

CAPÍTULO 3.3.9.

CÓLERA AVIAR

RESUMEN

El cólera aviar (pasteurellosis aviar) es una enfermedad común de las aves que puede afectar a todo tipo de aves y que tiene una distribución mundial. Los brotes de cólera aviar se manifiestan con frecuencia como septicemias agudas mortales, principalmente en aves adultas, aunque también pueden tener lugar en forma de infecciones crónicas y subclínicas. El diagnóstico depende del aislamiento y la identificación de la bacteria causante, *Pasteurella multocida*. El diagnóstico preliminar puede establecerse por la aparición de signos y lesiones característicos y/o la observación microscópica de muchas bacterias en muestras de sangre, o en frotis de tejidos como el hígado o el bazo. También se presentan formas leves o crónicas de la enfermedad donde esta es endémica, con infección localizada fundamentalmente en los aparatos respiratorio y locomotor.

Identificación del agente: *Pasteurella multocida* es fácil de aislar, con frecuencia en cultivo puro, a partir de vísceras y órganos como el pulmón, el hígado y el bazo, la médula ósea, las gónadas o la sangre del corazón de aves que mueren por septicemia aguda de la enfermedad, o de los exudados caseosos característicos de las lesiones del cólera aviar crónico. Es una bacteria anaerobia facultativa que crece mejor a 37°C. Normalmente, el aislamiento inicial se logra con medios sólidos de dextrosa-almidón, agar sangre y agar de tripticasa-soja. El aislamiento mejora añadiendo un 5% de suero inactivado por calor. Las colonias tienen un diámetro de entre 1 y 3 mm después de 18–24 horas de incubación y son aisladas, circulares, convexas, traslúcidas y oleosas. Las células son cocobacilos o bacilos cortos de un tamaño de 0,2–0,4 × 0,6–2,5 µm, gramnegativas y, por lo general, se presentan aisladas o en parejas. Con tinción de Wright o de Giemsa se pone de manifiesto una tinción bipolar.

La identificación de *Pasteurella multocida* clásicamente se ha basado en los resultados de las pruebas bioquímicas, que incluyen la fermentación de carbohidratos, la producción de enzimas y la producción de determinados metabolitos. En los últimos tiempos, se han adoptado muchos ensayos basados en la reacción en cadena de la polimerasa (PCR).

La caracterización serológica de las cepas de *P. multocida* incluye la determinación de los serogrupos capsulares (Carter) y la serotipificación somática (Heddleston). Un método basado en la PCR es ahora el método aceptado para la tipificación capsular de Carter. Un método de PCR que reconoce ocho genotipos (L1-L8) basados en el locus de biosíntesis del núcleo externo del lipopolisacárido (LPS) se prefiere ahora al serotipado convencional de Heddleston. La huella de ADN y, más recientemente, la secuenciación del genoma completo, pueden diferenciar entre *P. multocida* que tienen el mismo serogrupo capsular y serovar somático. Estas caracterizaciones requieren un laboratorio especializado con reactivos de diagnóstico adecuados.

Pruebas serológicas: Para el diagnóstico del cólera aviar apenas se utilizan pruebas serológicas. Por lo general, la facilidad con que se obtiene un diagnóstico confirmativo mediante el aislamiento e identificación del organismo causal hace innecesaria la utilización del serodiagnóstico.

Requisitos para las vacunas: En general, las vacunas en uso contra *P. multocida* son bacterinas que contienen como adyuvante hidróxido de aluminio o aceite, que se preparan a partir de múltiples serovares. Lo habitual es que se requieran dos dosis de vacuna muerta. Ahora se sabe que una vacuna muerta sólo proporciona protección contra las cepas aisladas con una estructura de LPS idéntica o casi idéntica, pudiendo existir múltiples estructuras dentro de un serovar de Heddleston. Las vacunas de cultivo vivo tienden a impartir una mayor inmunidad protectora y no tienen el mismo requisito de una estructura exacta de LPS para proporcionar protección, e incluso pueden proporcionar una protección cruzada entre serovares. Algunas vacunas vivas se han asociado a posibles secuelas post-vacunales como la neumonitis y la artritis. Las vacunas multivalentes suelen

incorporar los serovares somáticos 1, 3 y 4, ya que se encuentran entre los serovares aviares más comúnmente aislados. En las pruebas de seguridad y potencia de las bacterinas se suele utilizar el animal huésped. La potencia de los contenedores finales de cultivos vivos se comprueba mediante recuentos bacterianos.

A. INTRODUCCIÓN

El cólera aviar (también denominado cólera de las aves de corral, pasteurelisis aviar o septicemia hemorrágica aviar) es una enfermedad contagiosa bacteriana de especies aviares domésticas y salvajes. Esta enfermedad suele presentarse como una enfermedad fulminante con bacteriemia masiva y alta morbilidad y mortalidad en aves de edad avanzada. También tienen lugar infecciones crónicas con signos clínicos y lesiones relacionados con las infecciones localizadas. El aparato respiratorio y los tejidos asociados con el aparato locomotor son con frecuencia los receptores de la infección crónica. El agente causal es *Pasteurella multocida*, miembro de la familia *Pasteurellaceae*. Aunque *P. multocida* es un agente patógeno del ser humano, esta asociación suele vincularse a mordeduras de animales. No se considera que las cepas aisladas de cólera aviar de *P. multocida* tengan potencial zoonótico, ya que las aviares no suelen ser patógenas para los mamíferos expuestos por vía oral o subcutánea. Sin embargo, las manipulaciones en el laboratorio deben realizarse con los procedimientos de bioseguridad y contención apropiados, tal y como se determine en el análisis de riesgo biológico (véase el Capítulo 1.1.4 *Bioseguridad y bioprotección: Normas para la gestión del riesgo biológico en el laboratorio veterinario y en las instalaciones para animales*). Otras enfermedades bacterianas, como la salmonelosis, la colibacilosis y la listeriosis en los pollos, y la pseudotuberculosis, la erisipela y la clamidiasis en los pavos, pueden presentarse con signos clínicos y lesiones similares al cólera aviar. La diferenciación se basa tradicionalmente en el aislamiento y la identificación, ya que *P. multocida* se cultiva fácilmente a partir de casos de cólera aviar. También se ha validado el análisis directo del material clínico con herramientas moleculares.

B. TÉCNICAS DE DIAGNÓSTICO

El cólera aviar (pasteurelisis aviar) es una enfermedad aviar común que afecta a todos los tipos de aves y con frecuencia es mortal (Blackall y Hofacre, 2020). En la forma hiperaguda, el cólera aviar es una de las enfermedades más virulentas e infecciosas de las aves corral. El diagnóstico se basa en la identificación de la bacteria causante, *P. multocida*, después de su aislamiento en aves con los signos y las lesiones característicos de esta enfermedad o detección directa del microorganismo con ensayos moleculares específicos. El diagnóstico preliminar puede basarse en la observación de signos típicos y de lesiones y/o en la observación microscópica de las bacterias con tinción bipolar en frotis de tejidos, como sangre, hígado o bazo. Pueden tener lugar formas leves de la enfermedad.

