

Métodos de aislamiento e identificación de *Salmonella pullorum*

VIRGINIA MASDEU

Laboratorio de Bacteriología, Laboratorios de Investigación y Diagnóstico Avícola. "Jesús Menéndez", Santiago de las Vegas, Ciudad de La Habana.

RESUMEN

En el presente trabajo el autor realizó una revisión bibliográfica de los métodos diagnósticos para el aislamiento e identificación de *Salmonella pullorum* y *Salmonella gallinarum* e hizo énfasis en los principales medios de cultivo utilizados.

INTRODUCCIÓN

Las Salmonellas son gérmenes que en muchas ocasiones pueden atacar al hombre y los animales.

El primer germen representativo de este grupo fue aislado en 1885 por Salmón se le denominó *Bacillus cholerae suis*, y es el causante de la enteritis infecciosa del cerdo. En 1880 Eberth descubrió un miembro importante de este grupo, *Salmonella typhi*. Gerther en 1888, del bazo de un muerto de gastroenteritis, por haber comido carne cruda de una vaca enferma, aisló un germen que denominó *Bacillus enteritis*. El nombre genérico de *Salmonella* fue puesto en 1900 en honor a D. E. Salmón. (Heseeph, 1974.)

Infecciones paratifoideas es la expresión que se usa para designar cierto grupo de enfermedades crónicas de las aves domésticas causadas por uno o varios miembros del género *Salmonella*, no obstante, las palabras pulleriosis y tifosis se usan a menudo como sinónimos de infección por bacterias pertenecientes al género antes mencionado y es una denominación de amplio sentido que designa las enfermedades causadas por *Salmonella pullorum* o *Salmonella gallinarum* citado por (Biester and Schawarte, 1968).

Una de las vías más comunes de propagación de las Salmonellas es a través del agua y de los alimentos contaminados, por lo que se hace indispensable el análisis de los alimentos y el posterior decomiso de los mismos. (Ojalvo, 1976.)

Frecuentemente se ha demostrado que las Salmonellosis humana proviene de los productos alimenticios de origen aviar.

Aunque los alimentos pueden resultar contaminados en muchos puntos durante su elaboración y distribución existen pocas dudas de que la contaminación directa e indirecta a partir de aves infectadas desempeña una función significativa en la contaminación inicial de los productos alimenticios elaborados con tales aves. En consecuencia, es total-

mente lógico que los intereses de la salud pública consideren altamente deseable el fomento y mantenimiento de aves de corral libres de *Salmonella*. (Snoeybos, 1971.)

En Cuba esta enfermedad ha sido controlada, lo que nos libra de innumerables pérdidas económicas; no obstante, en los centros de diagnóstico de enfermedades de las aves se sigue un método sistemático de investigaciones serológicas para la posible aparición de esta peligrosa entidad.

En el presente trabajo se realiza una revisión bibliográfica sobre el aislamiento e identificación de *Salmonella pullorum*, causa principal de la pullorosis de los pollitos que tanto golpea la economía de otros países.

Algunos aspectos sobre la incidencia y distribución de la enfermedad

En las aves de corral existen dos enfermedades especiales: Pullorosis y Tifosis, causadas por *Salmonella pullorum* y *Salmonella gallinarum*, respectivamente, ambas tienen mucha importancia y se encuentran distribuidas ampliamente, causando daños significativos. Además de éstas, existen otras *Salmonellas* que son capaces de enfermar las aves aunque no causan grandes epidemias como las primeras como es por ejemplo la *Salmonella typhimurium*, que ha sido aislada de ovarios de gallinas y pavos. (Fritzche y Garriets, 1969.)

Aserkeff y colaboradores (1970) plantean que el progresivo desarrollo y expansión de la industria avícola al introducir nuevas tecnologías en los procesos de incubación y crianza ha favorecido la disminución de la enfermedad; en su trabajo señalan la importancia de la Salmonellosis en EU haciendo una revisión de esta enfermedad con datos acumulados durante 5 años de trabajo diagnóstico.

Por otra parte, Renault y colaboradores (1972) plantean la incidencia de *Salmonellas* en Francia durante el período comprendido entre 1961-1971, señalando fundamentalmente la frecuencia de Pullorosis tifosis durante estos años en relación con otras Salmonellosis y el papel que juega la edad en la presentación de estas entidades.

A continuación presentamos los resultados obtenidos por Renault y colaboradores (1972) (Gráficos 2a y 2b).

En general la enfermedad ha sido diagnosticada en los EU, Canadá, Inglaterra, diferentes partes de África continental, Asia, Australia, Europa, Japón, Corea y América del Sur, causando considerables pérdidas, por ejemplo, en Hungría, durante el año 1977, fue la Pullorosis una de las enfermedades que más afectó la economía del país. (Turin, 1978.)

