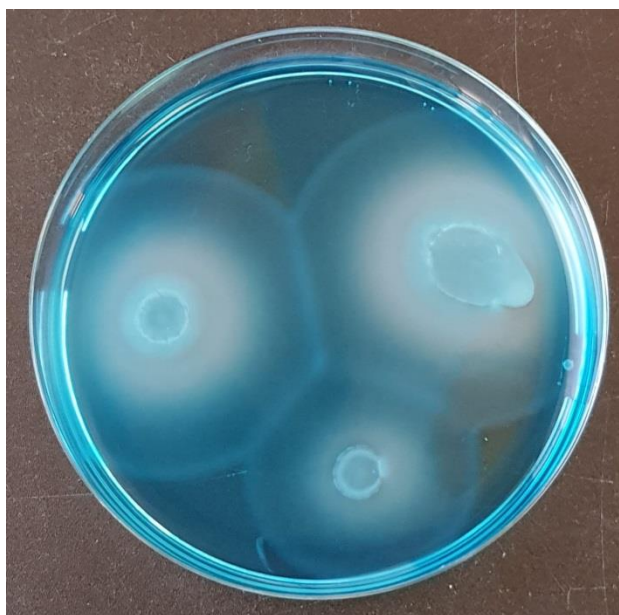


Figura 9. Crecimiento de *Salmonella* spp. en medio semisólido Rappaport-Vassiliadis modificado.

- Siembra en medios sólidos selectivos, los cultivos positivos obtenidos, se inoculan en 2 medios sólidos selectivos. Uno de ellos es el agar xilosa lisina desoxicolato (agar XLD) y el segundo medio puede ser cualquier otro medio sólido

selectivo complementario del agar XLD. En el aislamiento de *Salmonella* spp. de nuestro capítulo experimental se utilizó el medio de cultivo AES *Salmonella* Agar Plate (ASAP, bioMérieux, Barcelona, Spain) (Figura 10). Ambos medios se incuban a 37 °C y se examina después de 24 h. Otros medios de cultivo diferenciales para el crecimiento de *Salmonella* spp. son el Agar Hektoen entérico, Agar *Salmonella*-Shigella® (SS), Verde brillante (Murray et al., 2004), Agar xilosa-lisina-tergitol (XLT4) (Pachón, 2009), entre otros.



Figura 10. Crecimiento de *Salmonella* spp. en agar XLD (izquierda) y ASAP (derecha).

- Confirmación, las colonias de presunta *Salmonella* spp. se subcultivan en medios nutritivos y su identidad se confirma mediante pruebas bioquímicas y serológicas apropiadas.

La confirmación bioquímica debe incluir las siguientes pruebas: agar TSI, agar urea, medio de L-lisina descarboxilasa, y de forma opcional test para detección de β – galactosidasa y test del indol (Figura 11).



Figura 11. Prueba de confirmación bioquímica (Galería API®).

El esquema del proceso para el aislamiento de *Salmonella* spp. se puede observar en la **Figura 12**.

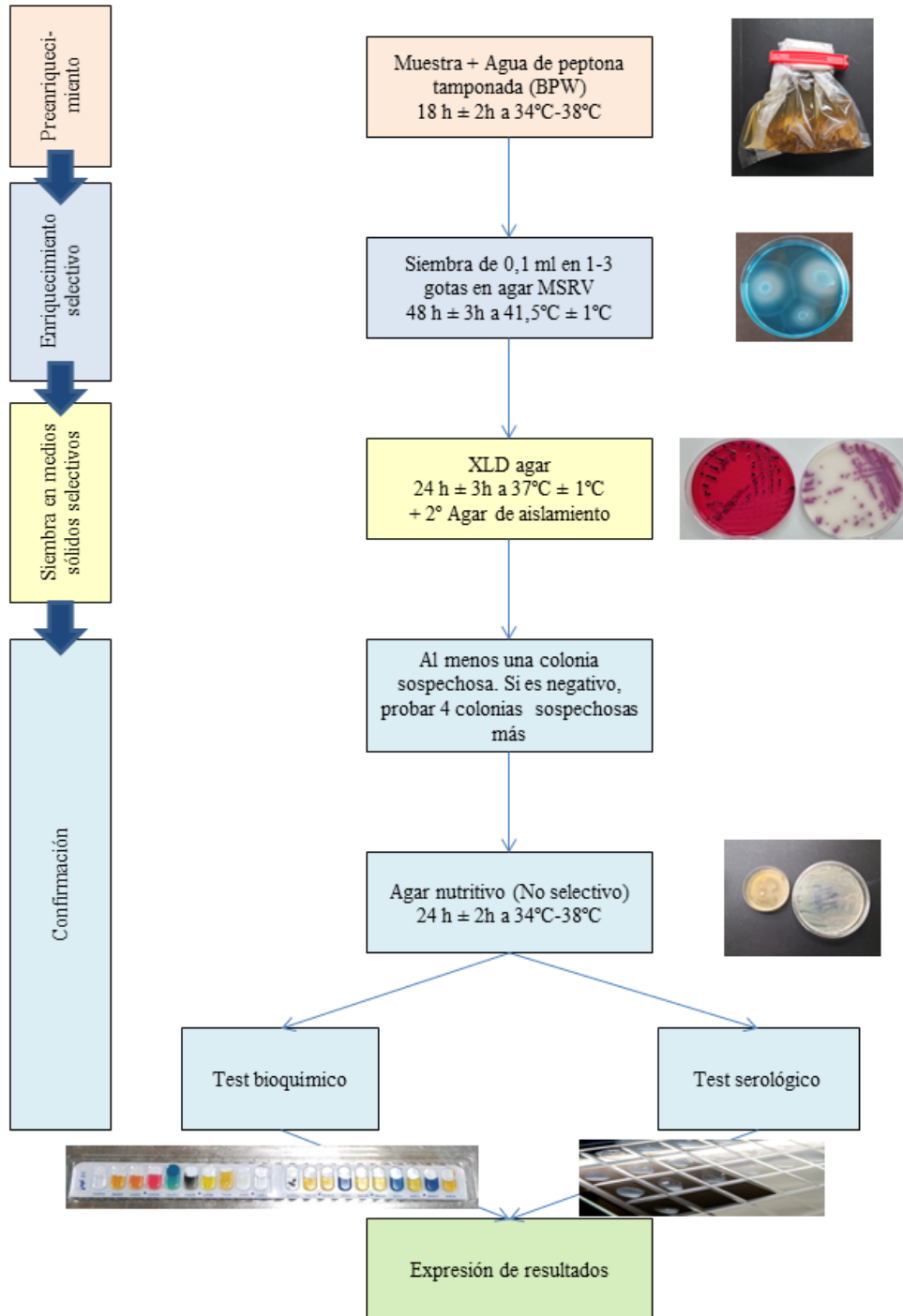


Figura 12. Diagrama del procedimiento para la detección de *Salmonella* en heces animales y en muestras ambientales de la etapa de producción primaria (Adaptado ISO, 2019).

Tras la confirmación bioquímica, se debe realizar la confirmación serológica y el serotipado de la cepa aislada siguiendo las directrices marcadas en la ISO/TR 6579-3 denominada “*Microbiología de la cadena alimentaria: Método horizontal para la detección, enumeración y serotipado de Salmonella. Parte 3: Directrices para el serotipado de Salmonella spp.*”.

El género *Salmonella* spp. contiene más de 2.500 serotipos diferentes, entre los cuales encontramos serotipos específicos de hospedador y serotipos no específicos, serotipos zoonóticos y serotipos comensales, oportunistas y patógenos, por ello es necesario conocer el serotipo de las cepas obtenidas de *Salmonella* spp. (Terragno et al., 2003).

Los principales antígenos de *Salmonella* se dividen en 3 tipos principales, los antígenos somáticos (O), antígenos flagelares (H), antígenos capsulares (Vi). Estos antígenos generalmente se identifican mediante el uso de anticuerpos monovalentes y polivalentes, disponibles comercialmente mediante la técnica de aglutinación rápida (**Figura 13**) (Jawetz et al., 2014). La identificación de los serotipos según la combinación antigénica obtenida se obtiene siguiendo el esquema de Kauffman-White-Le Minor (Grimont y Weill, 2007).

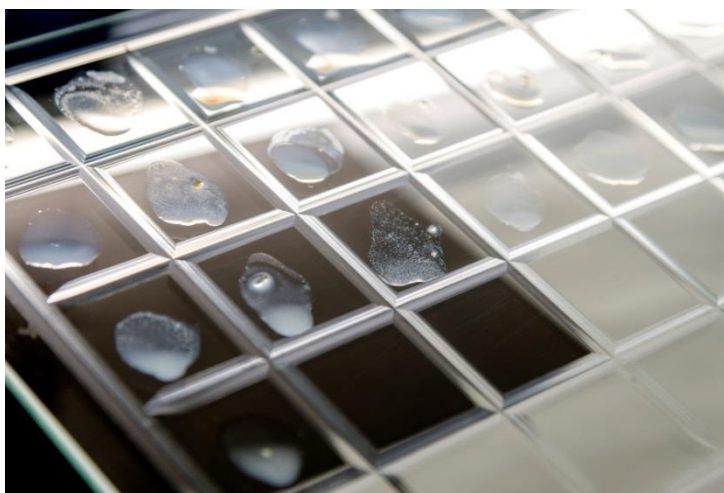


Figura 13. Serotipado. Aglutinación de cepa de *Salmonella* spp. frente a diferentes antisueros.

1.8.1.2. Método de investigación y recuento de *Campylobacter* spp.

En el capítulo experimental 3.1.3 se realizó el recuento de *Campylobacter* spp. en muestras de heces procedentes de granjas de broilers. Para ello se siguió la norma EN/ISO 10272-2 denominada “*Microbiología de la cadena alimentaria. Método horizontal para la detección y enumeración de Campylobacter spp. Parte 2: Técnica de recuento de colonias*”. Este procedimiento requiere los siguientes 3 pasos de forma sucesiva.

- Preparación de las diluciones: en la que se introducen las muestras en agua de peptona tamponada en la proporción adecuada y se realizan diluciones decimales seriadas.
- Recuento, se transfiere 0,1mL de cada dilución en el agar selectivo desoxicolato-cefoperazona-carbón modificado (mCCD) y se incuba a $41,5\pm 1^{\circ}\text{C}$ en microaerofilia durante 44 horas. Si sólo se siembra la dilución inicial, debe sembrarse por duplicado en una placa adicional de mCCD.



Figura 14. Crecimiento de *Campylobacter* spp. en placa de agar mCCD

- Confirmación, las colonias de presunto *Campylobacter* spp. (**Figura 14**) se observan al microscopio para confirmar la morfología y movilidad de las bacterias. Se subcultivan 5 colonias en medio agar sangre (no selectivo) y se incuban a $41,5\pm 1^{\circ}\text{C}$ en microaerofilia durante 44 horas. Si se produce crecimiento, debe confirmarse la actividad oxidasa positiva mediante el test de la oxidasa. Por otro lado, 5 de las colonias

presuntivas de *Campylobacter* spp. han de sembrarse en medio agar sangre (no selectivo) y se incuban a 25°C en aerobiosis. No debe producirse crecimiento para confirmar las colonias de *Campylobacter* spp. . Opcionalmente, se pueden utilizar test bioquímicos o métodos moleculares para la confirmación de *Campylobacter* spp. . El número de unidades formadoras de colonias (UFC) debe ser calculado según la proporción sembrada a partir del número de colonias típicas confirmadas por placa.

El esquema del proceso puede verse en la **Figura 15**.

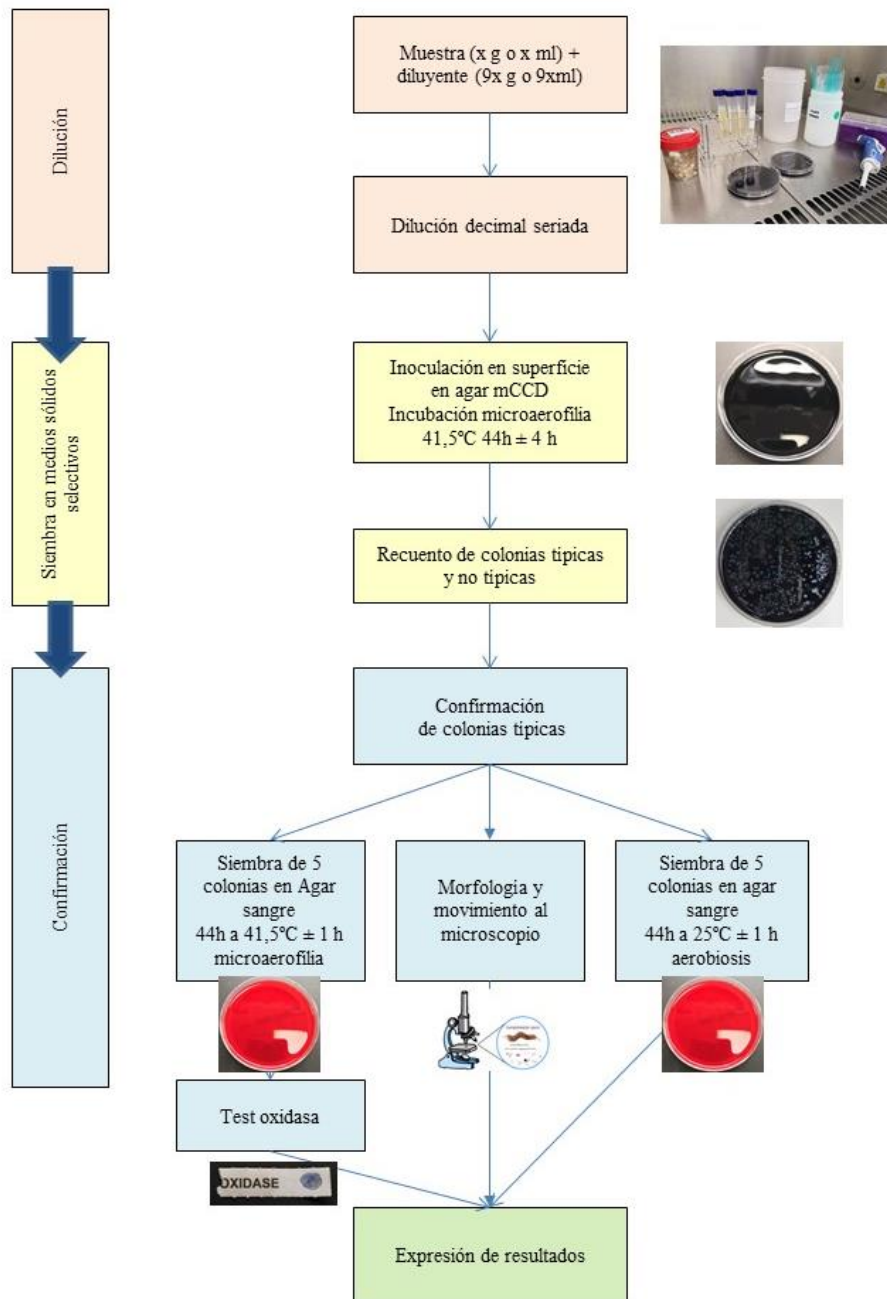


Figura 15. Procedimiento para el recuento de *Campylobacter* spp. (Adaptado ISO, 2017).

1.8.1.3. Evaluación de la susceptibilidad antimicrobiana

En el capítulo 3.1.2 se realizó la investigación de la susceptibilidad antimicrobiana de cepas de *Salmonella* spp. en cepas aisladas de muestras positivas de autocontroles de explotaciones del sector avícola. Para ello se realizó una técnica basada en la norma EN/ISO ISO 20776-1:2006 denominada “*Ensayo de susceptibilidad de agentes infecciosos y evaluación del funcionamiento de los dispositivos de ensayo de susceptibilidad antimicrobiana. Parte 1: Método de referencia de microdilución en caldo para ensayar la actividad in vitro de agentes antimicrobianos frente a bacterias aerobias de crecimiento rápido implicadas en enfermedades infecciosas*”. En la actualidad esta norma se ha actualizado a UNE-EN ISO 20776-1:2021 en el que se ha enfocado el documento a la técnica de microdilución en caldo, se han eliminado las definiciones los puntos de corte S (susceptible), I (intermedio), R (resistente), se han eliminado algunas tablas y creado anexos, actualizado los diluyentes y solutos para determinados antimicrobianos y se ha actualizado la información sobre medios de cultivo especiales y rendimiento del método para agentes antimicrobianos específicos utilizados actualmente.

Existen diferentes métodos para determinar la susceptibilidad microbiana a los antimicrobianos. Pueden clasificarse en cualitativos y cuantitativos. Entre las pruebas más utilizadas encontramos:

- Prueba de difusión en disco: descrita por Bauer et al. (1966) y normalizada por el Instituto de Estándares Clínicos y de Laboratorio (CLSI). Es una técnica cualitativa indicada para microorganismos no exigentes de crecimiento rápido. El método consiste en depositar en la superficie de una placa de agar Mueller Hinton (MH), previamente inoculada con el microorganismo con un inóculo de 0,5 McFarland ($1,5 \times 10^8$ CFU/mL), discos de papel de filtro impregnados con los diferentes antibióticos. Tan pronto el disco impregnado en antibiótico se pone en contacto con la superficie húmeda del agar, el filtro absorbe agua y el antibiótico difunde por el agar, formándose un gradiente de concentración. Transcurridas 18 a 24 horas de incubación, los discos pueden o no aparecer rodeados por una zona de inhibición de crecimiento bacteriano. La lectura se realiza a través de la medición de los halos de inhibición que se clasifican en susceptible (S), intermedio (I) y resistente (R). Existen tablas proporcionadas por el CLSI que según el diámetro del halo de

inhibición de crecimiento bacteriano, definen categorías de resistencia, sensibilidad y sensibilidad intermedia (**Figura 16**) (Tarroco et al., 2006).

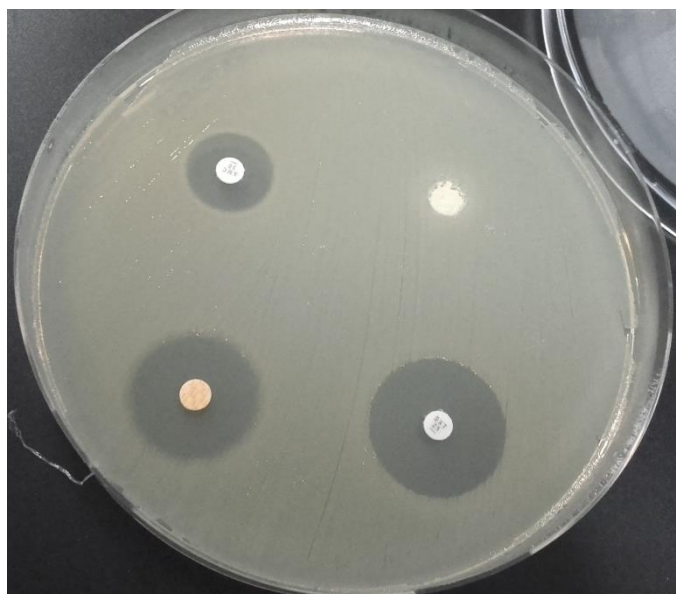


Figura 16. Placa de Mueller Hinton inoculada con *Salmonella* spp. con discos de antibióticos.

- Método de gradiente antibiótico (E-test): método cuantitativo, siendo una expansión de la técnica de difusión en disco. Se realiza mediante lectura directa, la determinación la concentración mínima inhibitoria (MIC). Consiste en una tira de plástico no poroso de 6 cm de largo por 5 mm de ancho que incorpora un gradiente predefinido de antimicrobiano equivalente a 15 diluciones. El protocolo para preparar el inóculo es el mismo que para la difusión en disco (**Figura 17**) (Tarroco et al., 2006).



Figura 17. Crecimiento bacteriano en placa de Mueller Hinton con tiras Etest® (Fuente: Biomerieux)

- Método de dilución en caldo:
 - o Macrodilución: el procedimiento se realiza mediante tubos de ensayo con caldo de cultivo a las que se añaden diluciones crecientes de antibióticos. Consiste en exponer a las cepas problema a diferentes concentraciones de antibióticos y observar el crecimiento para definir la CMI (concentración mínima inhibitoria), siendo la concentración de antibiótico donde no se observa crecimiento (turbidez). La CMI se expresa en µg/mL. Para determinar si las cepas son sensibles o resistentes a un determinado antibiótico se debe recurrir, a las tablas del CLSI (Tarroco et al., 2006).
 - o Microdilución: En el método de microdilución se utilizan placas de microtitulación con fondo en U de 96 pocillos. Una placa puede contener de 7 a 8 diluciones de diferentes antibióticos. Los antibióticos pueden añadirse de forma manual o usar placas comerciales como las placas Sensititre™ (Thermo Scientific, East Grinstead, United Kingdom), Avipro® Plate (Lohman Animal Health GmbH, Cuxhaven, Germany), entre otras (**Figura 18**).

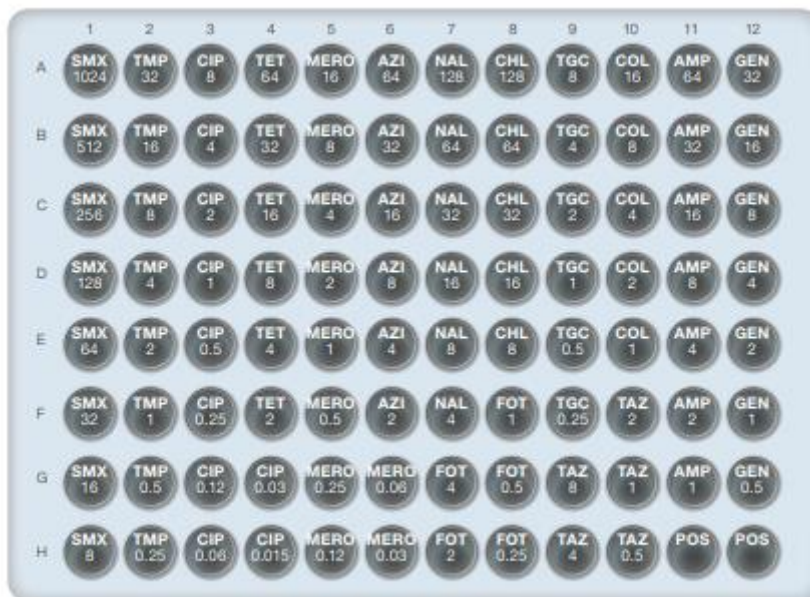


Figura 18. Ejemplo de placa de microdilución.

El método consiste en realizar un inóculo tomando de 3 a 5 colonias aisladas (de cultivo joven de 24-48 horas), emulsionándolas en 5 mL de agua desmineralizada (Thermo Scientific, Santa Fe Drive, EE.UU.) ajustando el inóculo a una turbidez de 0,5 en la escala de McFarland. Posteriormente se

transfieren 10µL de la suspensión anterior a un tubo de 11mL de caldo Mueller-Hinton (Thermo Scientific, Santa Fe Drive, EE.UU.), y se homogeneiza la mezcla mediante vorteo o inversión del tubo 8-10 veces. Para inocular la placa se transfieren entre 50-100µL de la suspensión anterior a cada pocillo manualmente mediante pipeta multicanal. Por último, se sella la placa con una lámina adhesiva, asegurando que todos los pocillos quedan cubiertos y sellados. Se incuban las placas en aerobiosis a $37\pm 1^{\circ}\text{C}$ durante 24 ± 3 horas. Una vez transcurrido el periodo de incubación, se procede a la lectura de las placas de forma visual sin retirar la lámina adhesiva. La lectura puede realizarse de forma automatizada y/o manual. Si es manual, se interpreta como crecimiento (resistencia) aquellos pocillos en los que se observó turbidez (0,5 en la escala de McFarland) o depósito de células en el fondo de pocillo y ausencia de crecimiento (sensible) aquellos pocillos en los que no se observan ni turbidez ni células en el fondo (**Figura 19**).

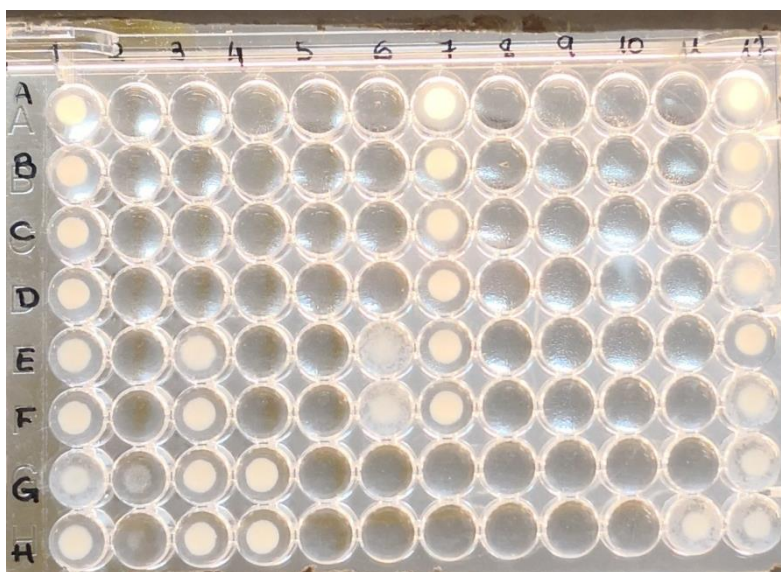


Figura 19. Placa de microdilución inoculada con *Salmonella* spp. tras 24h de incubación a 37°C .

1.8.2. Técnicas de análisis serológico

1.8.2.1. Técnicas inmunoenzimáticas

La medición de las reacciones antígeno-anticuerpo con fines diagnósticos se denomina serología. El suero es la fuente más común de anticuerpos empleados en las distintas técnicas serológicas (Girón, 2014).

El ELISA (de las siglas en inglés, *enzyme linked immunosorbent assay*) o prueba inmunoenzimática ligada a enzimas, es una de las técnicas serológicas más utilizadas en avicultura. El ELISA fue desarrollado en 1971 por los científicos suizos Engvall y Perlmann basado en la técnica radioinmunoensayo (RIA), empleando este nuevo método para determinar los niveles de anticuerpos IgG en suero de conejo (Engvall et al., 1971). Los ensayos que usan como marcador enzimas presentan ventajas como elevada sensibilidad y especificidad, equipamiento barato, procedimientos técnicos rápidos y sencillos, alta precisión y exactitud y gran variedad de sustratos y cromógenos que incrementa su versatilidad. La reacción antígeno-anticuerpo se detecta por un cambio de color o la emisión de luz, producidos por la interacción de la enzima y su sustrato (**Figura 20**). Ambos efectos son cuantificables y proporcionales a la intensidad de la interacción (Ochoa, 2012).

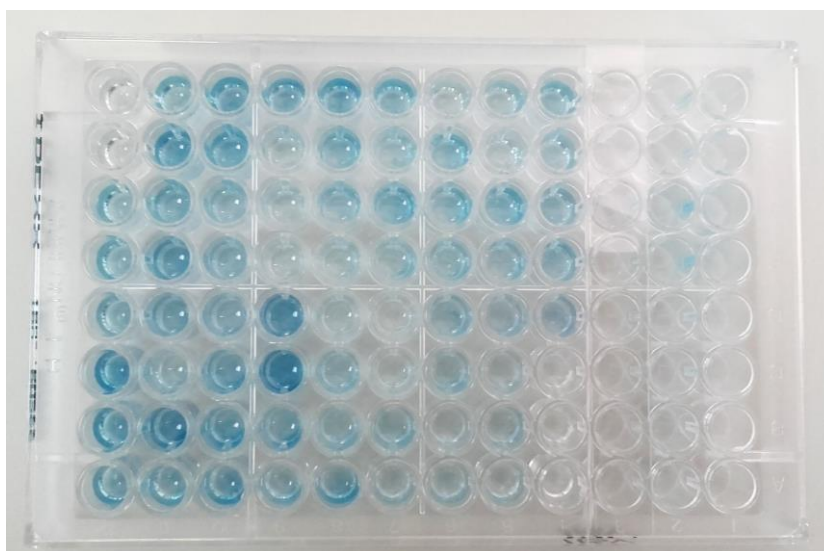


Figura 20. Test ELISA, reacción colorimétrica tras adición del sustrato.

Los métodos de inmunoensayo enzimático se dividen en dos tipos de forma general, los homogéneos y los heterogéneos. En los métodos homogéneos las enzimas se inactivan cuando se unen al anticuerpo, por lo que no existe una etapa de lavado en la

que se separa el antígeno del medio. Los métodos homogéneos son costosos y tienen baja sensibilidad, por ello los métodos heterogéneos son los más utilizados. Los métodos heterogéneos cuentan con etapas de lavado para evitar la interferencia de cualquier molécula después de la unión inicial antígeno-anticuerpo, eliminando todo lo que no sea dicho complejo (O'Kennedy et al., 1990).

Algunos de los tipos de ELISA son (**Figura 21**):

- ELISA directo: en esta técnica la placa se encuentra recubierta directamente con el anticuerpo o antígeno. La medición se realiza gracias a un anticuerpo o antígeno marcado con una enzima. Tras la incubación le sigue un lavado que elimina el antígeno o anticuerpos no unidos al medio. Luego se agrega el sustrato apropiado para producir una señal a través de coloración. La señal colorimétrica se cuantifica para determinar la cantidad de antígeno o anticuerpo adherido a la placa (Engvall et al., 2010).
- ELISA indirecto: este método se llama método indirecto ya que lo que determina y separa el antígeno diana no es el anticuerpo primario, sino otro anticuerpo que se coloca en el medio. El suero problema se agrega a los pocillos recubiertos con antígeno y las placas se incuban. Durante esta incubación, los anticuerpos formados contra los antígenos en la placa del suero problema producen un complejo antígeno-anticuerpo. Para hacer visible este complejo, se agrega un anticuerpo secundario que reconoce el anticuerpo en el suero y que se marca con la enzima. Luego se agrega el sustrato para producir color y se determina la concentración mediante medición colorimétrica (Lindström et al., 1978).
- ELISA sándwich: En este método ELISA, los pocillos se recubren con un anticuerpo de captura. La muestra se añade a los pocillos de la microplaca recubiertos con el anticuerpo; tras esto la placa se incuba y se lava eliminando los antígenos no unidos. Después del lavado, se agregan e incuban unos anticuerpos secundarios que están marcados con la enzima específica del antígeno. Tras la incubación, para revelar la actividad enzimática, se agrega sustrato enzimático al medio y se asegura la coloración. La coloración muestra un resultado positivo, mientras que la falta de coloración indica un resultado negativo (Kato et al., 1977).

- ELISA de competición: En este método, la superficie de los pocillos se recubre con anticuerpos o antígeno específicos. La muestra a medir y el antígeno o anticuerpo marcado con enzima se colocan en el mismo pocillo simultáneamente. El antígeno marcado y sin marcar (antígeno o anticuerpo problema) compiten entre sí para unirse al anticuerpo o antígeno en los pocillos. Después de lavar y agregar el sustrato enzimático, la coloración final permite cuantificar la concentración. Cuando la cantidad del antígeno o del anticuerpo analizado en el suero es baja, se obtiene una absorbancia alta, mientras que cantidades mayores producen una absorbancia baja (Yorde et al., 1976).