Todas las especies de aves son susceptibles a *P. multocida*, aunque los pavos pueden ser los más gravemente afectados. Las aves de más de 16 semanas de edad son las más afectadas. Con frecuencia, el primer signo de la enfermedad es la muerte de las aves. Otros signos son fiebre, anorexia, depresión, mucosidad en el pico, diarrea, erizamiento de las plumas, descenso en la producción de huevos acompañado de la disminución de su tamaño, aumento de la frecuencia respiratoria, y muerte con cianosis. Las lesiones que se observan más a menudo son órganos congestionados con hemorragias, hepatomegalia y esplenomegalia, zonas necróticas múltiples en el hígado y/o el bazo, neumonía, ascitis leve y edema pericárdico. Las aves que superan el estado septicémico agudo o las infectadas por microorganismos de baja virulencia, pueden desarrollar un cólera aviar crónico, caracterizado por infecciones localizadas. Estas infecciones afectan con frecuencia a las articulaciones, plantas de las patas, vainas tendinosas, bursa del esternón, conjuntivas, barbas, faringe, pulmones, sacos aéreos, oído medio, médula ósea y meninges. Las lesiones de estas infecciones son normalmente resultado de una colonización bacteriana con necrosis, exudados fibrinosupurativos y grados de fibroplasia.

Clásicamente, el diagnóstico se ha basado en el aislamiento e identificación del microorganismo causante.

Tabla 1. Métodos analíticos disponibles para el diagnóstico del cólera aviar y su propósito

Método	Propósito					
	Demostrar ausencia de circulación del virus en la población	Demostrar ausencia de infección en animales individuales antes de los desplazamientos	Contribuir a las políticas de erradicación	Confirmar casos clínicos	Determinar la prevalencia de la infección – vigilancia	Determinar el estado inmunitario en animales o poblaciones tras la vacunación
Identificación del agente ^(a)						
Cultivo	–	–	–	+++	–	–
Métodos de PCR	–	–	–	+++	–	–
Detección de respuesta inmunitaria						
ELISA	–	–	–	–	–	++

Clave: +++ = método recomendado para este propósito; ++ = método recomendado pero tiene limitaciones;

+ = método adecuado en muy pocas situaciones; – = no adecuado para este propósito.

Aunque no todas las pruebas clasificadas como +++ o ++ han sido validadas formalmente, su uso sistemático y el hecho de que se hayan utilizado ampliamente sin resultados dudosos las hace aceptables.

PCR = reacción en cadena de la polimerasa; ELISA = enzimoimmunoanálisis-

^(a)Se recomienda aplicar varios métodos de identificación del agente en una misma muestra clínica.

1. Identificación del agente

1.1. Cultivo *in-vitro*

Pasteurella multocida es una bacteria anaerobia facultativa que crece mejor a 35–37°C. El aislamiento primario se realiza generalmente utilizando medios como agar sangre, agar tripticasa-soja o agar dextrosa-almidón, y el aislamiento se mejora suplementando estos medios con un 5% de suero inactivado por calor. Los medios de mantenimiento no suelen requerir suero suplementario. Las colonias varían de 1 a 3 mm de diámetro después de 18–24 horas de incubación. Normalmente son aisladas, circulares, convexas, traslúcidas y oleosas. Las colonias mucoides acuosas, que se observan frecuentemente en el tracto respiratorio de los mamíferos, son muy raras en el caso de las cepas aviarias. Las células son cocobacilos o bacilos cortos de un tamaño de 0,2–0,4 × 0,6–2,5 µm, gramnegativas y, por lo general, se presentan aisladas o en parejas. Los microorganismos recién aislados o los que se encuentran en los frotis de tejidos muestran tinción bipolar con las tinciones de Wright o de Giemsa, o con la de azul de metileno, y normalmente son capsulados.

El aislamiento del microorganismo es, por lo general, fácil de realizar a partir de órganos y vísceras como el hígado, la médula ósea, el bazo o la sangre del corazón de aves que mueren padeciendo la forma aguda de la enfermedad, o de lesiones exudativas en las aves que sufren la forma crónica. El aislamiento es con frecuencia difícil en aves con la infección crónica y sin más signos de la enfermedad que la extenuación y la letargia. En esta circunstancia, o cuando ha tenido lugar la descomposición del animal, el tejido de elección para el aislamiento es la médula ósea. La superficie del tejido a cultivar se cauteriza con una espátula al rojo y la muestra se obtiene insertando una torunda de algodón estéril en un asa de siembra de metal o de plástico, a través de la superficie esterilizada por calor. Como alternativa, la superficie esterilizada puede cortarse con unas tijeras o bisturí estériles, con el fin de insertar el hisopo o el asa en el corte sin tocar la superficie externa. La muestra se siembra directamente en el medio sólido o bien en triptosa u otro medio líquido, se incuba durante 2–3 horas, se transfiere a un medio sólido y se incuba de nuevo.

La identificación clásicamente se ha basado en los resultados de las pruebas bioquímicas. Las reacciones de fermentación de los carbohidratos son esenciales. Los carbohidratos positivos a la fermentación son: glucosa, manosa, galactosa, fructosa y sacarosa. Los negativos son: ramnosa,

celobiosa, rafinosa, inulina, eritritol, adonitol, m-inositol, y salicina. Generalmente el manitol es fermentado. Normalmente, la arabinosa, la maltosa, la lactosa y la dextrina no fermentan. Debe utilizarse maltosa de calidad con muy poca contaminación por glucosa para evitar falsos positivos de la contaminación por glucosa presente en preparaciones de maltosa de menor calidad. La xilosa, la trehalosa, el glicerol y el sorbitol dan reacciones variables. Las cepas aviares de *Pasteurella multocida* no causan hemólisis en agar sangre de oveja, no son móviles y crecen muy raramente en agar MacConkey. El microorganismo es catalasa, oxidasa y ornitina decarboxilasa positivas y ureasa, lisina decarboxilasa, beta-galactosidasa o arginina dihidrolasa negativas. La reacción de la fosfatasa es variable. Reducen nitratos a nitritos y son indol y sulfídrico positivos, y las pruebas de rojo de metilo y de Voges-Proskauer son negativas. H₂S. Se proporcionan todos los datos en Glisson et al. (2008; 2013).

La diferenciación fenotípica de *P. multocida* de otros microorganismos aviares similares puede lograrse normalmente utilizando las pruebas y los resultados indicados en la Tabla 2. La experiencia en el laboratorio ha demostrado que *P. multocida* se identifica más fácilmente por la morfología de sus colonias y su aspecto en las tinciones de Gram. Las reacciones positivas a la oxidasa, el indol y la ornitina decarboxilasa son las indicaciones bioquímicas más útiles.

Existen kits comerciales de pruebas bioquímicas, pero no se recomiendan (Blackall y Norkov-Lauritsen, 2008). El uso de la espectrometría de masas por adsorción asistida por matriz y tiempo de vuelo (MALDI-TOF) se ha evaluado en solo dos estudios hasta la fecha, y ambos indican que la tecnología identificó correctamente todas las cepas aisladas de *P. multocida* analizadas (Kuhnert et al., 2012; Zangenah et al., 2013).

Tabla 2. Pruebas utilizadas para diferenciar *Pasteurella multocida* de otros microorganismos hallados en hospedadores aviares*

Prueba*	<i>Pasteurella multocida</i>	<i>Avibacterium gallinarum</i>	<i>Gallibacterium anatis</i> biovar haemolytica	<i>Riemerella anatipestifer</i>
Hemólisis en agar sangre de oveja	–	–	+	V
Crecimiento en agar MacConkey	–	–	v	–
Producción de indol	+	–	–	–
Licuefacción de gelatina	–	–	–	+u
Producción de catalasa	+	+	+	+
Producción de ureasa	–	–	–	v
Fermentación de glucosa	+	+	+	–
Fermentación de lactosa	–u	–	V	–
Fermentación de sacarosa	+	+	+	–
Fermentación de maltosa	–u	+	V	–
Ornitina decarboxilasa	+	–	–	–

**Avibacterium gallinarum* se denominaba anteriormente [*Pasteurella*] *gallinarum*, *Gallibacterium anatis* biovar haemolytica se denominaba anteriormente [*Pasteurella*] *haemolytica* y *Riemerella anatipestifer* se denominaba anteriormente [*Pasteurella*] *anatipestifer*. Resultados de la reacción de la prueba: – = sin reacción; + = con reacción; v = reacciones variables; –u = normalmente sin reacción; +u = normalmente con reacción.