Caracteres generales del agente causal

La *Salmonella pullorum* y la *Salmonella gallinarum* están consideradas por algunos autores como una sola entidad (Renault, 1972; Beaucleir, 1975).

Sin embargo, otros investigadores plantean la *Salmonella pullorum* como el agente causal de una infección intestinal aguda de los pollitos jóvenes y por otra parte, la *Salmonella gallinarum* como la causa principal de una enfermedad intestinal aguda de las gallinas (Biester y Zeh-

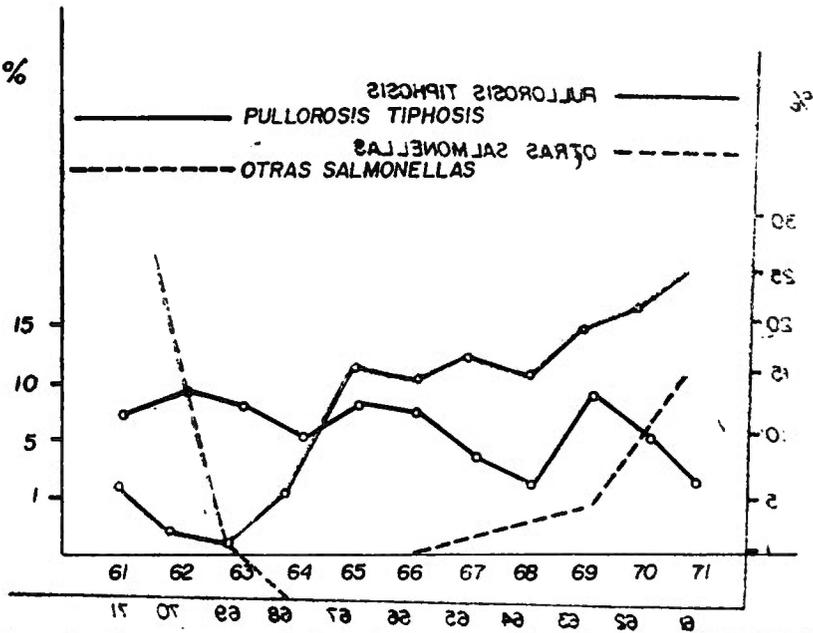


Gráfico 1. Incidencia en Francia de la Pullorosis — Tiphosis durante 1961-1971 (Renault y cols. 1972). Tomado de Tiphosis pour le diagnostic vétérinaire, Pierre Beauclair, 1975. *Salmonella pullorum* y *Salmonella typhimurium* en aves adultas (Renault y cols. 1972). Tomado de Tiphosis pour le diagnostic vétérinaire, Pierre Beauclair, 1975. warte, 1968; Carter, 1969; Hofstad *et al*, 1972), basándose en las características bioquímicas de ambas para diferenciarlas.

En general morfológicamente son semejantes, se presentan en forma de bacilos rectos de una talla media de 0,5 a 3M, no poseen cápsulas, ni flagelos peritricos.

En medios sólidos dan colonias de 2 a 4 mm de formas lisas y convexas que al envejecer los cultivos pueden ser rugosas (R). (Beauclair, 1975.)

Bioquímicamente no fermentan lactosa, sacarosa y salicín; no producen indol, no hidrolizan la urea y no producen acetilmetilcarbinol, producen H₂S, aunque algunos autores plantean que la *Salmonella pullorum* puede producirlo o no. (Hofstad *et al*, 1972.)

Diagnóstico de la Pullorosis

Reacciones serológicas

A) Prueba serológica de aglutinación rápida

Obtención de la muestra de sangre

La muestra se obtiene con jeringuilla de 5 ml y se deposita en un tubo de aglutinación durante 3 horas a temperatura ambiente, con una inclinación de la gradilla de 45°. Los sueros deben ser utilizados en breve plazo.

Gráfico 1. Incidencia en Francia de la Pullorosis — Tiphosis durante 1961-1971 (Renault y cols. 1972). Tomado de Tiphosis pour le diagnostic vétérinaire, Pierre Beauclair, 1975. *Salmonella pullorum* y *Salmonella typhimurium* en aves adultas (Renault y cols. 1972). Tomado de Tiphosis pour le diagnostic vétérinaire, Pierre Beauclair, 1975.