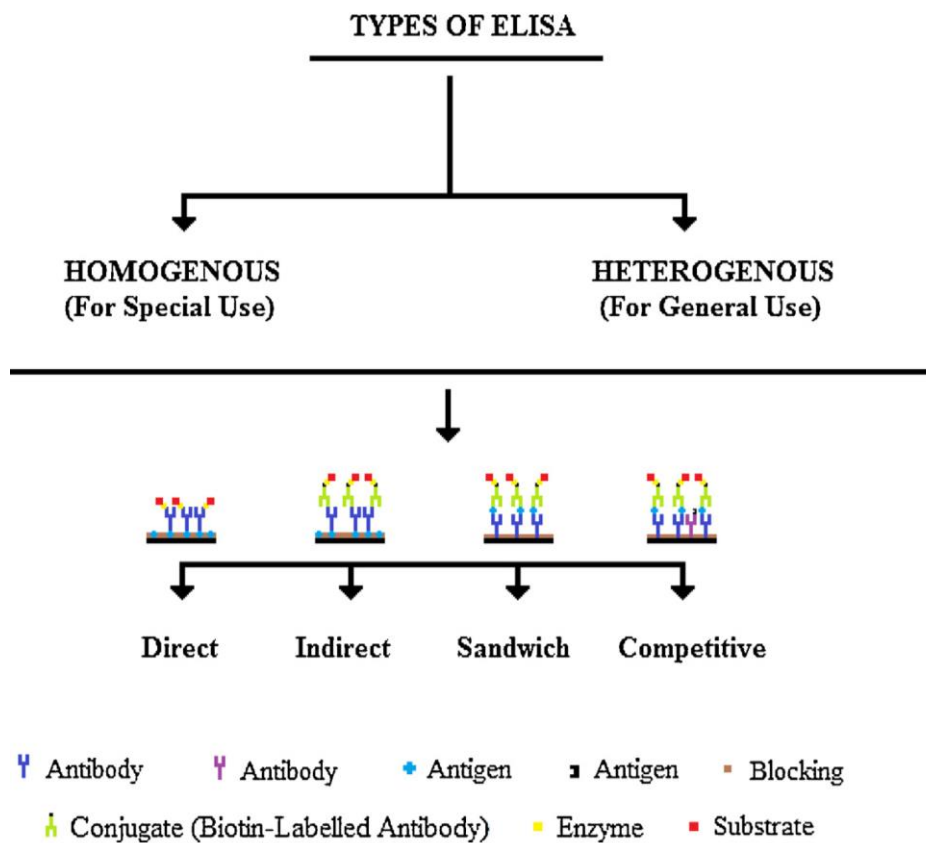


Figura 21. Tipos de ELISA (Aydin, 2015)

1.8.3. Técnicas de biología molecular

1.8.3.1. Reacción en cadena de la polimerasa

Una de las técnicas de biología molecular más utilizada para el diagnóstico en avicultura y que está ampliamente distribuida es la reacción en cadena de la polimerasa (PCR). Esta técnica fue desarrollada por K. Mullis en la década de los 80 y por ello recibió el Premio Nobel en 1993 (Majó, 2010).

La PCR es una técnica enzimática de amplificación *in vitro* del ADN. Esta técnica trata de amplificar secuencias de ADN o ARN concreto, obteniendo un número elevado de copias a partir de una copia de ADN diana. Para que esta reacción en cadena sea posible y se produzca la síntesis de una copia de ADN, se necesita un ADN monocatenario, pH y fuerza iónica adecuados, un cebador que hibride en el extremo 3' de la monohebra, una enzima ADN polimerasa, los cuatro dexosinucleósidos trifosfato y iones Mg^{2+} que actúen como cofactor de la polimerasa (Lozano et al., 2005)

Previo a la reacción de PCR debe obtenerse, aislarse y purificarse el ADN contenido en las células mediante extracción con solventes orgánicos.

Un ciclo de la reacción de PCR consta de tres pasos, repetidos cíclicamente (**Figura 22**):

- Desnaturalización, a temperaturas de 95 °C, que separa las dos hebras del ADN diana.
- Hibridación de los cebadores, reduciendo la temperatura hasta que se formen híbridos estables de cada cebador con su diana.
- Elongación, a temperatura compatible con la acción de la polimerasa, que cataliza la formación de una monohebra complementaria de la diana, en sentido 5'→3', a partir del cebador. Como consecuencia, aparecen dos dobles cadenas por cada molécula diana inicial.

Los tres pasos descritos constituyen un ciclo. Una PCR típica suele constar de unos 30 a 40 ciclos consecutivos, en los que el número de copias del ADN diana aumenta exponencialmente. Aunque los últimos ciclos suelen tener un rendimiento menor que los primeros, las cantidades de ADN obtenido permiten su análisis directo por electroforesis o secuenciación (Lozano et al., 2005).

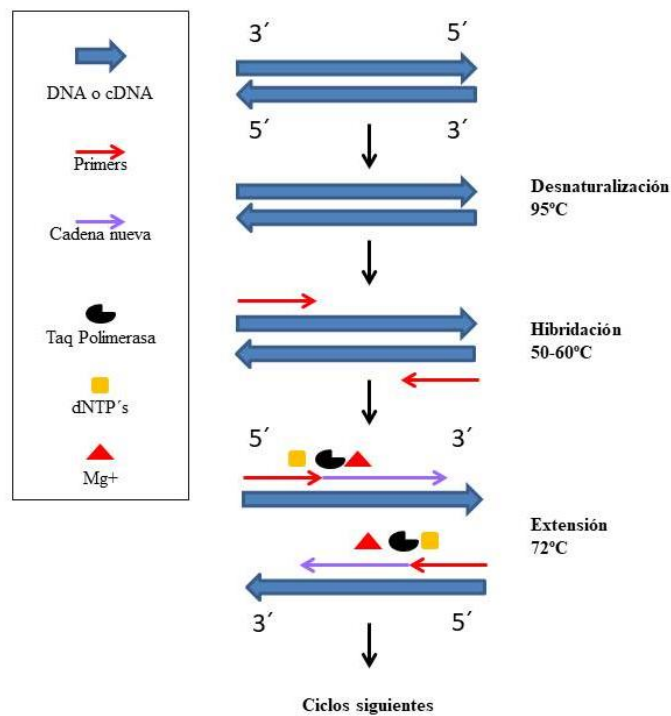


Figura 22. Pasos de un ciclo de PCR (Adaptado Lozano et al., 2005)

1.8.3.2. PCR en tiempo real

En la actualidad existe una variante, la PCR en “Tiempo real”, desarrollada en 1992 por Higuchi & Co. que permite mediante el empleo de técnicas de fluorescencia la cuantificación del producto amplificado al final de cada ciclo mediante el uso de transmisores de fluorescencia en la reacción (Figura 23) (Lozano et al., 2005). El principio de la técnica está basado en la PCR convencional, diferenciándose en cómo se detectan y analizan las copias de ADN (Tamay de Dios et al., 2013).

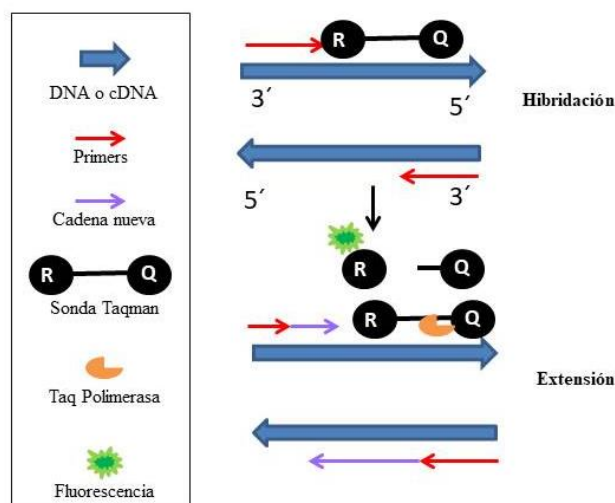


Figura 23. Esquema sondas taqman (Adaptado de Lozano et al., 2005)

Este método sigue el principio denominado como «transferencia de energía de resonancia fluorescente» (FRET) consistente en la transmisión de energía de un donador o «reporter» fluorescente a un aceptor o «quencher». Este método se basa en sondas fluorescentes de oligonucleótidos marcados con un reporter fluorescente y un «quencher», ambos se encuentran unidos mientras la sonda no hibride a su secuencia diana. Cuando hibrida, ocurren cambios en el reporter y el quencher, rompiendo esta unión la Taq polimerasa haciendo que la fluorescencia emitida por el reporter se libere y pueda ser capturada por el equipo. Un ejemplo de estos sistemas son las sondas comerciales conocidas como TaqMan. El resultado de la captura de la fluorescencia se muestra en una gráfica que muestra el curso de la reacción (**Figura 24**) (Tamay de Dios et al., 2013).

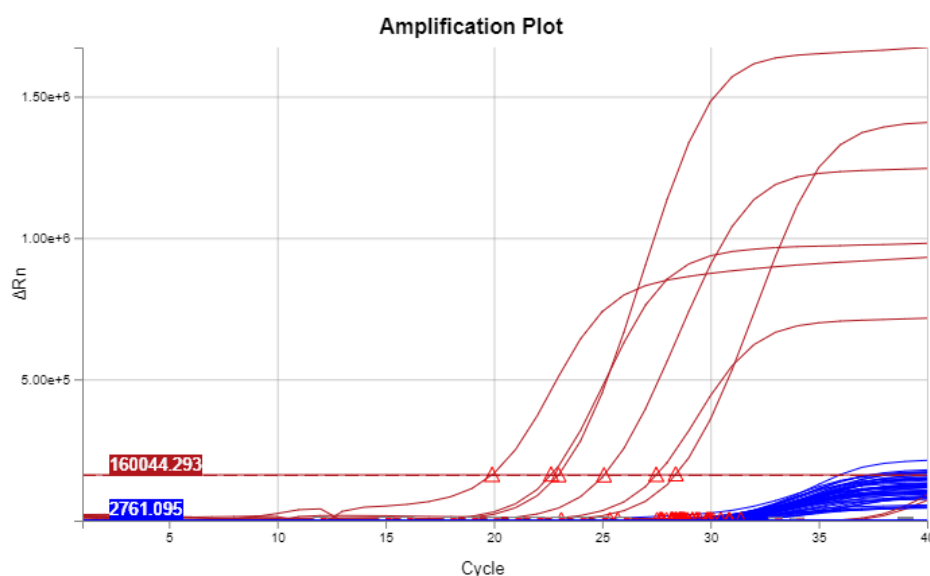


Figura 24. Curvas de amplificación PCR Real Time.

1.8.3.3. PCR con transcriptasa inversa (RT-PCR)

La RT-PCR (Reverse Transcription-PCR, por sus siglas en inglés) se trata de la PCR convencional pero el molde usado es ADN complementario (ADNc) procedente de un ácido ribonucleico mensajero (ARNm). Esta conversión se logra mediante una reacción conocida como transcripción reversa y controlada por la enzima transcriptasa reversa, capaz de convertir el ARNm en una molécula de ADNc. La RT-PCR consta de 3 etapas; La primera etapa donde se extrae, aísla y purifica el ARNm; la segunda etapa de retrotranscripción, donde la retrotranscriptasa transcribirá el ARNm en moléculas de ADNc; y la tercera etapa, amplificación del ADNc que sigue la secuencia de repetición de ciclos de la PCR (Lozano et al., 2005).

1.8.3.4. Secuenciación

La secuenciación del ADN es el análisis más detallado de la estructura del mismo y una herramienta útil en la identificación de variaciones del material genético descrita por Sanger en 1975 (Sanger et al., 1975). Desde entonces se han desarrollado plataformas de secuenciación de alto rendimiento o nueva generación (Next-Generation Sequencing o NGS), capaces de secuenciar millones de fragmentos de ADN en un mismo proceso. El procedimiento general de la secuenciación masiva consiste en fragmentación del ADN, enriquecimiento (selección de las áreas de interés), ligadura del material amplificado a una superficie sólida donde se lleva a cabo la secuenciación, secuenciación del material genético, creación de archivos con información de la secuenciación y alineamiento de las lecturas con respecto de un genoma referencia (**Figura 25**) (Santamaría et al., 2018).

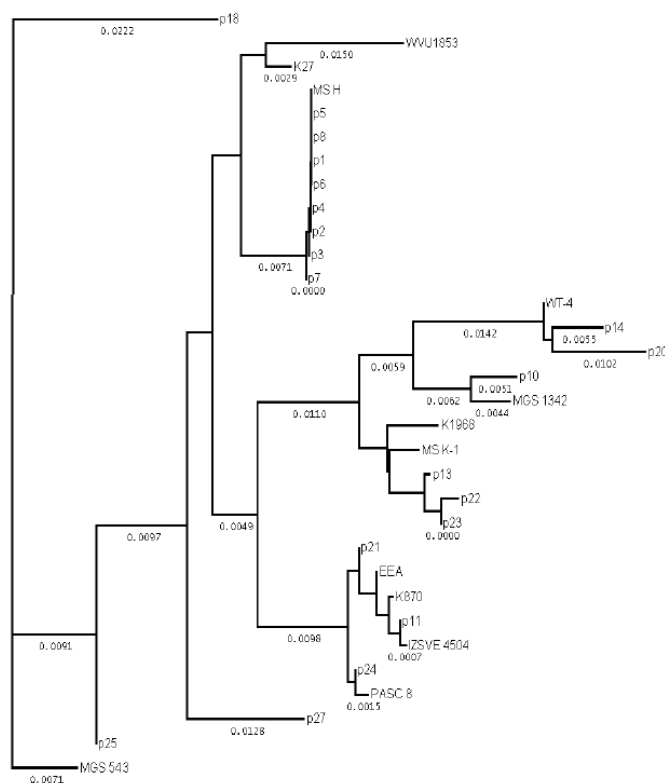


Figura 25. Dendrograma obtenido a partir de secuenciación.

1.9. Referencias

Acevedo-Beiras, A. M. 2017. Infectious bronchitis virus: a challenge for poultry. *Rev. Salud Anim.*, Vol. 39, No. 3.

AECA-WPSA. 2005. Estrategias de recría en reproductoras pesadas. IX Congreso Nacional de Avicultura (Venezuela). https://www.wpsa-aeca.es/aeca_imgs_docs/05_04_21_Manejo_de_reproductoras.pdf. Acceso: 4/03/2022.

Alders, R. 2005. Producción Avícola por Beneficio y por Placer. FAO. *In press*. <https://www.fao.org/3/y5114s/y5114s00.htm#Contents>. Acceso: 3/3/2022.

Alekshun, M.N., S.B. Levy. 2007. Molecular mechanisms of antibacterial multidrug resistance. *Cell*. 128:1037-50.

Ankri, S., and D. Mirelman 1999. Antimicrobial properties of allicin from garlic. *Microb.Infect.* 1, 125-129.

AVEC. 2021. Annual report 2021. Association of Poultry Processors and Poultry Trade in the EU (AVEC). *In press*.

Aydin, S. 2015. A short history, principles, and types of ELISA, and our laboratory experience with peptide/protein analyses using ELISA. *Peptides*. 72:4-15.

Bauer, A. W., W. M Kirby, J.C. Sherris, and M. Turck. 1966. Antibiotic susceptibility testing by a standardized disk method. *Amer. J. Clin. Path.* 45:493-496.

Belguith, H., F. Kthiri, A. Chati, A. Abu Sofah, J. Ben Hamida and A. Ladoulsi. 2010. Inhibitory effect of aqueous garlic extract (*Allium sativum*) on some isolated *Salmonella* serovars. *African Journal of Microbiology Research*. 4 (5):328-338.

Berrang, M.E., J.C. Bailey, S.F. Altekruise, W. K. Shaw, B. L. Patel, R. J. Mainersmann, P. J. Fedorka-Cray. 2009. Prevalence, serotype, and antimicrobial resistance of *Salmonella* on broiler carcasses postpick and postchill in 20 U.S. processing plants. *Journal of Food Protection*. 72:1610–1615.

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

Borlinghaus, J., F. Albrecht, M.C.H. Gruhlke, I.D. Nwachukwu, A.J. Slusarenko. 2014. Allicin: chemistry and biological properties. *Molecules* 19, 12591–12618.

Bradbury, J.M. 2005. Gordon Memorial Lecture. Poultry mycoplasmas: sophisticated pathogens in simple guise. *Br Poult Sci.* 46:125–136.

Brandes, N., S. Schmitt, U. Jakob. 2009. Thiol-based redox switches in eukaryotic proteins. *Antioxid. Redox Signal.*, 11 (5): 997-1014.

Byrd, J., R.H. Bailey, R. Wills, and D. Nisbet. 2007. Recovery of *Campylobacter* from commercial broiler hatchery trayliners. *Poult Sci.* 86:26–29.

Callejo Ramos, A. 2019. Cría y recría de futuras reproductoras. *In press*. http://ocw.upm.es/pluginfile.php/449/mod_label/intro/Tema_05_52_Cria_y_recria_de_futuras_reproductoras.pdf. Acceso: 04/3/2022.

Camps i Rabadá, J. 2015. Historia. ¿Por qué tuvimos gallinas en Europa? *Selecciones Avícolas*. <https://seleccionesavicolas.com/avicultura/2015/04/historia.-porque-tuvimos-gallinas-en-europa>. Acceso: 3/3/2022.

Capua, I., Z. Minta, E. Karpinska, K. Mawditt, P. Britton, D. Cavanagh, R. E. Gough. 1999. Co-circulation of four types of infectious bronchitis virus (793/B, 624/I, B1648 and Massachusetts). *Avian Pathology*. 28:587-592.

Catalá-Gregori P. 2007. Nuevos retos en la alimentación del broiler: medioambiente, producción sin antibióticos promotores del crecimiento e inclusión de materias primas alternativas. Tesis Doctoral.

Catania S., D. Bilato, F. Gobbo, A. Granato, C. Terregino., L. Iob, R.A. Nicholas. 2010. Treatment of eggshell abnormalities and reduced egg production caused by *Mycoplasma synoviae* infection. *Avian Dis.*, 54, 961–964.

Cavallito, C.J., J.H. Bailey. 1944. Allicin, the antibacterial principle of *Allium sativum*. I. Isolation, physical properties and antibacterial action. *J. Am. Chem. Soc.* 66 (11), 1950–1951.

Cavanagh, D., K. Mawditt, P. Britton and C.J. Naylor. 1999. Longitudinal field studies of infectious bronchitis virus and avian pneumovirus in broilers using type-specific polymerase chain reactions. *Avian Pathology*. 28:593-605.

Cavanagh, D. 2007. Coronavirus avian infectious bronchitis virus. *BMC Vet Res*. 38:281-297.

Center for Food Security & Public Health. 2010. Tifosis aviar y Pullorosis Diarrea Blanca Bacilar (Pullorosis). *In press*.

Chalquest, R.R. 1962. Cultivation of the infectious-synovitis-type pleuropneumonia-like organisms. *Avian Dis*. 6:36-43.

Chew, P. H., P. S. Wakenell, and T. B. Farver. 1997. Pathogenicity of attenuated infectious bronchitis virus for oviduct of chickens exposed in ovo. *Avian Dis*. 41:598-603.

Comisión Europea. Reglamento (CE) n° 2160/2003 del Parlamento Europeo y del Consejo, de 17 de noviembre de 2003, sobre el control de la salmonela y otros agentes zoonóticos específicos transmitidos por los alimentos. *DOUE*. 3 (41):328-342.

Comisión Europea. 2013. Decisión de Ejecución de la Comisión, de 12 de noviembre de 2013, relativa a una ayuda financiera de la Unión para un plan coordinado de control para la vigilancia de la resistencia a los antimicrobianos en agentes zoonóticos en 2014 [notificada con el número C(2013) 7289]. *DOUE*. 303:40-47.

Comisión Europea. 2017. Reglamento (UE) 2017/1495 de la Comisión, de 23 de agosto de 2017, que modifica el Reglamento (CE) n.º 2073/2005 por lo que se refiere a *Campylobacter* en canales de pollos de engorde. *DOUE*. 218.

Cook, J. K. A., M. Jackwood, and R. C. Jones. 2012. The long view: 40 years of infectious bronchitis research. *Avian Pathol*. 41:239-250.

Crawshaw, T.R., J.I. Chanter, S.C. Young, S. Cawthraw, A.M. Whatmore, M.S. Koylass, A.B. Vidal, F.J. Salguero, and R.M. Irvine. 2015. Isolation of a novel thermophilic *Campylobacter* from cases of spotty liver disease in laying hens and

experimental reproduction of infection and microscopic pathology. *Vet Microbiol.* 179:315–321.

Cumming RB. 1963. Infectious avian nephrosis (uraemia) in Australia. *Aust Vet J.* 39:145-147.

Daza Pérez, R.M. 1998. Resistencia bacteriana a antimicrobianos: su importancia en la toma de decisiones en la práctica diaria. *Información Terapéutica del Sistema Nacional de Salud.* 22 (3):57-67.

Domermuth, C.H., W.B. Gross, and R.T. DuBose. 1967. Mycoplasmal salpingitis of chickens and turkeys. *Avian Dis.* 11:393–398.

European Food Safety Authority (EFSA). 2010. Analysis of the baseline survey on the prevalence of *Campylobacter* in broiler batches and of *Campylobacter* and *Salmonella* on broiler carcasses in the EU, 2008 - Part A: *Campylobacter* and *Salmonella* prevalence estimates. *EFSA Journal.* 8(03):1503.

European Food Safety Authority (EFSA). 2020. Update and review of control options for *campylobacter* in broilers at primary production. *EFSA Journal.* 18(4):6090.

European Food Safety Authority and European Centre for Disease Prevention and Control. 2021. The European Union One Health 2020 Zoonoses Report. *EFSA Journal.* 19(12):6971.

European Food Safety Authority and European Centre for Disease Prevention and Control. 2021. The European Union Summary Report on Antimicrobial Resistance in zoonotic and indicator bacteria from humans, animals and food in 2018/2019. *EFSA Journal.* 2021; 19(4):6490.

Eck, J. H. H. van. 1983. Effects of experimental infection of fowl with EDS'76 virus, infectious bronchitis virus, and/or fowl adenovirus on laying performance. *Vet Q.* 5:11–25.

Engvall E, Perlmann P. 1971. Enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA). Quantitative assay of immunoglobulin G. *Immunochemistry.* 8:871-4.

Engvall, E. 2010. The ELISA, enzyme-linked immunosorbent assay. *Clin Chem.* 56(2):319-20.

FAO. 2021. Statistical yearbook world food and agriculture 2020. <https://www.fao.org/3/cb1329en/online/cb1329en.html> Acceso :05/03/2022.

FAO. 2020. FAO Statistical Database (FAOStat). Production of Meat, turkey: Top 10 producers, 2019. *In press*. <https://www.fao.org/faostat/en/#data/QCL/visualize> Acceso: 04/03/2022.

Farmer, K.L., G.E. Hill & S.R. Roberts. 2005. Susceptibility of wild songbirds to the house finch strain of *Mycoplasma gallisepticum*. *Journal of Wildlife Diseases*, 41, 317-325.

Feberwee, A., T. von Banniseht-Wysmuller, J.C. Vernooij, A.L. Gielkens, and J.A. Stegeman. 2006. The effect of vaccination with a bacterin on the horizontal transmission of *Mycoplasma gallisepticum*. *Avian Pathol.* 35:35–37.

Feberwee, A., C. J. Morrow, S. A. Ghorashi, A. H. Noormohammadi, W. J. Landman. 2009a. Effect of a live *Mycoplasma synoviae* vaccine on the production of eggshell apex abnormalities induced by a *M. synoviae* infection preceded by an infection with infectious bronchitis virus D1466. *Avian Pathol.* 38:333-340.

Feberwee A., J. J. De Wit, W.J.M Landmand. 2009b. Induction of eggshell apex abnormalities by *Mycoplasma synoviae*: field and experimental studies. *Avian Pathol.* 38, 77–85

García Rodríguez JA, García Sánchez E. El resurgimiento de los gram positivos: razones, significado clínico y posibilidades de control. 1997: 197 *Monográfico 2*: 3-11.

Generalitat Valenciana. 2008. Guía de mejores técnicas disponibles para el sector de explotaciones intensivas de aves en la Comunitat Valenciana. *In press*.

Gharibi, D., R. Ghadimipour and M. Mayahi. Detection of *Mycoplasma gallisepticum* and *Mycoplasma synoviae* among Commercial Poultry in Khouzestan Province, Iran. 2018. *Archives of Rai Institute.* 73(2): 139-146.

Girón, J. 2014. Uso práctico e interpretación de la serología en campo. AECA-WPSA LI Simposio científico avicultura. https://www.wpsa-aeca.es/articulo.php?id_articulo=3740. Acceso: 13/3/2022.

Golz, G., B. Rosner, D. Hofreuter, C. Josenhans, L. Kreienbrock, A. Lowenstein, A. Schielke, K. Stark, S. Suerbaum, L.H. Wieler, and T. Alter. 2014. Relevance of *Campylobacter* to public health – the need for a One Health approach. *Int J Med Microbiol.* 304:817-32.

Grimont P. A.D., F. X. Weill. 2007. Antigenic Formulae of the *Salmonella* Serovars, Ninth Edition, World Health Organization Collaborating Centre for Reference and Research on *Salmonella*. Institut Pasteur, Paris, France.

Gruhlke, M.C.H., H. Antelmann, J. Bernhardt, V. Kloubert, L. Rink, A. J. Slusarenko. 2019. The human allicin-proteome: S-thioallylation of proteins by the garlic defence substance allicin and its biological effects. *Free Radic. Biol. Med.* 131, 144–153.

Heinrich, M.; J. Barnes; S. Gibbons; E.M. Williamson. 2004. Fundamentals of pharmacognosy and phytotherapy. Edinburgh: Churchill Livingstone.

Hermans, D., F. Pasmans, W. Messens, A. Martel, I.F. Van, G. Rasschaert, M. Heyndrickx, D.K. Van, and F. Haesebrouck. 2012. Poultry as a host for the zoonotic pathogen *Campylobacter jejuni*. *Vector Borne Zoonotic Dis.* 12:89-98.

Higuchi R, Dollinger G, Walsh PS, Griffith R. 1992 Simultaneous amplification and detection of specific DNA sequences. *Biotechnology.* 10: 413-417.

Hofstad, M. S. and H. W. Yoder, Jr. 1996. Avian infectious bronchitis-virus distribution in tissues of chicks. *Avian Dis.* 10:230–239.

Hopkins, S. R. and C.W. Beard. 1985. Studies on methods for determining the efficacy of oil emulsion vaccines against infectious bronchitis virus. *J Am Vet Med Assoc.* 187:305.

INPROVO, Organización interprofesional del huevo y sus productos. 2019. Aumenta el censo de gallinas ponedoras en 2019 en España. In press. <https://www.inprovo.com/aumenta-el-censo-de-gallinas-ponedoras-en-2019-en-espana/>. Acceso: 7/03/2022.

Jawetz, E., J. Melnick, and E. Adelberg. 2014. Microbiología Médica 26ª edición. Editado por: Brooks, G.F., Carroll, K. C., Butel, J. S., Morse, S. A., & Mietzner, T. A. AMGH Editora.

Junta Andalucía (Consejería de Agricultura, Ganadería, Pesca y Desarrollo Sostenible). 2008. Caracterización de las explotaciones andaluzas del sector avícola. *In press*. https://www.juntadeandalucia.es/sites/default/files/20204/carcterizacion_explot_avicola.pdf. Acceso: 05/03/2022.

Kato K, Y. Hamaguchi, S. Okawa, E. Ishikawa, K. Kobayashi. 1977. Use of rabbit antibody IgG bound into plain and aminoalkylsilyl glass surface for the enzyme-linked sandwich immunoassay. *J Biochem.* 82:261-6.

Kelly, D.J. 2001. The physiology and metabolism of *Campylobacter jejuni* and *Helicobacter pylori*. *Symp Ser Soc Appl Microbiol.* 16S-24.

King, B., B.J. Potts, D.A. Brian. 1985. Bovine coronavirus hemagglutinin protein. *Virus Res.* 2:53-59.

Kleven, S.H., D.D. King, and D.P. Anderson. 1972. Airsacculitis in broilers from *Mycoplasma synoviae*: effect on air-sac lesions of vaccinating with infectious bronchitis and Newcastle virus. *Avian Dis.* 16:915-924.

Kleven, S. H., and N. Ferguson-Noel. 2008. *Mycoplasma synoviae* infection. *Diseases of poultry*,12:845-56.

Kume, K., Y. Kawakubo, C. Morita, E. Hayatsu, and M. Yoshioka.1977. Experimentally induced synovitis of chickens with *Mycoplasma synoviae*. Effects of bursectomy and thymectomy on course of the infection for the first four weeks. *Am J Vet Res* 38: 1595-1600.

Landman, W. J. M., and A. Feberwee. 2001. Field studies on the association between amyloid arthropathy and *Mycoplasma synoviae* infection, and experimental reproduction of the condition in brown layers. *Avian Pathol* 30: 629-639.

Landman, W. J. M., D. J. Mevius, K. T. Veldman and A. Feberwee. 2008. *In vitro* antibiotic susceptibility of Dutch *Mycoplasma synoviae* field isolates originating from joint lesions and the respiratory tract of commercial poultry. *Avian Pathol.* 37:415-420.

Lastovica AJ, On SLW, and Zhang L. 2014. The Family Campylobacteraceae. In: *The Prokaryotes– Deltaproteobacteria and Epsilonproteobacteria*. Rosenberg E, DeLong EF, Lory S, Stackebrandt E, and Thompson F, eds. Springer-Verlag, Berlin. 307-336.

Lauerman, L.H. 1998. *Mycoplasma* PCR assays. In: Nucleic Acid Amplification Assays for Diagnosis of Animal Diseases. L.H. Lauerman, ed. American Association of Veterinary Laboratory Diagnosticians, Turlock, California. 41-42.

Linder, E. 1995. Toxicología de los alimentos. EditorialAcribia. Zaragoza España. 53-65.

Lindström, P., O. Wager. 1978. IgG autoantibody to human serum albumin studied by the ELISA-technique. Scand J Immunol.7:419-25.

Lowenthal J.W., T. E. O'Neil, A. David, G. Strom. and M. E. Andrew. 1999. Cytokine therapy: a natural alternative for disease control. Vet. Immunol. Immunopathol. 72:183-188.

Lozano Teruel, J. A., J. D. Galindo Cascales, J. C. García-Borrón Martínez, J. H. Martínez-Liarte, R. Peñafiel García, F. Solano Muñoz. 2005. Bioquímica y biología molecular para ciencias de la salud. McGraw-hill Interamericana 3a edición.

Majó, N. 2010. Nuevas herramientas de diagnóstico de las enfermedades más importantes que afectan a aves de corral. Doser técnico sanidad animal (I). Aviar. *In press*.

MAPA. 2000. Real Decreto 1888/2000, de 22 de noviembre, por el que se establecen las condiciones de sanidad animal aplicables a los intercambios intracomunitarios y las importaciones de aves de corral y de huevos para incubar, procedentes de países terceros. BOE. 306.

MAPA.2004. Real Decreto 479/2004, de 26 de marzo, por el que se establece y regula el Registro general de explotaciones ganaderas. BOE. 89:14978-14983.

MAPA. 2010. Guía de mejores técnicas disponibles del sector de la avicultura de puesta.https://www.mapa.gob.es/es/ganaderia/publicaciones/GuiaMTDsSectorAviculturaPuesta_tcm30-105318.pdf. Acceso: 04/03/2022.

MAPA.2019. Acuerdo para el desarrollo del Programa de Prescripción y Uso Razonable de Antibióticos en POLLOS BROILER. <https://www.resistenciaantibioticos.es/es/programa-reduce-pollos-broiler>. Acceso: 07/03/2022.

MAPA. 2021. Programas nacionales de vigilancia y control de *Salmonella* en aves de corral. Resultados 2020. https://www.wpsa-aeca.es/articulo.php?id_articulo=5521. Acceso: 7/03/2022.

MAPA.2021. El sector de la avicultura de carne en cifras. Principales indicadores económicos 2020. *In press*.

Marois, C., J.P. Picault, M. Kobisch, and I. Kempf. 2005. Experimental evidence of indirect transmission of *Mycoplasma synoviae*. *Vet Res.* 36:759-769.

Ministerio de Presidencia. 2004. Real Decreto 1940/2004, de 27 de septiembre, sobre la vigilancia de las zoonosis y los agentes zoonóticos. BOE. 237: 32772-32777.