1.2. Inoculación de animales

La inoculación en ratones ha sido un método tradicional para aislar *P. multocida*, especialmente en lugares no estériles, y Muhairwa et al. (2001) ofrecen una descripción completa de la metodología. Este sistema aísla selectivamente los clones que son patógenos para los ratones. Y lo que es más importante, la técnica ya no se considera una alternativa adecuada dados los problemas de bienestar animal y la necesidad de sustituir el uso de animales en las técnicas de diagnóstico.

1.3. Caracterización antigénica

La caracterización antigénica de *P. multocida* se realizó clásicamente mediante la determinación de los serogrupos capsulares y los serovares somáticos. Los serogrupos capsulares se establecen con una prueba de hemaglutinación pasiva (Carter, 1955; 1972). Los serogrupos capsulares son A, B, D, E y F. Todos los serogrupos se han aislado de aves, excepto el E. Se ha desarrollado una prueba no serológica de difusión en disco que utiliza mucopolisacaridasas específicas para diferenciar los serogrupos A, D y F (Rimler, 1994). Se ha desarrollado una reacción en cadena de la polimerasa (PCR) múltiple que permite una tipificación rápida y específica de la cápsula (Townsend *et al.*, 2001) y, así, se ha sustituido en gran medida la clásica tipificación de la cápsula por métodos serológicos.

Los serovares somáticos se han determinado tradicionalmente mediante una prueba de inmunodifusión en gel de agar (AGID) y se centran en los antígenos del lipopolisacárido (LPS) (Heddleston, 1962; Heddleston *et al.*, 1972). Se han notificado los serovares 1 a 16; los 16 serovares se han aislado de hospedadores aviares (Blackall & Hofacre, 2020). Sin embargo, una comparación de la tipificación lograda por una caracterización química completa de la estructura del LPS, el serovar somático de Heddleston determinado por AGID y un nuevo ensayo molecular que se centra en los loci biosintéticos del LPS (discutido más adelante) reveló que el serotipado tradicional tiene una alta tasa de error (Harper *et al.*, 2015). Cuando se combina con la dificultad de producir antisueros de título alto, el esquema tradicional de serotipado somático de Heddleston ya no puede recomendarse como metodología de tipificación adecuada.

1.4. Métodos moleculares – detección de ácidos nucleicos

Se han comparado varios ensayos de PCR desarrollados para la identificación confirmatoria de cepas aisladas sospechosas de ser *P. multocida* (Adhikary *et al.*, 2013). La PCR desarrollada por Townsend *et al.* (1998) demostró tener una sensibilidad del 100% y una especificidad del 92% cuando se probó con 85 cepas aisladas de *P. multocida* y 13 cepas de taxones relacionados (Adhikary *et al.*, 2013) y es el ensayo molecular recomendado para la identificación de cepas de *P. multocida*. Este ensayo se dirige a una secuencia clonada conocida como KMT1. La PCR de Townsend *et al.* (1998) utiliza los siguientes cebadores:

5'-GCT-GTA-AAC-GAA-CTC-GCC-AC-3' (KMT1SP6)

5'-ATC-CGC-TAT-TTA-CCC-AGT-GG-3' (KMT1T7)

La mezcla de amplificación de la PCR contiene cada cebador a 1,65 μ M, dNTPs (cada uno a 200 μ M), tampón 1 \times Expand High Fidelity con MgCl₂ 1,5 mM y 1 U de Taq polimerasa. Las condiciones del ciclo son las siguientes: desnaturalización inicial a 95°C durante 4 minutos, seguida de 30 ciclos de desnaturalización a 95°C durante 1 minuto, hibridación a 55°C durante 1 minuto, extensión a 72°C durante 1 minuto y una extensión final a 72°C durante 9 minutos. Las cepas de *P. multocida* producen un producto de 460 pb.

Se han validado pocos ensayos para la detección directa de *P. multocida* en material clínico. La PCR en tiempo real descrita por Corney *et al.* (2007) ha demostrado tener un rendimiento al menos tan bueno como el del cultivo cuando se utiliza directamente en hisopos de aves. El ensayo de Corney *et al.* (2007) se dirige al gen 16S rRNA y utiliza los siguientes cebadores y una sonda de surco menor (MGB):

cebador directo PMA2f, 5'-ATA-ACT-GTG-GGA-AAC-TGC-AGC-TAA-3'

cebador inverso PMA2r, 5'-GGT-CCC-ACC-CTT-T(A/C)-CTC-CTC-3'

sonda MGB PMA2, 5'-6FAM-CCG-CGT-A(A/T)-TCT-CT-MGBNFQ-3'

El ensayo utiliza una concentración de cebadores de 0,2 μ M y una concentración de sonda de 0,3 μ M, y una mastermix comercial en tiempo real. Las condiciones del ciclo son 15 segundos a 95°C y 60 segundos a 60°C durante 50 ciclos.

Se ha desarrollado un ensayo específico de PCR capsular multiplex que permite una tipificación capsular rápida y específica (Townsend *et al.*, 2001). Actualmente, este ensayo se mucho en lugar del ensayo tradicional de serotipado capsular o de los métodos no serológicos. Los detalles de los cebadores se proporcionan en la Tabla 3.

Tabla 3. Detalles genéticos de los cebadores y la diana del ensayo de tipificación capsular por PCR multiplex para *Pasteurella multocida* de Townsend et al. (2001)

Serogrupo	Gen	Cebador	Secuencia (5'-3')	Tamaño del amplicón (pb)
Todos	KMT1	KMT1T7	ATC-CGC-TAT-TTA-CCC-AGT-GG	460
		KMT1SP6	GCT-GTA-AAC-GAA-CTC-GCC-AC	
A	<i>hyaD-hyaC</i>	CAPA-FWD	TGC-CAA-AAT-CGC-AGT-CAG	1044
		CAPA-REV	TTG-CCA-TCA-TTG-TCA-GTG	
B	<i>bcbD</i>	CAPB-FWD	CAT-TTA-TCC-AAG-CTC-CAC-C	760
		CAPB-REV	GCC-CGA-GAG-TTT-CAA-TCC	
D	<i>dcbF</i>	CAPD-FWD	TTA-CAA-AAG-AAA-GAC-TAG-GAG-CCC	657
		CAPD-REV	CAT-CTA-CCC-ACT-CAA-CCA-TAT-CAG	
E	<i>echJ</i>	CAPE-FWD	TCC-GCA-GAA-AAT-TAT-TGA-CTC	511
		CAPE-REV	GCT-TGC-TGC-TTG-ATT-TTG-TC	
F	<i>fcB</i>	CAPF-FWD	AAT-CGG-AGA-ACG-CAG-AAA-TCA-G	851
		CAPF-REV	TTC-CGC-CGT-CAA-TTA-CTC-TG	

La mezcla de PCR multiplex contenía cada uno (a 3,2 µM) de los seis conjuntos de cebadores, 1 U de Taq ADN polimerasa, MgCl₂ 2 mM y dNTPs (cada uno a una concentración de 200 µM). Las condiciones del ciclo son las siguientes: una desnaturalización inicial a 95°C durante 5 minutos, seguida de 30 ciclos de desnaturalización a 95°C durante 30 segundos, hibridación a 55°C durante 30 segundos, extensión a 72°C durante 30 segundos y una extensión final a 72°C durante 5 minutos (Townsend et al., 2001).