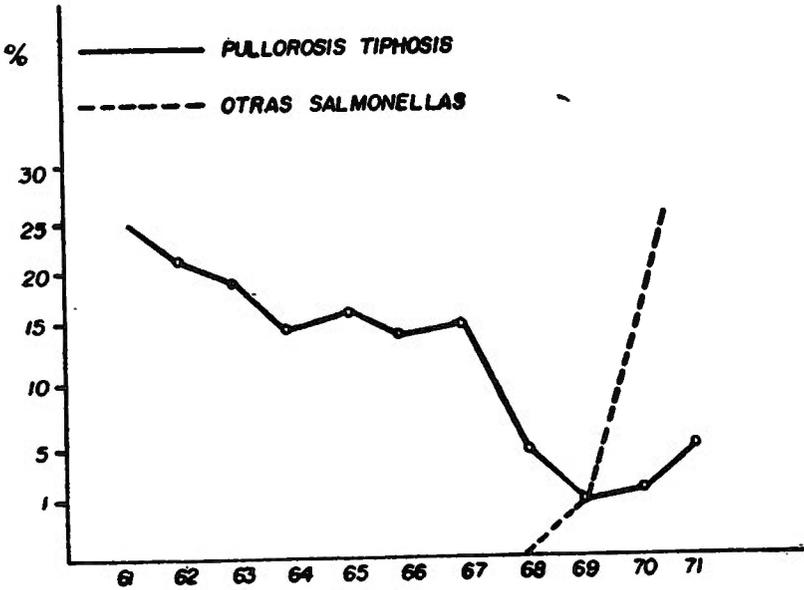


Gráfico 2a. Incidencia en Francia de la Pullorosis-Tipnosis durante 1961-1971, en pollitos de 0-3 semanas de edad y en aves adultas (Renault y col. 1972). Tomado de These pour le doctorat veterinaire, Pierre Beauclair, 1975.

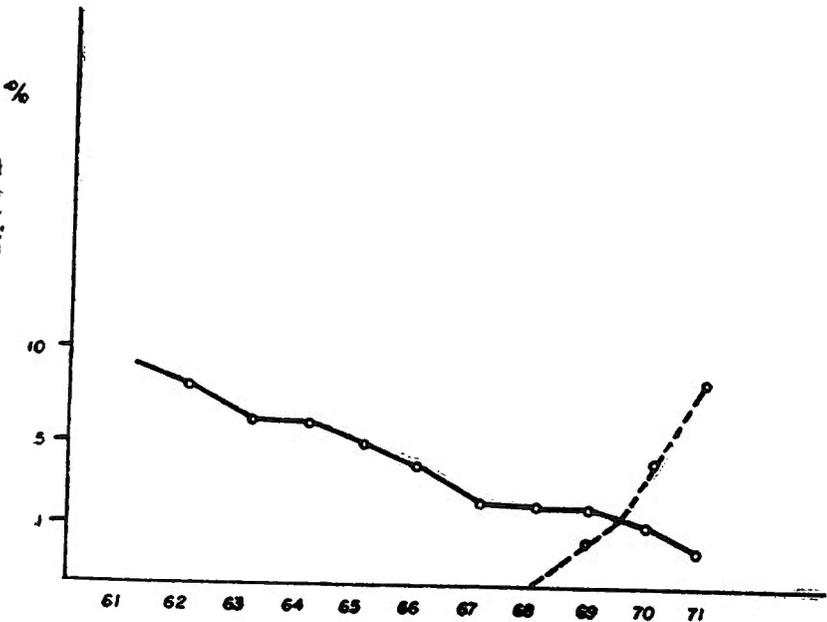


Gráfico 2b Incidencia en Francia de la Pullorosis — Tipnosis durante 1961-1971, en pollitos de 0-3 semanas de edad y en aves adultas, (Renault y col. 1972). Tomado de These pour le doctorat veterinaire, Pierre Beauclair, 1975.

Realización de la prueba

Con el antígeno y los sueros a temperatura ambiente (20°-30°C) se procede a mezclar una gota de aproximadamente 0,03 ml del antígeno y otra gota de 0,03 ml de suero sobre una placa de cristal en condiciones de óptima iluminación.

Lectura e interpretación

Se consideran como positivas las reacciones de franca aglutinación con formaciones de grumos bien definidos, en los 30 primeros segundos.

Se consideran como sospechosas aquellas reacciones débiles o poco definidas que ocurran durante el primer minuto.

Se considera como negativa aquella reacción en que la mezcla de ambas gotas permanece homogénea durante un minuto.

Control de positividad y negatividad

En cada placa de aglutinación se efectúa sistemáticamente una prueba de control de positividad basada en la utilización de un suero positivo, del mismo modo se realizará un control con un suero negativo o con solución salina al 0,85%.