Ministerio de Presidencia. 2006. Real Decreto 640/2006, de 26 de mayo, por el que se regulan determinadas condiciones de aplicación de las disposiciones comunitarias en materia de higiene, de la producción y comercialización de los productos alimenticios. BOE. 126: 19999-20002.

Ministerio de la Presidencia, Relaciones con las Cortes y Memoria Democrática. 2021. Real Decreto 637/2021, de 27 de julio, por el que se establecen las normas básicas de ordenación de las granjas avícolas. BOE. 179:90724-90759.

Mohammed, H. O., T. E. Carpenter, R. Yamamoto, and D. A. McMartin. 1986. Prevalence of *Mycoplasma gallisepticum* and *M. synoviae* in commercial layers in southern and central California. *Avian Dis.* 30: 519-26.

Müller, A., J. Eller, F. Albrecht, P. Prochnow, K. Kuhlmann, J. Bandow, J.E., Slusarenko, A.J., Leichert, L.I.O., 2016. Allicin induces thiol stress in bacteria through S-allylmercapto modification of protein cysteines. *J. Biol. Chem.* 291:11477-11490.

Murray, P. R., & Shea, Y. R. 2004. Pocket guide to clinical microbiology. ASM Press.*In press*.

Ochoa Azze, R.F. 2012. Técnicas inmunoenzimáticas para ensayos clínicos de vacunas y estudios inmunoepidemiológicos. Finaly ediciones.

O'Kennedy, R., M. yrne, C. O'Fagain, & G. Berns. 1990. Experimental section: A review of enzyme-immunoassay and a description of a competitive enzyme-linked

immunosorbent assay for the detection of immunoglobulin concentrations. *Biochemical Education*. 18(3):136-140.

OMS. 2018. *Salmonella* (no tifoidea). *In press*. [https://www.who.int/es/news-room/fact-sheets/detail/Salmonella-\(non-typhoidal\)](https://www.who.int/es/news-room/fact-sheets/detail/Salmonella-(non-typhoidal)). Acceso: 7/03/2022.

OMS. 2020. Resistencia a los antimicrobianos. *In press*. <https://www.who.int/es/news-room/fact-sheets/detail/antimicrobial-resistance>. Acceso: 7/03/2022.

Pachón, D. A. 2009. Aislamiento, identificación y serotipificación de enterobacterias del género *Salmonella* en una población de *Crocodylus intermedius* y estuadios mantenidos en cautiverio en la estación de biología tropical.

Patten, B. E., P. A. Higgins, and K. G. Whithear. 1984. A urease-ELISA for the detection of *Mycoplasma* infections in poultry. *AustVet J.* 61: 151-155.

Petersen, L., E.M. Nielsen, and S.L. On. 2001. Serotype and genotype diversity and hatchery transmission of *Campylobacter jejuni* in commercial poultry flocks. *Vet Microbiol.* 82:141-154.

Popoff, M., L. Le Minor. 1992. Antigenic formulas of the *Salmonella* serovars. Institute Pasteur. Dr. Roux. París, Francia.

PRAN. 2018. Informe JIACRA España. Primer análisis integrado del consume de antibioticos y sy relación con la aparición de resistencia. *In press*.

Rabinkov, A., T. Miron, D. Mirelman, M. Wilchek, S. Glozman, E. Yavin, L. Weiner. 2000. S-allylmercaptoglutathione: the reaction product of allicin with glutathione possesses SH-modifying and antioxidant properties. *Biochim. Biophys. Acta (BBA) Mol. Cell Res.* 1499:144-153.

RAE. 2022. <https://dle.rae.es/avicultura>. Acceso: 24/03/2022.

Región de Murcia digital. S.f. Pavo, Historia, propiedades y producción. *In press*. https://www.regmurcia.com/servlet/s.S1?sit=c,543,m,2717&r=ReP-23859-DETALLE_REPORTAJESPADRE. Acceso: 03/03/2022.

Rosales AG. 1991. Enfermedades Respiratorias en el Pollo de Engorde. In: Conferência APINCO 1991 de Ciência e Tecnologia Avícolas 163-176.

Sahin, O., I.I. Kassem, Z. Shen, J. Lin, G. Rajashekara, and Q. Zhang. 2015. *Campylobacter* in Poultry: ecology and potential interventions. Avian Dis. 59:185-200.

Sahu, S. P., and N. O. Olson. 1976. Evaluation of broiler breeder flocks for nonspecific *Mycoplasma synoviae* reaction. Avian Dis. 20:49–64.

Salim, H. M., Huque, K. S., Kamaruddin, K. M., & Haque Beg, A. 2018. Global restriction of using antibiotic growth promoters and alternative strategies in poultry production. Science progress, 101(1): 52-75.

Sanger, F., A.R. Coulson. 1975. A rapid method for determining sequences in DNA by primed synthesis with DNA polymerase. J Mol Biol. 94: 441-448.

Santamaría González, M., J. M. Lezana Rosales. 2018. Técnicas de secuenciación masiva (ngs). Ed. Cont. Lab. Clin 37: 33-40.

Schalk AF, Hawn MC.1931. An apparently new respiratory disease of baby chicks. J Am Vet Med Assoc. 78:413-416.

Sevilla-Navarro S., P. Catalá-Gregori, C. Marin. 2020. *Salmonella* Bacteriophage Diversity According to Most Prevalent *Salmonella* Serovars in Layer and Broiler Poultry Farms from Eastern Spain. Animals. 10(9): 1456.

Shahbandeh, M. 2022. Egg production worldwide 1990-2020. Statista. In press. <https://www.statista.com/statistics/263972/egg-production-worldwide-since-1990/>. Acceso: 07/03/2022.

Shoetan A., K.T. Augusti and P.K. Joseph .1984. Hypolipidemic effects of garlic oil in rats fed ethanol and a high lipid diet. Experimental. 40:261-263.

Sivam, G.P. 2001. Protection against *Helicobacter pylori* and other bacterial infections by garlic. J. Nutr. 131:1106-1108.

Terragno R, M. Caffer, S. Bruno, N. Binsztein. 2003. *Salmonella*: aislamiento, identificación y serotipificación. En: Manual de Procedimientos. Argentina: Instituto Nacional de Enfermedades Infecciosas. *In press*.

Tamay de Dios L, C. Ibarra, C. Velasquillo. 2013. Fundamentos de la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) y de la PCR en tiempo real. *In press*. <https://www.medigraphic.com/pdfs/invd/ir-2013/ir132d.pdf> . Acceso: 14/03/2022.

Térezolo, H.R. 2004. Actualización sobre Salmonelosis de las aves. Conference: Actualización sobre Salmonelosis de las aves. VI Seminario de Actualización Avícola.

Tortuero Cosialls, F. 2009. La avicultura y la sociedad Española en los últimos Cincuenta años. *Selecciones avícolas*. 51 (1): 65-70.

Van, T.T., E. Elshagmani, M.C. Gor, A. Anwar, P.C. Scott, and R.J. Moore. 2017. Induction of spotty liver disease in layer hens by infection with *Campylobacter hepaticus*. *Vet Microbiol*. 199:85-90.

Vardaman, T.H. 1976. The resistance and carrier status of meat-type hens exposed to *Mycoplasma synoviae*. *Poult Sci*. 55:268-273.

Villarreal L, T. L. Sandri, S. P. Souza, L. J. Richtzenhain J. J. de Wit y P. E. Brandao. 2010. Molecular epidemiology of avian infectious bronchitis in Brazil from 2007 to 2008 in breeders, broilers, and layers. *Avian Dis*. 54:894-898.

Weinack, O.M., G.H. Snoeyenbos, and S.H. Kleven. 1983. Strain of *Mycoplasma synoviae* of low transmissibility. *Avian Dis*. 27:1151-1156.

Woo, P.C.Y., Y. Huang, S. K. P. Lau, K. Yuen. 2010. Coronavirus Genomics and Bioinformatics Analysis. *Viruses* .2:1804-1820.

Yorde, D.E., E. A. Sasse, T.Y Wang, R. O. Husa, J.C. Garancis. 1976. Competitive enzymeliked immunoassay with use of soluble enzyme/antibody immune complexes for labeling. I. Measurement of human choriogonadotropin. *Clin Chem*. 22:1372-7.

Zhu, L., M.A. Shahid, J. Markham, G. F. Browning, A. H. Noormohammadi & M.S. Marena. 2018. Genome analysis of *Mycoplasma synoviae* strain MS-H, the most common *M. synoviae* strain with a worldwide distribution. *BMC Genomics*.19:117.

CAPÍTULO II. OBJETIVOS

2. OBJETIVOS

El objetivo general de esta tesis doctoral es abordar diferentes retos a los que se enfrenta la avicultura actual desde el punto de vista de salud animal y de salud pública, monitorizando el estado sanitario y mejorando el conocimiento de la epidemiología de varios agentes zoonóticos y/o patógenos, como *Salmonella* spp., *Campylobacter* spp., *Mycoplasma synoviae* y el virus de la Bronquitis Infecciosa Aviar en las explotaciones avícolas de la Comunidad Valenciana, constituyendo una fuente de información adicional que ayude en la toma de decisiones, en la instauración de programas y estrategias de control sanitario, así como en la evaluación de la eficacia de los mismos.

Para ello se plantearon los siguientes objetivos:

Desde el punto de vista de patógenos zoonóticos con relevancia en salud pública:

1. Conocer las resistencias en *Salmonella* spp. en las explotaciones avícolas de la Comunidad Valenciana.
2. Evaluar estrategias de control de las resistencias mediante alternativas naturales.
3. Conocer la presencia de *Campylobacter* spp. en las explotaciones avícolas de la Comunidad Valenciana y de zonas o comunidades autónomas limítrofes.

Desde el punto de vista de patógenos con relevancia en sanidad animal:

4. Conocer la seroprevalencia y prevalencia de *Mycoplasma synoviae* y los genotipos presentes en las explotaciones avícolas de la Comunidad Valenciana para evaluar la situación actual y la eficacia de los planes de control.
5. Conocer la seroprevalencia y prevalencia de IBV y detectar posibles variantes del virus presente en las explotaciones avícolas de la Comunidad Valenciana, para evaluar la situación actual y la implementación de los planes de control.

CAPÍTULO III. CAPÍTULOS EXPERIMENTALES

3. CAPÍTULOS EXPERIMENTALES

Los capítulos experimentales de esta Tesis doctoral se dividen en dos partes.

En los tres primeros capítulos se abordaron dos de los patógenos relevantes desde el punto de vista de salud pública, *Salmonella* spp. y *Campylobacter* spp. Con relación a *Salmonella* se monitorizaron las resistencias de cepas aisladas en avicultura y se evaluó el efecto de una sustancia natural, la alicina, sobre las resistencias de este patógeno. El tercer capítulo se dedicó a evaluar la presencia de *Campylobacter* spp. en campo tras los límites impuestos por la Unión Europea en 2017. Las publicaciones derivadas son:

- 3.1.1 Monitorización de las resistencias antimicrobianas de *Salmonella* spp. en avicultura en el Este de España.
- 3.1.2 Evaluación del efecto sinérgico entre alicina y diferentes antibióticos frente a cepas de *Salmonella* multirresistente.
- 3.1.3. Presencia de *Campylobacter* spp. en avicultura a nivel de campo, dos años después de la entrada en vigor del Reglamento Europeo (EU) 2017/1495.

Los dos capítulos finales se dedican a *Mycoplasma synoviae* y el virus de la Bronquitis Infecciosa, dos patógenos relevantes en avicultura por su impacto en la salud de los animales y por las pérdidas económicas que ocasionan. En estos capítulos se monitoriza la seroprevalencia, prevalencia y los serotipos/variantes circulantes en explotaciones de la Comunidad Valenciana. Las publicaciones derivadas son:

- 3.2.1 Seroprevalencia y Prevalencia de *Mycoplasma synoviae* en gallinas ponedoras y reproductoras pesadas en España.
- 3.2.2 Seroprevalencia y Prevalencia de Bronquitis Infecciosa en pollos, gallinas ponedoras y reproductoras pesadas en España.

3.1. Patógenos zoonóticos relevantes en salud pública.

3.1.1. Monitorización de las resistencias antimicrobianas de *Salmonella* spp. en avicultura en el Este de España.

V. Cortés, S. Sevilla-Navarro, C. García, C. Marín, P. Catalá-Gregori. 2022. Monitoring antimicrobial resistance trends in *Salmonella* spp. from poultry in Eastern Spain. Poultry Science. 101(6).DOI:101832

3.1.1.1. Resumen

Salmonella spp. es uno de los patógenos zoonóticos más importantes con impacto económico en salud pública a nivel mundial. La relevancia de *Salmonella* spp. aumenta con la aparición de las cepas resistentes. El objetivo de este estudio fue determinar el nivel de resistencias antimicrobianas en 332 aislados de *Salmonella* spp. seleccionados de 3 orientaciones productivas diferentes de avicultura en el este de España durante 3 años (2015 a 2017). La susceptibilidad antimicrobiana se evaluó mediante el método de microdilución en caldo utilizando 14 antibióticos. Se utilizaron valores de corte epidemiológicos (ECOFF) para evaluar la resistencia microbiológica a los antibióticos. Las tasas de resistencia de *Salmonella* spp. a al menos un antibiótico fueron del 96%, 98% y 56% en pollos, pavos y ponedoras, respectivamente. En cuanto a la multiresistencia, todas las orientaciones productivas presentan una tendencia decreciente a lo largo del estudio, siendo las tasas medias del 80% en pavos seguidas de pollos de engorde (40%) y ponedoras (6%). A lo largo del estudio se encontró el mayor porcentaje de resistencia al sulfametoxazol en todas las orientaciones productivas. Las cepas de pollos mostraron las tasas más altas de resistencia al sulfametoxazol (73%), gentamicina (57 %), ciprofloxacina (50%), ácido nalidíxico (29%) y tetraciclina (24%). En relación a los pavos, las tasas de resistencia más altas fueron al sulfametoxazol (76%), ciprofloxacina (69%), tetraciclina (75%), ácido nalidíxico (63%) y ampicilina (63%). Las ponedoras presentaron las tasas de resistencia más elevadas a sulfametoxazol (39%) y tetraciclina (13%). Con respecto a los serotipos, aquellos que presentaron multirresistencias (MDR) comunes a las 3 orientaciones productivas fueron *S. Kentucky* y *S. Hadar*. Por otro lado, se encontraron altas tasas de multirresistencias en otros serotipos como *S. Infantis* y *S. Typhimurium* en pollos y pavos. Los resultados mostrados en el presente estudio sugieren que la reducción del uso de antibióticos comienza a verse reflejada en la reducción del número de multirresistencias especialmente en ponedoras, que no obtuvieron cepas de *Salmonella* spp. multirresistentes en el último periodo. Sin embargo, el nivel de resistencias encontrado en este estudio sugiere la necesidad de continuar trabajando en la limitación del uso de antimicrobianos en aves para lograr (al igual que en ponedoras) el control de los microorganismos multirresistentes.

3.1.1.2. Introducción

Salmonella spp. es uno de los patógenos zoonóticos más importantes con impacto económico en salud pública a nivel mundial. Los últimos resultados informados por la Autoridad Europea de Seguridad Alimentaria (EFSA) durante 2019 mostraron que el 17,9% de los casos transmitidos vía alimentaria fueron causados por *Salmonella* spp., con un total de 87.923 casos humanos confirmados en la Unión Europea (UE), convirtiéndose la salmonelosis, en la segunda enfermedad zoonótica más frecuentemente notificada en humanos (EFSA, 2021). Aunque se ha observado una tendencia decreciente entre los años 2008 a 2016, durante los últimos 5 años (2012-16) la tendencia se ha mantenido estable sin un aumento o disminución significativos (EFSA, 2021). Los alimentos de origen animal, en concreto los productos avícolas (carne, huevos y ovoproductos), son señalados por la EFSA (2021) como una de las principales vías de transmisión en humanos. Teniendo en cuenta la relevancia de los productos avícolas como fuente de transmisión de esta bacteria, en España se instauraron los Programas Nacionales de Control (PNCS), para la vigilancia de determinados serotipos como *Salmonella* Enteritidis (*S. Enteritidis*) y *Salmonella* Typhimurium (*S. Typhimurium*) en ponedoras de la especie *Gallus gallus* desde 2008, pollos de engorde de la especie *Gallus gallus* desde 2009, así como para pavos desde 2010.

La relevancia de *Salmonella* spp. se incrementa con la aparición de las cepas resistentes a los antimicrobianos. En medicina veterinaria, los antibióticos han sido ampliamente utilizados terapéuticamente, profilácticamente y como promotores del crecimiento en el pasado (Usera et al., 2002). Aunque la mayoría de los casos de salmonelosis en humanos son autolimitantes y suelen resolverse sin necesidad de tratamiento, en casos graves o pacientes inmunocomprometidos puede ser necesaria la antibioterapia con ciprofloxacina en adultos y ceftriaxona en niños (Berrang et al., 2009).

La aparición y el desarrollo de la resistencia a los antimicrobianos (AMR) es un problema de salud mundial que involucra tanto a la medicina veterinaria como a la salud pública. En la UE, es obligatorio que los Estados miembros controlen y notifiquen la AMR de *Salmonella* (EFSA, 2021). En este sentido, en 2014 se implantó en España el Plan Nacional de Resistencias a Antibióticos (PRAN) para el periodo 2014-2018, que

recientemente se ha prorrogado hasta 2021 (MAPA, 2018). Por lo tanto, para proporcionar información útil sobre la influencia de la implementación de PRAN en el sector avícola, es esencial monitorear las tendencias de AMR de *Salmonella* spp. a nivel de granja. Por ello los objetivos principales de este estudio fueron investigar las tendencias de las resistencias a los antibióticos de *Salmonella* en 3 orientaciones productivas avícolas diferentes en el este de España a lo largo de tres años (2015 a 2017) y evaluar los patrones de resistencia frente a los antibióticos utilizados actualmente en veterinaria y terapia humana.

3.1.1.3. Material y métodos

3.1.1.3.1. Selección de cepas de *Salmonella* spp.

Para conocer la resistencia antibiótica de *Salmonella* spp. se seleccionaron 332 cepas pertenecientes a muestras positivas de los PNCS en el Este de España recogidas entre 2015 y 2017. Todas las muestras fueron analizadas en el Centro de Calidad Avícola y Alimentación Animal de la Comunidad Valenciana (CECAV). Más del 95% de las granjas avícolas ubicadas en esta región participaron en el estudio

3.1.1.3.2. Procedimiento de aislamiento e identificación

El procedimiento de aislamiento de *Salmonella* spp. se realizó de acuerdo con el método ISO 6579:2002/Amd 1:2007 (ISO, 2007). Todas las cepas aisladas fueron serotipadas según la técnica de Kauffman-White-Le Minor. Las cepas de *Salmonella* spp. aisladas se congelaron a -80°C después de ser resuspendidas en agua destilada estéril con 20% (v/v) de glicerol bidestilado al 99,5% (VWR, Lovaina, Bélgica).

3.1.1.3.3. Procedimiento de susceptibilidad antimicrobiana

Los perfiles de susceptibilidad antimicrobiana se determinaron mediante la técnica de microdilución en caldo, según ISO 20776-1:2006 (ISO, 2006), mediante placas de microtitulación disponibles en el mercado: Sensititre™ EUVSEC (Thermo Scientific, East Grinstead, Reino Unido). Estas placas son una micro-versión del método clásico de antibiograma basado en la dilución en caldo. Los antibióticos seleccionados y sus concentraciones fueron los establecidos en la Decisión 2013/653 (UE, 2013) incluyendo 2 quinolonas: ciprofloxacina (CIP) y ácido nalidíxico (NAL); 3 betalactámicos: ampicilina (AMP), cefotaxima (FOT) y ceftazidima (TAZ); un fenicol: cloranfenicol (CHL); una sulfonamida: sulfametoxazol (SMX); una polimixina:

CAPÍTULO III. CAPÍTULOS EXPERIMENTALES

colistina (COL); un macrólido: azitromicina (AZI); una glicilciclina: tigeciclina (TGC); un aminoglucósido: gentamicina (GEN); una tetraciclina: tetraciclina (TET); un carbapenem: meropenem (MERO) y una pirimidina: trimetoprim (TMP). El panel de antibióticos y sus concentraciones se han descrito en la **Tabla 9**.

Tabla 9. Panel de concentraciones antimicrobianas de sensititre, después de la adición de 50 μ L de caldo inoculado y ECCOFF.

Antibiótico	Abreviaturas	Rango de concentraciones (μ g/mL)	ECCOFF <i>Salmonella</i> spp. (μ g/mL)
Sulfametoxazol	SMX	8 – 1024	≥ 76
Trimetoprim	TMP	0.25 – 32	> 2
Ciprofloxacina	CIP	0.06 – 8	> 0.064
Tetraciclina	TET	2 – 64	> 8
Meropenem	MERO	0.12 – 16	> 0.125
Azitromicina	AZI	2 – 64	≥ 32
Ácido nalidixico	NAL	4 – 128	> 16
Cefotaxima	FOT	0.25 – 1	> 0.5
Cloramfenicol	CHL	8 – 128	> 16
Tigeciclina	TGC	0.25 – 8	> 1
Ceftazidima	TAZ	0.5 – 8	> 2
Colistina	COL	1 – 16	> 2
Ampicilina	AMP	1 – 64	> 8
Gentamicina	GEN	0.5 – 32	> 2

Para la recuperación de las cepas congeladas, se sembraron 10 μ L de suspensión congelada en agar nutritivo sólido (Biokar®, Francia). Posteriormente, se incubaron a 37 ± 1 °C durante 24 ± 3 horas. Después del crecimiento de las cepas, las placas de microtitulación Sensititre™ EUVSEC (Thermo Scientific, East Grinstead, Reino Unido) se inocularon e interpretaron siguiendo las instrucciones del fabricante. Se tomaron valores de corte epidemiológico (ECCOFF) para determinar la resistencia frente a los antibióticos analizados. Estos valores fueron establecidos por el Comité Europeo de Pruebas de Susceptibilidad Antimicrobiana (EUCAST) y los establecidos en la Decisión 2013/653 (UE, 2013). Los valores no incluidos en esta legislación (AZI y SMX) se evaluaron siguiendo los criterios del Instituto de Estándares Clínicos y de Laboratorio (CLSI, 2017). El crecimiento de la cepa *Salmonella* spp. CECT 4300 se

utilizó como control de calidad positivo. Las cepas resistentes a tres o más antibióticos se consideraron multirresistentes (EFSA, 2021).

3.1.1.3.4. Análisis estadístico

Se utilizó un modelo lineal generalizado para comparar las tasas de AMR de cada antibiótico dentro de la misma producción avícola a lo largo de los años (2015, 2016 y 2017) y para comparar los resultados globales entre cada producción avícola. Este modelo también se utilizó para comparar resultados dentro del mismo año. Se consideró que un valor P de $\leq 0,05$ indicaba una diferencia estadísticamente significativa. Los análisis se llevaron a cabo utilizando una aplicación de software comercialmente disponible (paquete de software Statgraphics Centurion XVI 16.2.04; Statgraphics Technologies, Inc. The Plains, Virginia, 2021).

3.1.1.4. Resultados

En este estudio se seleccionaron 332 cepas (200, 86, 46 de pollos, pavos y ponedoras, respectivamente). Se determinó la susceptibilidad antimicrobiana de cepas de campo de *Salmonella* spp. procedentes de granjas de pollos (82 en 2015; 40 en 2016; 78 en 2017). Un total de 93% (72/82) en 2015, 97% (39/40) en 2016 y 97% (76/78) en 2017 de las cepas de *Salmonella* presentaron AMR a al menos un antibiótico. En cuanto a las multirresistencias (MDR, por sus siglas en inglés), se encontraron tasas de 47,5% (39/82) en 2015, 37,5% (15/40) en 2016 y 38,5% (30/78) en 2017 de cepas de *Salmonella* (**Tabla 10**). La distribución de las cepas de *Salmonella* en relación al número de antibióticos a los que fueron resistentes en todas las orientaciones productivas se muestra en la **Figura 26**.

Tabla 10. Resumen de resistencias, multirresistencias y número máximo de antibióticos a los que *Salmonella* fue resistente en pollos, pavos y ponedoras durante 2015-2017.

Tasas resistencia	Pollos			Pavos			Ponedoras		
	2015	2016	2017	2015	2016	2017	2015	2016	2017
Resistencia (%)	93	97	97	97	97	100	50	50	69
Multirresistencia (%)	44,5	37,5	38,5	66,7	90	82,6	14	6	0
Nº máximo de antibióticos	11	7	8	9	8	6	3	3	2

Como se muestra en la **Tabla 11**, las resistencias a SMX, CIP y GEN fueron las más comúnmente obtenidas y se observaron en el 73%, 50% y 57% de los aislados, respectivamente. Con respecto a SMX y TMP, los niveles medios de resistencia presentaron un aumento estadísticamente significativo (P -valor $\leq 0,05$) (**Tabla 11**).

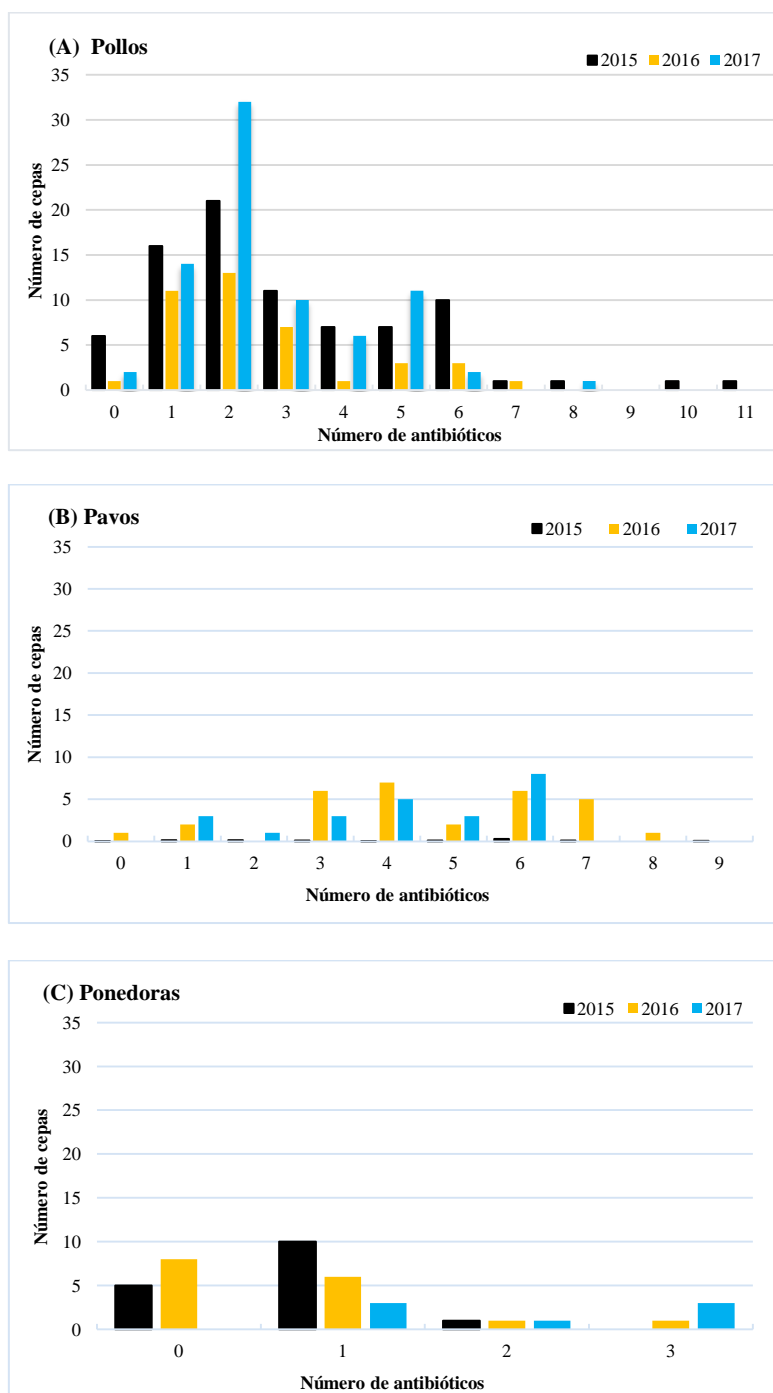


Figura 26. Distribución las cepas de *Salmonella* spp. aisladas en producción avícola (pollos, pavos y ponedoras) de acuerdo al número de antibióticos frente a los que fueron resistentes. El eje X representa el número de antibióticos frente al que las cepas fueron resistentes; el eje Y el número de aislados.

CAPÍTULO III. CAPÍTULOS EXPERIMENTALES

Tabla 11. Tasas de resistencia de *Salmonella* aislada de diferentes orientaciones productivas.

Antibió- ticos	Pollos			Pavos			Ponedoras		
	2015 % (n = 82)	2016 % (n = 40)	2017 % (n = 78)	2015 % (n = 33)	2016 % (n = 30)	2017 % (n = 23)	2015 % (n = 14)	2016 % (n = 16)	2017 % (n = 16)
SMX	65 ^{ab}	65 ^{ab}	87 ^{bb}	64 ^{ab}	83 ^{abB}	83 ^{bb}	29 ^A	38 ^A	50 ^A
\bar{x}		73 ^b			76 ^b			39 ^a	
TMP	3.7 ^{aA}	2.5 ^{aA}	19 ^b	30 ^B	20 ^B	13	0 ^A	0 ^A	0
\bar{x}		9 ^a			22 ^b			0 ^a	
CIP	59 ^{bb}	53 ^{abB}	40 ^{ab}	61 ^{ab}	70 ^{abB}	83 ^{bc}	14 ^A	13 ^A	0 ^A
\bar{x}		50 ^b			69 ^c			9 ^a	
TET	29 ^{ba}	10.0 ^{aA}	24 ^{abA}	70 ^B	83 ^B	74 ^B	21 ^A	6 ^A	13 ^A
\bar{x}		24 ^a			75 ^b			13 ^a	
MERO	1.2	3	1	0	0	0	0	0	0
\bar{x}		1.5			0			0	
AZI	3.7	0	1	3	7	0	0	0	0
\bar{x}		2			3			0	
NAL	35 ^A	23 ^A	26 ^B	58 ^B	63 ^B	70 ^C	14 ^A	13 ^A	0 ^A
\bar{x}		29 ^b			63 ^c			8.6 ^a	
FOT	3.7 ^A	2.5 ^A	1 ^A	27 ^B	23 ^B	13 ^B	0 ^A	0 ^A	0 ^A
\bar{x}		2 ^a			22 ^b			0 ^a	
CHL	0 ^A	3	0	12 ^{bb}	13 ^a	0	0 ^A	0	0
\bar{x}		0.5 ^a			9 ^b			0 ^a	
TGC	1.2	0	0	0	0	0	0	0	0
\bar{x}		0.5			0			0	
TAZ	6.1 ^A	5	1	18 ^{bb}	10 ^{ab}	0 ^a	0 ^A	0	0
\bar{x}		4 ^a			10 ^b			0 ^a	
COL	2.4	0	1	0	3	0	0	0	6
\bar{x}		1.5			1.2			2.1	
AMP	35.4 ^{bb}	20 ^{abA}	15 ^{aA}	70 ^C	57 ^B	61 ^B	0 ^A	0 ^A	6 ^A
\bar{x}		24.5 ^b			63 ^c			2.1 ^a	
GEN	60 ^{abB}	70 ^{bb}	47 ^{ab}	18 ^A	23 ^A	22 ^{AB}	0 ^A	0 ^A	0 ^A
\bar{x}		57 ^c			22 ^b			0 ^a	

\bar{x} : media del periodo. Para cada antibiótico, los valores dentro de la misma producción avícola con letras minúsculas en superíndice diferentes en la misma fila son significativamente diferentes ($p \leq 0,05$). Para cada antibiótico, los valores dentro del mismo año con diferentes letras mayúsculas en superíndice en una fila son significativamente diferentes ($p \leq 0,05$). Para cada antibiótico, los valores medios de cada producción avícola con diferentes letras minúsculas en superíndice en una fila son significativamente diferentes ($p \leq 0,05$).