Como se ha señalado en la sección anterior, la caracterización molecular del genotipo del LPS se reconoce ahora como mucho más fiable que el esquema tradicional de tipificación serológica basado en los antígenos del LPS: el esquema de Heddleston (Harper et al., 2015). La PCR multiplex del LPS desarrollada por Harper et al. (2015) se dirige al locus de biosíntesis del núcleo externo del LPS y reconoce ocho genotipos del LPS, denominados L1 a L8. Las 16 cepas originales de referencia de LPS de Heddleston se asignan como sigue a los ocho genotipos de LPS: serovares 1 y 14 - LPS L1; serovares 2 y 5 - LPS L2; serovares 3 y 4 - LPS L3; serovares 6 y 7 - LPS L4; serovares 9 - LPS L5; serovares 10, 11, 12 y 15 - LPS L6; serovares 8 y 13 - LPS L7; serovares 16 - LPS L8. Los detalles de los cebadores utilizados en el ensayo de genotipado del LPS se muestran en la Tabla 4.

Tabla 4. Detalles genéticos del ensayo de genotipificación multiplex del LPS de *Pasteurella multocida* de Harper et al. (2015)

Locus del LPS	Localización del cebador	Cebador*	Secuencia (5'-3')	Tamaño del amplicón (pb)
L1	<i>pcgD</i>	BAP6119 (f)	ACA-TTC-CAG-ATA-ATA-CAC-CCG	1307
		BAP6120 (r)	ATT-GGA-GCA-CCT-AGT-AAC-CC	
L2	<i>nctA</i>	BAP6121 (f)	CTT-AAA-GTA-ACA-CTC-GCT-ATT-GC	810
		BAP6122 (r)	TTT-GAT-TTC-CCT-TGG-GAT-AGC	
L3	<i>gatF</i>	BAP7213 (f)	TGC-AGG-CGA-GAG-TTG-ATA-AAC-CAT-C	474
		BAP7214 (r)	CAA-AGA-TTG-GTT-CCA-AAT-CTG-AAT-GGA	
L4	<i>latB</i>	BAP6125 (r)	TTT-CCA-TAG-ATT-AGC-AAT-GCC-G	550
		BAP6126 (f)	CTT-TAT-TTG-GTC-TTT-ATA-TAT-ACC	
L5	<i>rmlA</i>	BAP6129 (f)	AGA-TTG-CAT-GGC-GAA-ATG-GC	1175
		<i>rmlC</i> BAP6130 (r)	CAA-TCC-TCG-TAA-GAC-CCC-C	
L6	<i>nctB</i>	BAP7292 (f)	TCT-TTA-TAA-TTA-TAC-TCT-CCC-AAG-G	668
		BAP7293 (r)	AAT-GAA-GGT-TTA-AAA-GAG-ATA-GCT-GGA-G	

Locus del LPS	Localización del cebador	Cebador*	Secuencia (5'-3')	Tamaño del amplicón (pb)
L7	ppgB	BAP6127 (f)	CCT-ATA-TTT-ATA-TCT-CCT-CCC-C	931
		BAP6128 (r)	CTA-ATA-TAT-AAA-CCA-TCC-AAC-GC	
L8	natG	BAP6133 (f)	GAG-AGT-TAC-AAA-AAT-GAT-CGG-C	255
		BAP6134 (r)	TCC-TGG-TTC-ATA-TAT-AGG-TAG-G	

* f = cebador directo, r = cebador inverso

La PCR multiplex de LPS se realizó en un volumen de 50 µl e incluyó cada cebador a 0,4 µM, cada dNTP a 0,2 mM y 1,7 U de Taq en un tampón comercial. Las condiciones del ciclo (usando un extracto de ADN) fueron 96°C durante 5 minutos, seguidos de 30 ciclos de 96°C durante 30 segundos, 52°C durante 30 segundos y 72°C durante 2,5 minutos, con una extensión final a 72°C durante 5 minutos. Para la PCR con material de colonias directas, el único cambio en las condiciones de los ciclos fue que el paso de desnaturalización inicial a 96°C se aumentó a 10 minutos.

En los estudios epidemiológicos de los brotes de cólera aviar se han utilizado diversos métodos moleculares, por ejemplo, la huella de ADN de *P. multocida* mediante el análisis de endonucleasas de restricción (REA) (Wilson *et al.*, 1992), la PCR de inserción repetitiva de enterobacterias (ERIC) (Singh *et al.*, 2014) y la tipificación de secuencias multilocus (MLST) (Singh *et al.*, 2013). Sin embargo, estos métodos están siendo sustituidos por la secuenciación del genoma completo y el análisis bioinformático (LeCount *et al.*, 2018; Omaleki *et al.*, 2020). Ahora está claro que el análisis WGS/bioinformático proporciona un seguimiento más profundo y preciso de las cepas, además de proporcionar una tipificación *in silico* de LPS y MLST (LeCount *et al.*, 2018; Omaleki *et al.*, 2020). Los loci LPS también pueden examinarse para identificar variantes dentro del genotipo LPS. A continuación, esta información de la secuencia puede utilizarse para predecir la estructura del LPS producida por estas variantes, por ejemplo, debido a los codones de parada introducidos y a los cambios de marco (Omaleki *et al.*, 2020). Después, esta estructura de LPS predicha puede compararse con la estructura predicha de la vacuna muerta contra el cólera aviar que se utiliza o se planea utilizar. Esta capacidad de predecir la estructura del LPS es fundamental, ya que ahora se sabe que una vacuna muerta contra el cólera aviar solo proporciona protección contra las cepas de campo con una estructura del LPS idéntica o casi idéntica (Harper *et al.*, 2016).

2. Pruebas serológicas

Las pruebas serológicas de anticuerpos específicos no se utilizan para el diagnóstico del cólera aviar. La facilidad con que se obtiene un diagnóstico definitivo mediante el aislamiento y la identificación del microorganismo causal hace innecesario el serodiagnóstico. Se han utilizado experimentalmente pruebas serológicas, como la aglutinación, la IGDA, y la hemaglutinación pasiva, para poner de manifiesto anticuerpos contra *P. multocida* en el suero de aves; ninguna fue muy sensible. Las determinaciones de los títulos de anticuerpos empleando el enzoinmunoanálisis se han usado con éxito variable en los intentos de analizar la seroconversión en aves vacunadas, pero no para el diagnóstico.

C. REQUISITOS PARA LAS VACUNAS

C1. Vacuna inactivada

1. Antecedentes

1.1. Fundamento y uso previsto del producto

El cólera aviar puede estar causado por cualquiera de los 16 serovares de *P. multocida*, aunque algunos de estos parecen asociados con más frecuencia a la enfermedad. Las vacunas de uso general contra *P. multocida* son inactivadas, contienen hidróxido de aluminio o aceite como adyuvante y están preparadas con células inactivadas de determinados serovares en función de la información

epidemiológica. Las vacunas comerciales suelen contener los serovares 1, 3 y 4. La vacunación desempeña un papel importante en el control de esta enfermedad. Las directrices para la producción de vacunas veterinarias se presentan en el capítulo 1.1.8 *Principios de producción de vacunas veterinarias*. Las normas dadas aquí y en el capítulo 1.1.8 son genéricas y pueden suplementarse con requisitos nacionales y regionales.

