

UNIVERSIDAD DE CHILE
FACULTAD DE CIENCIAS VETERINARIAS Y PECUARIAS
ESCUELA DE CIENCIAS VETERINARIAS

**“REDUCCIÓN DE LA COLONIZACIÓN DE *Salmonella*
Enteritidis EN POLLOS COMERCIALES TRATADOS CON
BACTERIÓFAGOS”**

PAMELA PATRICIA CARVAJAL GONZÁLEZ

Memoria para optar al Título
Profesional de Médico Veterinario
Departamento de Medicina
Preventiva Animal.

PROFESOR GUIA: DRA. CONSUELO BORIE P. MV.; M.Sc.

SANTIAGO, CHILE
2007

ÍNDICE

RESUMEN.....	2 – 3
SUMMARY.....	4 – 5
INTRODUCCIÓN.....	6 – 7
REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA.....	8 – 42
ASPECTOS GENERALES.....	8 - 22
BACTERIÓFAGOS.....	22 - 42
OBJETIVOS.....	43
MATERIALES Y MÉTODOS.....	44 - 51
RESULTADOS.....	52 - 57
DISCUSIÓN.....	58 – 65
CONCLUSIONES.....	66
BIBLIOGRAFÍA.....	67 - 76

RESUMEN

Debido al problema actual provocado por *Salmonella* Enteritidis (S.E.), el sector avícola ha implementado medidas de control, pero ninguna de ellas ha demostrado la eficiencia necesaria. Actualmente, el uso de bacteriófagos líticos reaparece como una opción más de control que ha sido investigada a nivel internacional y nacional. En Chile, recientemente se obtienen resultados alentadores en el control de *Salmonella* Enteritidis mediante la utilización preventiva de 3 bacteriófagos líticos en pollos Libres de Patógenos Específicos (SPF, <Specific Pathogen Free>) experimentalmente infectados.

El objetivo de este trabajo fue determinar la eficiencia de una mezcla de 3 bacteriófagos sobre la colonización de *Salmonella* spp. en aves comerciales provenientes de madres vacunadas. Se formaron 5 grupos de 30 pollos cada uno: 2 grupos recibieron la terapia con bacteriófagos (aves comerciales y aves SPF) y 3 fueron controles (control de infección en aves comerciales, control de infección en aves SPF y control sano). Al día 6 de edad, las aves fueron tratadas con una mezcla de bacteriófagos vía aerosol, con una multiplicidad de infección de 10^3 UFP y, al día siguiente, fueron desafiadas con $2,95 \times 10^5$ UFC/ml de S.E. vía oral. Siete días post desafío (14 días de edad), las aves fueron sacrificadas para la obtención de muestras individuales de ciegos y un “pool” de órganos internos para realizar Bacteriología cualitativa y Bacteriología cuantitativa para recuento cecal (UFC/g).

En las aves comerciales que recibieron el desafío con S.E., la incidencia de la infección no disminuyó respecto al grupo de aves SPF desafiadas, alcanzando el 100% de infección total en ambos grupos, independiente del tipo de muestra. Al analizar sólo las muestras de “pool” de órganos, la incidencia en aves comerciales disminuyó en un 9,4%, reducción que no fue significativa. Por otro lado, en las aves comerciales que recibieron los bacteriófagos comparadas con las aves comerciales que no los recibieron, la incidencia de infección disminuyó significativamente ($p=0,01$) en un 20% mientras que, en las aves SPF tratadas con bacteriófagos la disminución alcanzó sólo un 6,9%. El análisis de la presencia de S.E. según tipo de muestra en ambos grupos de aves tratadas

con los bacteriófagos, demostró que en los ciegos la disminución fue significativa ($p=0,0028$) sólo en el grupo de aves comerciales, alcanzando una reducción de 26,7% respecto al control. En relación a la infección sistémica (“pool” de órganos internos) hubo un 8,7% de disminución, valor que no fue significativo. En las aves SPF tratadas, hubo una pequeña disminución a nivel cecal que no fue significativa y, a nivel sistémico, no se observó disminución en la incidencia.

En relación al recuento cecal, se observó una reducción de aproximadamente $1 \log_{10}$ UFC/g de S.E. en las aves comerciales que recibieron el tratamiento, disminución que no fue significativa. En el grupo de aves SPF tratadas con bacteriófagos, se registró una leve disminución de $0,19 \log_{10}$ UFC/g de S.E. respecto al control.

Los resultados obtenidos señalan que la inmunidad materna por sí sola no protegió frente a la colonización de S.E. en ciegos, ni disminuyó su recuento cecal, aunque logró disminuir la incidencia a nivel sistémico. Cuando las aves comerciales, provenientes de madres vacunadas, recibieron bacteriófagos se logró una disminución significativa de la incidencia total de infección y, a pesar que también se observó una disminución en el recuento cecal de S.E., este valor no fue significativo.

Los resultados de este estudio permiten concluir que la fagoterapia es una alternativa factible y complementaria para el control de este patógeno en pollos comerciales provenientes de madres vacunadas. Sin embargo, es necesario continuar en la búsqueda de nuevos bacteriófagos que logren disminuciones de mayor impacto en la incidencia de infección y sobre todo, en el recuento bacteriano a nivel cecal.

SUMMARY

Due to the current problem caused by *Salmonella* Enteritidis (S.E.), the poultry sector has implemented control procedures, but none has proved the necessary efficiency. Currently, the use of lytic bacteriophages reappears as another controlling option that has been investigated at national and international level. In Chile, recently encouraging results were obtained on the control of S.E. by means of the preventive use of 3 lytic bacteriophages in experimentally infected Specific Pathogen Free (SPF) chickens.