CAPÍTULO III. CAPÍTULOS EXPERIMENTALES

En el período 2015-2017 se observaron 20 patrones diferentes de resistencia (Tabla 12). Los patrones: SMX-CIP-GEN y SMX-CIP-TET-NAL-AMP-GEN, se repitieron a lo largo de los 3 años.

Tabla 12. Patrones de multirresistencias en cepas de *Salmonella* spp.

Patrones	Pollos			Pavoss			Ponedoras		
	2015	2016	2017	2015	2016	2017	2015	2016	2017
SMX-CIP-GEN	5	4	4	-	-	-	-	-	-
SMX-CIP-NAL	-	-	-	-	-	-	1	1	-
SMX-NAL-GEN	1	-	-	-	-	-	-	-	-
SMX-TET-AMP	1	-	-	2	-	-	-	-	-
SMX-TET-CHL	-	-	-	-	1	-	-	-	-
CIP-TET-AMP	1	-	-	-	-	-	-	-	-
CIP-TET-NAL	1	-	-	-	-	1	1	-	-
CIP-NAL-GEN	1	-	-	-	-	-	-	-	-
CIP-AMP-GEN	1	-	-	-	-	-	-	-	-
NAL-TAZ-GEN	-	-	-	-	-	-	-	-	-
SMX-CIP-NAL-GEN	5	-	-	-	-	-	-	-	-
SMX-CIP-NAL-TAZ	1	-	-	-	-	-	-	-	-
SMX-CIP-TET-AMP	1	-	-	-	-	-	-	-	-
SMX-TET-AZI-AMP	-	-	1	-	-	-	-	-	-
CIP-TET-NAL-AMP	-	-	-	1	-	1	-	-	-
CIP-TET-NAL-COL	-	-	-	-	1	-	-	-	-
SMX-CIP-NAL-AMP-GEN	9	-	-	-	-	-	-	-	-
SMX-CIP-MERO-TET-GEN	-	-	-	-	-	-	-	-	-
SMX-CIP-TET-CHL-AMP	-	-	-	1	1	-	-	-	-
SMX-CIP-TET-NAL-AMP	-	-	-	-	-	2	-	-	-
SMX-TMP-CIP-TET-NAL	-	-	9	-	-	-	-	-	-
TMP-CIP-AZI-FOT-TAZ-AMP	1	-	-	-	-	-	-	-	-
SMX-CIP-TET-NAL-AMP-GEN	3	3	2	-	-	-	-	-	-
SMX-TMP-CIP-TET-FOT-AMP	-	-	-	2	-	1	-	-	-
CIP-TET-NAL-FOT-TAZ-AMP	-	-	-	-	1	-	-	-	-
SMX-CIP-TET-NAL-TGC-AMP-GEN	1	-	-	-	-	-	-	-	-
SMX-TMP-CIP-TET-FOT-TGC-AMP	-	1	-	-	-	-	-	-	-
SMX-TMP-CIP-TET-AZI-FOT-AMP	-	-	-	-	1	-	-	-	-
SMX-TMP-CIP-TET-NAL-TAZ-GEN	-	-	1	-	-	-	-	-	-
SMX-TMP-CIP-TET-NAL-FOT-AMP	-	-	-	-	1	-	-	-	-
SMX-CIP-TET-NAL-FOT-CHL-TAZ-AMP-GEN	-	-	-	1	-	-	-	-	-
SMX-TMP-CIP-TET-AZI-NAL-FOT-TAZ-AMP-GEN	1	-	-	-	-	-	-	-	-
SMX-TMP-CIP-TET-MERO-NAL-FOT-TAZ-COL-AMP-GEN	1	-	-	-	-	-	-	-	-

Las tasas de MDR según los diferentes serotipos se enumeran en la **Tabla 13**. Los serotipos que presentaron MDR durante este período fueron *Salmonella* Kentucky (*S. Kentucky*), *Salmonella* Mikawasima (*S. Mikawasima*), *Salmonella* Senftenberg (*S. Senftenberg*) y *Salmonella* Virchow (*S. Virchow*). En cuanto a *Salmonella* Typhimurium (*S. Typhimurium*) presentó tasas de MDR de 75% en 2015 y 100% en 2017. No se observó MDR en el aislado de *Salmonella* Enteritidis (*S. Enteritidis*) que solo fue resistente a CIP y NAL.

En pavos se determinó la resistencia de 86 cepas de *Salmonella* spp. aisladas (33 en 2015; 30 en 2016; 23 en 2017). Un total de 97% (32/33) en 2015, 97% (29/30) en 2016 y 100% (23/23) en 2017 de los aislamientos de *Salmonella* fueron resistentes a al menos uno de los agentes antimicrobianos probados. En cuanto a la MDR, se encontró un 66,7% (22/33) en 2015, 90% (27/30) en 2016 y 82,6% (19/23) en 2017 (**Tabla 10**).

Los antibióticos con mayores tasas de resistencias en este período fueron SMX (76%), TET (75%), CIP (69%), NAL (63%) y AMP (63%) (**Tabla 11**). En cuanto al desarrollo de resistencias en el periodo (2015-2017) se ha detectado un aumento estadístico significativo en SMX (64%, 83% y 83%) y CIP (61%, 70% y 83%) (P-valor $\leq 0,05$). Además, se encontró una disminución estadísticamente significativa en las tasas de AMR en CHL (12%, 13% y 0%) y TAZ (18%, 10% y 0%) (valor $P \leq 0,05$).

Se observaron 12 patrones de resistencia (**Tabla 12**). Los patrones CIP-TET-NAL-AMP; SMX-CIP-TET-CHL-AMP y SMX-TMP-CIP-TET-FOT-AMP se repitieron durante 2 años.

Según serotipos, *S. Kentucky*, *Salmonella* Agona (*S. Agona*), *Salmonella* Bredeney (*S. Bredeney*) y *S. Hadar* presentaron multirresistencias en todo el período. Con relación a *S. Typhimurium*, se observaron tasas del 66% en 2015 y 50% en 2016 (**Tabla 13**).

Con relación a la orientación productiva de ponedoras, se analizó la susceptibilidad antimicrobiana de 46 cepas de *Salmonella* (14 en 2015; 16 en 2016; 16 en 2017). Un total de 50% (7/14) en 2015, 50% (8/16) en 2016 y 69% (11/16) en 2017 de los aislamientos de *Salmonella* fueron resistentes a al menos un antibiótico (**Tabla 10**). En cuanto a multirresistencias, se encontró un 14% (2/14) en 2015, 6% (1/16) en 2016 y 0% (0/16) en 2017.

Tabla 13. Distribución de la resistencia y multirresistencias de los serotipos de *Salmonella*.

	Año		Agona	Bredeney	Enteritidis	Hadar	Infantis	Kentucky	Mikawasima	Ohio	Senftenberg	Typhimurium	Virchow	Otros
Pollos	2015	R ₁	100	-	-	100	-	100	100	50	96	100	100	73
		R ₃	-	-	-	100	-	100	30	50	31	75	87	18
	2016	R ₁	-	-	100	100	-	100	100	-	100	-	100	88
		R ₃	-	-	-	-	-	66	50	-	32	-	100	33
	2017	R ₁	100	-	-	-	100	100	100	-	100	100	100	85
		R ₃	-	-	-	-	86	100	14	-	13	100	100	38
Pavos	2015	R ₁	83	100	-	100	-	100	100	-	-	100	-	100
		R ₃	66	100	-	20	-	100	-	-	-	66	-	80
	2016	R ₁	100	90	-	100	100	100	-	-	-	100	-	100
		R ₃	80	80	-	100	100	100	-	-	-	50	-	100
	2017	R ₁	100	100	-	100	-	100	-	-	-	-	-	100
		R ₃	100	50	-	100	-	100	-	-	-	-	-	-
Ponedoras	2015	R ₁	-	-	-	100	100	100	-	50	-	-	-	50
		R ₃	-	-	-	100	-	100	-	-	-	-	-	-
	2016	R ₁	-	-	50	-	33	100	-	40	-	-	100	50
		R ₃	-	-	-	-	-	100	-	-	-	-	-	-
	2017	R ₁	-	-	-	-	50	-	-	50	100	400	-	75
		R ₃	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-

Los datos son presentados como porcentajes; R₁, resistente a uno o más antibióticos; R₃, resistente a 3 o más antibióticos (multirresistente).

Como se muestra en la **Tabla 11**, el antibiótico con más resistencia fue SMX (39%). También se detectaron pequeños niveles de resistencia a TET (13%), CIP (9%), NAL (8,6%) y AMP (2,1%). En el período 2015-2017 se observaron 2 patrones diferentes de resistencia (**Tabla 12**). El patrón SMX-CIP-NAL se repitió durante 2 años.

S. Hadar y *S. Kentucky* presentaron multirresistencias en cepas durante 2015-2016. No hubo cepas MDR en 2017. Con respecto a *S. Enteritidis*, no se observó MDR en los 5 aislamientos.

3.1.1.5. Discusión

En los últimos años, se ha realizado un uso generalizado de antibióticos en medicina humana y veterinaria (Anjum et al., 2011). En el pasado, el uso de antibióticos en ganadería intensiva estaba justificado para evitar la dispersión de las infecciones y, en consecuencia, este hecho ha provocado un aumento en el desarrollo de cepas multirresistentes de *Salmonella* spp. (Usera et al., 2002). En el este de España, no existen estudios previos sobre la resistencia antimicrobiana de cepas de *Salmonella* procedentes de explotaciones de pollos, pavos y ponedoras.

Este estudio reveló que las cepas de *Salmonella* aisladas presentaron altas tasas de resistencia a al menos un antibiótico (97%, 100% y 69%, en pollos, pavos y ponedoras, respectivamente). En línea con nuestros hallazgos, Usera et al. (2002) reportaron en España una prevalencia de resistencia del 81,5% en cepas aisladas de granjas de pollos. Asimismo, los estudios de Carramiñana (2004) y Álvarez-Fernández (2012) mostraron tasas del 100%, tanto de resistencia como de multiresistencia en muestras de *Salmonella* spp. aisladas en explotaciones avícolas. Además, las últimas tasas reportadas por la EFSA mostraron una resistencia del 51,8% y 80,6% de pollos y pavos, respectivamente, en aislados de *Salmonella* recuperados de animales/canales durante 2018 en España (EFSA, 2021).

Por otro lado, nuestros datos mostraron que la orientación productiva de ponedoras fue las que presentó menores índices de resistencia, posiblemente debido a la existencia de restricciones en el uso de antibióticos. En línea con estos resultados, Musgrove et al. (2006) encontró tasas de resistencia del 66,9% en aislados de *Salmonella* spp. procedentes de la cáscara de huevos comerciales. En contraposición,

otros grupos de investigación encontraron un menor grado de resistencia antimicrobiana en la mayoría de los aislados de *Salmonella*, como Pande et al. (2015) en Australia (8,3%) y Snow et al. 2007 en Reino Unido (24%). El informe de la EFSA mostró tasas de resistencia más bajas (17,8%) en cepas aisladas en granjas de ponedoras en España durante 2018 (EFSA, 2021).

En cuanto a multirresistencias, se observaron altas tasas en pavos (80%) seguido de pollos (40%), aunque ambos presentaron una tendencia decreciente en todo el período. Las altas tasas están en línea con otras investigaciones en España que reportaron tasas de multirresistencias en avicultura del 65,4% (Carramiñana et al., 2004) y del 100% (Álvarez-Fernández et al., 2012). La EFSA reportó tasas en la UE en 2018 más bajas en pavos (38,8%). Sin embargo los datos para pollos fueron similares (38,2%). Es importante destacar que en este estudio no se obtuvieron MDR de ponedoras en el último periodo lo cual está en línea con las bajas tasas (6,5%) reportadas por la EFSA en 2018 (EFSA, 2021).

En cuanto al número máximo de antibióticos a los que las cepas fueron resistentes, los pollos presentaron una tasa más alta, pero con una tendencia decreciente, seguida de una tendencia estable de multirresistencias en pavos y por último la ausencia en ponedoras en 2017. Esta reducción o estabilización sugiere una disminución en el uso de algunas familias de antimicrobianas. La gran cantidad de antibióticos a los que las cepas fueron resistentes en este estudio es consistente con los hallazgos de Yang et al. (2010) quienes reportaron que el 28% de los aislados de *Salmonella* spp. presentaron MDR a 9 antibióticos. Asimismo, Álvarez-Fernández et al. (2012) observaron en cepas aisladas en España, una resistencia a 13 antibióticos (22,5%).

En el presente estudio, la resistencia a SMX fue más común en pollos (73%) y pavos (76%) que en ponedoras (39%). Eran de esperar estos resultados, ya que el SMX ha sido ampliamente utilizado durante muchos años en medicina veterinaria para tratar infecciones en animales de producción (EFSA, 2021). Las tasas encontradas por la EFSA en España durante 2018 para este antibiótico son inferiores, del 32,9%, 54,1% y 7,7% en pollos, pavos y ponedoras, respectivamente, observándose una reducción con respecto los datos obtenidos en nuestro estudio que sugieren la reducción debido a las medidas adoptadas. Otros grupos de investigación en España, Usera et al. (2002),

encontraron previamente en España un 13,7% de resistencia frente a la familia de las sulfamidas.

Con respecto a CIP, un fármaco de primera línea en el tratamiento de la salmonelosis invasiva en adultos (Threlfall et al., 1999), se observó una alta tasa de resistencia en pavos y pollos de engorde. Esta reducción de la susceptibilidad puede estar asociada con el uso excesivo de CIP o el uso de enrofloxacin en animales productores de alimentos, debido a la estructura y el espectro antibiótico similar (Lai et al., 2014). La EFSA reportó tasas de resistencia similares en 2018 en cepas aisladas en pollos (45,3%). En cuanto a los pavos, las tasas fueron menores (55,3%) y similares a las ponedoras (8,9%). Durante años anteriores, otros autores reportaron en aves ausencia de resistencia (0%) a este antibiótico en España (Carramiñana et al., 2004; Usera et al., 2002).

Por otro lado, AMP y CHL han sido durante décadas los fármacos de elección en el tratamiento de la salmonelosis humana. Se ha observado un aumento de la resistencia a estos antimicrobianos desde que se generalizó el uso de las fluoroquinolonas y cefalosporinas (Miranda et al., 2009). En nuestra investigación, encontramos algunas cepas resistentes a ambos antibióticos. Este patrón de resistencia sugiere que estas cepas podrían comprometer el tratamiento de la infección humana por *Salmonella* spp. Sin embargo, se ha observado una baja tasa de resistencia a CHL en todas las orientaciones productivas, atribuyéndose este hecho a que en producción animal no se usa este antibiótico (Álvarez-Fernández et al., 2012). Las tasas de AMP fueron estadísticamente más altas en pavos (63%) que en broilers (24,5%) y en ponedoras (2,1) (P -value <0.05).

La tetraciclina ha sido uno de los antibióticos más utilizados en la producción animal (Antunes et al., 2003). Nuestro estudio mostró niveles de resistencia superiores (75%) a los informados por la EFSA en 2021 (54,1%). Se encontraron niveles estadísticamente más bajos en pollos (24%) y ponedoras (13%), en línea con los resultados informados por la EFSA (32,4% en pollos y 6,5% en ponedoras) (EFSA, 2021). Carramiñana et al., (2004) reportaron tasas similares en pollos (21,8%) en España.

En relación a la colistina, se encontraron tasas bajas de resistencia durante el último período (1,5% pollos, 1,2% pavos y 2,1% ponedoras), en línea con lo informado por la EFSA (2021) (4,1% pollos, 0% pavos y 6,5% ponedoras).

La resistencia antimicrobiana asociada específicamente con algunos serotipos de *Salmonella* ha sido estudiada anteriormente (Musgrove et al., 2006; Aslam et al., 2012). En el presente estudio, los serotipos multirresistentes más prevalentes fueron *S. Kentucky* (95%) y *S. Hadar* (91%). Se encontraron altas tasas de multirresistencia en serotipos de *S. Infantis* (86% en pollos y 100% en pavos) y *S. Typhimurium* (88% en pollos y 58% en pavos). Las cepas de *S. Typhimurium* son particularmente resistentes (Usera et al., 2002). El alto promedio de multirresistencias en este estudio es consistente con la mayoría de estudios previos (Capita et al., 2007; Berrang et al., 2009). La EFSA reportó tasas de multirresistencia inferiores al 20% en *S. Typhimurium* y del 75% en cepas monofásicas en pollos de engorde mientras que en pavos mostró tasas de 40% y 80% respectivamente (EFSA, 2021). Estas tasas de resistencia son relevantes, ya que *S. Typhimurium* provoca consecuencias más graves en la salud humana que otros serotipos de *Salmonella* (Álvarez-Fernandez et al., 2012). En relación con *S. Infantis*, las tasas obtenidas por la EFSA (2021) también fueron altas en pollos (80%) y pavos (alrededor del 80%). En cuanto a *S. Enteritidis*, no se observó multirresistencia en ninguna de las cepas aisladas analizadas. Este resultado está en línea con los publicados por Capita et al., (2007) y Álvarez-Fernandez et al., (2012), que demostraron que *S. Enteritidis* era menos propenso a desarrollar resistencias que otros serotipos. Además, los resultados informados por la UE en 2018 (EFSA, 2021) también mostraron un bajo nivel de multirresistencias en *S. Enteritidis* (<5% en pollos y ponedoras).

Los resultados mostrados en el presente estudio sugieren que la reducción en el uso de antibióticos desde la implementación del PRAN y las buenas prácticas de los avicultores españoles, comienza a verse reflejada con la reducción del número de multirresistencias encontradas con una tendencia decreciente especialmente en ponedoras. Sin embargo, el nivel de resistencias encontrado en este estudio sugiere la necesidad de seguir trabajando en la limitación del uso de antibióticos en aves para lograr (al igual que en ponedoras) la reducción de las MDR. En esta línea, el sector avícola español ha accedido voluntariamente a adherirse al programa nacional REDUCE en 2020 (MAPA, 2019). El principal objetivo de este acuerdo es el uso racional de los antibióticos y la propuesta de planes preventivos de salud gracias al

desarrollo de nuevas medidas terapéuticas más eficaces que permitan reducir el uso de antibióticos. Finalmente, para el tratamiento de las patologías infecciosas aviares siempre deben determinarse los antibióticos efectivos evitando el uso de aquellos frente a los que el microorganismo presente resistencia.

3.1.1.6. Agradecimientos

Este trabajo fue financiado por el Centro de Calidad Avícola y Alimentación Animal de la Comunidad Valenciana (CECAV) y la Asociación Avícola Valenciana (ASAV).

3.1.1.7. Referencias

Álvarez-Fernández, E., C. Alonso-Calleja, C. García-Fernández, R. Capita. 2012. Prevalence and antimicrobial resistance of *Salmonella* serotypes isolated from Poultry in Spain: Comparison between 1993 and 2006. *International Journal of Food Microbiology*. 153:281-287.

Anjum, M.F., S. Choudhary, V. Morrison, L.C. Snow, M. Mafura, P. Slickers, R. Ehricht, M. J. Woodward. 2011. Identifying antimicrobial resistance genes of human clinical relevance within *Salmonella* isolated from food animals in Great Britain. *J. Antimicrob. Chemother.* 66:550-559.

Antunes, P., C. Réu, J. C. Sousa, L. Peixe, N. Pestana. 2003. Incidence of *Salmonella* from poultry products and their susceptibility to antimicrobial agents. *International Journal of Food Microbiology*. 82:97-103

Aslam, M., S. Checkley, B. Avery, G. Chalmers, V. Bohaychuk, G. Gensler, R. Reid-Smith, P. Boerlin. 2012. Phenotypic genetic characterization of antimicrobial resistance in *Salmonella* serovars isolated from retail meats in Alberta. *Canada Food Microbiol.* 32:110-117.

AVEC. Annual report 2021. Association of Poultry Processors and Poultry Trade in the EU (AVEC). 2021.

Berrang, M.E., J.C. Bailey, S.F. Altekruse, W. K. Shaw, B. L. Patel, R. J. Mainersmann, P. J. Fedorka-Cray. 2009. Prevalence, serotype, and antimicrobial resistance of *Salmonella* on broiler carcasses postpick and postchill in 20 U.S. processing plants. *Journal of Food Protection*. 72:1610-1615.

Capita, R., C. Alonso-Calleja, M. Prieto. 2007. Prevalence of *Salmonella* enterica serovars and genovars from chicken carcasses from slaughterhouses in Spain. *Journal of Applied Microbiology*. 103:1366-1375.

Carramiñana, J. J., C. Rota, I. Agustín, A. Herrera. 2004. High prevalence of multiple resistance to antibiotics in *Salmonella* serovars isolated from a poultry slaughterhouse in Spain. *Veterinary Microbiology*. 104:133-139.

Catalá-Gregori P. Nuevos retos en la alimentación del broiler: medioambiente, producción sin antibióticos promotores del crecimiento e inclusión de materias primas alternativas. Tesis Doctoral. 2007.

Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI). 2017. Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing. M100 27th ed. 2017.

EFSA, European Food Safety Authority and European Centre for Disease Prevention and Control. 2021. The European Union One Health 2019 Zoonoses Report. *EFSA Journal*. 2021; 19(2):6406

EFSA, European Food Safety Authority and European Centre for Disease Prevention and Control. 2021. The European Union Summary Report on Antimicrobial Resistance in zoonotic and indicator bacteria from humans, animals and food in 2018/2019. *EFSA Journal*. 2021; 19(4):6490.

EC, European Union Commission. 2013. Commission Implementing Decision of 12 November 2013 on the monitoring and reporting of antimicrobial resistance in zoonotic and commensal bacteria. *Official Journal of the European Union*. 303:26-39.

ISO 6579:2002/Amd 1:2007. 2007. Microbiology of food and animal feeding stuffs — Horizontal method for the detection of *Salmonella* spp. — Amendment 1: Annex D: Detection of *Salmonella* spp. in animal faeces and in environmental samples from the primary production stage International Organization for Standardization. Ginebra, Suiza.

ISO 20776-1:2006. 2006. Susceptibility testing of infectious agents and evaluation of performance of antimicrobial susceptibility test devices — Part 1: Broth micro-dilution reference method for testing the *in vitro* activity of antimicrobial agents

against rapidly growing aerobic bacteria involved in infectious diseases. International Organization for Standardization. Ginebra, Suiza.

Lai, J., C. Wu, C. Wu, J. Qi, Y. Wang, H. Wang, Y. Liu, J. Shen. 2014. Serotype distribution and antibiotic resistance of *Salmonella* in food-producing animals in Shandong province of China, 2009 and 2012. International Journal of Food Microbiology. 180:30-38.

MAPA (Ministry of Agriculture, Fishing and Food. 2018. Informe JIACRA España. Primer análisis integrado del consumo de antibióticos y su relación con la aparición de resistencia. Available in: <http://www.resistenciaantibioticos.es/es/publicaciones/informe-jiacra-espana>. Acceso: 31/05/2021.

MAPA (Ministry of Agriculture, Fishing and Food. 2019. Acuerdo para el desarrollo del Programa de Prescripción y Uso Razonable de Antibióticos en POLLOS BROILER. Log-in: 06/10/2021. Available in: <https://www.resistenciaantibioticos.es/es/programa-reduce-pollos-broiler>.

Miranda, J.M., A.C. Mondragón, B. Martínez, M. Guarddon, J. A. Rodríguez. 2009. Prevalence and antimicrobial resistance patterns of *Salmonella* from different raw foods in Mexico. Journal of Food Protection. 72: 966-971.

Musgrove, M.T., D. R. Jones, J. K. Northcutt, N. A. Cox, M. A. Harrion, P. J. Fedorka-Cray, S. R. Ladely. 2006. Antimicrobial resistance in *Salmonella* and *Escherichia coli* isolated from commercial shell eggs. Poult. Sci. 85:1665-1669.

Pande, V. V., V. C. Gole, A. R. McWhorter, S. Abraham, K. K. Chousalkar. 2015. Antimicrobial resistance of non-typhoidal *Salmonella* isolates from egg layer flocks and egg shells. International Journal of Food Microbiology. 203:23-26.

PRAN (Plan Nacional Resistencia Antibioticos). 2018. Antibioticos críticos. Available in: <http://resistenciaantibioticos.es/es/>. Acceso: 26/3/2022

Snow, L. C., R. H. Davies, K. H. Christiansen, J. J. Carrique-Mas, A. D. Wales, J. L. O'Connor, A. J. C. Cook, S. J. Evans. 2007. Survey of prevalence of *Salmonella* species on commercial laying fars in the United Kingdom. Vet. Rec. 161:471-476.

Threlfall, E. J., L. R. Ward, B. Rowe. 1999. Resistance to ciprofloxacin in non-typhoidal *Salmonella* from humans in England and Wales- the current situation. Clin. Microbiol. Infect. 5:130-134.

Usera, M. A., A. Aladueña, R. Gonzalez, M. De la Fuente, J. García-Peña, N. Frías, M. A. Echeita. 2002. Antibiotic resistance of *Salmonella* spp. from animal sources in Spain in 1996 and 2000. Journal of Food Protection. 65(5):768-773.

Yang, B., D. Qu, X. Zhang, J. Shen, S. Cui, Y. Shi, M. Xi, M. Sheng, S. Zhi, J. Meng. 2010. Prevalence and characterization of *Salmonella* serovars in retail meats of marketplace in Shaanxi, China. International Journal of Food Microbiology. 141:63-72.

3.1.2. Evaluación del efecto sinérgico entre alicina y diferentes antibióticos frente a cepas de *Salmonella* multirresistente.

V. Cortés, S. Sevilla-Navarro, C. García, C. Marín and P. Catalá-Gregori. 2022. Allicin and antibiotics synergy against multiresistant *Salmonella* strains. Poultry Science. Under revision.

3.1.2.1. Resumen

Salmonella spp. es uno de los patógenos zoonóticos más importantes con impacto económico en salud pública a nivel mundial. La relevancia de *Salmonella* aumenta con la aparición de cepas resistentes y ha motivado la investigación de sustancias alternativas a los antibióticos. La alicina es una molécula presente en el ajo con actividad biocida frente a una amplia gama de microorganismos. Algunos estudios han demostrado que el uso de moléculas alternativas en combinación con antibióticos que han sido utilizados comúnmente a nivel de campo, ocasionando que se reduzca la concentración efectiva. Por tanto, son una nueva alternativa para reducir la administración de antibióticos, así como la aparición de resistencias. El objetivo de este estudio fue evaluar el efecto *in vitro* de la alicina sola y en combinación con 14 antibióticos diferentes contra los serotipos de *Salmonella* más importantes aislados de avicultura. El efecto antimicrobiano se evaluó mediante el método de microdilución en caldo, utilizando una suspensión de 9 µg/mL de alicina en combinación con las placas de microtitulación Sensititre™ EUVSEC. Nuestros resultados revelaron efectos estadísticamente significativos (Valor de $P \leq 0,05$) para la combinación alicina con ciprofloxacina y alicina con gentamicina, mostrando una reducción de la antibiorresistencia del 68,5% y 83,6% con respecto al valor inicial frente a cada antibiótico, respectivamente. Los efectos de la combinación de alicina y otros antibióticos (sulfametoxazol, trimetoprim, meropenem, cloranfenicol, tigeciclina, ampicilina, tetraciclina, azitromicina, ácido nalidíxico, cefotaxima, ceftazidima y colistina) no fueron estadísticamente significativos (valor de $P > 0,05$). Se observó una reducción estadísticamente significativa (valor de $P \leq 0,05$) en algunos serotipos analizados, como *S. Infantis*, *S. Kentucky*, *S. Mikawasima*, *S. Montevideo* y *S. Typhimurium* (monofásica). Estos resultados avalan que el uso de la alicina como suplemento puede ser una alternativa novedosa en combinación con los tratamientos clásicos con antibióticos. Este hecho representa una perspectiva atractiva para el desarrollo de nuevas estrategias de tratamiento contra algunos microorganismos multirresistentes que pueden presentar un desafío en la industria avícola.

3.1.2.2. Introducción

Salmonella spp. es uno de los patógenos zoonóticos con importante impacto en la salud pública a nivel mundial. Los alimentos de origen animal, en concreto los productos avícolas (carne, huevos y ovoproductos), han sido señalados por la Autoridad

Europea de Seguridad Alimentaria (EFSA) como una de las principales vías de infección en humanos (EFSA, 2021). El aumento en la aparición de resistencias a los antibióticos utilizados en los tratamientos de forma común, ha aumentado el interés por las moléculas antimicrobianas vegetales, motivando nuevas líneas de investigación sobre combinaciones con antibióticos frente cepas de bacterias multirresistentes (Salah et al., 2013).

El ajo (*Allium sativum*) es un agente antibacteriano bien conocido, eficaz tanto frente a bacterias Gram positivas como para las Gram negativas (Belguith et al., 2010). El ingrediente antimicrobiano del ajo, ha sido identificado como un compuesto de azufre oxigenado, denominado comúnmente como alicina. Esta molécula es un biocida, dependiente de concentración, con actividad contra una amplia gama de microorganismos (Curtis et al., 2004). Algunos autores sugirieron que el extracto de ajo induce un aumento de la sensibilidad a los antibióticos al alterar la estructura o permeabilidad de la pared bacteriana y retrasar o inhibir la síntesis de proteínas y ADN (Belguith et al., 2010). Además, algunos estudios de investigación han demostrado que la combinación de alicina con antibióticos puede conducir a un sinergismo parcial o total (Sivam et al., 1997).

El objetivo de este estudio es evaluar el efecto *in vitro* de la alicina sola y en combinación con 14 antibióticos diferentes contra los serotipos de *Salmonella* más importantes procedentes de la avicultura.

3.1.2.3. Material y métodos

3.1.2.3.1. Selección y aislamiento de cepas de *Salmonella*

Las 18 cepas de *Salmonella* incluidas en este estudio fueron seleccionadas de muestras positivas de los Programas Nacionales de Control de *Salmonella* (PNCS) en el Este de España. Se seleccionaron un total de 10 serotipos diferentes con patrones de multirresistencia: *Salmonella* Hadar (*S. Hadar*) (n=1); *Salmonella* Infantis (*S. Infantis*) (n=2); *Salmonella* Kentucky (*S. Kentucky*) (n=2); *Salmonella* Mikawasima (*S. Mikawasima*) (n=2); *Salmonella* Montevideo (*S. Montevideo*) (n=2); *Salmonella* Ohio (*S. Ohio*) (n=1); *Salmonella* Senftenberg (*S. Senftenberg*) (n=2); *Salmonella* Stuttgart (*S. Stuttgart*) (n=1); *Salmonella* Typhimurim (*S. Typhimurim*) (n=3); *Salmonella* Virchow (*S. Virchow*) (n=2). El procedimiento de aislamiento de *Salmonella* se realizó de acuerdo con el método ISO 6579:2002/Amd 1:2017 (ISO, 2017).

3.1.2.3.2. Prueba de sensibilidad a antibióticos

Los perfiles de susceptibilidad antimicrobiana se determinaron mediante la técnica de microdilución en caldo, según ISO 20776–1:2006 (ISO, 2006), mediante placas de microtitulación disponibles comercialmente Sensititre™ EUVSEC (Thermo Scientific, East Grinstead, Reino Unido) siguiendo las instrucciones del fabricante. Los antibióticos seleccionados y sus concentraciones fueron los establecidos en la Decisión 2013/653 (Unión Europea, 2013) incluyendo 2 quinolonas: ciprofloxacina (CIP) y ácido nalidíxico (NAL); 3 betalactámicos: ampicilina (AMP), cefotaxima (FOT) y ceftazidima (TAZ); un fenicol: cloranfenicol (CHL); una sulfonamida: sulfametoxazol (SMX); una polimixina: colistina (COL); un macrólido: azitromicina (AZI); una gliciliciclina: tigeciclina (TGC); un aminoglucósido: gentamicina (GEN); una tetraciclina: tetraciclina (TET); un carbapenem: meropenem (MERO) y una pirimidina: trimetoprima (TMP).