Heddleston *et al.* (1970) demostraron que una vacuna muerta contra el cólera aviar podía proteger contra la cepa homóloga pero no contra una cepa de un serovar heterólogo. Durante mucho tiempo se ha asumido que este hallazgo significa que las vacunas muertas contra el cólera aviar proporcionan una protección limitada frente a los serovares somáticos de las cepas presentes en la vacuna. Sin embargo, el reciente conocimiento de los genes biosintéticos del LPS ha proporcionado un conocimiento mucho más detallado e informado de la protección proporcionada por las vacunas muertas contra el cólera aviar.

La vacuna inactivada se suele administrar por inoculación intramuscular en los músculos de las extremidades o del tórax, o por vía subcutánea detrás del cuello. Lo habitual es administrar dos dosis a intervalos de 2–4 semanas. Como ocurre con la mayor parte de las vacunas inactivadas, no se puede esperar una inmunidad completa hasta aproximadamente 2 semanas después de la segunda dosis del primer ciclo de vacunación. Debe evitarse la vacunación de aves enfermas o desnutridas, ya que, en tales circunstancias, es posible que no se genere una respuesta inmunitaria satisfactoria.

2. Descripción de la producción y requisitos mínimos para las vacunas

2.1. Características del inóculo

2.1.1. Características biológicas

Todas las cepas de *P. multocida* que vayan a utilizarse en una vacuna deberán estar bien caracterizadas y ser de serovar conocido, puras, inocuas e inmunógenas. Véase el Capítulo 1.1.8 para conocer las directrices sobre los inóculos primarios.

2.1.2. Criterios de calidad (esterilidad, pureza, ausencia de agentes extraños)

Los inóculos de *Pasteurella multocida* deben ser cultivos puros y estar libres de bacterias extrañas u hongos (véase el Capítulo 1.1.9 *Pruebas de esterilidad y ausencia de contaminación en los materiales biológicos de uso veterinario*).

2.1.3. Validación como cepa vacunal

La idoneidad como cepa vacunal se determina mediante pruebas de eficacia y de inocuidad.

2.2. Método de producción

2.2.1. Procedimiento

Se preparan por separado cultivos de producción de cada cepa bacteriana que deba incluirse en el producto final. *Pasteurella multocida* puede cultivarse en medios líquidos adecuados o bien inicialmente en medios sólidos para subcultivarse después en medios líquidos. Los cultivos se someten a subpases hasta que se logra el volumen deseado, y se recogen cuando alcanzan una densidad adecuada, que suele medirse mediante espectrofotometría (densidad óptica).

A continuación, los cultivos se inactivan con formaldehído u otro agente inactivante adecuado. Las células inactivadas pueden concentrarse, normalmente mediante centrifugación o filtración, o bien diluirse hasta alcanzar la concentración deseada para mezclarlo con el producto terminado. Se combinan todos los componentes estandarizados y normalmente se mezclan con un adyuvante antes del vertido en los recipientes finales estériles.

2.2.2. Requisitos para los ingredientes

Véase el Capítulo 1.1.8.

2.2.3. Controles durante el proceso

En cada fase de producción previa a la inactivación se determina la pureza de los cultivos. Esto puede realizarse mediante un examen microscópico (por ejemplo, con microscopía de contraste de fases y tinción de Gram) y/o por cultivo. En los cultivos inactivados se comprueba si la inactivación es o no completa. Se realizan las pruebas analíticas en la vacuna a granel para determinar los niveles de formaldehído u otros conservantes, que deben estar dentro de los límites especificados. Durante la fabricación, los parámetros de producción deben controlarse de modo muy estricto para asegurar que todas las series (lotes) se produzcan de la misma manera que para producir las series utilizadas en los estudios de eficacia.

2.2.4. Pruebas en lotes de producto final

i) Esterilidad/pureza

Las pruebas de esterilidad se hacen en la vacuna envasada. Cada lote debe superar unos requisitos de inocuidad, como los detallados en el título 9 del Código de Regulaciones Federales, parte 113.26 (CFR USDA, 2013). (Véase también el capítulo 1.1.9.)

ii) Identidad

La identidad de los antígenos de los productos inactivados suele garantizarse mediante el concepto de inóculo primario y con buenos controles de fabricación. En EE.UU. no se precisan pruebas de identidad adicionales en los lotes de producto terminado, pero es posible que cada país tenga sus propios procedimientos.

iii) Inocuidad

Cada lote de vacuna a granel o envasada se somete a pruebas de inocuidad, aunque la potencia de los lotes también puede evaluarse en las aves vacunadas.

Algunos países o regiones, como la Unión Europea (UE) también pueden requerir pruebas de cada lote relativas al contenido en endotoxinas.

iv) Potencia del lote

En EE.UU., las vacunas inactivadas suelen realizarse pruebas de potencia del lote con ensayos de vacunación y desafío, como el que se describe en el título 9 del Código de Regulaciones Federales (CFR), parte 113.116-118 (USDA, 2013). Se expone a grupos independientes de aves (20 vacunadas y 10 controles) a cada uno de los serovares de *P. multocida* frente a los cuales se indica protección vacunal. Las vacunas se administran de acuerdo con la dosis y la vía de administración establecida en la ficha técnica, y todas las aves son expuestas 2 semanas después de la segunda dosis. Las aves se observan durante 14 días tras exposición. Para que la prueba resulte satisfactoria según el título 9 del CFR, deben sobrevivir por lo menos 14 de las 20 aves vacunadas, y deben morir al menos 8 de los 10 controles.

En la UE, puede utilizarse una prueba serológica u otro método validado para determinar la potencia del lote una vez que un lote de la potencia mínima permitida se haya analizado inicialmente con un ensayo de vacunación y desafío (Farmacopea Europea, 2008).

v) Contenido en formaldehído

En las vacunas inactivadas con formaldehído se realiza una prueba para determinar cuál es el contenido residual de formaldehído (VICH, 2003a).

2.3. Requisitos para la aprobación para el registro

Este apartado se basa en los requisitos para las vacunas contra *P. multocida* inactivadas de EE.UU. Es posible que en otros países haya requisitos ligeramente distintos.

2.3.1. Proceso de fabricación

Los fabricantes deben demostrar que con su método general de producción, el procedimiento utilizado para inactivar bacterias es suficiente para completar la inactivación. Debe desarrollarse una prueba para confirmar la inactivación de cada cultivo bacteriano.

2.3.2. Requisitos de inocuidad

i) Inocuidad en especies de destino y no de destino

Las vacunas inactivadas no deben suponer un peligro para las especies no de destino. En cuanto a las especies de destino, la inocuidad puede evaluarse de acuerdo con los requisitos armonizados de la VICH GL44 (VICH, 2009). La UE y EE.UU. recomiendan vacunar al menos a 20 aves no inmunes y no expuestas con arreglo a las recomendaciones de la ficha técnica y comprobar a diario si presentan reacciones adversas. La UE realiza dicho seguimiento durante 21 días. En EE.UU., la inocuidad en especies de destino se evalúa durante el periodo pre-exposición del estudio de eficacia, que suele ser de 5 semanas.

También debe comprobarse la inocuidad en un contexto de campo antes de otorgar la aprobación para el registro. Esta evaluación suele implicar múltiples ubicaciones geográficas o condiciones de manejo y número mucho mayores de aves.

ii) Reversión a la virulencia en vacunas atenuadas/vivas y consideraciones medioambientales

No es aplicable.

iii) Precauciones (peligros)

Las vacunas preparadas con adyuvantes de aluminio pueden dar lugar a nódulos temporales en el punto de inyección. La auto-inyección del operario no supone un problema inmediato, pero debe consultarse con el médico porque existe riesgo de infección si la aguja está contaminada.