The objective of this work was to determine the efficiency of a mixture of 3 bacteriophages on the colonization of *Salmonella* spp. in chickens from vaccinated hens. Five groups were formed of 30 chickens each one: 2 groups received the therapy with bacteriophages (chickens and SPF chickens) and three were control groups (infection control in chickens and SPF chickens and healthy control). On the six day of age, the birds were treated with a mixture of bacteriophages via spray, with a multiplicity of infection of 10^3 PFU and, the next day, were challenged with $2,95 \times 10^5$ CFU/ml of S.E. via oral. Seven days after challenge (14 days of age) the birds were sacrificed to obtain individual ceca samples and a pool of internal organs to qualitative Bacteriology and quantitative Bacteriology for cecal counting (CFU/g).

The incidence of the infection in the chickens that were challenged with S.E., did not decrease in relation to the challenged SPF chickens, reaching 100% of total infection in both groups, independently of the kind of sample. When only samples of the pool of organs were analyzed, the incidence in chickens decreased 9.4%, which is non-significative. On the other hand, in the birds treated with bacteriophages compared with the birds did not receive them, the incidence of infection decreased significantly ($p=0.01$) in 20% whereas, in the birds SPF treated with bacteriophages the decrease reached only 6.9%. The analysis of the presence of S.E. by type of sample in both groups of birds treated with bacteriophages demonstrated that only in the group of chickens the decrease in the ceca was significative ($p=0.0028$), reaching 26.7%

reduction compared to the control. In relation to the systemic infection (pool of internal organs), there were 8.7% of decrease, value that was not significant. In the treated SPF birds, there was a slight non-significative decrement at the cecal level, and no decrease in the incidence at the systemic level.

A non-significative reduction of approximately 1 log₁₀ CFU/g of S.E. in cecal count was observed in the chickens that received treatment. In the group of SPF birds treated with bacteriophages, a slight reduction of 0,19 log₁₀ CFU/g de S.E. in relation to the control was observed.

The results show that maternal immunity by itself was not protection against colonization of S.E. in ceca, nor did it diminish its cecal count, though did diminish the incidence at the systemic level. When the chickens (non SPF) received bacteriophages, a significative decrease on the total incidence of infection and a non-significative decrease on the cecal count were obtained.

The results in this research lead to conclude that phagotherapy is a feasible and complementary alternative for the control of this pathogen in chickens from vaccinated hens; however, it is necessary to continue the search for new bacteriophages that can decrease more significatively the incidence of infection and, specially, the S.E. count at the cecal level.

INTRODUCCIÓN

Salmonella es una bacteria de distribución mundial que ocasiona pérdidas en el sector avícola y, que es transmitida por los alimentos causando serios problemas para los consumidores. El serotipo prevalente en países desarrollados es *Salmonella enterica* serovar Enteritidis (S.E.) y, Chile no es la excepción, ya que afecta a gran parte del territorio nacional.

Entre las medidas de control utilizadas por el sector avícola se pueden mencionar: los antimicrobianos, la exclusión competitiva, los prebióticos y la vacunación con bacterias vivas o muertas. Entre todas las medidas, la vacunación constituye la principal herramienta utilizada en las aves reproductoras para la protección de ellas y de su progenie; los anticuerpos maternos cumplen un rol vital en la protección del pollo durante su primera semana de vida, debido a que su sistema inmune se encuentra aún en desarrollo. Diversos estudios señalan que la vacunación no debería ser el único recurso utilizado como protección frente a *Salmonella* spp., debiendo considerarla dentro de un conjunto de medidas ya que ninguna de ellas, por sí sola, ha tenido los resultados esperados para el control de esta bacteria.

Recientemente, otra medida de control reaparece frente a la infección por S.E.; el uso de los bacteriófagos, definidos como virus que lisan bacterias. Se comenzaron a usar como medida terapéutica en infecciones bacterianas desde principios del siglo XX con buenos resultados, pero la aparición de algunos efectos nocivos en conjunto con el inicio de la era antibiótica hizo que se desplazaran como terapia. Sin embargo, la multiresistencia de *Salmonella* a los antimicrobianos es un problema vigente y de gran preocupación, por ello los bacteriófagos vuelven a surgir como posible medida terapéutica y como biocontroladores en la industria agrícola y pecuaria.

En Chile, se han logrado aislar bacteriófagos específicos contra S.E. y con ellos se han realizado diversos estudios en relación al efecto lítico sobre la bacteria. Es así

como recientemente se logró comprobar la eficiencia de bacteriófagos en la prevención de la colonización de S.E. en pollos Libres de Patógenos Específicos (SPF, <Specific Pathogen Free>) experimentalmente infectados. Por ello, parece interesante determinar el posible efecto complementario entre la presencia de anticuerpos maternos y la dosificación de una mezcla de bacteriófagos en pollos comerciales, esperando con esto aportar una alternativa para el control de esta bacteria en el sector avícola nacional.

REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA

ASPECTOS GENERALES

Salmonella es una bacteria que ocasiona grandes pérdidas en la industria avícola, así como problemas de salud pública para el consumidor (Braden, 2006). Esta bacteria es un bacilo gram negativo perteneciente a la Familia *Enterobacteriaceae*, que se comporta como patógeno intracelular (Carter, 1984). Desde un punto de vista taxonómico se describen 2 especies, *Salmonella enterica* y *Salmonella bongori*. *S. enterica* por su parte se subdivide en seis subespecies, *enterica*, *arizonae*, *diarizonae*, *salamae*, *houtenae* e *indica* (Tindall *et al.*, 2005).

Además, por sus características antigénicas se describen al menos 2.400 serotipos, entre los cuales se describe *Salmonella enterica* subespecie *enterica* serotipo Enteritidis (S.E.). La serotipificación de *Salmonella* según el esquema de Kauffman-White, se realiza mediante la caracterización de tres tipos de antígenos: antígeno Somático O, antígeno Flagelar H (fase 1 y fase 2) y antígeno Capsular Vi (Carter, 1984).