3.1.2.3.3. Combinación de alicina con antibióticos

El efecto de la combinación de alicina con los antibióticos se determinó mediante el método de microdilución en caldo. Para esta prueba, las placas de microtitulación Sensititre™ EUVSEC (Thermo Scientific, East Grinstead, Reino Unido) se combinaron con una suspensión de 9 µg/mL de alicina de grado analítico (Sigma Aldrich®, Alemania). La concentración de alicina utilizada fue inferior a la concentración mínima inhibitoria (MIC) y la concentración mínima bactericida (MBD) descritas en estudios previos de Belguilt et al. (2010) sobre cepas de *Salmonella* spp. para evitar que el efecto inhibitorio o bactericida de la alicina enmascarara la posible sinergia de la combinación de sustancias.

Para preparar la suspensión de 9 µg/mL de alicina, se añadieron 900 µg de Alicina a 100 mL de caldo Mueller-Hinton (VWR, Lovaina, Bélgica) y se distribuyeron en tubos estériles con 5 mL de esta suspensión.

El inóculo de *Salmonella* spp. se realizó tomando de 3 a 5 colonias aisladas (cultivo de 24-48 horas), emulsionándolas en 5 mL de agua desmineralizada (Thermo Scientific, Santa Fe Drive, EE.UU.) ajustando el inóculo a una turbidez de 0,5 sobre la escala de McFarland. Posteriormente, se transfirieron 10 µL del inóculo a los tubos de 5mL que contenían la suspensión previamente preparada con alicina, y la mezcla se homogeneizó mediante vorteo. Para inocular la placa Sensititre™, se transfirieron 50 µL de la suspensión anterior a cada pocillo manualmente con una pipeta multicanal.

Finalmente, se selló la placa con una lámina adhesiva, asegurando que todos los pocillos quedaran tapados y sellados. Las placas se incubaron en aerobiosis a $37\pm 1^{\circ}\text{C}$ durante 24 ± 3 horas. Después de la incubación, las placas se leyeron visualmente sin retirar la lámina adhesiva siguiendo las instrucciones del fabricante. Se interpretó como crecimiento (resistencia) aquellos pocillos en los que se observó turbidez (0,5 en McFarland) o depósito de células en el fondo, y sin crecimiento (sensible) aquellos en los que no se observó turbidez ni células en el fondo.

3.1.2.3.4. Análisis estadístico

Se utilizó un modelo lineal generalizado para comparar los resultados entre las resistencias antes y después del uso de alicina. Este modelo también se utilizó para comparar los resultados dentro de los diferentes serotipos. Se consideró que un valor P de $\leq 0,05$ indicaba una diferencia estadísticamente significativa. Los análisis se llevaron a cabo utilizando una aplicación de software comercialmente disponible (paquete de software Statgraphics Centurion XVI 16.2.04; Statgraphics Technologies, Inc. The Plains, Virginia, 2021).

3.1.2.4. Resultados y discusión

Durante los últimos años se ha realizado un uso generalizado de antibióticos en medicina humana y veterinaria. Con la aparición de bacterias resistentes a los antibióticos, se ha hecho necesario el desarrollo de nuevas estrategias terapéuticas (Zhou et al., 2021). Estudios previos han demostrado los efectos inhibitorios de los extractos de ajo contra algunos microorganismos como las especies de *Salmonella* spp. (Belguith et al., 2010).

En este estudio, investigamos el efecto *in vitro* de la alicina en combinación con 14 antibióticos diferentes frente a 18 cepas de *Salmonella* aisladas de avicultura resistentes a múltiples antibióticos. Todos estos aislamientos poseían un patrón de multiresistencia (**Tabla 14**).

CAPÍTULO III. CAPÍTULOS EXPERIMENTALES

Tabla 14. Tasas de resistencia antes y después de la combinación de alicina con antibióticos.

	SMX	TMP	CIP	TET	MERO	AZI	NAL	FOT	CHL	TGC	TAZ	COL	AMP	GEN
Antibiótico	100	89	89 ^b	61	11	6	78	28	33	0	28	11	56	67 ^b
Antibiótico + alicina	100	89	28 ^a	50	11	0	50	22	33	0	6	0	56	11 ^a
% de reducción	0	0	68.5	18	0	100	36	21	0	0	78	100	0	83.6

Para cada antibiótico, los valores de resistencia con diferentes letras minúsculas en superíndice en cada columna son significativamente diferentes ($p \leq 0,05$). Abreviaturas: SMX, sulfamethoxazol; TMP, trimetoprim; CIP, ciprofloxacina; TET, tetraciclina; MERO, Meropenem; AMP, ampicilina; AZI, azitromicina; NAL, ácido nalidixico; FOT: cefotaxima; CHL, cloramfenicol; TGC, tigeciclina; TAZ, ceftazidima; COL, colistina; GEN, gentamicina.

Usando la combinación de alicina con diferentes antibióticos, se demostraron efectos estadísticamente significativos (P -valor $\leq 0,05$) para la combinación alicina + CIP y alicina + GEN, con una reducción de la resistencia del 68,5% y del 83,6% con respecto al valor inicial frente a cada antibiótico, respectivamente (**Tabla 15**). Estos resultados sugieren que la combinación de alicina con ciprofloxacina y alicina con gentamicina presentó un efecto sinérgico. De acuerdo con nuestros hallazgos, Salah et al. (2013) encontraron que la combinación de alicina con ciprofloxacina tiene un efecto sinérgico en algunos microorganismos gram negativos. En cuanto a la gentamicina, Belguith et al. (2021) describieron un efecto aditivo cuando este antibiótico se combinaba con extracto de ajo en cepas de *Salmonella* spp. .

Belghit et al. (2021) describieron efectos positivos cuando la alicina se combinó con neomicina, ampicilina y eritromicina en *Salmonella* spp. Sin embargo, en nuestro estudio no se observó ningún efecto estadísticamente significativo (P -valor $> 0,05$) en la combinación de alicina con algunos antibióticos (sulfametoxazol, trimetoprim, tetraciclina, meropenem, azitromicina, ácido nalidíxico, cefotaxima, cloranfenicol, tigeciclina, colistina y ampicilina). Esto puede deberse a la relativa inestabilidad de la alicina de grado analítico utilizada en nuestro estudio. Además, se ha descrito que la presencia de otras moléculas en el extracto de ajo, como los péptidos antimicrobianos vegetales, mejoran la actividad antibacteriana (Hammami et al., 2009).

CAPÍTULO III. CAPÍTULOS EXPERIMENTALES

Tabla 15. Resistencia de los serotipos de *Salmonella* antes y después de la aplicación de alicina.

Serotipo	Fórmula antigénica	\bar{x} Resistencias	\bar{x} Resistencia después antibiótico + alicina	\bar{x} % de reducción de resistencia
<i>S. Hadar</i>	6,8; Z10; enx	5	3	40
<i>S. Infantis</i>	6,7; r; 1,5	7 ^b	4 ^a	33
<i>S. Kentucky</i>	8,20; I; z ₆	9 ^b	7 ^a	33
<i>S. Mikawasima</i>	6,7,14; y; e, n, z ₁₅	8 ^b	5 ^a	38
<i>S. Montevideo</i>	6,7; gms; -	7 ^b	5 ^a	29
<i>S. Ohio</i>	6,7,14; b; l,w	5	3	40
<i>S. Senftenber</i>	1,3,19; g,[s],t; -	5	3	40
<i>S. Stuttgart</i>	6,7,14; i; z ₆	7	6	14
<i>S. Typhimurim</i> monofásica	1,4,[5],12; i; -	10 ^b	5 ^a	50
<i>S. Typhimurim</i>	1,4,[5],12; i; 1,2	6	5	8
<i>S. Virchow</i>	6,7,14; r; 1,2	5	4	20

\bar{x} : media; Para cada serotipo, los valores medios de resistencia seguidos de diferentes letras minúsculas en superíndice son significativamente diferentes ($p \leq 0.05$).

En cuanto a los serotipos, se ha observado una reducción estadísticamente significativa (P -valor $\leq 0,05$) de la resistencia en algunos de ellos, como *S. Infantis*, *S. Kentucky*, *S. Mikawasima*, *S. Montevideo* y *S. Typhimurium* (monofásico). Belguith et al. (2021) describieron que la sensibilidad al extracto de ajo depende de los serotipos de *Salmonella*, mostrando diferente intensidad de inhibición del crecimiento. La alicina produce cambios en la estructura o permeabilidad de la pared celular bacteriana (Belguith et al., 2010), por lo que las diferencias en el contenido de lípidos de la pared celular de los diferentes serotipos pueden explicar la variación en los efectos observados.

La creciente preocupación en salud pública por la aparición de resistencias y la reducción del uso de antibióticos que ha conllevado, ha motivado la búsqueda e investigación de soluciones alternativas a los antibióticos. El uso de extractos de plantas y aceites esenciales como complemento a los tratamientos habituales puede ser una alternativa novedosa a los antibióticos en la producción avícola. Sin embargo, se

necesitan más estudios *in vitro* e *in vivo* para conocer los mecanismos de actividad de estos compuestos, su posible toxicidad, aceptabilidad por parte de los animales, etc. En conclusión, nuestro estudio reveló que el uso de la alicina puede representar una perspectiva atractiva y alternativa para el desarrollo de nuevas estrategias de reducción de resistencias en la industria avícola.

3.1.2.4.1. Agradecimientos

Este trabajo fue financiado por el Centro de Calidad Avícola y Alimentación Animal de la Comunidad Valenciana (CECAV) y la Asociación Avícola Valenciana (ASAV).

3.1.2.4.2. Referencias

Belguith, H., F. Kthiri, A. Chati, A. Abu Sofah, J. Ben Hamida and A. Ladoulsi. 2010. Inhibitory effect of aqueous garlic extract (*Allium sativum*) on some isolated *Salmonella* serovars. African Journal of Microbiology Research. 4 (5):328-338.

Belguith, H., F. Kthiri, A. Landoulsi. 2021. S Synergic Interaction between Aqueous Garlic Extract (*Allium Sativum*) and Some Antibiotics against Tunisian Isolated Multi-Resistant *Salmonella* Serovars. Biochem anal Biochem. 1000:150.

Curtis, H., U. Noll, J. Störmann, A. J. Slusarenko. 2004. Broad-spectrum activity of the volatile phytoanticipin allicin in extracts of garlic (*Allium sativum* L.) against plant pathogenic bacteria, fungi and Oomycetes. Physiol. Mol. Plant Pathol. 65 (2), 79-89.

EFSA, European Food Safety Authority and European Centre for Disease Prevention and Control. 2021. The European Union One Health 2019 Zoonoses Report. EFSA Journal. 19(2):6406.

Hammami R, J. Ben Hamida, G. Vergoten, J.M. Lacroix, M. C. Slomianny, M. Neffati and I. Fliss. 2009. A new antimicrobial peptide isolated from *Oudneya africana* seeds. Microbiology and Immunology. 53: 658-666.

ISO 6579:2002/Amd 1:2007. 2007. Microbiology of food and animal feeding stuffs — Horizontal method for the detection of *Salmonella* spp. — Amendment 1: Annex D: Detection of *Salmonella* spp. in animal faeces and in environmental samples

from the primary production stage. International Organization for Standardization. Ginebra, Suiza.

ISO 20776-1:2006. 2006. Susceptibility testing of infectious agents and evaluation of performance of antimicrobial susceptibility test devices — Part 1: Broth micro-dilution reference method for testing the *in vitro* activity of antimicrobial agents against rapidly growing aerobic bacteria involved in infectious diseases. International Organization for Standardization. Ginebra, Suiza.

Salah, S.Z.A, I. Abdullah, S. Al-Salihi. 2013. The synergism effect of aqueous garlic extract and ciprofloxacin against some multi-resistant bacteria. Journal of Microbiology and Biotechnology Research. 3 (3): 136-142.

Sivam, G. P., J. W. Lampe, B. Ulness, S. R. Swanzy, J. D. Potter. 1997. *Helicobacter pylori*-*in vitro* susceptibility to garlic (*Allium sativum*) extract. Nutr Cancer. 27(2):118-21.

Zhou, Y. Z., Y.Y. Xiao, J. J. Chao, L. Ma. 2021. *In vitro* activity of allicin alone and in combination with antifungal drugs against *Microsporum canis* isolated from patients with Tinea Capitis. Frontiers in medicine. 8: 783086.

3.1.3. Presencia de *Campylobacter* spp. en avicultura a nivel de campo, dos años después de la entrada en vigor del Reglamento Europeo (EU) 2017/1495.

V. Cortés, S. Sevilla-Navarro, C. García, C. Marín and P. Catalá-Gregori. 2022. *Campylobacter* spp. presence at field level two years after the implementation of European Regulation (EU) 2017/1495. Poultry Science. Under revision

3.1.3.1. Resumen

La campilobacteriosis es la infección transmitida por los alimentos más frecuentemente reportada en humanos en la Unión Europea en los últimos años. *Campylobacter* spp. fue monitoreado a nivel de granja en manadas de pollos en España durante un período de doce meses (2020-2021). Las muestras de heces se analizaron de acuerdo con la norma ISO (International Standard Organisation) 10272-2:2018. De todas las muestras recolectadas, el 54% fueron positivas a *Campylobacter* spp. . En cuanto a la edad, *Campylobacter* spp. se aisló en el 36% de las manadas con ≤ 35 días de vida y en el 64% de las manadas de más de 35 días. Además, los recuentos de *Campylobacter* spp. aumentaron con la edad de los animales. Por otro lado, la presencia de *Campylobacter* spp. mostró diferencias estadísticas entre los diferentes meses del año (P-value ≤ 0.05) en manadas con más de 35 días de vida que excedieron el límite de ≥ 1000 UFC/g. Las tasas más altas se encontraron de junio a diciembre coincidiendo con las estaciones de verano y otoño. En conclusión, nuestro estudio muestra la situación de *Campylobacter* spp. en manadas de pollos en España teniendo en cuenta los efectos de la edad y la estacionalidad. De esta forma, se encontraron tasas y recuentos más altos en pollos cercanos a la edad de sacrificio y con picos durante el período de verano a otoño.

3.1.3.2. Introducción

La campilobacteriosis causada por especies termotolerantes de *Campylobacter* spp., fue la infección gastrointestinal transmitida por alimentos en humanos más notificada en la Unión Europea (UE) con un total de 120.946 casos confirmados en 2020 (EFSA, 2021). *Campylobacter* spp. coloniza los intestinos de los pollos clínicamente sanos y posteriormente contaminar las canales durante el sacrificio; por lo tanto, la carne de pollo se ha considerado una de las principales fuentes de *Campylobacter* spp transmitida por los alimentos (EFSA, 2021).

El control de este patógeno en avicultura y en sus productos es una de las principales estrategias de salud pública en la prevención de la campilobacteriosis en la UE (EFSA, 2021). Por ello, en 2017 se establece el Reglamento (UE) 2017/1495, que modifica el Reglamento (CE) n° 2073/2005 en relación con la vigilancia de *Campylobacter* spp. en canales de pollos donde se fijó un criterio de higiene de proceso >1000 UFC/g en matadero (UE, 2017).

Varios autores han estudiado en profundidad la epidemiología de *Campylobacter* spp. en manadas de pollos, tratando de reducir la prevalencia a nivel de granja en España (Marin et al., 2015; Ingesa-Capaccioni et al., 2016). Sin embargo, aunque hay varias opciones de control disponibles, no existe una medida estándar que pueda implementarse con éxito en toda Europa, y las estrategias de control a nivel de granja aún se están evaluando (Vidal et al., 2013). El muestreo sistemático de *Campylobacter* spp. en manadas de pollos en un momento concreto puede ser una herramienta valiosa para evaluar la presencia actual de este patógeno con el objetivo de estimar su prevalencia.

El objetivo general de este estudio fue investigar la situación actual de *Campylobacter* spp. en manadas de pollos en granja dos años después de la implementación de la regulación europea.

3.1.3.3. Material y métodos

3.1.3.3.1. Selección de muestras

Este estudio se llevó a cabo en 2074 manadas de pollos ubicadas en España durante un período de doce meses (junio de 2020 a junio de 2021). Las muestras de heces frescas se recolectaron al azar directamente de la cama de cada manada muestreada (2074). Las muestras de heces se tomaron asépticamente de la cama, con guantes estériles (dos recipientes estériles con aproximadamente 500 g de heces cada uno; Sandberg et al., 2006). De todas las muestras recolectadas, 691 fueron de animales con menos o 35 días de vida y 1.383 muestras fueron recolectadas de animales de más de 35 días de vida. Todas las muestras recolectadas fueron transportadas al laboratorio en condiciones de refrigeración entre 0°C y 4°C.

3.1.3.3.2. Aislamiento, identificación y recuento de *Campylobacter* spp.

Las muestras se analizaron de acuerdo con ISO (International Standard Organisation) 10272- 2:2018, el método horizontal para el recuento de *Campylobacter* spp. en alimentos y piensos (ISO, 2018). Para el recuento, se prepararon diluciones en serie en agua de peptona tamponada (BPW) (VWR, Lovaina, Bélgica) y se sembró una gota de 0,1 mL de cada inóculo en agar selectivo desoxicolato-cefoperazona-carbón modificado (mCCD) (Oxoid, Dardilly, Francia). A continuación, las muestras se incubaron a 41,5 °C ± 1 °C en microaerofilia con sobres generadores (Campygen™ 2,5

L, Oxoid Dardilly, Francia) durante 44 ± 4 horas. Después de la incubación, cinco colonias típicas se sembraron en placas de agar sangre columbia (Oxoid, Dardilly, Francia) para la confirmación. La morfología y la motilidad de las colonias se evaluaron bajo microscopio con campo oscuro. La confirmación de colonias sospechosas se realizó mediante pruebas de oxidasa y siembra en placas a diferentes temperaturas y atmósferas ($41,5\text{ }^{\circ}\text{C}$ en condiciones microaerófilas y $25\text{ }^{\circ}\text{C}$ en condiciones aeróbicas) en agar sangre Columbia (Oxoid, Dardilly, Francia).

3.1.3.3.3. Análisis estadístico

Se utilizó un modelo lineal generalizado para comparar los resultados entre las tasas de *Campylobacter* spp. entre los diferentes meses del año. Se consideró que un valor $P \leq 0,05$ indicaba una diferencia estadísticamente significativa. Los análisis se llevaron a cabo utilizando una aplicación de software comercialmente disponible (paquete de software Statgraphics Centurion XVI 16.2.04; Statgraphics Technologies, Inc. The Plains, Virginia, 2021).

3.1.3.4. Resultados y discusión

La presente investigación se realizó para actualizar la situación de *Campylobacter* spp. en pollos de engorde en España tras los límites impuestos por la UE en 2017 en mataderos (UE, 2017). El control de *Campylobacter* spp. en la producción primaria es un elemento clave en las estrategias de salud pública para reducir el número de casos de campilobacteriosis en humanos (EFSA, 2020). En este estudio, se aisló *Campylobacter* spp. en 1.128 de 2.074 muestras procesadas (54%). Estos resultados son inferiores a las tasas observadas previamente en España por Ingesa-Capaccioni et al. (2015) y Pérez-Arnedo et al., (2019), quienes reportaron tasas del 95,2% y 100% de *Campylobacter* spp. a nivel de campo, respectivamente. Tasas similares a nuestra investigación en España se observan en Torralbo et al. (2014) con porcentajes del 68,4% y 62,5% respectivamente. En varios países europeos, *Campylobacter* spp. también se ha aislado en pollos de engorde con prevalencias amplias entre el 3,5% y el 71,9% (EFSA, 2021).

En cuanto a la detección según días de vida, en pollos con ≤ 35 días de vida el porcentaje de *Campylobacter* spp. fue del 36% (248/691 muestras). En cambio, en manadas con más de 35 días de vida, el porcentaje fue del 64% (880/1128 muestras). Según los datos observados, parece que los recuentos de *Campylobacter* spp.

aumentaron con la edad de los animales. Estos hallazgos están en línea con los de Ingesa-Capaccioni et al. (2015) y Pérez-Arnedo et al. (2019) quienes reportaron mayores tasas de *Campylobacter* spp. a medida que aumentaba la edad de los animales.

Los resultados de recuentos de *Campylobacter* spp. en este estudio se categorizaron de la siguiente manera: 0 UFC/g, <1000 UFC/g y ≥ 1000 UFC/g y se muestran en la **Tabla 16**. Con respecto a las manadas con ≤ 35 días de edad, el 64% de las muestras tuvieron un recuento de 0 UFC/g, el 9% fue < 1000 UFC/g y el 27% obtuvo recuentos ≥ 1000 UFC/g. Sin embargo, en manadas con > 35 días de vida, el 36% obtuvo recuentos de 0 UFC/g, el 4% fue < 1000 UFC/g y el 60% superó los 1000 UFC/g.

Tabla 16. Recuentos de *Campylobacter* spp. obtenidos en granjas de pollos a partir de heces.

Edad de muestreo	Recuentos de <i>Campylobacter</i> spp. (UFC/g)		
	0*	<1000	≥ 1000
Manadas de pollos ≤ 35 días de vida	443 (64)	62 (9)	186 (27)
Manadas de pollos >35 días de vida	503 (36)	51 (4)	829 (60)

Datos expresados en número de muestras (porcentaje); * Detección y recuento negativos

En cuanto a los recuentos de *Campylobacter* spp. en manadas con > 35 días de vida que excedieron el límite ≥ 1000 UFC/g, encontramos diferencias estadísticas entre los diferentes meses del año (P-valor <0.05). Los recuentos obtenidos por meses se muestran en la **Tabla 17**. Las tasas más altas se encontraron de junio a diciembre presentando cambios estacionales. Los recuentos fueron mayores en verano y otoño (excepto septiembre que presentó tasas más bajas). Este hallazgo concuerda con otros estudios que reportaron variación estacional en la detección de *Campylobacter* spp. en pollos en España, siendo el pico de prevalencia los períodos más cálidos del año (Reich et al., 2008; Urdaneta et al., 2013).

Nuestro estudio demuestra la mayor presencia de *Campylobacter* spp. en lotes de pollos cercanos a la edad de sacrificio. Se requieren más estudios para verificar si los altos recuentos encontrados a nivel de granja se traducen en recuentos altos posteriormente en las canales de matadero. La reducción a nivel de granja puede ser un

aspecto a trabajar para reducir la carga de *Campylobacter* spp. en matadero, algunos autores señalan que podría conseguirse mejorando la bioseguridad en la granja (Reich et al., 2008; Torralbo et al., 2014). Por lo tanto, una combinación de estrictas medidas de bioseguridad en granja y un alto nivel de higiene en el matadero sería crucial para reducir *Campylobacter* spp. en la cadena alimentaria y por tanto el riesgo de infección de los consumidores.

Tabla 17. Distribución de la presencia de *Campylobacter* en granjas de pollos con más de 35 días de vida que exceden los 1.000 UFC/g en función de los meses del año.

Mes	N	% recuentos de <i>Campylobacter</i> ≥1000CFU/g
Enero	74	53 ^a
Febrero	199	58 ^{ab}
Marzo	363	54 ^a
Abril	215	61 ^{abc}
Mayo	69	52 ^a
Junio	41	76 ^{cd}
Julio	20	85 ^d
Agosto	22	77 ^{bcd}
Septiembre	50	50 ^a
Octubre	38	63 ^{abcd}
Noviembre	194	66 ^{bcd}
Diciembre	114	72 ^{cd}

N: tamaño de muestra; \bar{x} : media; Para cada mes, los valores medios con diferentes letras minúsculas en superíndice en la columna son significativamente diferentes ($p \leq 0.05$).

3.1.3.5. Agradecimientos

Este trabajo fue financiado por el Centro de Calidad Avícola y Alimentación Animal de la Comunidad Valenciana (CECAV) y la Asociación Avícola Valenciana (ASAV).

3.1.3.6. Referencias

EU. 2017. COMMISSION REGULATION (EU) 2017/1495 of 23 August 2017 amending Regulation (EC) No 2073/2005 as regards *Campylobacter* in broiler carcasses. Official Journal of the European Union. L 218:1-6.

European Food Safety Authority and European Centre for Disease Prevention and Control. 2021. The European Union One Health 2019 Zoonoses Report. EFSA Journal. 19(2):6406.

Ingesa-Capaccioni, S., S. Gonzalez-Bodi, E. Jimenez-Trigos, F. Marco-Jimenez, P. Catalá, S. Vega, C. Marin. 2015. Comparison of different sampling types across the rearing period in broiler flocks for isolation of *Campylobacter* spp. Poultry Science. 94:766-771.

ISO 10272-2. 2018. Microbiology of the food chain –Horizontal method for detection and enumeration of *Campylobacter* spp. Part 2: Colony-count technique. Geneva, Switzerland: International Organization for Standardization.

Perez-Arnedo, I. E. Gonzalez-Fandos. 2019. Prevalence of *Campylobacter* spp. in poultry in three Spanish farms, a slaughterhouse and a further processing plant. Foods.8:111.

Reich, F., V. Atanassova, E. Haunhorst, G. Klein. 2008. The effects of *Campylobacter* numbers in caeca on the contamination of broiler carcasses with *Campylobacter*. International Journal of Food Microbiology. 127:116-120.

Sandberg, M., O. Ostensvik, A. L. Aunsmo, E. Skjerve, and M. Hof-shagen. 2006. An evaluation of sampling and culturing methods in the Norwegian action plan against *Campylobacter* in broilers. Int. J. Food Microbiol. 106:313–317.

Torralbo, A., C. Borge, A. Allepuz, I. García-Bocanegra, S. K. Sheppard, A. Perea, A. Carbonero. 2014. Prevalence and risk factors of *Campylobacter* infection in broiler flocks from southern Spain. Preventive Veterinary Medicine. 114:106-113.

Urdaneta, S. 2013. Prevalencia y estacionalidad de campylobacter termófilos en granjas de pollos de engorde de Cataluña. 50º Symp. AECA. Lleida, 2/4-10-2013.

Vidal, A. B., J. Rodgers, M. Arnold, F. Clifton-Hadley. 2013. Comparison of different sampling strategies and laboratory methods for the detection of *C. jejuni* and *C. coli* from broiler flocks at primary production. Zoonoses Public Health. 60:412-25.

3.2. Patógenos zoonóticos relevantes en sanidad animal

3.2.1. Seroprevalencia y Prevalencia de *Mycoplasma synoviae* en gallinas ponedoras y reproductoras pesadas en España

V. Cortés, S. Sevilla-Navarro, C. García, A. Tudón, C. Marín and P. Catalá-Gregori. 2022. Seroprevalence and Prevalence of *Mycoplasma synoviae* in laying hens and broiler breeders in Spain. Poultry Science. Volume 100, Issue 3

3.2.1.1. Resumen

Los micoplasmas son patógenos avícolas reconocidos a nivel mundial, siendo *Mycoplasma synoviae* (*M. synoviae*) la segunda especie más importante desde el punto de vista clínico, ya que causa considerables pérdidas económicas en la industria avícola. El objetivo de este estudio fue evaluar la seroprevalencia, prevalencia y las posibles variantes filogenéticas de *M. synoviae* presentes en las granjas de gallinas ponedoras y reproductoras pesadas de la especie *Gallus gallus* ubicadas en el este de España. Se analizaron 19 y 23 manadas de ponedoras y reproductoras respectivamente a 3 edades diferentes. Para evaluar la seroprevalencia, las muestras de suero se analizaron mediante la técnica de ELISA. Los hisopos traqueales se analizaron mediante PCR para evaluar la prevalencia. Se detectó una seroprevalencia de *M. synoviae* del 95% y 74% en ponedoras y reproductoras respectivamente. En cuanto a los datos obtenidos por edad, las tasas de positivos obtenidas parecen ser mayores a medida que aumenta la edad de muestreo. Según los resultados de la PCR se obtuvo una prevalencia del 95% en ponedoras y del 35% en reproductoras. El análisis genético mostró que las cepas presentes en las granjas de reproductoras eran compatibles con cepas vacunales (cepa MS-H). Por el contrario, se detectaron 6 cepas de campo diferentes en granjas de gallinas ponedoras. En conclusión, este estudio realizado en el este de España, mostró una mayor seroprevalencia y prevalencia de cepas de campo de *M. synoviae* en manadas de ponedoras que en reproductoras, destacando la utilidad del seguimiento de las manadas para controlar este patógeno avícola. Además, nuestros hallazgos sugieren que la vacunación en reproductoras pesadas podría ser una estrategia de prevención eficaz contra *M. synoviae* junto a otro tipo de medidas, como la bioseguridad.

3.2.1.2. Introducción

Los micoplasmas son patógenos avícolas reconocidos, siendo *M. synoviae* la segunda especie más importante desde el punto de vista de patología clínica e impacto económico (Feberwee et al., 2009). Este patógeno es el responsable de importantes pérdidas económicas en la industria avícola (Lierz et al., 2007) debido a que puede cursar con síndrome respiratorio, patología articular y retraso en el crecimiento en pollos y pavos (Kelven, 2003). Además, en ponedoras, *M. synoviae* puede inducir anomalías en la cáscara, lo que provoca un descenso en la calidad y producción del huevo aumentando los costes operativos (Catania et al., 2010; Landman, 2014). La micoplasmosis aviar puede transmitirse verticalmente de la gallina a la progenie a través

del huevo (Xue et al., 2017) u horizontalmente, a menudo por contacto directo entre portadores enfermos y animales sanos (Marois et al., 2000). Además, *Mycoplasma* puede permanecer en el lote bajo formas subclínicas de la enfermedad (Nascimento et al., 2005).

Las infecciones de *M. synoviae* se tratan principalmente con antibióticos, como la oxitetraciclina (Landman et al., 2008). Sin embargo, debido al efecto temporal del tratamiento con antibióticos, la aparición de resistencias y el riesgo de que permanezcan residuos en los huevos comerciales, deben considerarse estrategias alternativas como la monitorización y la vacunación para el control de esta bacteria (Feberwee et al., 2009). La vacunación es una herramienta de uso común para controlar la infección de *M. synoviae* en manadas comerciales en muchos países con importantes industrias avícolas (Zhu et al., 2018) pero el éxito de estos programas de control depende del diagnóstico preciso y oportuno en las manadas infectadas (Gharibi et al., 2017). El aislamiento de micoplasmas mediante el método de cultivo tradicional es difícil, costoso, requiere mucho tiempo y no es concluyente (Ewing et al., 1996). Por ello en la actualidad, se han utilizado diferentes técnicas para detectar la presencia de *M. synoviae*, como la búsqueda de anticuerpos en suero mediante ELISA (Gole et al., 2012) y detección de ADN por PCR (Sun et al., 2017). Estas técnicas surgen como una alternativa interesante para el diagnóstico, debido a su sensibilidad, especificidad, capacidad de realizar gran cantidad de análisis y su viabilidad económica (Nascimento et al., 1991).

Antes de iniciar un programa de control, es conveniente conocer la prevalencia de la enfermedad en la región en las diferentes especies de aves involucradas. Estudios epidemiológicos realizados en diferentes países europeos han demostrado altas prevalencias de *M. synoviae* en aves de corral (Hagan et al., 2004; Dufour-Gesbert et al., 2006; Gole et al., 2012). Sin embargo, se desconoce la presencia y distribución de *M. synoviae* en granjas ubicadas en el este de España. En este contexto, el objetivo de este estudio fue determinar la seroprevalencia, prevalencia y variantes filogenéticas de *M. synoviae* en granjas de ponedoras y reproductoras pesadas de la especie *Gallus gallus*, ubicadas en esta región.