Las vacunas preparadas con adyuvantes oleosos pueden causar reacciones más graves en el punto de inyección, que podrían manifestarse en forma de nódulos grandes. Estas vacunas deben administrarse correctamente. La auto-inyección del operario requiere atención médica inmediata, porque es necesario realizar una incisión cuanto antes e irrigar la zona.

2.3.3. Requisitos de eficacia

Es necesario demostrar que los productos preparados a partir de inóculos primarios candidatos son eficaces en caso de exposición. Debe demostrarse dicha eficacia en cada una de las especies animales (por ejemplo, pollos y pavos) y por cada una de las vías de administración recomendadas para el producto, y también debe demostrarse la protección contra cada uno de los serovares para los cuales se indica protección. Las aves utilizadas en los estudios de eficacia no deben haber contactado jamás con el cólera aviar y deben tener al menos la edad mínima recomendada para el producto. El lote de producto utilizado para demostrar la eficacia debe producirse a partir del pase más alto permitido del inóculo primario.

En EE.UU. y en la UE, en cada prueba de eficacia se utilizan 20 aves vacunadas y 10 controles. Estas aves se exponen al microorganismo no menos de 14 (EE.UU.) o 21 (UE) días después de la vacunación y se observan durante 14 días tras dicha exposición. En EE.UU., se mide la mortalidad, y para que la vacuna supere la prueba es necesario que al menos ocho de los controles mueran y que al menos 16 de las aves vacunadas sobrevivan (USDA, 2013). En la UE, se espera que las aves sigan libres de signos graves de la enfermedad, y para que la vacuna supere la prueba es necesario que al menos un 70% de las aves control estén afectadas y que al menos un 70% de las aves vacunadas estén libres de la enfermedad (Farmacopea Europea, 2008).

2.3.4. Vacunas que permiten una estrategia DIVA (detección de infección en animales vacunados)

No es aplicable a esta enfermedad.

2.3.5. Duración de la inmunidad

No suele exigirse la duración formal de los estudios de inmunidad, pero sí es importante comprobar los requisitos de cada país. En cuanto a las recomendaciones para la revacunación, a partir del ciclo inicial de vacunación lo más habitual es determinarla de forma empírica.

2.3.6. Estabilidad

La estabilidad de la vacuna debe confirmarse mediante pruebas de potencia en el producto a intervalos periódicos durante todo el periodo de validez indicado. En EE.UU., se analizan al menos tres lotes de vacuna, que deben superar los requisitos de potencia establecidos al final de dicho periodo. Las vacunas suelen guardarse a 2–7°C y protegerse de la congelación. Al final del día deben desecharse los recipientes utilizados parcialmente.

C2. Vacuna viva

1. Antecedentes

1.1. Fundamentos y uso previsto del producto

Se usan vacunas vivas que contienen *P. multocida* modificada en algunas regiones del mundo, como en Norteamérica y Australia. Las vacunas vivas suelen administrarse en el agua de bebida o en la membrana del ala. Debe evitarse la vacunación de aves enfermas y de las que se encuentren en mal estado nutricional, porque en tales circunstancias podría no generarse una respuesta inmunitaria satisfactoria.

Un rasgo clave de las vacunas para el cólera aviar es que la eficacia protectora de estas vacunas es independiente de la estructura del núcleo externo del LPS (Harper *et al.*, 2016).

2. Descripción de la producción y requisitos mínimos para las vacunas

Las directrices para la producción de vacunas veterinarias se indican en el Capítulo 1.1.8.

2.1. Características del inóculo

2.1.1. Características biológicas

Todas las cepas de *P. multocida* que vayan a incorporarse a una vacuna deben estar bien caracterizadas y ser de un serovar conocido, puras, inocuas e inmunógenas. Véase el Capítulo 1.1.8 para conocer las directrices sobre los inóculos primarios.

2.1.2. Criterios de calidad (esterilidad, pureza y ausencia de agentes extraños)

Los inóculos de *Pasteurella multocida* deben ser cultivos puros y estar libres de bacterias extrañas u hongos.

2.1.3. Validación como cepa vacunal

La idoneidad como cepa vacunal se comprueba mediante ensayos de eficacia y de inocuidad. Los inóculos que se utilizan en las vacunas vivas deben ser genéticamente y fenotípicamente estables en pases repetidos *in-vivo*. Teóricamente, no deben persistir en el animal vacunado, y las posibles excreciones del microorganismo vacunal en las aves vacunadas deben ser de escasa magnitud y duración.

2.1.4. Procedimiento de emergencia para la aceptación provisional de nuevos inóculos víricos primarios (MSV) en el caso de una epizootia

Muchos países disponen de mecanismos para la aceptación provisional en los casos de epizootias para las cuales las vacunas comerciales no son efectivas. No obstante, dado que las vacunas inactivadas contra el cólera aviar suelen ser efectivas y suponen menos riesgos para la seguridad, en una epizootia de cólera aviar lo más probable sería que se planteara el uso de una vacuna inactivada.

2.2. Método de fabricación

2.2.1. Procedimiento

Se preparan por separado cultivos de producción de cada cepa bacteriana que deba incluirse en el producto final. *Pasteurella multocida* puede cultivarse en medios líquidos adecuados o bien inicialmente en medios sólidos para subcultivarse después en medios líquidos. Los cultivos se someten a subpases hasta que se logra el volumen deseado, y se recogen cuando alcanzan una densidad adecuada, que suele medirse mediante espectrofotometría (densidad óptica).

Cada componente del cultivo puede estandarizarse, mediante concentración o dilución, hasta la concentración deseada. Se combinan todos los componentes estandarizados antes del vertido en los recipientes finales estériles. Las vacunas vivas suelen liofilizarse, e inmediatamente antes de su uso deben reconstituirse con un diluyente estéril.

2.2.2. Requisitos para los ingredientes

Véase el Capítulo 1.1.8.

2.2.3. Controles durante el proceso

La pureza de los cultivos se determina en cada etapa de la producción. Puede establecerse mediante examen microscópico (por ejemplo, microscopía de contraste de fases y tinción de Gram) o mediante cultivo. Durante la fabricación, los parámetros de producción deben controlarse estrictamente para garantizar que todas las series (lotes) se producen del mismo modo que el aplicado para producir los lotes que se emplean en los estudios de eficacia.

2.2.4. Pruebas en lotes de producto final

i) Esterilidad

Las pruebas de esterilidad se realizan en la vacuna envasada. Cada lote debe superar los requisitos de esterilidad, por ejemplo, como se indica en el título 9 del CFR, parte 113.27 (CFR USDA, 2013). (Véase también el Capítulo 1.1.9).

ii) Pureza

Cada lote debe superar una prueba de pureza realizada con medios sólidos e ignorando el crecimiento de la bacteria vacunal, por ejemplo, como se indica en el título 9 del CFR, parte 113.27 (CFR USDA, 2013). (Véase también el Capítulo 1.1.9).

iii) Identidad

En EE.UU., se realizan pruebas de identidad en todos los lotes de vacuna viva. Los requisitos de otros países pueden ser distintos. Dichas pruebas se llevan a cabo principalmente caracterizando la bacteria *in vitro*.

iv) Inocuidad

Las vacunas vivas pueden analizarse con arreglo al método descrito en el Apartado C1.2.3.2.i, excepto por el hecho de que a menudo solo se precisa una especie animal representativa.