B) Prueba serológica de aglutinación lenta (según Wright et al, 1948)

Preparación del antígeno lento

Se realiza una dilución 1:10 con el antígeno en solución de NaCl al 0,85% ph ajustado a 7.

Diluciones del suero

Con cada suero se prepara originalmente una serie de 6 diluciones de: 1:5, 1:10, 1:20, 1:40, 1:80 y 1:160.

En el primer tubo de aglutinación se sitúa 8,0 ml de solución salina al 0,85% ph = 7, en los restantes tubos se sitúa 0,5 ml de solución salina. Posteriormente se añade 0,2 ml del suero al primer tubo y de esa mezcla se pasa 0,5 ml al segundo tubo y así sucesivamente hasta el 6to. tubo del que finalmente se eliminan 0,5 ml (Fig. 1).

Cada tubo finalmente queda con 5,0 ml.

Mezcla del antígeno lento con las seis diluciones de suero

En cada tubo se sitúa 0,5 ml del antígeno lento; de esta forma se amplía la dilución original del suero doblemente, es decir ahora tenemos diluciones finales de 1:10, 1:20, 1:40, 1:80, 1:160 y 1:320.

Lectura

Al cabo de 20 horas a 37°C se procederá a leer los resultados:

Reacción positiva. Está dada por una columna transparente de la mezcla y un sedimento amplio de bacterias fuertemente aglutinadas.

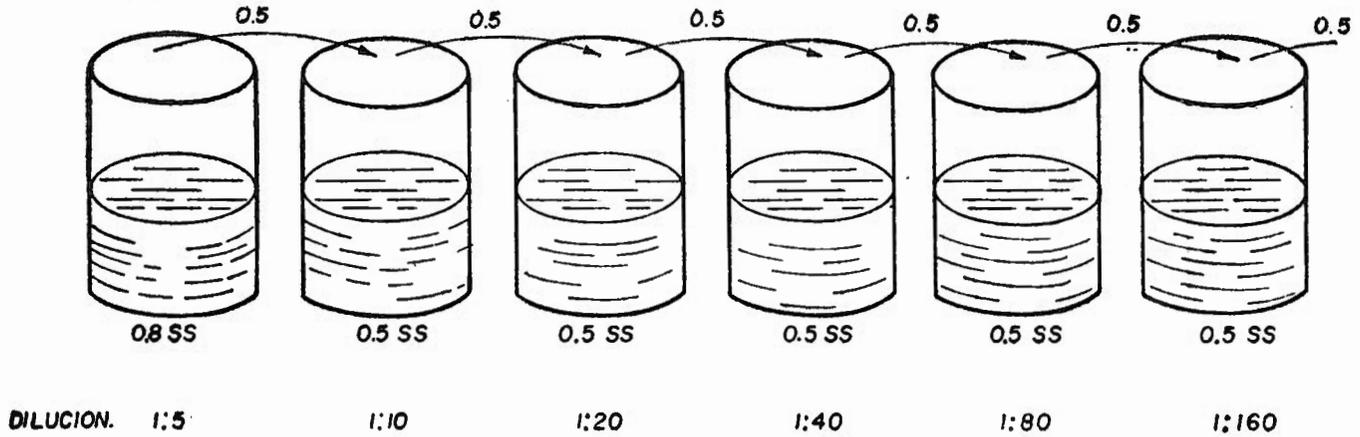


Fig. 1 Metodología a seguir para realizar las diluciones del suero (Tomado de Metodología para las pruebas serológicas rápidas y lentas, 1973).

Reacción negativa. Se mantiene la turbidez original y un pequeño sedimento de bacterias no aglutinadas en el fondo. Se evalúan como sospechosas las reacciones positivas débiles e incompletas.

Interpretación

Se consideran como positivas aquellos sueros que muestran reacción por lo menos sospechosa en el tercer tubo (1:40) y reacción positiva en los dos primeros tubos (1:10 y 1:20).

Se consideran sospechosos aquellos sueros que muestran reacción positiva o sospechosa solamente hasta el segundo tubo, pero permanecen negativas las reacciones a partir del tercer tubo.

El título del suero corresponde con la última dilución en que se presentó una reacción positiva.

Se debe realizar un control de positividad y negatividad, con un suero hiperinmune específico en el primer caso y con suero negativo o solución salina en el segundo.

Prueba serológica de aglutinación lenta, método Americano. (Williams y MacDonald, 1955)

Dilución del antígeno

El antígeno lento se prepara mediante una dilución del antígeno rápido 1:20 en solución de CINA al 0,85% - ph = 7.