En relación a los hospederos, hay algunos serotipos que muestran especificidad por uno en particular, como es el caso de *S. Typhi* y *S. Paratyphi* que causan enfermedad sólo en los seres humanos. Otros serotipos no muestran especificidad por un hospedero y causan enfermedad tanto en los hombres como en los animales como es el caso de *S. Tiphimurium*, *S. Enteritidis* y *S. Anatum* (Carter, 1984).

La patogénesis de este enteropatógeno comprende varias etapas (Sánchez y Cardona, 2003). Una vez que la bacteria es ingerida, debe resistir el ambiente ácido del estómago y a continuación colonizar el intestino delgado. Para esto, la bacteria debe adherirse a ciertos tipos de células del intestino, involucrando varios tipos de fimbrias o pili, que ayudarán a la bacteria a contactarse con las células epiteliales intestinales. La bacteria establece un contacto estrecho con el borde en cepillo del tejido epitelial del

intestino; cuando la bacteria se acerca a la superficie epitelial, las microvellosidades circundantes sufren el denominado “Ruffling”, que es un cambio morfológico degenerativo con el fin de reacomodar el citoesqueleto de actina e inducir cambios morfológicos que causan que estas células internalicen la bacteria en el proceso denominado invasión.

Posteriormente, una vez que se ha producido la invasión, la bacteria migra a la lámina propia de la región ileocecal, se multiplica en los folículos de la región linfoide e induce hiperplasia e hipertrofia reticuloendotelial. Por lo tanto, la manifestación temprana de la interacción hospedero-patógeno es la adhesión e invasión al epitelio intestinal por parte de la bacteria y como consecuencia, la inflamación de la lámina propia y nódulos linfáticos (Sánchez y Cardona, 2003).

Con todo este proceso, los neutrófilos son estimulados y la infección se limita en el caso de la enteritis. La respuesta inflamatoria también se relaciona con la liberación de prostaglandinas, estimulación de la producción de AMP cíclico y la secreción activa de líquidos, produciendo diarrea, pero este signo no es el resultado del daño tisular causado directamente por la bacteria, sino que principalmente está dado por la reacción del hospedero a los factores proinflamatorios liberados por la bacteria (Sánchez y Cardona, 2003). Dentro de estos factores se describe la acción de la endotoxina, capaz de inducir la liberación de interleuquina-1 (IL-1), IL-6, IL-8, Factor de Necrosis Tumoral, Factor activante plaquetario, macrófagos y pirógenos endógenos, entre otros (Todar, 2002). Adicionalmente, se describe la acción de una enterotoxina, capaz de inducir la actividad de prostaglandinas que causarían la acumulación de fluidos. Esta última, similar a la toxina de *Vibrio cholerae* y a la toxina termolabil (LT) de *E.coli* (Darwin y Miller, 1999).

La bacteria también puede ser fagocitada por macrófagos de la zona intestinal y replicarse dentro de la vacuola fagocítica, utilizando los macrófagos para diseminarse y llegar al hígado, bazo y órganos ricos en células fagocíticas.

En el ser humano, uno de los principales cuadros clínicos producidos por la infección con *Salmonella* no tíficas es la gastroenteritis, producida por un gran número de serotipos, incluido S.E. *Salmonella* también es capaz de afectar distintos tipos de animales, como reptiles, aves y mamíferos, produciendo alteraciones de tipo intestinal como también alteraciones fuera del tracto gastrointestinal (Radostits *et al*, 2002). Sin embargo en las aves, S.E. produce escasa signología clínica: en aves adultas puede pasar incluso desapercibido y en aves jóvenes puede presentar altas tasas de mortalidad, retraso en el crecimiento o disminución en la producción de huevos (Gast, 1994). La salmonelosis, entonces, constituye una infección de importancia en salud pública y salud animal ocasionando un serio impacto económico. Desde un punto de vista epidemiológico, es una enfermedad aguda de distribución mundial transmitida por los alimentos (Braden, 2006).

La enfermedad es importante en los países desarrollados, donde se reportan brotes de infección intestinal; así por ejemplo, en Estados Unidos es una infección común, alcanzando aproximadamente 1,4 millones de casos cada año (Braden, 2006). Uno de los serotipos más representativos es S.E, el cual apareció a nivel mundial en la década de los 80 y se ha expandido desde entonces en forma progresiva y pandémica (Fica *et al.*, 2001). En el caso de este serotipo, los alimentos involucrados en su cadena de transmisión son principalmente aquellos de origen aviar, como huevos y carne (Gast, 1994; Altekruise *et al.*, 2006). Las frecuencias de contaminación de los huevos son relativamente bajas, no superando el 1% (Gast, 1994), pero es importante considerar que los huevos contaminados generalmente provienen de aves asintomáticas, con lo que la contaminación transovárica del huevo sin la presencia de la bacteria en la superficie permite que se generen vectores biológicos indetectables (Gast y Beard, 1990). Por otra parte, en 1991 se realizó un estudio microbiológico en plantas procesadoras de huevos, en la cual se encontró 61% de muestras positivas a *Salmonella* y, de este porcentaje, un 14% correspondió S.E. En la década de los 90, en Estados Unidos, la frecuencia de huevos contaminados con S.E. en restaurantes fue 1 de 12 y aunque se consideró bajo en relación a los huevos producidos por ese país (65 billones/año), se estimó un número de

huevos contaminados de 2,2 millones/año, valor que constituyó un número significativo de exposiciones potenciales para los seres humanos (Braden, 2006).