3.2.1.3. Material y métodos

Este estudio se llevó a cabo en 19 granjas de ponedoras y 23 de reproductoras pesadas ubicadas en el este de España durante un período de 18 meses. Las categorías

productivas de aves comerciales incluidas en este estudio fueron gallinas ponedoras y reproductoras pesadas. Las principales empresas avícolas de la región participaron en el estudio. Todas las muestras fueron analizadas en el Centro de Calidad Avícola y Alimentación Animal de la Comunidad Valenciana, (CECAV) ubicado en España.

3.2.1.3.1. Selección de la población de estudio

En primer lugar, para encontrar la población de estudio se identificaron todas las granjas y naves activas ubicadas en el este de España durante los 12 meses anteriores. Durante este período se encontraron 56 granjas activas con 134 naves para gallinas ponedoras y 16 granjas activas con 66 naves para reproductoras pesadas. Se calculó un tamaño de muestra de 26 y 23 naves de ponedoras y reproductoras pesadas, respectivamente (**Tabla 18**). La selección de las manadas se hizo por muestreo aleatorio simple utilizando un generador de números sin repetición (<http://nosetup.org/>), dando un número correlativo a cada unidad.

Para calcular el tamaño de la muestra para el estudio, se tomó como unidad epidemiológica la nave activa. Se consideró un nivel de confianza del 95% y una prevalencia esperada del 10%. Las naves activas descritas anteriormente se tomaron como tamaño de población. El tamaño de la muestra se calculó de la siguiente manera:

$$n = (1 - \alpha^{1/d}) \times \left(N - \frac{d - 1}{2} \right)$$

Donde n = tamaño de muestra; α = error de tipo I = 1-NC (nivel de confianza, asumimos 95%); d = prevalencia esperada y N = tamaño de la población.

Tabla 18. Tamaño de muestra en ponedoras y reproductoras pesadas de acuerdo a la prevalencia esperada de *M. synoviae*.

Orientación productiva	Prevalencia esperada (%)	Granjas activas	Naves activas	Tamaño de muestra calculado (número de naves)	Tamaño de muestra final (número de naves)*
Ponedoras	10	56	134	26	19
Reproductoras	10	16	66	23	23

*Algunas granjas no participaron en el estudio por cuestiones productivas o de bioseguridad.

3.2.1.3.2. Toma de muestras

Las manadas fueron muestreadas 3 veces a diferentes edades cuando fue posible. El primer muestreo se realizó a las 26-28 semanas para ponedoras y a las 30-32 semanas para reproductoras pesadas, coincidiendo con el pico de puesta. El segundo muestreo se realizó 10 semanas después para ambas orientaciones productivas, con el fin de observar la posible oscilación de anticuerpos. Y el último muestreo se realizó a las 60 semanas para ponedoras y a las 50 semanas en reproductoras pesadas, con el fin de aumentar la probabilidad de encontrar una cepa de campo (Dufour-Gesbert et al., 2006; Seifi et al., 2012). En cada momento de muestreo, se recolectaron 14 muestras de suero y 10 hisopos traqueales con hisopos de aluminio estériles (Deltalab®, Barcelona, España) de aves vivas seleccionadas al azar en cada manada (Dufour-Gesbert et al., 2006). Todas las muestras recolectadas fueron transportadas al laboratorio en condiciones de refrigeración entre 0°C y 4°C. El granjero supervisaba a los animales diariamente para detectar síntomas relacionados con *M. synoviae*.

3.2.1.3.3. Análisis serológico

Las muestras de suero se procesaron de acuerdo con el procedimiento descrito por García et al., (2016). Durante el análisis, las muestras de suero se mantuvieron en condiciones de refrigeración entre 0°C y 4°C. El análisis serológico se realizó mediante ELISA utilizando el kit comercial “*BioChek MS ELISA*” (BioChek, Reeuwijk, Países Bajos) que es un ensayo diseñado para detectar anticuerpos frente *M. synoviae* en suero. Los títulos se calcularon tal y como describe el fabricante. Cada muestra se diluyó (1:500) en el reactivo diluyente de acuerdo con las instrucciones del fabricante. Tras la dilución, se añadieron 100 µL de muestra diluida (1:500) al pocillo correspondiente. Cada muestra se analizó en un solo pocillo. La placa se cubrió y las muestras se incubaron a temperatura ambiente de 22 °C a 27 °C durante 30 minutos. A continuación, se lavó cada pocillo con 350 µL de solución de lavado (4 lavados). Luego, se agregaron 100 µL de reactivo conjugado en cada pocillo. Se cubrió la placa y se incubó a temperatura ambiente de 22 °C a 27°C durante 30 minutos. A continuación, se lavó cada pocillo como se ha descrito anteriormente y se añadieron 100 µL de reactivo sustrato a cada pocillo. La placa se cubrió nuevamente y se incubó durante 15 minutos. Cada reacción se paró con 100 µL de solución de stop. La absorbancia se midió a 405 nm. Los sueros con valores de S/P por encima del nivel de corte de 0,5 (título \geq 594) se consideraron positivos.

3.2.1.3.4. Detección de *M. synoviae* mediante PCR

3.2.1.3.5. Procesamiento de las muestras

Todos los hisopos se almacenaron a -20°C hasta la realización del análisis por PCR. Los 10 hisopos tomados en cada manada se dividieron en 2 grupos de 5 hisopos. La manada se consideró positiva si al menos uno de los dos grupos analizados era positivo.

3.2.1.3.6. Extracción de ADN

El ADN se extrajo de cada grupo utilizando el kit QIAmp®cador®Pathogen Mini (Qiagen, Hilden, Alemania) siguiendo las instrucciones del fabricante. En primer lugar, se diluyeron grupos de 5 hisopos en 200 µL de PBS (OXOID, Hampshire, Inglaterra) que se mezclaron mediante un pulso de vortex con 20 µL de proteinasa K, 1 µL de Carrier y 100 µL de tampón de lisis. Después de una incubación de 15 min a 20-25°C, las muestras se centrifugaron brevemente para eliminar las gotas de las paredes. A continuación, se añadieron 350 µL de tampón ACB y se vorteoó la muestra para que se mezclara completamente para ajustar las condiciones de unión para la purificación del ADN. La mezcla se colocó en una columna de recolección de 2 mL y se centrifugó a 6000 x g durante 1 min. El tubo de recogida se lavó con 600 µL de tampón de lavado (AW1) y se centrifugó como se ha descrito anteriormente. Después de un segundo paso de lavado con 600 µL de tampón de lavado (AW2) y centrifugación a 20.000 x g durante 2 min, el ADN se eluyó mediante la adición de 100 µL de tampón de elución (AVE) a la columna y se incubó a temperatura ambiente durante 1 min. Después de la incubación, el ADN se centrifugó a 20.000 x g durante 1 min. A continuación, el ADN extraído se recogió en microtubos estériles y se conservó a -20°C después del análisis por PCR.

3.2.1.3.7. Reacción en cadena de la polimerasa en tiempo real

Todos los análisis de PCR se realizaron con el kit INgene q DMS VIhA SYBR Detection Real Time-PCR (INGENASA, Madrid, España), siguiendo las recomendaciones del fabricante. La PCR se realizó en un termociclador 7300 (Applied Biosystems) en un volumen total de 22 µL de mezcla de reacción que contenía 10 µL de Mezcla A, 10 µL de Mezcla B y 2 µL de ADN extraído. Las reacciones de PCR incluyeron un paso inicial de precalentamiento a 95 °C durante 5 min y 40 ciclos de

desnaturalización a 95 °C durante 30 s, hibridación a 55 °C durante 30 s y extensión a 72 °C durante 30 s.

3.2.1.3.8. Secuenciación de ADN

Para confirmar la identidad de los aislamientos obtenidos en este estudio, se purificaron 26 productos de *M. synoviae* PCR-positivos con AccuPrep PCR/Gel Purification Kit (Bioneer (Ref: K-3038)) y se secuenciaron. El paso de secuenciación se realizó con el secuenciador automático de ADN BigDye® Terminator v3.1.at ABI PRISM H3130 (Applied Biosystems) y Vh1A dir y Vh1A rev como cebadores.

3.2.1.4. Resultados

Debido a problemas de producción y/o bioseguridad, algunas granjas de ponedoras seleccionadas no participaron en el estudio, por lo que el número final de manadas de ponedoras analizadas fue de 14. Todos los animales fueron manipulados de acuerdo con los principios de bienestar animal publicados por el Real Decreto 53/2013 (España, 2013).

3.2.1.4.1. Seroprevalencia

Según los resultados obtenidos a partir del ELISA, las manadas se dividieron en tres grupos: negativas, positivas sin vacunación y positivas con vacunación (manadas vacunadas con un título sospechoso de infección (Biocheck, 2018)). Las manadas sin vacunación con 10% o más de reacciones positivas, fueron consideradas serológicamente positivas (Kleven y Bradbury, 2008). Los servicios veterinarios de las manadas vacunadas informaron que la vacunación se realizó con la vacuna Vaxsafe MS-H (Bioproperties Ltd., Ringwood, Victoria, Australia) y fue aplicada a las 12 semanas. La vacunación reportada para manadas de reproductoras pesadas fue del 30% (7/23 manadas). No se reportó vacunación en gallinas ponedoras.

Los resultados obtenidos del análisis mediante la técnica de ELISA demostraron una alta presencia de anticuerpos contra *M. synoviae*. En la **Tabla 19** se muestran los resultados obtenidos a partir de muestras recolectadas, mostrando 95% (n = 18/19) y 74% (n = 17/23) de seroprevalencia de *M. synoviae* en gallinas ponedoras y reproductoras pesadas, respectivamente.

Tabla 19. Seroprevalencia de *M. synoviae* de acuerdo a la edad de muestreo.

Tiempo de muestreo*	Ponedoras						Reproductoras					
	N Sueros	N +	Tasa de + (%)	N Naves	Naves +	Tasa de + (%)	N Sueros	N +	Tasa de + (%)	N Naves	Naves +	Tasa de + (%)
Primero	168	105	63	13	10	77	294	100	34	21	8	38
Segundo	196	179	91	17	16	94	308	111	36	22	12	55
Tercero	98	97	98	10	10	100	322	118	37	23	13	57

N: Tamaño de muestra. *El primer, segundo y tercer momento de muestreo fue de 26-28, 36-38 y ≥ 60 semanas para gallinas ponedoras, y 30-32, 40-42 y ≥ 50 semanas para reproductoras pesadas, respectivamente.

Con respecto al análisis por edad y diferenciando manadas vacunadas respecto a no vacunadas, los títulos en gallinas ponedoras y reproductoras vacunadas parecían ser más altas a medida que aumentaba la edad de muestreo. Además, las tasas de sueros positivos también parecían ser más altas en las gallinas ponedoras que en las reproductoras pesadas (**Tabla 20**). Teniendo en cuenta la vacunación, la media de títulos en gallinas reproductoras vacunadas fue superior a la media de las no vacunadas, que presentó títulos medios entre 14 y 20 veces inferiores, en función del tiempo de muestreo.

Tabla 20. Títulos medios de *M. synoviae* de acuerdo al momento de muestreo y orientación productiva.

Tiempo de muestreo*	Ponedoras Título medio	Reproductoras Título medio	
		Vacunadas	No vacunadas
Primero	3690	3507	250
Segundo	4558	4048	200
Tercero	7384	4524	239

*El primer, segundo y tercer momento de muestreo fue de 26-28, 36-38 y ≥ 60 semanas para gallinas ponedoras, y 30-32, 40-42 y ≥ 50 semanas para reproductoras pesadas, respectivamente.

3.2.1.4.2. Prevalencia

La detección de *M. synoviae* se realizó mediante PCR a partir de muestras de los grupos positivos según resultados obtenidos en el ELISA (**Tabla 21**). De las 35 manadas positivas analizadas serológicamente en este estudio, se detectó *M. synoviae* en el 100% (n = 18/18) de las gallinas ponedoras y en el 47% (n = 8/17) de las reproductoras. Considerando todas las manadas, la prevalencia fue del 95% (18/19 manadas) en ponedoras, y del 35% (8/23 manadas) en reproductoras pesadas.

Tabla 21. Porcentaje de muestras positivas a *M. synoviae* detectadas por ELISA yPCR.

Orientación productiva	N° Muestras n _T	ELISA		PCR	
		n	%	n	%
Ponedoras	19	18	95	18	95
Reproductoras	23	17	74	8	35

n_T: tamaño de muestra; n: muestras positivas

3.2.1.4.3. Genotipos

La secuenciación completa del gen *vlhA* se realizó a partir de las 26 muestras PCR positivas a *M. synoviae* (18 de gallinas ponedoras; 8 de reproductoras pesadas), incluidas muestras de manadas vacunadas (**Tabla 21**). Cabe resaltar que la secuenciación del gen *vlhA* aporta similitudes en las secuencias de las muestras analizadas compatibles con algunos genotipos, aunque no agrupa en genotipos estandarizados. Se encontraron diferentes genotipos en gallinas ponedoras, siendo el 61% (11/18) cepas de campo, el 5% (1/18) cepa vacuna (MS-H), y el 33% (6/18) no se pudo secuenciar completamente debido a la baja cantidad y/o calidad del ADN obtenido (**Figura 27**). Las cepas de campo aisladas fueron compatibles con IZSVE/4504 (1/11), MSK-1 (4/11), MGS 1342 (1/11), MGS 543 (1/11), PASC 8 (3/11), WT4 (1 /11). Solo se encontró un genotipo en reproductoras, siendo el 100% (8/8) cepa vacunal (MS-H).

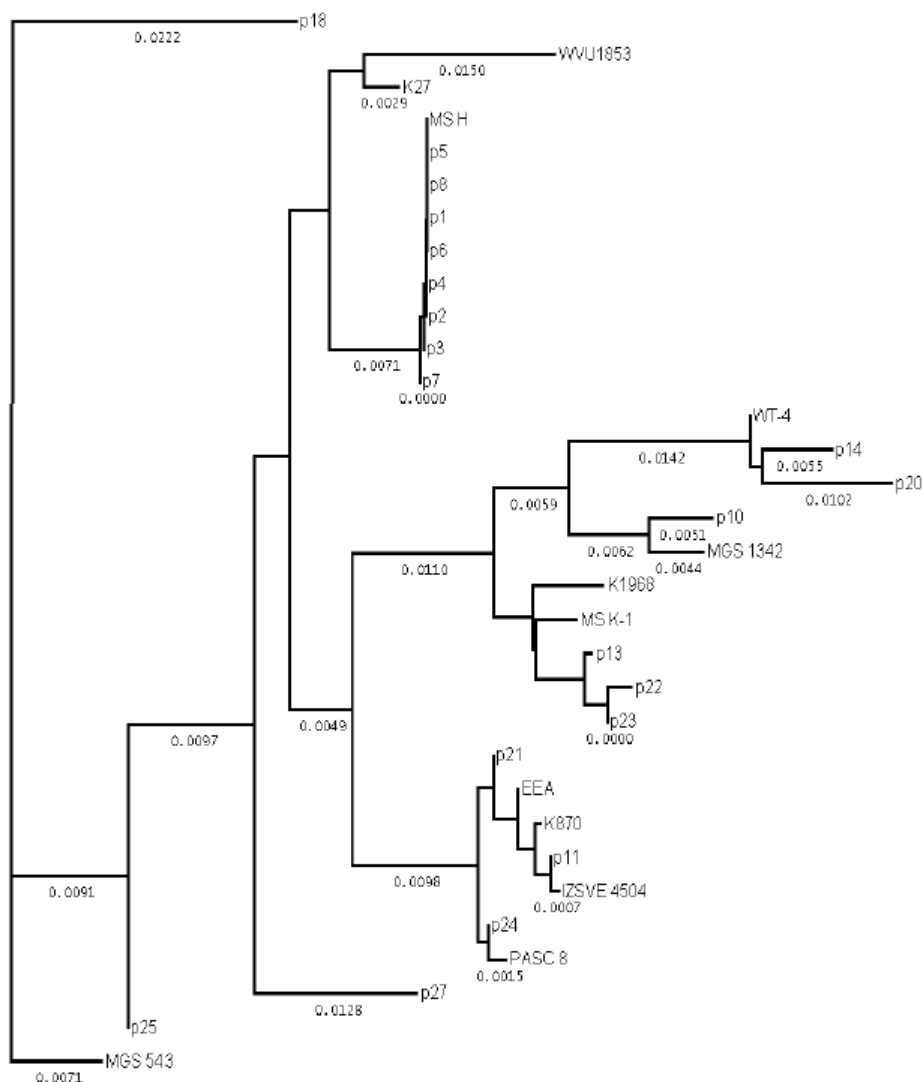


Figura 27. Dendrograma de las 20 muestras positivas por PCR a *M. synoviae*. Las cepas campo aisladas fueron 11 (IZSVE/4504 (1/11), MSK-1 (4/11), MGS 1342 (1/11), MGS 543 (1/11), PASC 8 (3/11), WT4 (1/11)).

3.2.1.5. Discusión

La infección por *M. synoviae* fue reportada por primera vez en América (Sun et al., 2017), posteriormente, investigadores de diferentes países con importancia en la industria avícola confirmaron la presencia de este patógeno. En el este de España no existían estudios previos sobre la seroprevalencia y prevalencia de *M. synoviae*. Nuestros hallazgos mostraron una alta seroprevalencia de *M. synoviae*, siendo del 95% en gallinas ponedoras y del 74% en reproductoras pesadas. Resultados similares fueron reportados por Kapetanov et al. (2010), quienes encontraron altas tasas de

seroprevalencia de *M. synoviae* en manadas adultas (90%) y en manadas durante el período de recría (40%) en 2009 en Serbia. Por otro lado, otra encuesta anterior reportó seroprevalencias menores en ponedoras comerciales de 69% (Buim et al., 2009) y 53% (Suzuki et al., 2009) medidas por ELISA. Asimismo, Feberwee et al. (2008) informaron, en los Países Bajos, de una seroprevalencia más baja también en reproductoras pesadas (35%). Estos resultados heterogéneos podrían explicarse debido a la diferente edad de muestreo, la presión de la enfermedad y al hecho de que la seroprevalencia hallada en gallinas reproductoras se debió a la vacunación (aislamiento de cepas 100% vacunales y títulos serológicos medios reducidos en manadas no vacunadas). En nuestro estudio, las diferencias encontradas entre ambos sistemas de producción comparando manadas no vacunadas probablemente se deben a las diferencias en los sistemas de producción, como la existencia de núcleos multiedad en gallinas ponedoras con respecto sistemas todo dentro-todo fuera en reproductoras pesadas o diferentes medidas de bioseguridad) En línea con Gharibi et al. (2018) que reportó una mayor frecuencia de vacunación en núcleos de reproductoras frente a gallinas ponedoras, ninguna de las granjas de gallinas ponedoras estudiadas reportó vacunación.

En cuanto al análisis por edad, la seroprevalencia fue numéricamente mayor a medida que aumentaba la edad de muestreo. Asimismo, las tasas de manadas positivas y las seroprevalencias también fueron numéricamente superiores en las gallinas ponedoras con respecto a las reproductoras, probablemente asociado al origen de la seroconversión, ya que en ponedoras las cepas encontradas fueron de campo y con la edad es previsible que aumente la diseminación horizontal, cuando en reproductoras está asociado a cepas de origen vacunal. Este hallazgo concuerda con los datos de otros grupos de investigación, quienes informaron de seroprevalencias del 47,8% en manadas de reproductoras mayores de 60 semanas (Seifi et al, 2012). En línea con nuestros hallazgos, Saâdia et al. (2014) demostraron el aumento de la seroprevalencia de *M. synoviae* con la edad, encontrando seroprevalencias del 64% en la semana 16, 82% en la semana 32 y 100% en la semana 56. En el estudio realizado por Hagan (2004) la edad se asoció como factor de riesgo. Además, Xue et al. (2017), reportaron tasas crecientes con respecto a la edad, con pollitos de 1 a 3 días que reportaron seroprevalencia de 29% a 54%, en comparación con los de 35 semanas que alcanzaron tasas de 71% a 83%.

En cuanto a la prevalencia, pocos estudios reportaron prevalencia en gallinas ponedoras y reproductoras por PCR. Encontramos una mayor (95%) en ponedoras (idénticamente a la seroprevalencia) y una menor (35%) en reproductoras pesadas. Los resultados de prevalencia superan la prevalencia esperada y validan así el cálculo del tamaño de la muestra. En este sentido, Gharibi et al. (2018) informaron un 72% de prevalencia en parvadas de reproductores en Irán; Buim et al. en 2009 se aislaron tasas del 72,7% de *Mycoplasma* spp. con predominio de *M. synoviae*. De igual forma, en un estudio realizado por Köhn et al. (2009), el 84% de las mandas de ponedoras comerciales durante el período de puesta fueron positivas para *Mycoplasma* spp. en la prueba PCR, siendo el 75% *M. synoviae*.

El análisis genético de las cepas aisladas mostró que la prevalencia detectada en reproductoras pesadas se debió a la cepa vacunal (MS-H), no encontrándose ninguna cepa de campo en los lotes analizados. Este hecho concuerda con la alta prevalencia de la cepa vacunal informada recientemente (Zhu et al., 2018). Por el contrario, la mayoría de las cepas halladas en gallinas ponedoras se clasificaron como cepas de campo, y únicamente una cepa era compatible con la cepa vacunal (MS-H), aunque en la encuesta no se reportó vacunación en ponedoras. Posiblemente, se produjo una contaminación cruzada en esta granja o se omitió la vacunación en este estudio. La amplia variabilidad de genotipos de *M. synoviae* también ha sido observada por otros autores (Felice et al., 2020). Kurska et al. (2019), hallaron cepas comunes a las encontradas en nuestro estudio como MSK-1 en Polonia, cuya primera descripción fue en UK (Reino Unido). La cepa PASC8 también ha sido descrita por Catania et al. (2016) en Italia, donde se observó correlación entre la EAA (Anomalía del ápice de la cáscara de huevo) y la presencia de esta cepa en los oviductos. Sin embargo, en nuestro estudio, esta granja no reportó síntomas o EAA causados por esta cepa. Los resultados opuestos encontrados entre ponedoras y reproductoras pesadas podrían deberse a las diferentes medidas de bioseguridad, producción en núcleos controlados (todo dentro-todo fuera en reproductoras) y programas de vacunación entre ambas orientaciones productivas. Entre las cepas de campo, se detectaron 6 genotipos diferentes, lo que sugiere una amplia variación en las cepas dentro de la misma especie de *Mycoplasma*. Sin embargo, el análisis filogenético ayuda a determinar el origen de la cepa pero no a predecir su patogenicidad (Sun et al., 2017).

Concluyendo, este estudio es el primero en describir la seroprevalencia, prevalencia y análisis filogenético de *M. synoviae* en ponedoras y reproductoras pesadas en el este de España. Nuestros hallazgos mostraron la utilidad de la monitorización de las manadas para ayudar a controlar y prevenir la presencia de *M. synoviae* en la industria avícola. Asimismo, la vacunación junto a diversas medidas de bioseguridad en gallinas reproductoras parece ser una estrategia de prevención eficaz que podría extenderse a otras orientaciones productivas.

3.2.1.6. Agradecimientos

Este trabajo fue financiado por el Centro de Calidad Avícola y Alimentación Animal de la Comunidad Valenciana (CECAV) y la Asociación Avícola Valenciana (ASAV). Agradecemos a Joaquín Girón (Merck Sharp & Dohme, MSD) y José Luis Balaguer (CEVA) por su asistencia técnica y soporte económico.

3.2.1.7. Referencias

Biocheck. 2018. Biocheck Interpretation and Application of Results Manual. <https://www.biocheck.com/wp-content/uploads/2018/01/BIOCHECK-INTERPRETATION-Manual.pdf?x14571>. Acceso: 17/03/2019.

Buim, M. J., E. Mettifogo, J. Timenetsky, S. Kleven and A. J. Piantino Ferreira. 2009. Epidemiological survey on *Mycoplasma gallisepticum* and *M. synoviae* by multiplex PCR in commercial poultry. *Pesq. Vet Brass.* 29:552-556.

Catania, S., D. Bilato, F. Gobbo, A. Granato, C. Terregino, L. Iob and R. A. J. Nicholas. 2010. Treatment of eggshell abnormalities and reduced egg production caused by *Mycoplasma synoviae* infection. *Avian Dis.* 54:961-964.

Catania, S., F. Gobbo, D. Bilato, L. Gagliazzo, M.L. Moronato, C. Terregino, J.M. Bradbury, A.S. Ramírez, 2016. Two strains of *Mycoplasma synoviae* from chicken flocks on the same layer farm differ in their ability to produce eggshell apex abnormality. *Veterinary Microbiology.* 193:60-66.

Dufour-Gesbert, F., A. Dheilily, C. Marois and I. Kempf. 2006. Epidemiological study on *Mycoplasma synoviae* infection in layers. *Vet Mic.* 114: 148-154.

Ewing, M. L., L. H. Lauerman, S. H. Kleven and M.B. Brown. 1996. Evaluation of diagnostic procedures to detect *Mycoplasma synoviae* in commercial multiplier-breeder farms and commercial hatcheries in Florida. Avian Dis. 40:798-806.

Feberwee A., T. S de Vries, and W. J. Landman. 2008. Seroprevalence of *Mycoplasma synoviae* in Dutch commercial poultry farms. Avian Pathol. 37:629-633.

Feberwee, A., C. J. Morrow, S. A. Ghorashi, A. H. Noormohammadi, W. J. Landman. 2009a. Effect of a live *Mycoplasma synoviae* vaccine on the production of eggshell apex abnormalities induced by a *M. synoviae* infection preceded by an infection with infectious bronchitis virus D1466. Avian Pathol. 38:333-340.

Felice, V., C. Lupini, G. Mescolini, F. Silveira, A. Guerrini, E. Catelli, and A. Di Francesco. 2020. Molecular detection and characterization of *Mycoplasma gallisepticum* and *Mycoplasma synoviae* strains in backyard poultry in Italy. Poultry science. 99(2): 719-724.

Garcia, C., J. M. Soriano, P. Catala-Gregori. 2016. Development of a seroprevalence map for *Mycoplasma gallisepticum* in broilers and its application to broilers from Comunidad Valenciana (Spain) over the course of two years (2009–2010). Vet Med. 61(03):136-140.

Gharibi, D., R. Ghadimipour and M. Mayahi. Detection of *Mycoplasma gallisepticum* and *Mycoplasma synoviae* among Commercial Poultry in Khouzestan Province, Iran. 2018. Archives of Rai Institute. 73(2): 139-146.

Gole, V. C., K. K. Chousalkar and J. R. Roberts. 2012. Prevalence of antibodies to *Mycoplasma synoviae* in laying hens and possible effects on egg shell quality. Pre.Vet. Med.106(1):75-78.

Hagan, J.C., N.J. Ashton, J.M. Bradbury, K.L. Morgan. 2004. Evaluation of an egg yolk enzyme-linked immunosorbent assay antibody test and its use to assess the prevalence of *Mycoplasma synoviae* in UK laying hens. Avian Pathol. 33:93-97.

Kapetanov, M., D. Orlic, D. Potkonjak, M. Velhner. 2010. *Mycoplasma* in poultry flocks in the year 2009 compared to the year 2000 and significance of the control measures in Serbia. Lucrari Scientific Med.Vet. 43(1): 249-253.

Köhn, S., J. Spergse, C. Ahlers, M. Voss, T. Bartels, R. Rosengarten and M. E. Krautwald-Junghanns. 2009. Prevalence of Mycoplasmas in commercial layer flocks during laying period. *Berl Munch Tierarztl Wochenschr.* 122: 186-192.

Kleven, S. H., J. M. Bradbury. 2008. Avian mycoplasmosis (*Mycoplasma gallisepticum*, *M. synoviae*). In: OIE Standards Commission (Ed.), OIE Manual of Diagnostic Tests and Vaccines for Terrestrial Animals (Mammals, Birds and Bees). Office International des Epizooties, Paris. 482-496.

Kursa, O., G. Tomczyk, and A. Sawicka. 2019. Prevalence and Phylogenetic Analysis of *Mycoplasma synoviae* Strains Isolated from Polish Chicken Layer Flocks. *Journal of veterinary research.* 63(1): 41-49.

Landman, W. J. M., D. J. Mevius, K. T. Veldman and A. Feberwee. 2008. *In vitro* antibiotic susceptibility of Dutch *Mycoplasma synoviae* field isolates originating from joint lesions and the respiratory tract of commercial poultry. *Avian Pathol.* 37:415-420.

Landman, W. J. 2014. Is *Mycoplasma synoviae* outrunning *Mycoplasma gallisepticum*? A viewpoint from the Netherlands. *Avian Pathol.* 43:2-8.

Lierz, M., N. Hagen, N. Harcourt-Brown, S. J. Hernandez-Divers, D. Luschow and H. M. Hafez. 2007. Prevalence of mycoplasmas in eggs from birds of prey using culture and a genus-specific *Mycoplasma* polymerase chain reaction. *Avian Pathol.* 36 (2):145–150.

Macowan, K. J., M. J. Atkinson, M. A. Bell, T. F. Brand and C. J. Randall. 1984. Egg transmission of a respiratory isolate of *Mycoplasma synoviae* and infection of the chicken embryo. *Avian Pathol.* 13 (1):51-58.

Marois, C.; F. Oufour-Gesbert, I. Kempf. 2000. Detection of *Mycoplasma synoviae* in poultry environment samples by culture and polymerase chain reaction. *Veterinary Microbiology.* 73: 311-318.

Nascimento, E., R. Yamamoto, K. Herrick and R. Tait. 1991. Polymerase Chain Reaction for Detection of *Mycoplasma gallisepticum*. *Avian Dis.* 35(1):62-69. doi:10.2307/1591296.

Nascimento, E., V. L. A. Pereira, M. G. F. Nascimento, M. L. Barreto. 2005. Avian micoplasmosis update. *Brazilian J Poult Sci* 7(1): 1-9.

Saâdia, N., A. Rachid, A. Falak, R. Naoufal, L. A. Idriss, F. F. Ouafaa, and E. H. Mohammed. 2014. Detection of *Mycoplasma synoviae* Infection in Broiler Breeder Farms of Morocco Using Serological Assays and Real Time PCR. *J Life Sci* 8:815-821.

Seifi, S. and M. R. Shirzad. 2012. Incidence and risk factors of *Mycoplasma synoviae* infection in broiler breeder farms of Iran. *Vet. World.* 5(5):265-268.

Spain 2013. Royal Degree 53/2013, 1st of February, por el que se Establecen las Normas Básicas Aplicables Para la Protección de los Animales Utilizados en Experimentación y Otros Fines Científicos, Incluyendo la Docencia. Vol. 34. Boletín Oficial del Estado; Madrid, Spain: 2013. pp. 11370-11421.

Sun S., X. Lin, J. Liu, Z. Tian, F. Chen, Y. Cao, J. Qin and T. Luo. 2017. Phylogenetic and pathogenic analysis of *Mycoplasma synoviae* isolated from native chicken breeds in China. *Poultry Sci.* 96:2057-2063.

Suzuki, K., J. Origlia, F. Alvaez, M. Faccioli, M. Silva, J. Caballero, L. Nunrez and L. Castro. 2009. Relative risk estimation for *Mycoplasma synoviae* in backyard chickens in Paraguay. *Int. J. Poult. Sci.* 8:842-847.

Zhu, L., M. A. Shahid, J. Markham, G. F. Browning, A. H. Noormohammadi, and M. S. Marendal. 2018. Phylogenetic and pathogenic analysis of *Mycoplasma synoviae* isolated from native chicken breeds in China. *BMC Genomics.* 19: 117.

3.2.2. Seroprevalencia y Prevalencia de Bronquitis Infecciosa en pollos, gallinas ponedoras y reproductoras pesadas en España.