Dilución del suero

El antígeno lento se distribuye a razón de 2 tubos con 2 ml en cada uno por cada suero. En el primer tubo se sitúa 0,1 del suero (1:20) y en el segundo tubo 0,05 del suero (1:40).

Se colocan los tubos en gradillas durante 20 horas a 37°C.

Lectura e interpretación

La lectura es idéntica al método europeo de las 6 diluciones.

Se considera positivo un suero que muestra reacción positiva o dudosa en el segundo tubo (1:40) y positiva en el primero (1:20).

Se considera sospechoso un suero que muestra reacción positiva o dudosa sólo en el primer tubo (1:20) y reacción negativa en el segundo tubo (1:40).

D) Prueba serológica rápida con sangre total

Es el método más usado para detectar las infecciones por *Salmonella pullorum* y *Salmonella gallinarum* en pollos porque puede ser usado dentro de las condiciones de campo. (Anonymous, 1975.)

El test rápido con sangre total, se realiza utilizando también un antígeno coloreado con crystal - violeta (antígeno (K) pullorum polivalente) el cual se lleva a una placa de cristal con una gota de sangre total de aproximadamente 0,02 ml que se toma de la vena del ala con un asa.

El antígeno se mide con un cuentagotas medicinal, cuya punta está adaptada para entregar 0,05 ml cuando se usa en posición vertical. Las diluciones del antígeno en la sangre en diluciones 2:1 ó 3:1 son las que dan mejores resultados. La sangre contenida en el asa se mezcla con el antígeno y se extiende; la lámina de vidrio se rota para favorecer la mezcla de la sangre con el antígeno, la reacción se produce en un lapso entre unos segundos y dos minutos.

Reacción positiva

Consiste en la formación de grumos de violeta, constituidos por bacterias teñidas que flotan en un líquido transparente. La rapidez de la reacción y el tamaño de los grumos dependen de la potencia aglutinadora de la sangre. Reacción negativa. La mezcla permanece homogénea por lo menos 2 minutos.

E) Pruebas diversas

El test de microaglutinación planteado por J. Williams *et al.* (1971, 1973), usa muy pequeñas cantidades de suero y antígeno dispuesto en placas de microtest. Los antígenos de microtest son ventajosos para infecciones de Salmonella de los grupos serológicos B (*S. typhimurium* y otras) C y D (*S. pullorum* y otras).

Estos tests son considerablemente facilitados por la colección de muestras de sangre total de aves en placas de microtest (Williams, 1973) en transferencias de muestras de suero a tales placas antes que los tests sean determinados.

Por otra parte, Ellis *et al.* (1969) plantean la técnica de anticuerpos fluorescentes (F A) para detectar Salmonella y Arizonas en tejidos aviares y material fecal. Esta técnica es rápida, exacta y tal vez sea de gran utilidad en el futuro, ya que todavía algunos laboratorios no poseen equipos de FA.

Aislamiento e identificación del agente etiológico

Medios de cultivos y sustratos preferidos (Williams et al, 1975)

Caldo Tetratiemato Verde Brillante (T.B.G.) Se adicionan 10 ml de una solución de 1:1 000 de verde brillante a cada 1 000 ml de medio básico después de disuelto por calentamiento. También se le adicionan 20 ml de solución de iodo por cada 1 000 ml de medio preparado para suprimir el *Proteus spp* efectivamente. Se adiciona 1 ml de solución de Sulfathiazol Sódico (125 mg por 180 ml de agua destilada) en cada 1 000 ml de Caldo T.B.G. en el tiempo de adicionar el iodo, esto es importante para evaluar la eficiencia de diferentes lotes de verde brillante adicionado al caldo T.B.G.

Bismuto Sulfito Agar (B.S.)

Es un medio que se debe usar rápidamente. No se esteriliza por autoclave, se pueden guardar las placas no más de 3 días en frío.

Las lecturas se deben hacer de 24 a 48 horas de incubación a 37°C.

Caldo y Agar Infusión de Ternera (VI)

Esto es un excelente caldo y agar nutriente para los organismos *Salmonella* y *Arizona*. En cultivo de albúmina de huevo se adiciona 35 mg de sulfato ferroso por cada 1 000 ml de caldo, VI antes de la esterilización.

Agar Triple Azúcar Hierro (TSI)

El medio se distribuye en tubos de ensayos inclinados, este contiene una pequeña cantidad de dextrosa y una mayor cantidad de lactosa y sacrosa y un indicador de H₂S. El indicador de pH es el rojo phenol. El medio es de color amarillo cuando hay acidez y rojo cuando hay alcalinidad tanto en el inclinado como en el fondo del tubo.