En relación a la carne de ave, según datos del USDA (“United States Department of Agriculture”) y FSIS (“Food Safety and Inspection Service”), durante el periodo 2000-2005 la proporción de carcasas de Broiler contaminadas con S.E. aumentó de 2,5 % a 7,7% ($p < 0,0001$) en las muestras que fueron positivas a *Salmonella* spp.(6.382 muestras). En relación al total de carcasas examinadas (51.327 muestras) el porcentaje de carcasas positivas a S.E. también aumentó de un 0,2% en el año 2000 a un 1,3% en el año 2005 (Altekruse *et al.*, 2006).

La situación nacional de esta zoonosis es similar a la ocurrida en países desarrollados. En Chile, las infecciones por S.E. aparecieron en forma dramática en 1994 en el norte del país y, en 1998, de un total de 1.236 aislamientos clínicos de *Salmonella* sp., 69% correspondió al serotipo Enteritidis. Recientemente, durante el periodo 2000-2005, el Instituto de Salud Pública (ISP) determinó que, de un total de 2.219 muestras clínicas, un 53% correspondió a S.E., por lo que este serotipo es, hasta el día de hoy, el predominante en el país (Figueroa, 2007). En los años anteriores, fue *Salmonella* Tiphya quien predominaba, pero con la cobertura de agua potable y la aplicación de medidas básicas de higiene se logró modificar la transmisión impidiendo la contaminación de los alimentos a pesar que la bacteria persiste en los portadores (Fica *et al.*, 2001).

Según Fica *et al.* (2001), los factores que participaron en la emergencia de este patógeno en Chile se pueden dividir en dos; por una parte la centralización de las industrias productoras de huevos, lo que implica que grandes volúmenes de aves de postura comparten alimentos, hábitat y microorganismos comunes. Otro factor sería la tecnificación de la industria, con la aglomeración de aves en galpones, lo que facilita la diseminación de patógenos y la contaminación e infección de un gran número de aves.

En el año 1999 y 2000, Prado *et al.*, (2002), demostraron a través de un estudio de brotes de Enfermedades Transmitidas por los Alimentos (ETAS) en la Región Metropolitana, que *Salmonella* del grupo no Typhi (*Salmonella* Enteritidis y *Salmonella* Typhimurium) eran los agentes bacterianos más importantes, cuyas fuentes principales de infección fueron la carne de ave y los huevos, sin la cocción adecuada.

Alexandre *et al.*, (2000), realizaron una investigación donde encontraron una frecuencia de contaminación en la yema de los huevos de 0,09% en 1.081 muestras provenientes de distribuidores y supermercados que comercializan el producto. En el mismo estudio se analizaron 1.154 muestras de carne de pollo y 370 muestras de menudencias de la misma especie provenientes de marcas comerciales. Los resultados indicaron un 8,31% de muestras positivas a *Salmonella*, en las muestras de carne de pollo, y de este valor un 6,06% correspondió a S.E. En cuanto a las menudencias de pollos se encontró un 12,97% de muestras positivas a *Salmonella* y de ellas un 1,27% fue por S.E.

La clara asociación entre S.E. y las aves ha estimulado al sector avícola para optimizar las medidas de control de esta bacteria, entre las que se incluyen bioseguridad, antibióticos, probióticos, exclusión competitiva, prebióticos y uso de vacunas (Doyle y Erickson, 2006).

• Bioseguridad

En la búsqueda de estrategias para el control de *Salmonella*, se incluye la bioseguridad, entendida como el conjunto de medidas que tienden a evitar el ingreso del patógeno a un plantel y su diseminación posterior. Dentro de este concepto destacan las siguientes acciones: uso de jaulas aéreas que limiten el contacto de las aves con excretas y entre aves, provisión de agua potable, uso de alimentos microbiológicamente certificados, control de roedores y vectores mecánicos/biológicos y la supervisión de los planteles por médicos veterinarios, entre otros (Wray y Davies, 2000).

Estudios han asociado la infección por *Salmonella* con malos estándares en la higiene de los galpones avícolas. Así por ejemplo, de un galpón contaminado en forma natural con S.E. se obtuvieron muestras una semana después de eliminado el lote de aves y no se encontró *Salmonella* en la cama ni en las heces de la superficie de la cama. Sin embargo, los comederos, los nidos y otras áreas estaban contaminados. Ratones capturados de galpones donde la infección por S.E. había sido confirmada, excretaron la bacteria por lo menos durante 18 semanas y, una muestra de heces puede contener entre 10^5 a 10^6 /g de salmonelas (Wray y Davies, 2000). En otros estudios de los mismos autores, la bacteria se encontró en los ventiladores y en el polvo fuera del galpón.

- **Antibióticos**

En el sector avícola, los antibióticos fueron usados comúnmente para evitar la colonización bacteriana producida por *Salmonella* y como promotores de crecimiento. Este último uso se caracterizó mediante la administración de bajas dosis de antibióticos a través del alimento, con el fin de reducir el desarrollo de bacterias patógenas, aumentar la eficiencia alimenticia, disminuir la mortalidad y mejorar el bienestar de los animales que representa la mejor calidad de la cama. Sin embargo, a pesar de estos beneficios, la Union Europea prohibió su utilización debido a la preocupación referente a que el uso de estos antibióticos pudieran afectar la eficiencia de ellos cuando se utilizan en medicina humana (Breeders, 2000).

La fluoroquinolona más utilizada por el sector avícola frente a *Salmonella* es el enrofloxacino (Serrano, 2000). En Chile, González y Correa (1998) recomendaron el uso de antibióticos como una medida básica para el control de *Salmonella* en planteles positivos a esta bacteria.

Desde el comienzo de la década de los '90, cepas de *Salmonella* presentaron resistencia a un rango amplio de antimicrobianos y actualmente, constituye un problema de gran preocupación a nivel mundial. Es por este motivo, que se ha incentivado a buscar otras formas de control de este enteropatógeno (WHO, 2006).

- **Probióticos**

En la actualidad, se conoce como probiótico a los microorganismos que promueven un balance beneficioso de la población de microorganismos autóctonos del tracto gastrointestinal y dentro de ellos, los mayores representantes son las bacterias ácido lácticas.