Ciertos países (por ejemplo, la UE) también exigen realizar pruebas de contenido en endotoxinas en cada lote (Farmacopea Europea, 2008).

v) Potencia del lote

La potencia de los lotes de vacuna viva se determina mediante un recuento bacteriano en el producto liofilizado reconstituido en su envase final. En EE.UU., el recuento bacteriano medio de cualquier lote de vacuna en el momento de la preparación debe ser suficientemente alto como para garantizar que en cualquier momento antes de la fecha de caducidad el recuento será de al menos el doble que el estándar de inmunogenicidad. La UE exige un recuento que sea al menos igual al del estándar de inmunogenicidad.

vi) Contenido en humedad

En la vacuna liofilizada se realizan pruebas de humedad. Los requisitos armonizados para las pruebas de humedad mediante un método gravimétrico se describen en la VICH GL26 (VICH, 2003). Lo habitual es esperar que la humedad sea inferior al 5%.

2.3. Requisitos para la aprobación para el registro

Véase el Capítulo 1.1.8.

2.3.1. Proceso de fabricación

Véase el Capítulo 1.1.8.

2.3.2. Requisitos de inocuidad

i) Inocuidad en especies de destino y no de destino

Antes de emitir la aprobación para el registro de una vacuna viva, debe comprobarse la inocuidad de los inóculos primarios que se hayan utilizado. La inocuidad debe comprobarse en todas las especies animales (pollos, pavos, patos y psitácidas) para las cuales el producto esté recomendado. Puede consultarse la VICH GL44 armonizada (VICH, 2007) en referencia a la inocuidad en las especies de destino.

Para las vacunas vivas suelen exigirse estudios de sobredosis. Por ejemplo, se administra a cada una de 10 aves el equivalente de 10 dosis vacunales y se observan durante 10 días. Si se observan reacciones desfavorables, este hallazgo debe incluirse en una evaluación del riesgo, y puede ser adecuado establecer unos requisitos de potencia máxima permitida.

El inóculo primario también debe analizarse en especies no de destino representativas (como roedores o especies aviares no de destino) que sea esperable que entren en contacto con la bacteria vacunal excretada por las aves vacunadas. Debe administrarse la bacteria del inóculo primario a la mayoría de las especies sensibles y a la edad más sensible, por la vía de administración que sea esperable en condiciones de campo (por ejemplo, oral).

ii) Reversión a la virulencia en vacunas atenuadas/vivas y consideraciones medioambientales

Mediante repetidos pases in vivo, debe comprobarse la estabilidad de las bacterias del inóculo primario utilizado para vacunas vivas. El inóculo debe permanecer avirulento y genotípicamente estable tras múltiples pases. Los requisitos armonizados relativos a los estudios de reversión a la virulencia se describen en la VICH GL41 (VICH, 2007).

En los inóculos para vacunas vivas también debe comprobarse su potencial de excreción en animales vacunados y de persistencia y propagación en el medio ambiente. Teóricamente, los microorganismos vacunales solo se excretan brevemente y no deben persistir en el medio. Las excepciones a esta norma deberán estudiarse sometiendo el producto a una evaluación del riesgo.

iii) Precauciones (peligros)

La exposición humana inadvertida al microorganismo vacunal debe comunicarse a un médico.

2.3.3. Requisitos de eficacia

Es necesario demostrar que los productos preparados a partir de inóculos primarios candidatos son eficaces en caso de exposición. Debe demostrarse dicha eficacia en cada una de las especies animales (por ejemplo, pollos y pavos) y por cada una de las vías de administración recomendadas para el producto, y también debe demostrarse la protección contra cada uno de los serovares para los cuales se indica protección. Las aves utilizadas en los estudios de eficacia no deben haber contactado jamás con el cólera aviar y deben tener al menos la edad mínima recomendada para el producto. El lote de producto utilizado para demostrar la eficacia debe producirse a partir del pase más alto permitido del inóculo primario.

En el caso de las vacunas vivas contra *Pasteurella aviar*, en EE.UU., en cada prueba de eficacia se utilizan 20 aves vacunadas y 10 controles. Estas aves se exponen al microorganismo no menos de 14 días después de la vacunación y se observan durante 10 días tras dicha exposición. Para que la vacuna supere la prueba, es necesario que al menos ocho de los controles mueran y que al menos 16 de las aves vacunadas sobrevivan.

La media aritmética del recuento de unidades formadoras de colonia en el lote de producto que se ha utilizado para demostrar la eficacia se utiliza como estándar mínimo (estándar de inmunogenicidad) para todos los siguientes lotes de producción de la vacuna.

2.3.4. Vacunas que permiten una estrategia DIVA (detección de infección en animales vacunados)

No es aplicable.

2.3.5. Duración de la inmunidad

No suele exigirse la duración formal de los estudios de inmunidad, pero sí es importante comprobar los requisitos de cada país. En cuanto a las recomendaciones para la revacunación, a partir del ciclo inicial de vacunación lo más habitual es determinarla de forma empírica.

2.3.6. Estabilidad

La estabilidad de la vacuna debe confirmarse comprobando la potencia del producto a intervalos periódicos durante todo el periodo de validez. En EE.UU., los lotes de vacuna se analizan hasta que se establece un registro de estabilidad estadísticamente válido. Todos los lotes deben superar los requisitos de potencia al final de dicho periodo. Una vez abiertas, las vacunas vivas deben utilizarse cuanto antes.

BIBLIOGRAFÍA

- ADHIKARY S., BISGAARD M., FOSTER, G., KIESSLING N., FAHLEN A.R., OLSEN J.E. & CHRISTENSEN H. (2013). Comparative study of PCR methods to detect *Pasteurella multocida*. *Berl. Munch. Tierarztl. Wochenschr.*, **126**, 415–422.
- BLACKALL P.J. & HOFACRE C.L. (2020). Chapter 19. Pasteurellosis and other respiratory bacterial infections – Fowl Cholera. *In: Diseases of Poultry; Fourteenth Edition*, Swayne D.E., Editor in Chief, Boulianne M., Logue C.M., McDougald L.R., Nair V. & Suarez D.L. Associate Editors. John Wiley and Sons, Hoboken, New Jersey, USA, 831–845.
- BLACKALL P.J. & NORSKOV-LAURITSEN N. (2008). *Pasteurellaceae* – the view from the diagnostic laboratory. *In: Pasteurellaceae: Biology, Genomics and Molecular Aspects*, Kuhnert P., Christensen H., eds. Horizon Scientific Press, Norwich, UK, 227–260.
- CARTER G.R. (1955). Studies on *Pasteurella multocida*. I. A hemagglutination test for the identification of serological types. *Am. J. Vet. Res.*, **16**, 481–484.
- CARTER G.R. (1972). Improved hemagglutination test for identifying type A strains of *Pasteurella multocida*. *Appl. Microbiol.*, **24**, 162–163.
- CORNEY B.G., DIALLO I.S., WRIGHT L.L., HEWITSON G.R., DE JONG A.J., BURRELL P.C., DUFFY P.F., STEPHENS C.P., RODWELL B.J., BOYLE D.B. & BLACKALL P.J. (2007). *Pasteurella multocida* detection by 5' Taq nuclease assay: a new tool for use in diagnosing fowl cholera. *J. Microbiol. Methods*, **69**, 376–380.
- EUROPEAN PHARMACOPOEIA (2008). Vaccines for Veterinary Use. Fowl Cholera Vaccine Inactivated. 1945. European Directorate for the Quality of Medicines and Health Care (EDQM), Council of Europe, Strasbourg, France.
- GLISSON J.R., HOFACRE C.L. & CHRISTENSEN J.P. (2013). Chapter 19: Pasteurellosis and other respiratory bacterial infections. *In: Diseases of Poultry; Thirteenth Edition*, Swayne D.E., Editor in Chief, Glisson J.R., McDougald L.R., Nolan L.K., Suarez D.L. & Nair V., Associate Editors. Wiley-Blackwell, Ames, Iowa, USA and Oxford, UK, pp 807–823.
- GLISSON J.R., SANDHU T.S. & HOFACRE C.L. (2008). Pasteurellosis, Avibacteriosis, Gallibacteriosis, Riemerellosis, and Pseudotuberculosis. *In: A Laboratory Manual for the Isolation, Identification, and Characterization of Avian*

Pathogens, Fifth Edition, Dufour-Zavala L., Swayne D.E., Glisson J.R., Pearson J.E., Reed W.M., Jackwood M.W. & Woolcock P.R., eds. American Association of Avian Pathologists, Athens, Georgia, USA, 12–14.