Caldos utilizados en las pruebas bioquímicas de fermentación

Es muy utilizado en la fermentación de los carbohidratos el agua peptonada con reactivo de Andrade, utilizando una concentración de 1% de la sustancia a fermentar. Se utilizan tubos Durham invertidos para la producción de gas.

El caldo malonato es un medio líquido preparado con materiales de composición química conocido con sulfato de amonio y sodio y el malonato como única fuente de nitrógeno y carbón. El indicador de pH es el bromethimol azul. Al preparar como fuente de energía producen una reacción alcalina que cambia el medio de verde - azul.

Caldo Urea

Este medio es recomendado para la identificación del género *Proteus*, el cual da reacción de ureasa positiva (hidrólisis de la urea) indicado por un cambio del medio de color amarillo (pH - 6,8) a rojo o cereza (pH - 8,1 o más).

Las *Salmonellas* son negativas en caldo urea.

El medio es rehidratado, filtrado para su esterilización y distribuido asepticamente en cantidad de 3 ml dentro de tubos de ensayos. Los tubos inoculados se incuban a 37°C y se realizan las lecturas después de 24 y 48 horas.

Agar Semisólido

Este agar es comercialmente útil como medio para el Test de la motilidad.

Se prepara de la siguiente forma: 3 g de extracto de carne, 10 g de peptona, 5 g de cloruro de sodio, 4 g de agar, en 1 000 ml de agua des-

tilada. Ajustar la reacción a $\text{pH} = 7,4$ y poner 8 ml dentro de cada tubo, esterilizar por autoclave por 15 minutos a 121°C . No inclinar. Inocular por punción cerca de 5 mm de profundidad dentro de la columna de medio. Incubación a 37°C por 1 ó 2 días.

En Cuba, Joseph (1974), plantea en sus trabajos el diagnóstico bacteriológico de la Pullorosis en nuestro país utilizando para ello los medios de cultivo siguientes:

Caldo tetratonato (Oxoid), Agar Endo (Oxoid) y Agar Desoxicolato-Citrato (Oxoid) utilizando el primero como caldo de enriquecimiento durante 24-48 horas en incubadora a 37°C y hacer pasaje a los medios sólidos (Agar Endo, Agar Dexoxicolato) para el tratamiento del germen, incubando también a 37°C durante 48 horas hasta la aparición de colonias sospechosas.

Las pruebas bioquímicas para completar la identificación es similar a la de la bibliografía consultada.

Otras investigaciones sugieren la utilización de otros medios como Agar Drigalsky, Agar S.S., Caldo Selenito y Caldo Kauffmann entre otros (Turin, 1978).

Toma de muestras

Se toman con hisopo estéril muestras de órganos afectados tales como: hígado, corazón, bazo, heces fecales y ovarios y se siembran en caldos de enriquecimiento como T.B.G. y VI durante 48 horas y después en los medios sólidos durante el mismo tiempo a 37°C . Los análisis se deben complementar con exudados cloacales, análisis de los huevos en incubación tanto de su contenido como del embrión cuando esto está presente, siempre en todos estos casos se debe utilizar el caldo de enriquecimiento primeramente y después los medios sólidos. (Ellis *et al*, 1972.)

Identificación del agente

Las colonias de *Salmonella pullorum* y *Salmonella gallinarum* son pequeñas, rosadas en medios de cultivo como Agar Endo (dentro se han aislado cepas fermentadoras de maltosas), en otros medios como el Agar desoxicolato citrato las colonias son incoloras, pequeñas, convexas, lisas (Edwards y Ewing, 1972).

Del cultivo típico de *Salmonella pullorum* y *Salmonella gallinarum* se toma lo más estérilmente posible de centro de una coonia para transferir a medios selectivos como los ya expuestos para su limpieza y de esta forma obtener un cultivo puro a utilizar en las pruebas bioquímicas para clasificar el microorganismo (Williams *et al*, 1975).

Hofstad *et al* (1972) plantea las siguientes reacciones, las cuales han sido determinadas en 24 horas de incubación y que ayuda a la identificación de la *Salmonella pullorum*.

En agar T.S.I. la *Salmonella pullorum* produce alcalinidad en el inclinado y acidez en el fondo, en casos con un retardado ennegrecimiento del medio por la producción de H_2S .

Comportamiento en la fermentación de carbohidratos.

Dextrosa	—	Fermenta con gas
Lactosa	—	No fermenta
Sacarosa	—	No fermenta
Manitol	—	Fermenta con gas
Maltosa	—	Usualmente no fermenta
Dulcitol	—	No fermenta

No produce indol, no hidroliza la urea, motilidad negativa.

Positiva frente a antisueros del grupo D.