A este tipo de biocontrolador se le reconocen variadas acciones beneficiosas, como por ejemplo, beneficios nutricionales por la producción de vitaminas y enzimas, como también un efecto de mantención de la integridad de la mucosa intestinal frente a infecciones que causen diarrea (Holzapfel y Schillinger, 2002).

Higgins *et al.* (2007b), evaluaron la habilidad de un probiótico para reducir S.E. o *Salmonella* Typhimurium (S.T.) en pollos de un día de edad, siendo sus resultados alentadores. En los grupos que recibieron probiótico se logró una reducción significativa ($p < 0,05$) en la incidencia de S.E. en un 60 a 70% y de S.T. en un 89 a 95%. Además, el tratamiento causó una reducción significativa en el recuento de S.E. mayor a $2,9 \log_{10}$ de UFC en el contenido cecal. Los mejores resultados se obtuvieron 24 horas post-tratamiento, comparado con 6 y 12 horas post-tratamiento.

- **Exclusión competitiva**

La definición de exclusión competitiva corresponde a la definición de probiótico, pero las bacterias utilizadas corresponden a una o a pocas especies bacterianas de una población microbiana conocida (Patterson y Burkholder, 2003).

Para demostrar los efectos de la exclusión competitiva, Snoeyenbos *et al.* (1985), realizaron un estudio en el cual pollos de un día de edad fueron tratados con la microflora y a los 3 días de vida desafiados con *S. Infantis* vía transmisión horizontal. Los resultados muestran disminución en la incidencia de infección, ya que a los 53 días

de vida sólo 6 de 250 aves fueron positivas a la bacteria, mientras que en el grupo control 46 de 50 aves estaban infectadas.

- **Prebióticos**

Los prebióticos son ingredientes alimenticios que estimulan selectivamente el crecimiento y la actividad de bacterias específicas en el intestino, usualmente bifidobacterias y lactobacilos, con beneficios para la salud. En la práctica, son carbohidratos de cadena corta que no son digeribles por enzimas humanas (Cummings *et al.*, 2001) ni animales (Thitaram *et al.*, 2005).

Estas sustancias causan efectos benéficos, como por ejemplo, la modulación de flora colónica por estimulación de bacterias beneficiosas e inhibición de bacterias no deseables (Holzapfel y Schillinger, 2002). Thitaram *et al.* (2005) analizaron la adición de un prebiótico (isomaltooligosacárido) en la dieta de pollos experimentales desafiados con S.T. a los 7 días de edad. El prebiótico logró incrementar las bacterias ácido lácticas en el ciego (bifidobacterias) y, con esto se redujo en 2 log₁₀ la colonización por *S. Tiphymurium* en el contenido cecal.

- **Vacunación**

En el sector avícola la vacunación con vacunas vivas o muertas ha sido la herramienta tradicional para el control de *Salmonella*. La eficacia de las vacunas es medida por el nivel de colonización sistémica e intestinal y valores de mortalidad después de la vacunación e infección experimental usando rutas de administración oral o parenteral. El nivel de protección depende de la cepa de desafío, la ruta de administración, la dosis de infección, la edad del ave y la especie/línea del ave. En consecuencia, es difícil comparar estrictamente la eficacia de las vacunas actualmente disponibles (Barrow, 2007).

Las vacunas muertas (inactivadas) han sido usadas para el control de infección de salmonelas tíficas y no tíficas (S.E., *Salmonella* Tiphymurium, etc.), con variados resultados en relación a la diseminación fecal y colonización del intestino y órganos internos (Barrow, 2007).

Woodward *et al.* (2002) analizaron la eficacia de una vacuna muerta (Selenvac, Intervet) contra S.E. en aves de postura. Para ésto, diseñaron 2 protocolos de vacunación, en el primero de ellos se vacunó a las aves el primer día de vida y a las 4 semanas, y en el segundo se agregó una tercera vacunación a las 18 semanas de vida. Las aves se dividieron en grupos que fueron desafiados y evaluados a distintos tiempos (8 días de vida, 17, 23, 30 ó 59 semanas). La primera variable medida en el estudio, fue el peso del ave después del desafío con la bacteria. En relación a este punto, en todos los grupos el peso promedio disminuyó a los 7 días post-infección y, generalmente las pérdidas de peso fueron mayores en los grupos controles (no vacunadas) que en los grupos vacunados, pero las diferencias no fueron estadísticamente significativas. La segunda variable fueron los signos clínicos observables después del desafío. Los resultados demostraron que en todos los grupos la vacunación redujo los signos clínicos (diarrea, malestar general, debilidad) en comparación con los controles, siendo los signos más evidentes en los pollos jóvenes.

En cuanto a la eliminación de la bacteria (medida mediante hisopados cloacales), colonización sistémica y contaminación de huevos, los resultados fueron diferentes dependiendo del protocolo de vacunación. Cuando la vacunación fue al primer día de edad y a las 4 semanas, sólo el 26% de las aves fueron positivas a S.E. al analizar hisopados cloacales, v/s su control con 46% de positividad; en cuanto a la colonización de tejidos sólo se encontraron 12,5% de aves positivas comparado con el 28% en el grupo control y la contaminación de los huevos disminuyó hasta un 7,4% en la cáscara y hasta un 8,3% en el contenido del huevo. Cuando se agregó una vacunación más a las 18 semanas de edad, la diseminación de la bacteria no tuvo disminuciones estadísticamente significativas; en la colonización de tejidos, hubo una disminución significativa ($p < 0,001$) alcanzando valores de 5,8% de positividad v/s un 37,9% de

muestras positivas en los controles. En la variable huevos, se encontró un 5,4% de cáscaras positivas a la bacteria y un 3,6% de contenido del huevo positivo v/s los controles con 16,7% de positividad a la bacteria en las cáscaras y un 20,2% en el contenido de los huevos.