V. Cortés, S. Sevilla-Navarro, C. García, C. Marín and P. Catalá-Gregori. 2022. Seroprevalence and Prevalence of Infectious Bronchitis Virus in broilers, laying hens and broiler breeders in Spain. *Poultry Science*. *In press*.

3.2.2.1. Resumen

La Bronquitis Infecciosa (IBV) es una de las enfermedades virales más importantes en la industria avícola, causando importantes pérdidas económicas. Este estudio tuvo como objetivo evaluar la seroprevalencia, prevalencia y las variantes de IBV en pollos, ponedoras y granjas de reproductoras pesadas de la especie *Gallus gallus* en el este de España. Así, se analizaron 29, 16 y 14 manadas de pollos, ponedoras y reproductoras pesadas, respectivamente. Para evaluar la seroprevalencia, las muestras de suero se analizaron mediante ELISA. Se analizaron hisopos traqueales y muestras de tejido mediante PCR para conocer la prevalencia y detectar variantes específicas. Se detectó una seroprevalencia de IBV del 100% en las tres orientaciones productivas. Según los resultados de PCR se obtuvo una prevalencia del 38% en broilers, 44% en ponedoras y 43% en broilers reproductoras. El análisis RT-PCR específico de variante mostró que las cepas 4/91, Massachusetts, QX, Italy-02 y D274 estaban presentes en manadas comerciales en el este de España, siendo 4/91 las más prevalentes en todas las orientaciones productivas. En ponedoras se detectó 100% de prevalencia de QX, 14% de Italy-02 y 14% de D274. En cuanto a los pollos de engorde, también se detectó una prevalencia del 18% de la cepa Massachusetts. En cambio, en las granjas de reproductoras pesadas solo se encontró la cepa 4/91. En conclusión, nuestros hallazgos mostraron la presencia de IBV en el este de España y la situación cambiante de la prevalencia de las variantes de IBV, siendo diferente según la orientación productiva. La continua aparición de nuevas variantes enfatiza la importancia del monitoreo continuo de IBV para optimizar las estrategias de vacunación.

3.2.2.2. Introducción

La bronquitis infecciosa aviar (IBV) es una enfermedad viral altamente contagiosa considerada como responsable de importantes pérdidas económicas en la industria avícola a nivel mundial (Moreno et al., 2017). El agente etiológico es un virus perteneciente al género *gamma Coronavirus* de la familia *Coronaviridae* del orden *Nidovirales* (Cavanagh et al., 2007). Esta enfermedad se caracteriza principalmente por causar síntomas de vías respiratorias superiores en las aves; sin embargo, también puede afectar a otros órganos como los riñones y el tracto reproductivo (Jackwood and de Wit, 2013) produciendo aerosaculitis, proventriculitis, nefritis, enteritis (Yu et al., 2001; Cook et al., 2012; Sjaak de Wit et al., 2011), disminución de la producción, mala calidad del huevo y mortalidad significativa (Moreno et al., 2017).

La bronquitis infecciosa aviar se encuentra distribuida mundialmente existiendo variedad de serotipos de esta (Jackwood and de Wit, 2013). La rápida evolución molecular de este virus se debe a la capacidad de variación antigénica por mutación o recombinación permitiendo la adaptación del virus bajo situaciones de presión de selección (Kusters et al., 1990). Debido a esta amplia variabilidad, podría producirse una falta de protección en los protocolos vacunales aplicados por lo que es necesario identificar el genotipo de las cepas presentes en las granjas para optimizar los programas de control y el conocimiento epidemiológico de este patógeno. En la actualidad, se utilizan diferentes técnicas de forma rutinaria para controlar la exposición al IBV, detectando respuestas de anticuerpos en muestras de suero como ELISA (OIE, 2018). Por otro lado, se han desarrollado otras técnicas basadas en la reacción en cadena de la polimerasa con retrotranscripción (RT-PCR) para identificar el virus y algunos de sus genotipos. Estos métodos moleculares son muy sensibles y específicos en comparación con otros métodos de diagnóstico (Alhatami et al., 2020).

El diagnóstico de IBV se ha realizado en Europa y en España desde los años 70, llevándose a cabo diversos estudios para el conocimiento de la situación epidemiológica y las cepas de IBV circulantes y para entender la dinámica de la enfermedad (Dolz et al., 2006; Worthington et al., 2007; Dolz et al., 2008; Moreno et al., 2016; Giner et al., 2017). Sin embargo, debido a la continua aparición de nuevas variantes de IBV, es esencial la vigilancia constante con el fin de conocer la prevalencia de esta enfermedad y las cepas circulantes con el fin de ajustar los programas de control apropiados para mitigar el bajo grado de protección cruzada de las vacunas comerciales entre diferentes serotipos (Jones et al., 2004). En este contexto, el objetivo de este estudio fue evaluar la seroprevalencia, prevalencia y variantes del IBV en pollos de engorde, ponedoras y granjas de reproductoras pesadas de la especie *Gallus gallus* ubicadas en el este de España.

3.2.2.3. Material y métodos

Este estudio se llevó a cabo en 71 explotaciones ubicadas en el este de España durante un período de 18 meses. Las categorías productivas comerciales incluidas en este estudio fueron pollos (29 granjas), gallinas ponedoras (19 granjas) y reproductoras pesadas (14 granjas). Las principales empresas avícolas de la región participaron en el

estudio. Todas las muestras fueron analizadas en el Centro de Calidad Avícola y Alimentación Animal de la Comunidad Valenciana, (CECAV) ubicado en España.

3.2.2.3.1. Selección de la población de estudio

En primer lugar, para encontrar la población diana, se identificaron todas las granjas y naves activas ubicadas en el este de España durante los 12 meses anteriores. Durante este período, se encontraron 421 granjas activas para pollos de engorde, 56 granjas activas para gallinas ponedoras y 16 granjas activas para reproductoras pesadas. Se calculó un tamaño de muestra de 29, 23 y 14 manadas de pollos de engorde, ponedoras y reproductoras de pollos de engorde, respectivamente (**Tabla 22**). La selección de la manada se hizo por muestreo aleatorio simple utilizando un generador de números sin repetición (<http://nosetup.org/>), dando un número correlativo a cada unidad.

Tabla 22. Tamaño de muestra en pollos, ponedoras y reproductoras de acuerdo con la prevalencia esperada de IBV.

Orientación productiva	Prevalencia esperada (%)	Granjas activas	Tamaño de muestra estimada (Nº de naves)	Tamaño de muestra final* (Nº de naves)
Pollos	10	421	29	29
Ponedoras	10	56	23	16
Reproductoras	10	16	14	14

*Por cuestiones de bioseguridad y producción, algunas granjas de ponedoras no participaron en el estudio.

Para calcular el tamaño de la muestra, se tomó como unidad epidemiológica las granjas activas. Se consideró un nivel de confianza del 95% y una prevalencia esperada del 10%. Las granjas activas descritas anteriormente se tomaron como tamaño de población. El tamaño de la muestra se calculó de la siguiente manera:

$$n = (1 - \alpha^{1/d}) \times \left(N - \frac{d - 1}{2} \right)$$

Donde n = tamaño de la muestra; α = error tipo; $I = 1-95\%$ nivel de confianza; d = prevalencia esperada y N = tamaño de la población.

3.2.2.3.2. Procedimientos de muestreo

Las granjas de pollos se muestrearon una vez a los 42 días de vida para descartar anticuerpos maternos frente a IBV. Las gallinas ponedoras y las reproductoras pesadas se muestrearon 3 veces a diferentes edades, cuando fue posible. El primer muestreo se realizó a las 26-28 semanas para ponedoras y a las 30-32 semanas para reproductoras pesadas, coincidiendo con el pico de puesta. El segundo muestreo se realizó 10 semanas después para ambas orientaciones productivas con el fin de observar la posible oscilación de anticuerpos. Y el último muestreo se realizó a las 60 semanas para ponedoras y a las 50 semanas en reproductoras pesadas, para aumentar la probabilidad de encontrar una cepa de campo (Barberis et al., 2018). En cada momento de muestreo, para gallinas ponedoras y reproductoras pesadas se recogieron 14 muestras de suero sanguíneo y 10 hisopos traqueales con hisopos de aluminio estériles (Deltalab®, Barcelona, España) de aves vivas seleccionadas al azar en cada manada. Para pollos de engorde, se recolectaron 14 muestras de suero de aves vivas. Además, se recolectaron muestras de tráquea y riñón en cada momento de muestreo de 5 pollos, con un total de 10 muestras por manada (5 tráqueas y 5 riñones). Todos los animales fueron manipulados de acuerdo con los principios de cuidado animal publicados por el Real Decreto 53/2013 (España, 2013). Las muestras recolectadas fueron transportadas al laboratorio en condiciones de refrigeración entre 0°C a 4°C. Los animales fueron revisados diariamente para detectar síntomas relacionados con IBV.

3.2.2.3.3. Análisis serológico

Las muestras de suero se procesaron de acuerdo con García et al. (2016). Durante el análisis, las muestras de suero se mantuvieron en condiciones de refrigeración entre 0°C y 4°C. El análisis serológico se realizó mediante la técnica ELISA utilizando un kit comercial “IBV ELISA” (BioChek, Reeuwijk, Países Bajos) diseñado para detectar anticuerpos de IBV en suero. Los títulos se calcularon según instrucciones del fabricante. Cada suero se diluyó (1:500) en reactivo diluyente. Brevemente, se añadieron 100 µL de muestra diluida (1:500) a cada pocillo. Cada muestra se analizó en un solo pocillo. La placa se cubrió y las muestras se incubaron a temperatura ambiente entre 22 a 27 °C durante 30 minutos. A continuación, se lavó cada pocillo con 350 µL de tampón de lavado (4 lavados). Luego, se agregaron 100 µL de reactivo conjugado en cada pocillo. La placa se tapó y se incubaron a temperatura ambiente entre 22 a 27°C durante 30 minutos. A continuación, se lavó cada pocillo

como se ha descrito anteriormente y se añadieron 100 µL de reactivo sustrato a cada pocillo. La placa se cubrió nuevamente y se incubó durante 15 minutos. Cada reacción se detuvo con 100 µL de solución de parada. La absorbancia se midió a 405 nm. Los sueros con valores de s/P por encima del nivel de corte de 0,2 (título \geq 834) se consideraron positivos.

3.2.2.3.4. Detección de IBV por RT-PCR

3.2.2.3.4.1. Procesamiento de muestras

Todos los hisopos se almacenaron a -20°C hasta el análisis mediante PCR. Los 10 hisopos traqueales tomados en cada granja para ponedoras y reproductoras pesadas se dividieron en 2 grupos de 5 hisopos. Para cada manada de pollos, las 5 tráqueas se analizaron como un pool. Asimismo, los 5 riñones recolectados también fueron procesados como pool. La manada se consideró positiva si al menos uno de los 2 grupos analizados dio positivo.

3.2.2.3.4.2. Extracción de ARN

El ARN se extrajo de cada pool utilizando el kit QIAmp[®] cador[®] Pathogen Mini (Qiagen, Hilden, Alemania) siguiendo las instrucciones del fabricante. En primer lugar, los pools de tejidos fueron triturados y se diluyeron en 1 mL de PBS (OXOID, Hampshire, Inglaterra). Luego, estas muestras se mezclaron mediante vorteo y se centrifugaron brevemente a 6.000 x g durante 1 min. Se recogieron 200 µL de sobrenadante de cada grupo y se mezclaron con 20 µL de proteinasa K y 100 µL de tampón de lisis. Por otro lado, los pools de hisopos se diluyeron en 200 µL de PBS (OXOID, Hampshire, Inglaterra) que se mezclaron mediante vórtex pulsado con 20 µL de proteinasa K, 1 µL de Carrier y 100 µL de tampón de lisis. Después de una incubación de 15 min a 20-25 °C, todas las muestras (muestras de tejido y torundas) se centrifugaron brevemente para eliminar las gotas de las paredes. A continuación, se añadieron 350 µL de tampón ACB y se mezclaron completamente mediante un pulso de vortex para ajustar las condiciones de unión para la purificación del ARN. La mezcla se colocó en una columna con filtro de silica gel de 2 mL y se centrifugó a 6.000 x g durante 1 min. La columna se lavó con 600 µL de tampón de lavado (AW1) y se centrifugó como se describió anteriormente. Después de un segundo paso de lavado con 600 µL de tampón de lavado (AW2), se centrifugó a 20.000 x g durante 2 min. El ARN se eluyó de la columna mediante la adición de 100 µL de tampón de elución (AVE) y se

incubó a temperatura ambiente durante 1 min. Después de la incubación, el ARN se centrifugó a 20.000 x g durante 1 min. A continuación, el ARN extraído se recogió en un microtubo estéril y se conservó a -80°C después del análisis por PCR.

3.2.2.3.4.3. Reacción en cadena de la polimerasa con transcriptasa inversa

Se realizó una primera RT-PCR en todas las muestras de ARN extraídas para detectar la presencia de IBV con el Kylt® IB-aCoV (AniCon Labor GmbH), siguiendo las recomendaciones del fabricante. Esta RT-PCR se realizó en QuantStudio 5 Thermocycler (ThermoFisher Scientific).

Si esta primera RT-PCR fue positiva, se realizaron RT-PCR específicas de cada variante para detectar diferentes variantes de IBV utilizando kits de AniCon Labor GmbH (Emstek, Alemania) siguiendo los protocolos del fabricante. Se utilizaron sondas de hibridación con los siguientes cebadores: Kylt®IBV-Variant 02, Kylt® IBV-Variant 4/91 (793b), Kylt® IBV-Variant Arkansas, Kylt® IBV-Variant D1466, Kylt® IBV-Variant D274, Kylt® IBV-Variant Italy02, Kylt® IBV-Variant Massachusetts, Kylt®IBV-Variant Q1, Kylt® IBV-Variant QX y Kylt®IBV-IB80 (AniCon Labor GmbH). Se utilizó un Termociclador QuantStudio 5 (ThermoFisher Scientific) de acuerdo a las siguientes condiciones: 1 ciclo de 50°C por 10 min y 95°C por 1 min, luego 42 ciclos de 95°C por 10 s, 60°C por 1 min.

3.2.2.4. Resultados

Debido a cuestiones relacionadas con la producción y bioseguridad, algunas granjas de ponedoras seleccionadas no participaron en el estudio, por lo que el número final de manadas de ponedoras analizadas fue de 16.

3.2.2.4.1. Seroprevalencia

En base en los resultados obtenidos mediante ELISA, las granjas se dividieron en dos grupos: negativas y positivas. El grupo positivo estuvo compuesto por granjas con 10% o más de reacciones positivas y con título sospechoso de infección (Títulos ≥ 12.000 e Índice de Vacunación (VI) ≥ 400) (Biocheck, 2018). Algunos servicios veterinarios de las granjas participantes no compartieron la información sobre el programa vacunal, por lo que se asumió que en la actualidad todas habían recibido vacunación frente a IBV. La vacunación reportada se realizó con diferentes cepas variantes o combinación de ellas, como cepas variantes 4/91, Ma5, H120, 1/96, D274 y

M41. El ELISA aplicado sobre muestras analizadas demostró una alta presencia de anticuerpos frente a IBV. En la **Tabla 23** se muestran los resultados obtenidos a partir de muestras recolectadas, mostrando el 100% de seroprevalencia de IBV de las tres orientaciones productivas.

Tabla 23. Muestras positivas detectadas por ELISA y PCR.

Orientación productiva	N	ELISA		PCR	
		n	%	n	%
Pollos	29	29	100	11	38
Ponedoras	16	16	100	7	44
Reproductoras pesadas	14	14	100	6	43

N: tamaño de muestra; n: granjas positivas

Con respecto al análisis por edad y títulos medios según orientación productiva, las tasas de sueros positivos fueron más altas en las gallinas ponedoras que en las reproductoras pesadas (**Tabla 24**).

Tabla 24. Títulos medios de IBV de acuerdo al momento de muestreo y orientación productiva.

Tiempo de muestreo*	Ponedoras	Reproductoras	Broilers
Primero	10.173	6.114	1.784
Segundo	10.491	7.026	-
Tercero	11.845	7.838	-

*El primer, segundo y tercer momento de muestreo fue de 26-28, 36-38 y ≥ 60 semanas para gallinas ponedoras, y 30-32, 40-42 y ≥ 50 semanas para reproductoras pesadas, respectivamente. El muestreo en broilers se realizó a 42 días.

3.2.2.4.2. Prevalencia

La detección de IBV se realizó mediante PCR a partir de muestras positivas en ELISA. La prevalencia de IBV fue del 38% en granjas de pollos (11/29), del 44% en granjas de ponedoras (7/16) y del 43% en reproductoras pesadas (6/14) (**Tabla 23**).

3.2.2.4.3. Cepas variantes de IBV

Las RT-PCR específicas de cada variante de IBV se llevaron a cabo a partir de las 24 muestras PCR positivas (11 de pollos; 7 de gallinas ponedoras; 6 de reproductoras pesadas; **Tabla 25**). En granjas de pollos las cepas detectadas fueron 4/91

(100%) y Massachusetts (18%). En 2 granjas, las 2 cepas se encontraron al mismo tiempo. En granjas de ponedoras las variantes halladas fueron Qx (100%), 4/91 (43%), Italy-02 (14%) y D274 (14%). En algunas de estas manadas (43%), se encontraron hasta 2 variantes diferentes (QX con D274, 4/91 o Italy-02). Por otro lado, en las granjas de reproductoras pesadas solo se encontró la variante 4/91 (100%).

Tabla 25. Cepas de IBV detectadas de acuerdo las diferentes orientaciones productivas.

Orientación productiva	N	4/91		Mass		Qx		Italy		D274	
		n	%	n	%	n	%	n	%	n	%
Pollos	11	11	100	2	18	-	-	-	-	-	-
Ponedoras	7	5	43	-	-	7	100	1	14	1	14
Reproductoras	6	6	100	-	-	-	-	-	-	-	-

N: tamaño de muestra; n: granjas positivas a IBV.

3.2.2.5. Discusión

La bronquitis infecciosa aviar es una gran amenaza para la avicultura ya que provoca pérdidas directas debido a la mortalidad animal, la reducción del crecimiento diario y la disminución de la producción y la calidad de los huevos (Cavanagh, 2007). El IBV se diagnostica en España desde principios de los años setenta mediante técnicas serológicas y de aislamiento del virus (Dolz et al., 2008). El presente estudio se realizó para monitorear la seroprevalencia y la prevalencia de IBV en la industria avícola en el este de España. La seroprevalencia observada en nuestro estudio en todas las orientaciones productivas (100%) probablemente debido a que en la actualidad la vacunación de IBV es habitual en todas las orientaciones productivas (Jackwood, 2012). Estas tasas son cercanas a las reportadas en Etiopía (94%) y Nigeria (84%) (Hutton et al., 2017; Bhuiyan et al., 2018). Además, la seroprevalencia encontrada en nuestro estudio parece superior a la encontrada por otros investigadores en Argelia (78,25%) (Barberis et al., 2018), Pakistán (67%) (Ahmed et al., 2007) y Francia (61%) (Auvigne et al., 2013). Asimismo, las muestras se recolectaron a edades avanzadas en todas las manadas concordando con los resultados observados por Javed et al. (1991) y Barberis et al. (2018) quienes informaron que la seroprevalencia de IBV aumentó con la edad debido al período de exposición más prolongado a los virus de campo. Las diferencias con respecto a la media de títulos observada en las diferentes orientaciones productivas

puede deberse a diferencias en los sistemas de producción, las medidas de bioseguridad y/o la edad de muestreo.

En cuanto a la prevalencia, encontramos un 44% en ponedoras, un 43% en reproductoras pesadas y un 38% en pollos. En años anteriores, Worthington et al. (2008) mostró tasas similares (57%) a nuestra investigación en granjas comerciales en España. Sin embargo, Giner et al. (2017) informaron de tasas más altas (78,4 a 94,4%) entre 2012 y 2016. Otros investigadores como Andreopoulou et al. (2019) en Grecia detectaron tasas más altas (83,96%) de IBV en manadas de ponedoras y pollos. De igual forma, en un estudio realizado por Roussan et al. (2009) en Jordania, el 92,9% de las granjas comerciales dieron positivo para IBV por PCR.

El análisis mediante RT-PCR específica de cada variante mostró que las cepas 4/91, Massachusetts, QX, Italy-02 y D274 están presentes en granjas comerciales en el este de España.

La variante encontrada con mayor frecuencia fue 4/91, presente en el 100% de las granjas de pollos y reproductoras pesadas y en el 43% de las ponedoras. Estas tasas pueden ser debidas a la vacunación reportada debido al uso generalizado de la variante 4/91 (Worthington et al., 2008). Los resultados hallados coincidieron con Roussan et al. (2008) en Jordania, quienes demostraron que las manadas de pollos, ponedoras y reproductoras presentaban una prevalencia del 100%, 78% y 61% de la variante 4/91, respectivamente. Giner et al. (2017) encontraron tasas más bajas en España (10% a 48%) y Worthington et al. (2008) (25,9%), sin embargo, las tasas generales encontradas en Europa occidental están de acuerdo con nuestros hallazgos.

La segunda variante más detectada fue QX, presente en el 100% de las manadas de ponedoras. Estudios previos en España (Worthington et al., 2008) no encontraron la variante QX, pero se ha informado de la circulación de esta variante en diferentes países europeos como Francia, Bélgica y Alemania. Años más tarde, Giner et al. (2017) observaron un aumento significativo de esta variante durante el año 2016 en avicultura, donde la tasa fue del 81,6% en línea con nuestros resultados. Las medidas de control usadas contra el genotipo QX se basan en el uso de vacunas homólogas (desde temprana edad) y/o inactivadas (Malo, 2013), lo que explicaría las altas tasas halladas de esta variante en estudios posteriores, aunque en nuestro estudio no se reportó vacunación con esta variante.

Con respecto a los pollos, la variante Massachusetts se encontró en el 18% de las manadas. Se encontró una prevalencia similar en España entre 2002 y 2006, donde el 50% de las variantes eran idénticas a las vacunas (Worthington et al., 2008). Además, Giner et al. (2017) mostraron tasas del 5% al 20% en España. Esto no fue sorprendente considerando el uso extensivo de la variante Massachusetts con vacunas vivas (Worthington et al., 2008). Trabajos recientes han confirmado que se ha encontrado que las vacunas vivas contra IBV persisten en las aves durante muchas semanas después de la administración (Naqi et al., 2003).

De los genotipos de IBV, D274 se detectó en el 18% de las granjas de ponedoras. Este hallazgo concuerda con los resultados reportados en España, donde se detectó la variante D274 en el 17,6% de las explotaciones investigadas (Worthington et al., 2008). Se encontraron tasas similares en Bélgica (22,8%), sin embargo, en otros países europeos la prevalencia de D274 fue menor, como Reino Unido (7%), Holanda (6,9%) o Alemania (10%) (Worthington et al., 2008).

En este estudio, la variante Italy 02 se detectó solo en el 18% de las granjas de ponedoras. Este genotipo fue descrito por Dolz et al. (2006) y Worthington et al. (2008) en España, siendo la cepa de IBV más frecuentemente detectada en contraste con la baja prevalencia encontrada en nuestro estudio. Sin embargo, estudios recientes (Giner et al., 2017) reportan una disminución de la prevalencia de esta variante en España y coinciden con Moreno et al. (2017) en que este serotipo ha sido reemplazado por otros serotipos como QX y 793B (4/91). Esta hipótesis confirma la baja detección de este genotipo en nuestro estudio y explica la mayor prevalencia de QX y 4/91.

Más de una variante de IBV se detectó en el 18% de los pollos y en el 43% de las ponedoras analizadas en este estudio. Esto coincide con estudios previos, que mostraron que las manadas pueden infectarse simultáneamente con varios tipos de IBV (Cavanagh et al., 1999) y pueden encontrarse diferentes variantes incluso en los mismos animales, estando demostrada la cocirculación de serotipos (Capua et al., 1999). A diferencia de la mayoría de los métodos de secuenciación, la técnica de RT-PCR permite detectar las diferentes cepas presentes en la muestra y no solo la cepa predominante (Giner et al., 2017).

En conclusión, este estudio describe la seroprevalencia y la prevalencia de IBV en la industria avícola del este de España. Nuestros hallazgos ilustraron el valor de la

vigilancia continua de IBV debido a la aparición de nuevas variantes y la prevalencia cambiante. Debido a la patogenicidad de algunos serotipos emergentes, la información epidemiológica es importante para ajustar los planes de vacunación para proteger las granjas avícolas.

3.2.2.6. Agradecimientos

Este trabajo fue financiado por el Centro de Calidad Avícola y Alimentación Animal de la Comunidad Valenciana (CECAV) y la Asociación Avícola Valenciana (ASAV). Agradecemos a Joaquín Girón (Merck Sharp & Dohme, MSD), Jose Luis Balaguer (CEVA) y Alberto Giner (Zoetis) por su asistencia técnica y económica.

3.2.2.7. Referencias

Alhatami, A.O., F. alaraji, H. M. Abdulwahab and Y. I. Khudhair. 2020. Sequencing and phylogenetic análisis of infectious bronchitis virus variant strain from an outbreak in egg-layers flocks in Baghdad, Iraq. *Veterinary world*. 13(7):1358-1362.

Ahmed, Z., K. Naeem, A. Harmeed. 2007. Detection and seroprevalence of infectious bronchitis virus strains in commercial poultry in Pakistan. *Poult.Sci.*, 86:1329-1335.

Andreopoulou, M., G. Granzo, C.M. Tucciarone, Z. Prentza, K.C. Koutoulis, M. Cecchinato and I. Chaligianni. 2019. Molecular epidemiology of infectious bronchitis virus and avian metapneumovirus in Greece. *Poult. Sci.*, 98:5374-7384.

Auvigne, V., S. Gibaud, L. Léger, X. Malher, R. Currie, A. Riggi. 2013. A longitudinal study of the incidence of Avian Infectious Bronchitis in France using strain-specific haemagglutination inhibition tests and cluster analysis. *Revue Méd. Vét.* 164:417-424.

Barberis, A., N. Alloui, A. Boudaoud, O. Bennoune and A. Ammar. 2018. Seroprevalence of Infectious Bronchitis Virus in broiler farms in Batna, East Algeria. *Int. J. Poult. Sci.* 17(9):418-422.

Bhuiyan, Z.A., Md. Giasuddin and Z.U. M. Khan. 2018. Seroprevalence of infectious bronchitis virus in different types of chicken in Bangladesh. *Asin J. Med. Biol. Res.* 4(1):132-136.

Biocheck. 2018. Biocheck Interpretation and Application of Results Manual. [https://www.biocheck.com/wp-content/uploads/2018/01/BIOCHECK-INTERPRETATION -Manual.pdf? x14571](https://www.biocheck.com/wp-content/uploads/2018/01/BIOCHECK-INTERPRETATION-Manual.pdf?x14571). Acceso: 15/11/2021.

Capua, I., Z. Minta, E. Karpinska, K. Mawditt, P. Britton, D. Cavanagh, R. E. Gough. 1999. Co-circulation of four types of infectious bronchitis virus (793/B, 624/I, B1648 and Massachusetts). *Avian Pathology*. 28:587-592.

Cavanagh, D., K. Mawditt, P. Britton and C.J. Naylor. 1999. Longitudinal field studies of infectious bronchitis virus and avian pneumovirus in broilers using type-specific polymerase chain reactions. *Avian Pathology*. 28:593-605.

Cavanagh, D. 2007. Coronavirus avian infectious bronchitis virus. *BMC Vet Res*. 38:281-297.

Cook, J. K. A., M. Jackwood, and R. C. Jones. 2012. The long view: 40 years of infectious bronchitis research. *Avian Pathol*. 41:239-250.

Dolz R., J. Pujols, G. Ordoñez, R. Porta and N. Majó. 2006. Antigenic and molecular characterization of isolates of the Italy 02 infectious bronchitis virus genotype. *Avian Pathology*. 35(2): 77-85

Dolz R., J. Pujols, G. Ordoñez, R. Porta and N. Majó. 2008. Molecular epidemiology and evolution of avian infectious bronchitis virus in Spain over a fourteen-year period. *Virology*. 274: 50-59.

Ferberwee, A., C. J. Morrow, S. A. Ghorashi, A. H. Noormohammadi, W. J. Landman. 2009a. Effect of a live *Mycoplasma synoviae* vaccine on the production of eggshell apex abnormalities induced by a *M. synoviae* infection preceded by an infection with infectious bronchitis virus D1466. *Avian Pathol*. 38:333-340.

Garcia, C., J. M. Soriano, P. Catala-Gregori. 2016. Development of a seroprevalence map for *Mycoplasma gallisepticum* in broilers and its application to broilers from Comunidad Valenciana (Spain) over the course of two years (2009–2010). *Vet Med*. 61(03):136-140.

Giner, A., F. Blond, T. Bru and R. Vila. 2017. Bronquitis infecciosa aviar: Genotipos identificados en España del 2012 al 2016. LIV Symposium Científico de

Avicultura. https://www.wpsa-aeca.es/articulo.php?id_articulo=4535. Acceso: 13/11/2021.

Hutton, S., J. Bettirdge, R. Christley, T. Habte, K. Ganapathy. 2017. Detection of infectious bronchitis virus 793B, avian metapneumovirus, *Mycoplasma galisepticum* and *Mycoplasma synoviae* in poultry in Ethiopia. Trop. Anim. Health Prod., 49:317-322.

Kusters, J.G., Jager, E.J., Niesters, H.G.M., van der Zeijst, B.A.M., 1990. Sequence evidence for RNA recombination in field isolates of avian coronavirus infectious bronchitis virus. Vaccine. 8:605-608.

Moreno, A., G. Franzo, P. Massi, G. Tosi, A. blanco, N. Antilles, M. Biarnes, N. Majo, M. Nofrarías, R. Dolz, D. Lelli, E. Sozzi, A. Lavazza and M. Ceccinato. 2017. A novel variant of the infectious bronchitis virus resulting from recombination events in Italy and Spain. Avian Pathology. 46(1): 28-35.

Jackwood, M.W., deWit, S., 2013. Infectious bronchitis. In: Swayne, D.E., Glisson, J.R., McDougald, L.R., Nolan, L.K., Suarez, D.L., Nair, V. (Eds.), Diseases of Poultry. Wiley-Blackwell Publishing, Ames, Iowa, Ames, IA, pp. 139-160.

Javed, T., M. Siddique and A. Hameed. 1991. Persistence and morphopathological studies on infectious bronchitis in chickens in Pakistan. Asslut. Vet. Med.J. 25:216-228.

Jones, R. C., C. E. Savage, C. J. Naylor, J. K. A. Cook, and M. A. El-Houadfi. 2004. Possible North African progenitor of the major European infectious bronchitis variant (793B, 4/91, CR88). In Proceedings of the IV International Symposium on Avian Corona and Pneumovirus Infections.

Malo, A. 2013. Afectación de IBV QX en ponedoras y pollos. 50 Congreso científico de Avicultura. Simposio WPSA-AECA.

Moreno, A., G. Franzo, P. Massi, G. Tosi, A. Blanco, N. Antilles, M. Biarnes, N. Majó, M. Nofrarías, R. Dolz, D. Lelli, E. Sozzi, A. Lavazza and M. Cecchinato. 2017. A novel variant of the infectious bronchitis virus resulting from recombination events in Italy and Spain. Avian Pathol. 46: 28-35.

Naqui, S., K. Gay, P. Patalla, S. Mondal and R. Liu. 2003. Establishment of persistent avian infectious bronchitis virus infection in antibody-free and antibody positive chickens. *Avian Diseases*. 47:594-601.

OIE. 2018. *Terrestrial Manual: Avian infectious bronchitis*. 2018: 2.3.2.

Roussan, D.A., G.Y. Khawaldeh, I.A. Shaheen. 2009. Infectious bronchitis virus in Jordanian chickens: Seroprevalence and detection. *The Canadian Veterinary Journal*. 50(1):77-80.