A continuación ofrecemos una tabla resumen de las reacciones bioquímicas de la *Salmonella pullorum* y *Salmonella gallinarum* en relación con otras Salmonelas y Arizona (Williams et al, 1975).

TABLA 1

Reacciones químicas de la *Salmonella pullorum* y *Salmonella gallinarum* en comparación con otras salmonellas y Arizonas (Williams et al, 1975)
Tomado de "Isolation and identification of Avian Pathogens" P = 33

Medio	S. Pullorum	S. Gallinarum	Otras salmonellas (paratyphoides)	A. hinshawii
Dextrosa	A(G)	A	AG	AG
Lactosa	—	—	—	AG o AGL
Sucrosa	—	—	—	—
Manitol	A(G)	A	AG	AG
Maltosa	(—)	A	AG	AG
Dulcitol	—	A	AG	—
Malonato	—	—	—	—
Gelatina	—	—	—	—L
Caldo Urea	—	—	—	—
Motilidad	—	—	—	—

A Produce ácido — Negativo L Tardíamente de 7-10 días
G Produce gas () Variable

Identificación serológica

Existe un gran número de serotipos de *Salmonella* que afectan las aves, la cual requiere una cantidad considerable de antisueros para completar la caracterización de estas cepas, este es a veces imposible de realizar por el personal de laboratorio, por lo cual se usa para estos tests, el antisuero polivalente, antisuero semático de grupo específico (O), y el flagelar (H) que consta de 2 fases (Edwards y Ewing, 1972).

También se plantea por este mismo autor la existencia del antígeno K (capsular o de cubierta).

En la mayor parte de los laboratorios de diagnóstico veterinario las *Salmonellas* aisladas se examinan serológicamente para determinar el grupo a que pertenecen. La identificación del grupo se basa en la posesión de ciertos antígenos somáticos.

El antisuero polivalente de *Salmonella* se halla fácilmente en el comercio cubriendo los grupos de A hasta E. La técnica es una simple prueba de aglutinación en placa, primero con el suero polivalente y luego con los de grupo específico. La identificación posterior hasta la especie se realiza con antígeno flagelar (H) (Hofstad, 1972).

La *Salmonella pullorum* y la *Salmonella gallinarum* no presentan flagelar sólo semático, que corresponde con el grupo serológico (1,9.12) (Edwards y Ewing, 1972).

Resistencia de la Salmonella pullorum y Salmonella gallinarum frente a algunos antibióticos

Karyagin (1964) plantea el incremento de la resistencia de la *Salmonella pullorum* frente a la clorotetraciclina.

Por otra parte, Renault *et al* (1972) pone de manifiesto en un trabajo realizado sobre la incidencia de *Salmonella pullorum* y *Salmonella gallinarum* en comparación con otras salmonellas en Francia durante el período de 1961-1971 la resistencia a diferentes antibióticos presentada por las cepas aisladas, entre los que se encontraban: cloranfenicol, tetraciclina y estreptomycin principalmente.

Actualmente se conocen dos mecanismos genéticos para la resistencia bacteriana a los antibióticos (Duval y Soussy, 1977):

A) Cromosómico por mutación.

B) Extracromosómico por plasmidos.

A) Señalan Guillot y Elizabeth Chaslus (1976) que la resistencia cromosómica es debida generalmente a una mutación sobre el cromosoma de los genes que afectan específicamente el mecanismo de acción de un antibiótico o de una familia de antibióticos.

B) Este tipo de resistencia es la que se conoce como transferible, trasmisible e infectivo (Watanabe, 1963).

Son numerosos los estudios realizados sobre este tipo de resistencia Chabbert (1973) y Guillet; Elizabeth Chaslus (1976) coinciden en señalar que las plasmidas o factor R están constituidas de ADN bicatenario extracromosómico de estructura parecida al cromosoma bacteriano pero con algunas características propias y que el mecanismo de transferencia puede ser a través de procesos genéticos tales como: transformación, transducción y conjugación.

SUMMARY

The present work deals with a review of the literature on the diagnostic methods for the isolation and identification of *Salmonella pullorum* and *Salmonella gallinarum*; the leading culture media used are highlighted.