A pesar que las vacunas muertas pueden presentar relativa eficiencia en la reducción de *Salmonella*, las vacunas vivas tienen algunas ventajas, como es la estimulación del sistema inmune humoral y celular, mientras que las vacunas muertas estimulan principalmente la producción de anticuerpos. Por otra parte, el hecho que la bacteria esté viva, le permite replicarse al interior del hospedador, expresando así todos los antígenos que le caracterizan, mientras que, en las vacunas muertas, esta situación no ocurre. La sobre expresión de antígenos de S.E. es capaz de incrementar la proliferación de linfocitos en gallinas de postura y con ello, aumentar la inmunidad de tipo celular. Ha sido extensamente aceptado que la inmunidad mediada por células es más importante que la respuesta humoral para la protección contra *Salmonella* (Barrow, 2007).

Para comprobar la efectividad de las vacunas vivas, Chacana y Terzolo (2006) evaluaron la protección conferida por una vacuna viva de S.E. contra *Salmonella Gallinarum*, ya que se conoce que las vacunas producen protección cruzada entre los mismos serogrupos (D1). Los grupos de aves fueron vacunadas con diferentes protocolos de vacunación con variaciones en la vía de administración (oral o subcutánea) y el número de “booster” de la vacuna, pero siempre comenzando el primer día de vida. Cuando el desafío de las aves fue a las 28 semanas de vida, la eliminación fecal de la bacteria disminuyó significativamente ($p < 0,0001$) de un 100% a un 23 ó 12% dependiendo del protocolo de vacunación y, la mortalidad disminuyó hasta en un 100%. Cuando las aves fueron desafiadas a las 52 semanas, todas murieron y presentaron invasión de la bacteria en órganos internos. Los autores consideraron que este problema se solucionaría aumentando la cantidad de “booster”, ya que el último que recibieron las aves fue a las 30 semanas.

Los programas de vacunación en aves, generalmente, se basan en la vacunación de las aves reproductoras, debido a que durante la primera semana de vida, los pollos son susceptibles a variados patógenos. Durante los primeros 7 días de vida el sistema inmune aún no está totalmente desarrollado, por lo tanto los anticuerpos maternos serían su primera protección en contra de antígenos específicos (Hamal *et al.*, 2006).

Las aves transmiten sus anticuerpos maternos a su progenie. En los pollos hay tres clases de anticuerpos, Ig Y (Ig G en mamíferos), Ig A e Ig M. En términos moleculares y de estructura, estas últimas son similares a las inmunoglobulinas mamíferas. En cambio Ig Y, se considera equivalente pero no igual a la Ig G mamífera (Hamal *et al.*, 2006).

Hamal *et al.*, (2006), estudiaron la transferencia de Ig Y, Ig A e Ig M, desde madres Broiler a su descendencia, determinando además la persistencia de los anticuerpos maternos y el comienzo de la producción endógena por parte de los pollos. Los resultados obtenidos indican que en madres, yemas, huevos y pollos, la Ig Y es la inmunoglobulina predominante en todos los grupos, seguida de la Ig M y por último la Ig A. En cuanto a la cuantificación plasmática de la Ig Y en los pollos, los autores describen niveles fluctuantes, tendientes a la baja en los primeros días (día 3: 1,6 mg/ml; día 7: 1,0 mg/ml y día 14: 0,8 mg/ml), para volver a recuperar su concentración el día 21 (1 mg/ml, correspondiente a la producción endógena de la inmunoglobulina). El patrón de Ig A e Ig M indica que en el día 7, las concentraciones están en un rango alto, lo que demuestra que en este día la producción endógena ya ha comenzado. Es así como, basado en los cambios cronológicos de los niveles de Ig en la circulación, Ig M es la primera que se comienza a producir endógenamente, seguida por la Ig A y por último la Ig Y. Por último, se midió el porcentaje de anticuerpos transferidos de la madre al pollo; la Ig Y se transfirió en un 27 a 30%, mientras de las Ig A e Ig M lo hicieron en menos de 1%, lo que determina que la Ig Y es un indicador directo de la transferencia de anticuerpos maternos.

Estos autores también midieron las concentraciones plasmáticas de 2 anticuerpos contra patógenos específicos, correspondientes a anticuerpos contra la enfermedad de Newcastle y Bronquitis infecciosa aviar. Los dos tipos de anticuerpos maternos se encontraron en concentraciones altas en el día 3, decrecieron para el día 7 y en el día 14, no pudieron ser cuantificados. En el caso de los anticuerpos contra la enfermedad de Newcastle y Bronquitis infecciosa aviar, estos se transfirieron entre un 31 y un 41% (Hamal *et al.*, 2006).

Respecto a la capacidad protectora de los anticuerpos maternos, en pollos, frente a una infección con S.E., los trabajos indican resultados variables. En 1994 se estudió el uso de vacunas vivas y vacunas muertas contra S.E. fagotipo 4 en gallinas ponedoras. Para ésto, se consideraron grupos de aves vacunadas con vacuna viva, con vacuna muerta, o con una combinación de ambas. Como resultado se obtuvo que el aislamiento de S.E. tanto en las cáscaras como en el contenido del huevo fue significativamente menor en los huevos provenientes de aves vacunadas, siendo la combinación de vacuna viva con vacuna muerta lo que otorgó mayor protección a las ponedoras (Nassar *et al.*, 1994).

Otros autores señalan que la vacunación materna con vacunas muertas no reduce significativamente la excreción de *Salmonella* en la progenie, aunque si reduce la mortalidad (Barrow, 2007).