HARPER M., JOHN M., TURNI C., EDMUNDS M., ST MICHAEL F., ADLER B., BLACKALL P.J., COX A.D. & BOYCE J.D. (2015). Development of a rapid multiplex PCR to genotype *Pasteurella multocida* strains using the lipopolysaccharide outer core biosynthesis locus. *J. Clin. Microbiol.*, **53**, 477–485.

HARPER M., JOHN M., EDMUNDS M., WRIGHT A., FORD M., TURNI C., BLACKALL P.J., COX A., ADLER B. & BOYCE J.D. (2016). Protective efficacy afforded by live *Pasteurella multocida* vaccines in chickens is independent of lipopolysaccharide outer core structure. *Vaccine*, **34**, 1696–1703.

HEDDLESTON K.L. (1962). Studies on pasteurellosis. V. Two immunogenic types of *Pasteurella multocida* associated with fowl cholera. *Avian Dis.*, **6**, 315–321.

HEDDLESTON K.L., GALLAGHER J.E. & REBERS P.A. (1970). Fowl cholera: immune responses in turkeys. *Avian Dis.*, **14**, 626–635.

HEDDLESTON K.L., GALLAGHER J.E. & REBERS P.A. (1972). Fowl cholera: Gel diffusion precipitin test for serotyping *Pasteurella multocida* from avian species. *Avian Dis.*, **16**, 925–936.

INTERNATIONAL COOPERATION ON HARMONISATION OF TECHNICAL REQUIREMENTS FOR REGISTRATION OF VETERINARY MEDICINAL PRODUCTS (VICH) (2003a). Guideline 25: Testing of residual formaldehyde. <https://vichsec.org/en/guidelines/biologicals/bio-quality/impurities>

INTERNATIONAL COOPERATION ON HARMONISATION OF TECHNICAL REQUIREMENTS FOR REGISTRATION OF VETERINARY MEDICINAL PRODUCTS (VICH) (2003b). Guideline 26: Testing of residual moisture. <https://vichsec.org/en/guidelines/biologicals/bio-quality/impurities>

INTERNATIONAL COOPERATION ON HARMONISATION OF TECHNICAL REQUIREMENTS FOR REGISTRATION OF VETERINARY MEDICINAL PRODUCTS (VICH) (2007). Guideline 41: Target animal safety – Examination of live veterinary vaccines in target animals for absence of reversion to virulence. <https://vichsec.org/en/guidelines/biologicals/bio-safety/target-animal-safety>

INTERNATIONAL COOPERATION ON HARMONISATION OF TECHNICAL REQUIREMENTS FOR REGISTRATION OF VETERINARY MEDICINAL PRODUCTS (VICH) (2009). Guideline 44: Target animal safety for veterinary live and inactivated vaccines. <https://vichsec.org/en/guidelines/biologicals/bio-safety/target-animal-safety>

KUHNERT P., BISGAARD M., KORCZAK B.M., SCHWENDENER S., CHRISTENSEN H. & FREY J. (2012). Identification of animal *Pasteurellaceae* by MALDI-TOF mass spectrometry. *J. Microbiol. Methods*, **89**, 1–7.

LECOUNT K.J., SCHLATER L.K., STUBER T., ROBBE AUSTERMAN S., FRANA T.S., GRIFFITH R.W. & ERDMAN M.M. (2018). Comparison of whole genome sequencing to restriction endonuclease analysis and gel diffusion precipitin-based serotyping of *Pasteurella multocida*. *J. Vet. Diagn. Invest.*, **30**, 42–55.

MUHAIRWA A.P., MTAMBO M.M.A., CHRISTENSEN J.P. & BISGAARD M. (2001). Occurrence of *Pasteurella multocida* and related species in village free ranging chickens and their animal contacts in Tanzania. *Vet. Microbiol.*, **78**, 139–153.

OMALEKI L., BLACKALL P.J., CUDDIHY T., BEATSON S.A., FORDE B.M. & TURNI C. (2020). Using genomics to understand inter- and intra- outbreak diversity of *Pasteurella multocida* isolates associated with fowl cholera in meat chickens. *Microbial Genomics*, **6**, doi10.1099/mgen.1090.000346.

RIMLER R.B. (1994). Presumptive identification of *Pasteurella multocida* serogroups A, D, and F by capsule depolymerisation with mucopolysaccharidases. *Vet. Rec.*, **134**, 191–192.

SINGH R., BLACKALL P.J., REMINGTON B. & TURNI C. (2013). Studies on the presence and persistence of *Pasteurella multocida* serovars and genotypes in fowl cholera outbreaks. *Avian Pathol.*, **42**, 581–585.

SINGH R., REMINGTON B., BLACKALL P.J. & TURNI C. (2014). Epidemiology of fowl cholera in free range broilers. *Avian Dis.*, **58**, 124–128.

TOWNSEND K.M., FROST A.J., LEE C.W., PAPADIMITRIOU J.M. & DAWKINS J.S. (1998). Development of PCR assays for species- and type-specific identification of *Pasteurella multocida* isolates. *J. Clin. Microbiol.*, **36**, 1096–1100.

TOWNSEND K.M, BOYCE J.D., CHUNG J.Y., FROST A.J. & ADLER B. (2001). Genetic organization of *Pasteurella multocida* cap Loci and development of a multiplex capsular PCR typing system. *J. Clin. Microbiol.*, **39**, 924–929. Erratum in: *J. Clin. Microbiol.*, (2001), **39**, 2378.

UNITED STATES DEPARTMENT OF AGRICULTURE (USDA) (2013). Code of Federal Regulations, Title 9, Animals and Animal Products. Office of the Federal Register, National Archives and Records Administration. US Government Printing Office, Washington D.C., USA.

WILSON M.A., RIMLER R.B. & HOFFMAN L.J. (1992). Comparison of DNA fingerprints and somatic serotypes of serogroups B and E *Pasteurella multocida* isolates. *J. Clin. Microbiol.*, **30**, 1518–1524.

ZANGENAH S., GÜLERYÜZ G., BORÄNG S., ULLBERG M., BERGMAN P. & OZENCI V. (2013). Identification of clinical *Pasteurella* isolates by MALDI-TOF – a comparison with VITEK 2 and conventional microbiological methods. *Diagn. Microbiol. Infect. Dis.*, **77**, 96–98.

*
* *

NB: En el momento de la publicación (2022) no existían Laboratorios de Referencia de la OIE para el cólera aviar (puede consultarse la página web de la OIE:

<https://www.woah.org/es/que-ofrecemos/red-de-expertos/laboratorios-de-referencia/#ui-id-3>)

NB: ADOPTADO POR PRIMERA VEZ EN 1990. ÚLTIMAS ACTUALIZACIONES ADOPTADAS EN 2022.