BIBLIOGRAFÍA

- Anónimo.* (1975). National poultry improvement plan and auxiliary provision. Publication ARS - NS - 32 - 1, Agricultural Res. Serv. U.S. Dep. of Agr. Baltsville, Maryland.
- Aserkoff, B., J. W. Walker; P. S. Bracman.* (1970). Salmonellosis in the USA. A five year review. *Am. J. Epim.* 92: 13-24.
- Beauclair, P.* (1975). Les infections Aviaires por Salmonelles entres que *Salmonelle pullorum* y *Salmonelle gallinarum*. These pour le Doctorat Vétérinaire E. cole National Vétérinaire D'Alfort p. 3-14.
- Biester, H. E. y L. H. Schawarte.* (1968). Enfermedades de las aves. 1ra. edición del español. Edición Revolucionaria. Instituto del Libro p. 166-199.
- Carter, G. R.* (1969). Procedimientos de Diagnóstico en Bacteriología y Micología Veterinaria. Editorial Acribia, Zaragoza, p. 93-95.
- Chabbert, Y. A.* (1973). Données actuelles sur la resistance des bactéries aux antibiotiques. *Actualites pharmacologiques.* Mason Edit. Paris. 26. 27-60.
- Duval, J., C. J. Saussy.* (1977). Abrége d'antibiotherapie. La resistance des bacteries aux antibiotiques. Ed. Mason. Paris. New York. Barcelona, p. 9-31.
- Edwards, P. R. and W. H. Ewing.* (1972). Identification of enterobacteriaceae. Burgess Publ. Co.; Minneapolis Minnesota p. 180.
- Ellis, E. M. and B. Harrington.* (1969). A direct fluorescent antibody test for Salmonella. Applications in examining Animal feeds and by products. *Arch. En Hlth.* 19: 876-881.
- Ellis, E. M., J. G. Williams; E. T. Mallerson; G. E. Snoeyenbos and W. J. Martin.* (1972). Cultural methods for detection of animal salmonellosis and arizonosis. Iowa State University Press Ames Iowa.
- Fritzsche, K., E. Gerriets.* (1969). "Enfermedades de las Aves." 2da. Edic. Ciencia y Técnica, Instituto Cubano del Libro. P. 259-279.
- Guillot, J. F., Elizabeth Chaslus.* (1969). Resistances de bacteries aux Agentes Antimicrobiens. *Le Point Veterinaire.* 3(15) p. 21-29.
- Hofstad, M. S., B. W. Calnek; C. F. Reimboldt; W. M. Reid and H. A. Yoder Jr.* (1972). Diseases of Poultry 6th ed. Iowa State, University, Press, Ames, Iowa. P. 218.
- Jones, P. W.* (1975). The effects of alotage in surry of the virulence of Salmonella dublin. *Journal of Hygiene* 43: 3-4.
- Joseph, Nuria, I.* (1974). Papel patógeno de los gérmenes Salmonella y Escherichia. *Rev. Avicultura* 18(2). 159-164.
- Karyagin, V. I.* (1964). Development of resistance of *Salmonella pullorum*. *Vet. Inst.* p. 31-49.
- Grupo Técnico. Nacional CAN.* (1973). Metodologías para las pruebas serológicas lentas. Programa de lucha contra la pullorosis.
- Ojalvo, Susana.* (1976). "Microbiología de los piensos y materias primas." *Rev. Avicultura* 20(2): 97-114.
- Renault, L., C. L. Marie; S. Voissars; M. Paliske, et th Linder* (1972). Reerudissenes des Salmonellosis animales in France. Bilan des annees 1961-1971. *Bull Acad. Vit.* 1972: 413-425.

- Turín, Isabel.* (1878). Centro de Investigaciones Avícolas "Jesús Menéndez". Comunicación personal.
- Watanabe, T.* (1963). Infections Drug Resistance.
- Williams, J. E.* (1973). Collection of avian blood samples in microtest plates. *Avian Dis.* 17: 445-449.
- Williams, J. E., A. D. Mac Donald.* (1955). The past, present, and future of *Salmonella* antigens for poultry. *Prac. Am. Vet. Med. Assac.* 92 md. Meeting p. 333-339.
- Williams, J. E., E. T. Mallanson; G. H. Snoeyenbos.* (1975). Isolation of avian Pathogens. (Edited by Hetchner, S. B. C. H. Domermuth; N. Graham; J. E. Williams.) Editorial Commeted for the American Ass. of Avian Path. Dep. of Veterinary. Micro., Texas, University. P. 15-33.
- Williams, J. E., A. D. Wittemore.* (1971). Serological diagnosis of pullorum disease with the microagglutination system. *Appe. Microbial.* 21. 394-399.
- Williams, J. E.; A. D. Whitmore.* (1973). Microtesting for avian Salmonellosis. *Prac. 77th Avian Meet. U.S. An Heth. Assac.* P 6070-613.
- Wright, M. L., P. R. Edward.* (1948). The serologie differentiction of *Salmonella* pullorum forms. *Am. Jour. Vet. Res.* 9: 386.