Ávila *et al.* (2006) estudiaron el efecto de la vacunación materna en la infección de pollos Broiler desafiados con S.E. en el primer día de vida. Para ésto, se utilizaron 3 grupos de reproductoras; un grupo control, que no fue vacunado (VAC-CTL), un grupo de aves vacunadas intramuscularmente a las 12 y 16 semanas de vida (VAC-IM) y el último grupo, el cual fue vacunado intraperitonealmente a las 12 semanas e intramuscularmente a las 16 semanas de vida (VAC-IP). Para este estudio se utilizó una vacuna comercial inactivada. El desafío para cada uno de los grupos se realizó mediante pollos “sembradores” (“seeder” para transmisión horizontal), infectados con distintas dosis de S.E. y enfrentados a las aves susceptibles a distintos tiempos. La efectividad

evaluada por bacteriología cuantitativa (UFC/g) de ciego e hígado a los 3, 5 y 7 días post-infección (p.i) demostró que no hay diferencias importantes en el número de ciegos positivos ni en la cuantificación de *Salmonella* spp. en los pollos de madres vacunadas (promedio $7,8 \log_{10}$ UFC) y de madres no vacunadas ($7,15 \log_{10}$ UFC), por ende se infiere que la vacunación materna no tuvo efectos en cuanto a la colonización en el ciego. La evaluación del hígado como indicador de la infección sistémica demostró que esta depende de la dosis de S.E. recibida y del tiempo transcurrido entre que las aves fueron colocadas en sus unidades y enfrentadas al desafío. Así, las aves que recibieron altas dosis ($1,6 \times 10^8$ UFC) y expuestas en un corto tiempo muestran rápidamente infección sistémica, en cambio en los grupos que recibieron menores dosis ($1,8 \times 10^6$ ó $1,2 \times 10^4$ UFC) y a un mayor tiempo de espera, la infección sistémica se presentó a los 5 y 7 días p.i. En los grupos que recibieron las menores dosis hay un efecto significativo de la vacunación materna a los 5 días p.i. Los autores describen que solo el 41,7% de las aves VAC-IP muestran la bacteria en el hígado, en cambio los VAC-CTL y los VAC-IM muestran el 100% de positividad. A los 7 días p.i. no se observaron diferencias significativas, probablemente por la baja cantidad de anticuerpos maternos.

Otro estudio se realizó para verificar los resultados de la vacunación con bacterina Layermune (Biomune vaccine), vacuna diseñada para brindar protección contra S.E. Se realizó vacunación a gallinas de 12 y 18 semanas de edad y transcurrido 21 semanas fueron recogidos los huevos e incubados para el desarrollo de la investigación. El desafío se realizó mediante transmisión horizontal a los tres días después de la eclosión. Las aves sembradoras fueron infectadas con 10^5 UFC de *S. Typhimurium* o *S. Heidelberg*. A las 2, 4 y 6 semanas después del desafío, se escogieron aves al azar para ser eutanasiadas y realizar un análisis bacteriológico cuantitativo (UFC/ml) de ciego. Los resultados fueron concluyentes; aunque la vacunación materna fue efectiva al evaluar títulos de anticuerpos contra S.E en pollos y gallinas, los anticuerpos no tuvieron impacto en la colonización cecal de las aves evaluadas ($4,2 \log_{10}$ UFC/ml en el control v/s $4,4 \log_{10}$ UFC/ml) (Chambers y Lu, 2002). Una explicación para estos resultados es que la vacunas muertas contra *Salmonella* puede proteger a los pollos contra la invasión de órganos internos pero falla en el

control de la colonización intestinal, responsable de la diseminación del patógeno (Cerquetti y Gherardi, 2000).

En el año 1968, Solomon ya planteaba la idea de que los anticuerpos no parecen ser protectivos en infecciones por *Samonella* en las aves (Solomon, 1968) y, en 1973 se demostraba que los anticuerpos maternos de ambas clases, Ig Y e Ig M son transmisibles al embrión (Kramer, 1973), pero no se vió ninguna evidencia de que éstas produzcan protección.

Actualmente, los programas de vacunación contra *Salmonella* usando vacunas muertas en las reproductoras y una vacuna viva a temprana edad en la vida de su progenie ha ganado popularidad en la industria avícola. Sin embargo, existiría una potencial interferencia con las inmunoglobulinas maternas que neutralizarían la vacuna viva dada tempranamente. Por esta razón, en el año 2007, Bailey *et al.* realizaron un estudio para evaluar la efectividad de la vacunación temprana con una vacuna viva de *Salmonella* en presencia de anticuerpos maternos. El desafío con *Salmonella* se realizó a los 3, 13 y 34 días con 1 ml de una suspensión de 10^7 - 10^8 UFC/ml de S.E. y S.T. La respuesta inmune humoral intestinal (Ig A e Ig G) también fue medida en los días nombrados anteriormente y el recuento de *Salmonella* fue medido a los 7 días post desafío. La vacunación de las reproductoras consistió en una vacuna muerta de S.E. o una vacuna muerta trivalente (S. Heidelberg, S. Kentucky y S. Berta) colocada a las 40 y 43 semanas de vida, y los huevos se retiraron a las 46 semanas. Al nacer, algunos pollos recibieron una vacuna viva de S.T. La experiencia demostró que no hay efectos protectivos de los anticuerpos maternos, excepto cuando se combina con una vacuna viva dada a la progenie. Esta combinación resulta en la reducción de la invasividad después del desafío, demostrado por la reducción del recuento de *Salmonella* en el “pool” de órganos. Además, con esta experiencia se demostró que la Ig G es la inmunoglobulina materna prevalente y además que las dos dosis de la vacuna muerta en las reproductoras inducen Ig G pero no Ig A en la progenie. Por otra parte, los investigadores no fueron capaces de demostrar interferencia con los anticuerpos maternos en el tratamiento temprano con la vacuna viva.