Seifi, S. and M. R. Shirzad. 2012. Incidence and risk factors of *Mycoplasma synoviae* infection in broiler breeder farms of Iran. *Vet. World*. 5(5):265-268.

Sjaak de Wit, J. J., J. K. Cook, and H. M. van der Heijden. 2011. Infectious bronchitis virus variants: a review of the history, current situation and control measures. *Avian Pathol*. 40:223–235.

Spain. 2013. Royal Degree 53/2013, 1st of February, por el que se establecen las normas básicas aplicables para la protección de los animales utilizados en experimentación y otros fines científicos, incluyendo la docencia. *Boletín Oficial del Estado*. 44:318-335.

Worthington, K.J., R. J.W. Currie and C. Jones. 2008. A reverse transcriptase-polymerase chain reaction survey of infectious bronchitis virus genotypes in Western Europe from 2002 to 2006. *Avian Pathology*. 37(3): 247-257.

Yu, L., Y. Jiang, S. Low, Z. Wang, S. J. Nam, W. Liu, and J. Kwang. 2001. Characterization of three infectious bronchitis virus isolates from China associated with proventriculus in vaccinated chickens. *Avian Dis*. 45:416-424.

CAPÍTULO IV. DISCUSIÓN GENERAL

4. DISCUSIÓN GENERAL

La avicultura es un pilar económico para diversos países a nivel mundial y sus productos una pieza clave en la alimentación. El crecimiento de la industria y la exigencia en la seguridad y calidad de los productos alimentarios por parte del consumidor ha llevado al sector avícola a enfrentarse a importantes retos desde el punto de vista tanto de salud pública como de sanidad animal.

Tal y como se ha descrito en los objetivos, en esta Tesis Doctoral se han abordado parte de estos retos anteriormente mencionados, monitorizando el estado sanitario de las explotaciones y mejorando el conocimiento de la epidemiología de varios agentes zoonóticos y/o patógenos, como *Salmonella* spp., *Campylobacter* spp., *Mycoplasma synoviae* y el virus de la Bronquitis Infecciosa Aviar en la Comunidad Valenciana y comunidades o áreas limítrofes, constituyendo una fuente de información adicional en la mejora de los programas y estrategias de control sanitario actuales, así como en la evaluación de la eficacia de los mismos.

Uno de los retos abordados en nuestro trabajo ha sido el microorganismo *Salmonella* spp. y el desarrollo de sus resistencias antimicrobianas. *Salmonella* spp. es uno de los patógenos zoonóticos más importantes con impacto económico y en la salud pública a nivel mundial. Los productos de origen avícola (carne, huevos y ovoproductos) se consideran una de las principales fuentes de transmisión a humanos de esta bacteria (EFSA, 2021) y teniendo cuenta el incremento en el consumo de estos productos (AVEC, 2021) y la prevalencia de *Salmonella* en los mismos, se instauraron los Programas Nacionales de Control (PNCS) desde 2008 para la vigilancia de este patógeno en España. La preocupación por la presencia de este patógeno en los productos alimentarios se ha acrecentado con la aparición de las cepas resistentes a los antibióticos, convirtiéndose en un reto aún mayor. El uso amplio de los antimicrobianos durante años (Usera et al., 2002), y la aparición de casos de salmonelosis graves o en pacientes inmunocomprometidos que requieren tratamiento hizo que en 2014 se estableciera la obligatoriedad de controlar y notificar las resistencias de *Salmonella* spp. entre otros patógenos. En España, se implantó el Plan Nacional de Resistencias a Antibióticos, en vigencia actualmente. En el estudio presentado en esta Tesis Doctoral, tras varios años de la aplicación de estos planes, se reveló que las tasas de resistencia fueron altas, del 97%, 100% y 69%, en pollos, pavos y ponedoras, respectivamente, en

línea con otros estudios previos en España en avicultura (Usera et al., 2002; Carramiñana et al., 2004 y Álvarez-Fernández et al., 2012). En cuanto a las multirresistencias se observó una tendencia decreciente en las tres orientaciones productivas, aunque las tasas fueron altas en pavos (80%) y pollos (40%), con respecto de las ponedoras que presentaron un 0%. Las tasas obtenidas en este estudio son ligeramente inferiores a las reportadas en estudios previos a la aplicación de los planes de reducción de resistencias (Álvarez-Fernández et al., 2012), pero superiores a las reportadas a nivel Europeo por la EFSA en pavos y pollos. Sin embargo, sí que guardan relación las tasas observadas en ponedoras. El hecho de que las ponedoras fueran las que menores tasas de resistencia y multirresistencias presentaron, puede ser debido a las importantes restricciones que se realizan en el uso de antibióticos para evitar residuos en el huevo (EFSA, 2021).

Con respecto los diferentes antibióticos analizados, el sulfametoxazol fue el antibiótico que mayores tasas de resistencia presentó en las tres orientaciones productivas. Este resultado era esperado ya que este antibiótico ha sido ampliamente utilizado en animales de producción para combatir enfermedades infecciosas (EFSA, 2021). Con respecto los antibióticos que se utilizan en el tratamiento de salmonelosis humana, como la ciprofloxacina, la resistencia observada fue alta en pavos y pollos, probablemente debido al uso excesivo de la enrofloxacin en producción animal, ya que la estructura y espectro de ambos antibióticos es similar (Lai et al., 2014). El cloranfenicol y la ampicilina también han sido utilizados en el tratamiento de la salmonelosis en humanos, sin embargo, no se observó una resistencia significativa al cloranfenicol, probablemente porque no es un antibiótico autorizado en avicultura. Las tasas de resistencia a la ampicilina sí que fueron altas, sobretodo en pavos. El aumento de la resistencia a estos antimicrobianos de tratamiento en humana puede deberse a la generalización del uso de las fluoroquinolonas y cefalosporinas en tratamientos veterinarios (Miranda et al., 2009).

Con respecto a los serotipos, aquellos que presentaron multirresistencias comunes a las 3 orientaciones productivas fueron *S. Kentucky* y *S. Hadar*. Otros serotipos relevantes de *Salmonella* como son *S. Infantis* y *S. Typhimurium* mostraron altas tasas de multirresistencias en pollos y pavos. Estas tasas de resistencia son relevantes, ya que *S. Typhimurium* provoca consecuencias más graves en la salud humana que otros serotipos de *Salmonella* (Álvarez-Fernández et al., 2012). En cuanto a

S. Enteritidis, no se observó multirresistencia en ninguna de las cepas aisladas analizadas. Este resultado está en línea con los publicados por Capita et al., (2007) y Álvarez-Fernández et al., (2012), que demostraron que *S. Enteritidis* era menos propenso a desarrollar resistencias que otros serotipos. Los resultados de este primer estudio sugirieron que la reducción en el uso de antibióticos comienza a verse reflejada con la reducción de las multirresistencias y en la tendencia decreciente de las resistencias, especialmente en ponedoras. Sin embargo, el alto nivel de resistencias encontrado en este estudio sugiere la necesidad de seguir trabajando en la limitación del uso de antimicrobianos en aves y en la búsqueda de terapéutica alternativa para lograr una disminución significativa en las resistencias.

Debido a las tasas de resistencia encontradas en este estudio, nuestra siguiente investigación se centró en la investigación *in vitro* de un compuesto natural, la alicina. Este compuesto tiene actividad biocida contra una amplia gama de microorganismos (Curtis et al., 2004), y ya existían estudios previos que demostraban que la combinación de alicina con antibióticos puede conducir a un sinergismo parcial o total (Sivam et al., 1997). En el presente estudio se observó que usando la combinación de alicina con algunos antibióticos se produjo una reducción de resistencia estadísticamente significativa (P -valor $\leq 0,05$), como en la combinación alicina + ciprofloxacina y alicina + gentamicina, con una reducción de la resistencia del 68,5% y del 83,6%, respectivamente. De acuerdo con nuestros hallazgos, Salah et al. (2013) encontraron que la combinación de alicina con ciprofloxacina tiene un efecto sinérgico en algunos aislados bacterianos gram negativos, y Belguith et al. (2021) describieron un efecto aditivo cuando la gentamicina se combinaba con extracto de ajo en cepas de *Salmonella* spp. . Estos resultados resultan esperanzadores, ya que las tasas de resistencia frente a la ciprofloxacina fueron altas en nuestro estudio previo y este es un antibiótico de elección en el tratamiento de la salmonelosis en humanos. Además, se observó que algunos serotipos presentaron una reducción estadísticamente significativa (P -valor $\leq 0,05$) como *S. Infantis*, *S. Kentucky*, *S. Mikawasima*, *S. Montevideo* y *S. Typhimurium* (monofásica). Esta diferencia de sensibilidad entre serotipos fue descrita previamente por Belguith et al., (2021) quien demostró la diferente intensidad de inhibición del crecimiento según serotipos. Aunque son necesarios más estudios tanto *in vitro* como *in vivo*, nuestro estudio reveló que la combinación de alicina con ciprofloxacina y gentamicina puede representar una perspectiva atractiva para ayudar al control de

infecciones y a la reducción del desarrollo de resistencias en *Salmonella* spp., así como en el tratamiento de otros microorganismos que pueden presentar un desafío en la industria avícola.

Por otro lado, nuestros estudios también se centraron en el conocimiento de la epidemiología, situación actual y evaluación de los planes de control de tres enfermedades *Campylobacter* spp., *M. synoviae* e IBV.

El primer agente mencionado, *Campylobacter* spp., es otro de los patógenos zoonóticos que supone un reto en avicultura desde el punto de vista de salud pública ya que desde hace años es el mayor productor de infecciones gastrointestinales en la UE (EFSA, 2021). El reto en avicultura erradica en que *Campylobacter* spp. coloniza el tracto gastrointestinal de aves sanas en granja sin producirles patología, y posteriormente este produce la contaminación de las canales durante el faenado en matadero (EFSA, 2021). Con el objetivo de controlar y prevenir la presencia de este patógeno en los alimentos procedentes de la avicultura en 2017 se estableció el Reglamento (UE) 2017/1495, que modifica el Reglamento (CE) n° 2073/2005 en relación con la vigilancia de *Campylobacter* spp. en canales de pollos donde se fijó un criterio de higiene de proceso >1000 UFC/g en matadero (CE, 2017). Sin embargo, aunque hay varias opciones de control disponibles, no existe una medida efectiva o estrategia de control efectiva a nivel de granja (Vidal et al., 2013), por ello en la presente Tesis Doctoral se estudió la presencia de *Campylobacter* spp. a nivel de granja tras los límites restrictivos impuestos en 2017. En este estudio, se aisló *Campylobacter* spp. en el 54% de las muestras analizadas. Con relación a investigaciones previas, la prevalencia hallada tanto en España con el resto de Europa es muy variable, entre el 3,5% y el 100% (Torralbo et al., 2014; Ingesa-Capaccioni et al., 2015; Pérez-Arnedo et al., 2019; EFSA, 2021). Con relación a los niveles de *Campylobacter* spp. encontrados en las granjas de pollos con ≤ 35 días de edad, el % de recuentos superiores .1000 UFC/g fue del 27%. Sin embargo, en granjas con >35 días de vida la tasa fue del 60%. Los resultados según el mes del año indicaron que en las manadas que estaban más próximas a la edad de matadero (>35 días de vida) y que excedieron el límite ≥ 1.000 UFC/g presentaron diferencias estadísticas entre los diferentes meses del año (P-valor $\leq 0,05$). Se encontraron tasas mayores de junio a diciembre (verano y otoño) presentando cambios estacionales en la presencia de *Campylobacter* spp., hallazgo que ya había sido reportado en España por otros autores (Reich et al., 2008; Urdaneta et al.,

2013). Nuestro estudio demuestra una presencia mayor de *Campylobacter* spp. en lotes de pollos cercanos a la edad de matadero, especialmente en algunos meses del año, lo que puede incrementar la contaminación de canales posteriormente en matadero. Por tanto, el desarrollo de estrategias para la reducción de la carga de *Campylobacter* spp. en granja son necesarias, y que quizá, como algunos autores señalan, podría iniciarse con el incremento de las medidas de bioseguridad (Reich et al., 2008; Torralbo et al., 2014). Por otro lado, el muestreo sistemático de *Campylobacter* spp. en granjas de pollos en un momento dado puede ser una herramienta valiosa para evaluar la presencia de *Campylobacter* spp. con el objetivo de estimar y mejorar el conocimiento de su prevalencia.

Desde el punto de vista de la sanidad animal, la aparición y reaparición de enfermedades aviarias es otra de las preocupaciones de la avicultura actual. Tanto por su impacto en la salud de los animales (Feberwee et al., 2009), como sobre los resultados productivos y su repercusión económica sobre la actividad ganadera, son importantes la bronquitis infecciosa aviar y la micoplasmosis, como la causada por *M. synoviae*. En el este de España no existían investigaciones previas de vigilancia y monitorización de ambas enfermedades, por lo que con nuestros estudios se pretendió evaluar la situación actual, para proporcionar información que ayudara en la toma de decisiones en la instauración de programas de control y estrategias sanitarias.

Con respecto *M. synoviae* los hallazgos encontrados mostraron que la seroprevalencia en gallinas ponedoras fue del 95% y la prevalencia del 100%. Otros investigadores habían reportado tasas bastante heterogéneas de seroprevalencia desde el 69% al 90% en gallinas adultas. Con relación a la prevalencia, los datos obtenidos son cercanos a los encontrados en otros estudios en los que se observaron tasas del 72,7% al 84% (Buim et al., 2009; Köhn et al., 2009). En cuanto a las reproductoras pesadas, la seroprevalencia fue del 74% y la prevalencia del 47%. Estas tasas fueron menores que las observadas en ponedoras, sin embargo, fueron superiores a las observadas por otros autores (Feberwee et al., 2009) probablemente debido a la alta tasa de vacunación en nuestro estudio. Estos resultados heterogéneos comparando manadas no vacunadas podrían explicarse debido a la diferente edad de muestreo, la presión de la enfermedad, la alta seroprevalencia vacunal en reproductoras (Feberwee et al., 2009) y las diferencias en los sistemas de producción, como la existencia de núcleos multiedad en

gallinas ponedoras con respecto sistemas todo dentro-todo fuera en reproductoras pesadas o diferentes medidas de bioseguridad.

En cuanto al análisis por edad, la seroprevalencia fue numéricamente mayor a medida que aumentaba la edad de muestreo. Asimismo, las tasas de manadas positivas y las seroprevalencias también fueron numéricamente superiores en las gallinas ponedoras con respecto a las reproductoras , probablemente asociado al origen de la seroconversión, ya que en ponedoras las cepas encontradas fueron de campo y con la edad es previsible que aumente la diseminación horizontal, cuando en reproductoras está asociado a cepas de origen vacunal. En esta línea con lo reportado por Saâdia et al. (2014), quien demostró el aumento de la seroprevalencia con la edad y por Hagan et al. (2004) quien asoció la edad como factor de riesgo.

Con respecto los genotipos encontrados en ponedoras fueron IZSVE/4504, MSK-1, MGS 1342, MGS 543, PASC 8, WT4 y MS-H; en reproductoras todas las cepas aisladas fueron la cepa vacunal (MS-H). La amplia variabilidad de genotipos de *M. synoviae* también ha sido observada por otros autores, quienes hallaron cepas comunes a las encontradas en nuestro estudio (Kursa et al., 2019; Felice et al., 2020). Los resultados opuestos encontrados entre ponedoras y reproductoras pesadas podrían deberse a las diferentes medidas de bioseguridad y programas de vacunación entre ambas orientaciones productivas. Nuestros hallazgos mostraron la utilidad de la monitorización de las manadas para ayudar a controlar y prevenir la presencia de *M. synoviae* en la industria avícola. Asimismo, la vacunación podría ser una estrategia de prevención eficaz frente a este agente extensible tanto a ponedoras como reproductoras.

Desde el punto de vista de sanidad animal, la segunda enfermedad objeto de nuestro estudio fue IBV, enfermedad de gran importancia en avicultura por la alta mortalidad y la reducción de índices productivos (Cavanagh, 2007). La seroprevalencia observada en nuestro estudio en todas las orientaciones productivas fue de 100%. Esta alta tasa puede deberse a un nivel alto de vacunación de las manadas (Jackwood, 2013), así mismo, las muestras se recolectaron a edades avanzadas en todas las manadas con el objetivo de aumentar las probabilidades de una infección de campo ya que otros autores (Javed et al., 1991; Barberis et al., 2018) informaron de que la seroprevalencia de IBV aumentó con la edad debido al período de exposición más prolongado a los virus de campo. Las diferencias con respecto a la media de títulos observada en las diferentes

orientaciones productivas puede deberse a las diferencias en los sistemas de producción, las medidas de bioseguridad y/o la edad de muestreo. En relación a la prevalencia, encontramos un 44% en ponedoras, un 43% en reproductoras pesadas y un 38% en pollos, sin embargo, otros autores informaron de tasas más altas (78,4% a 94,4%) entre 2012 y 2016 en nuestro país (Giner et al., 2017). El análisis de las variantes mostró que las variantes 4/91, Massachusetts, QX, Italy-02 y D274 están presentes en granjas comerciales en el este de España. Además, en el 18% de las granjas de pollos y en el 43% de las ponedoras analizadas en este estudio, se encontró más de una variante, por lo que se demuestra que las manadas pueden infectarse simultáneamente con diferentes variantes de IBV como ya habían descrito otros autores (Capua et al., 1999; Cavanagh et al., 1999).

La variante más común encontrada fue 4/91, presente en el 100% de los pollos y reproductoras y en el 43% de las ponedoras. Aunque otros autores encontraron tasas más bajas en España (Giner et al. 2017), las tasas generales encontradas en Europa occidental están de acuerdo con nuestros hallazgos (Roussan et al., 2009). La variante Massachusetts se encontró en el 18% de las granjas de pollos, en línea con los datos reportados por otros investigadores que reportaron tasas del 5% al 20% en España (Giner et al., 2017). La presencia de estas dos variantes no fue sorprendente considerando el uso extensivo de las variantes 4/91 y Massachusetts en vacunas vivas (Worthington et al., 2008). Trabajos recientes han confirmado que las vacunas vivas contra el IBV persisten en las aves de corral durante muchas semanas después de la administración (Naqi et al., 2003).

La segunda variante más encontrada fue QX, presente en el 100% de las manadas de ponedoras, coincidiendo con los datos aportados por Giner et al. (2017) quien reportó un aumento significativo de esta variante en España. De los genotipos de IBV, D274 e Italy 02 se detectó en el 18% de las granjas de ponedoras en ambos casos. Los hallazgos de D274 concuerdan con los resultados informados en España (Worthington et al., 2008). Sin embargo, en estudios previos Italy02 fue la cepa de IBV más prevalente (Dolz et al., 2008; Worthington et al. 2008), pero datos aportados recientemente mostraron una disminución de la prevalencia de esta variante en España (Giner et al., 2017) y coinciden con Moreno et al. (2017) en que este serotipo ha sido reemplazado por otros serotipos como QX y 793B (4/91). Esta hipótesis confirma la baja detección de este genotipo en nuestro estudio y explica la mayor prevalencia de QX

y 4/91. Los hallazgos del estudio ilustran el valor de la vigilancia continuada de este patógeno para ajustar los planes de vacunación, debido a la aparición de nuevas variantes patógenas y la prevalencia cambiante de este agente.

Como conclusión global a todos los estudios incluidos en la presente Tesis Doctoral debemos destacar la utilidad de la monitorización de las manadas en avicultura mediante muestreo sistemático, permitiéndonos identificar y evaluar la presencia de los agentes patógenos objeto de estudio. La aportación de datos de valor sobre enfermedades relevantes en sanidad avícola y salud pública nos permite un mayor conocimiento de los microorganismos y ayuda al sector avícola en la implantación de planes de prevención y control. Así mismo, tras su implantación, el monitoreo regular nos permite evaluar la eficacia de las medidas y planes implantados, permitiéndonos la mejora y actualización de estos con respecto nuevos retos en avicultura.

4.1 Referencias

Álvarez-Fernández, E., C. Alonso-Calleja, C. García-Fernández, R. Capita. 2012. Prevalence and antimicrobial resistance of *Salmonella* serotypes isolated from Poultry in Spain: Comparison between 1993 and 2006. *International Journal of Food Microbiology*. 153:281-287.

AVEC. Annual report 2021. Association of Poultry Processors and Poultry Trade in the EU (AVEC). 2021.

Barberis, A., N. Alloui, A. Boudaoud,, O. Bennoune and A. Ammar. 2018. Seroprevalence of Infectious Bronchitis Virus in broiler farms in Batna, East Algeria. *Int. J. Poult. Sci.* 17(9):418-422.

Belguith, H., F. Kthiri, A. Landoulsi. 2021. S Synergic Interaction between Aqueous Garlic Extract (*Allium Sativum*) and Some Antibiotics against Tunisian Isolated Multi-Resistant *Salmonella* Serovars. *Biochem anal Biochem*. 1000:150.

Buim, M. J., E. Mettifogo, J. Timenetsky, S. Kleven and A. J. Piantino Ferreira. 2009. Epidemiological survey on *Mycoplasma gallisepticum* and *M. synoviae* by multiplex PCR in commercial poultry. *Pesq. Vet Brass.* 29:552-556.

Capita, R., C. Alonso-Calleja, M. Prieto. 2007. Prevalence of *Salmonella* enterica serovars and genovars from chicken carcasses from slaughterhouses in Spain. *Journal of Applied Microbiology*. 103:1366-1375.

Capua, I., Z. Minta, E. Karpinska, K. Mawditt, P. Britton, D. Cavanagh, R. E. Gough. 1999. Co-circulation of four types of infectious bronchitis virus (793/B, 624/I, B1648 and Massachusetts). *Avian Pathology*. 28:587-592.

Carramiñana, J. J., C. Rota, I. Agustín, A. Herrera. 2004. High prevalence of multiple resistance to antibiotics in *Salmonella* serovars isolated from a poultry slaughterhouse in Spain. *Veterinary Microbiology*. 104:133-139.

Cavanagh, D., K. Mawditt, P. Britton and C.J. Naylor. 1999. Longitudinal field studies of infectious bronchitis virus and avian pneumovirus in broilers using type-specific polymerase chain reactions. *Avian Pathology*. 28:593-605.

Cavanagh, D. 2007. Coronavirus avian infectious bronchitis virus. *BMC Vet Res.* 38:281-297.

Comisión Europea. 2017. Reglamento (UE) 2017/1495 de la Comisión, de 23 de agosto de 2017, que modifica el Reglamento (CE) n.º 2073/2005 por lo que se refiere a *Campylobacter* en canales de pollos de engorde. DOUE. 218.

Curtis, H., Noll, U., Störmann, J., Slusarenko, A.J., 2004. Broad-spectrum activity of the volatile phytoanticipin allicin in extracts of garlic (*Allium sativum* L.) against plantpathogenic bacteria, fungi and Oomycetes. *Physiol. Mol. Plant Pathol.* 65 (2), 79–89.

Dolz R., J. Pujols, G. Ordoñez, R. Porta and N. Majó. 2008. Molecular epidemiology and evolution of avian infectious bronchitis virus in Spain over a fourteen-year period. *Virology.* 274: 50-59.

European Food Safety Authority and European Centre for Disease Prevention and Control. 2021. The European Union One Health 2019 Zoonoses Report. *EFSA Journal.* 19(2):6406

Feberwee, A., C. J. Morrow, S. A. Ghorashi, A. H. Noormohammadi, W. J. Landman. 2009a. Effect of a live *Mycoplasma synoviae* vaccine on the production of eggshell apex abnormalities induced by a *M. synoviae* infection preceded by an infection with infectious bronchitis virus D1466. *Avian Pathol.* 38:333-340.

Felice, V., C. Lupini, G. Mescolini, F. Silveira, A. Guerrini, E. Catelli, and A. Di Francesco. 2020. Molecular detection and characterization of *Mycoplasma gallisepticum* and *Mycoplasma synoviae* strains in backyard poultry in Italy. *Poultry science.* 99(2): 719–724.

Giner, A., F. Blond, T. Bru and R. Vila. 2017. Bronquitis infecciosa aviar: Genotipos identificados en España del 2012 al 2016. *LIV Symposium Científico de Avicultura.* https://www.wpsa-aeca.es/articulo.php?id_articulo=4535. Acceso: 13/11/2021.

Hagan, J.C., N.J. Ashton, J.M. Bradbury, K.L. Morgan. 2004. Evaluation of an egg yolk enzyme-linked immunosorbent assay antibody test and its use to assess the prevalence of *Mycoplasma synoviae* in UK laying hens. *Avian Pathol.* 33:93-97.

Ingresa-Capaccioni, S., S. Gonzalez-Bodi, E. Jimenez-Trigos, F. Marco-Jimenez, P. Catalá, S. Vega, C. Marin. 2015. Comparison of different sampling types across the rearing period in broiler flocks for isolation of *Campylobacter* spp. Poultry Science. 94:766-771.

Jackwood, M.W., deWit, S., 2013. Infectious bronchitis. In: Swayne, D.E., Glisson, J.R., McDougald, L.R., Nolan, L.K., Suarez, D.L., Nair, V. (Eds.), Diseases of Poultry. Wiley-Blackwell Publishing, Ames, Iowa, Ames, IA, pp. 139-160.

Javed, T., M. Siddique and A. Hameed. 1991. Persistence and morphopathological studies on infectious bronchitis in chickens in Pakistan. Asslut. Vet. Med.J. 25:216-228.

Köhn, S., J. Spergse, C. Ahlers, M. Voss, T. Bartels, R. Rosengarten and M. E. Krautwald-Junghanns. 2009. Prevalence of Mycoplasmas in commercial layer flocks during laying period. Berl Munch Tierarztl Wochenschr. 122: 186-192.

Kursa, O., G. Tomczyk, and A. Sawicka. 2019. Prevalence and Phylogenetic Analysis of *Mycoplasma Synoviae* Strains Isolated from Polish Chicken Layer Flocks. Journal of veterinary research. 63(1): 41–49.

Lai, J., C. Wu, C. Wu, J. Qi, Y. Wang, H. Wang, Y. Liu, J. Shen. 2014. Serotype distribution and antibiotic resistance of *Salmonella* in food-producing animals in Shandong province of China, 2009 and 2012. International Journal of Food Microbiology. 180:30-38.

Miranda, J.M., A.C. Mondragón, B. Martínez, M. Guarddon, J. A. Rodríguez. 2009. Prevalence and antimicrobial resistance patterns of *Salmonella* from different raw foods in Mexico. Journal of Food Protection. 72: 966-971.

Moreno, A., G. Franzo, P. Massi, G. Tosi, A. Blanco, N. Antilles, M. Biarnes, N. Majó, M. Nofrarías, R. Dolz, D. Lelli, E. Sozzi, A. Lavazza and M. Cecchinato. 2017. A novel variant of the infectious bronchitis virus resulting from recombination events in Italy and Spain. Avian Pathol. 46: 28-35.

Naqui, S., K. Gay, P. Patalla, S. Mondal and R. Liu. 2003. Establishment of persistent avian infectious bronchitis virus infection in antibody-free and antibody positive chickens. Avian Diseases. 47:594-601.

Perez-Arnedo, I. E. Gonzalez-Fandos. 2019. Prevalence of *Campylobacter* spp. in poultry in three Spanish farms, a slaughterhouse and a further processing plant. *Foods*.8:111

Reich, F., V. Atanassova, E. Haunhorst, G. Klein. 2008. The effects of *Campylobacter* numbers in caeca on the contamination of broiler carcasses with *Campylobacter*. *International Journal of Food Microbiology*. 127:116-120.

Roussan, D.A., G.Y. Khawaldeh, I.A. Shaheen. 2009. Infectious bronchitis virus in Jordanian chickens: Seroprevalence and detection. *The Canadian Veterinary Journal*. 50(1):77-80.

Saâdia, N., A. Rachid, A. Falak, R. Naoufal, L. A. Idriss, F. F. Ouafaa, and E. H. Mohammed. 2014. Detection of *Mycoplasma synoviae* Infection in Broiler Breeder Farms of Morocco Using Serological Assays and Real Time PCR. *J Life Sci* 8:815-821.

Salah, S.Z.A, I. Abdullah, S. Al-Salihi. 2013. The synergism effect of aqueous garlic extract and ciprofloxacin against some multi-resistant bacteria. *Journal of Microbiology and Biotechnology Research*. 3 (3): 136-142.

Sivam, G. P., J. W. Lampe, B. Ulness, S. R. Swanzy, J. D. Potter. 1997. *Helicobacter pylori*-in vitro susceptibility to garlic (*Allium sativum*) extract. *Nutr Cancer*. 27(2):118-21.

Torrallbo, A., C. Borge, A. Allepuz, I. García-Bocanegra, S. K. Sheppard, A. Perea, A. Carbonero. 2014. Prevalence and risk factors of *Campylobacter* infection in broiler flocks from southern Spain. *Preventive Veterinary Medicine*. 114:106-113.

Urdaneta, S. 2013. Prevalencia y estacionalidad de campylobacter termófilos en granjas de pollos de engorde de Cataluña. 50° Symp. AECA. Lleida, 2/4-10-2013.

Usera, M. A., A. Aladueña, R. Gonzalez, M. De la Fuente, J. García-Peña, N. Frías, M. A. Echeita. 2002. Antibiotic resistance of *Salmonella* spp. from animal sources in Spain in 1996 and 2000. *Journal of Food Protection*. 65(5):768-773.

Vidal, A. B., J. Rodgers, M. Arnold, F. Clifton-Hadley. 2013. Comparison of different sampling strategies and laboratory methods for the detection of *C. jejuni* and *C. coli* from broiler flocks at primary production. *Zoonoses Public Health*. 60:412-25.

Worthington, K.J., R. J.W. Currie and C. Jones. 2008. A reverse transcriptase-polymerase chain reaction survey of infectious bronchitis virus genotypes in Western Europe from 2002 to 2006. *Avian Pathology*. 37(3): 247-257.

CAPÍTULO V. CONCLUSIONES

5. CONCLUSIONES

1. La reducción en el uso de antibióticos en avicultura, especialmente desde la implementación del PRAN y el compromiso del sector avícola con la adhesión a nuevos planes, comienzan a verse reflejadas en la reducción del número de multiresistencias en las aves, mostrando una tendencia decreciente, especialmente en ponedoras. Sin embargo, el nivel de resistencias detectado en otras orientaciones productivas sugiere la necesidad de continuar trabajando en la reducción del uso de antibióticos en las aves y en estrategias alternativas para lograr una reducción aún más significativa de las resistencias antimicrobianas.
2. El uso de extractos de plantas y aceites esenciales como complemento a algunos tratamientos antibióticos que presentan alta tasa de resistencia en su uso de forma individual, puede ser una alternativa novedosa en los tratamientos en producción avícola. En conclusión, nuestro estudio reveló que el uso de la alicina puede representar una perspectiva atractiva y alternativa para el desarrollo de nuevas estrategias de reducción de resistencias en la industria avícola.
3. Existe una mayor presencia de *Campylobacter* spp. en lotes de pollos cercanos a la edad de sacrificio, especialmente en algunos meses del año, lo que puede incrementar la contaminación de canales en matadero. La reducción a nivel de granja puede ser un factor que contemplar para disminuir la carga de *Campylobacter* spp. posteriormente en matadero.
4. La monitorización de las manadas puede ayudar a controlar y prevenir la presencia de *M. synoviae* en la industria avícola. Así mismo, la vacunación junto a diversas medidas de bioseguridad en gallinas reproductoras parece ser una estrategia de prevención eficaz que podría extenderse a otras orientaciones productivas.
5. Nuestros hallazgos ilustraron el valor de la vigilancia continua de IBV debido a la aparición de nuevas variantes y el cambio de prevalencia. Debido a la patogenicidad de algunos serotipos emergentes, la información epidemiológica es importante para ajustar los planes de vacunación para proteger las granjas avícolas.