Aunque han sido variadas las medidas de control utilizadas por el sector avícola aún no se ha conseguido la disminución necesaria en los recuentos bacterianos ni en la incidencia de la infección por S.E. Es por este motivo que hoy en día aparecen diversas alternativas de control, como es el uso de bacteriófagos. Estos últimos han renacido como una interesante alternativa con resultados promisorios en el control de la bacteria.

BACTERIÓFAGOS

Los bacteriófagos son virus que infectan células bacterianas. Su naturaleza general es similar a otros virus, ya que constan de un ácido nucleico (ADN o ARN) y una cubierta proteica; algunos contienen lípidos en su envoltura. La taxonomía de los bacteriófagos se basa en su forma y en su tamaño, como también en su ácido nucleico, constituyendo el orden Caudovirales y 3 familias, *Siphoviridae*, *Myoviridae* y *Podoviridae* (Dabrowska *et al.*, 2005). La mayoría de ellos contienen como ácido nucleico ADN que puede ser de cadena doble o simple, o bien ARN, de cadena doble o simple (Skurnik y Strauch, 2006).

La historia de su descubrimiento ha sido controvertida, ya que decidir cual investigador los descubrió primero fue producto de largos debates. En 1896 un bacteriólogo inglés, Ernest Hankin, sugirió que una sustancia no identificada en las aguas de unos ríos en India, era responsable de una actividad antimicrobiana que evitaba la diseminación de una bacteria (actualmente *Vibrio cholerae*). Dos años después, Gamaleya, bacteriólogo ruso, observó un fenómeno similar mientras trabajaba con *Bacillus subtilis*. Fue el médico bacteriólogo Frederick Twort, quien casi 20 años después de la observación de Hankin, reporta un fenómeno similar y plantea la hipótesis que puede deberse a un tipo de virus, dentro de otras posibilidades. Por diversos motivos este investigador no pudo seguir con sus estudios, y pasaron 2 años más para que los bacteriófagos fueran oficialmente descubiertos por Felix d'Herelle, microbiólogo del Instituto Pasteur de París. El descubrimiento de d'Herelle se realizó gracias al estudio de severos brotes de disentería hemorrágica en tropas francesas en Maisons-Laffitte

(París) ocurridos en 1915. Una parte de sus estudios fue buscar una vacuna contra la bacteria causante de la disentería; sembró muestras de heces de los pacientes en agar para realizar observaciones acerca del crecimiento de la bacteria. En estos cultivos, el microbiólogo observó unas pequeñas áreas transparentes carentes de desarrollo bacteriano, a las que denominó “taches” o placas. Un año después, el investigador con su esposa deciden nombrarlo como bacteriófago, nombre formado por bacteria y fago, tratando de dar a entender que el fago devora o come bacterias (Sulakvelidze *et al.*, 2001).

Este tipo de virus, predadores de bacterias, se pueden encontrar en forma abundante en todos los hábitat donde se encuentren sus hospederos, así se ha estimado que por cada célula bacteriana hay 10 bacteriófagos (Skurnik y Strauch, 2006). Estimaciones de la frecuencia de los fagos en hábitat acuáticos indican que su número total es aproximadamente 10^{31} partículas virales (Dabrowska *et al.*, 2005). Es por esta razón que algunos investigadores sugieren que los fagos pueden jugar un rol en la mantención de la diversidad de comunidades naturales de bacterias (Brockhurst *et al.*, 2006).

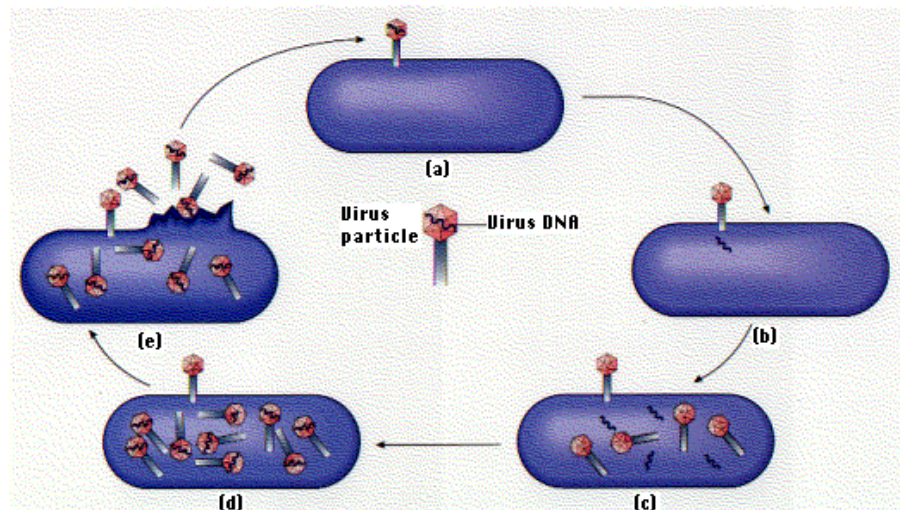
Además de encontrarse en diversos ambientes, también se les ha descrito en seres vivos, por ejemplo, se les puede encontrar en piel, saliva, heces y sangre. Los bacteriófagos son comunes en el tracto gastrointestinal y junto con sus bacterias hospederas, son un importante componente de la flora del intestino (Dabrowska *et al.*, 2005).

Los bacteriófagos pueden presentar dos efectos sobre las bacterias: producir su lisis (fagos líticos, ciclo lítico), o bien introducir su material genético en el genoma bacteriano quedando en condición de latencia o profago por prolongados periodos (fagos lisogénicos, ciclo lisogénico) (Skurnik y Strauch, 2006).

Dentro del ciclo lítico se pueden distinguir las siguientes etapas (ver figura N°1):

- 1.- Adsorción del bacteriófago a la célula bacteriana a través de un receptor específico: cápsula bacteriana, diferentes partes del lipopolisacárido (LPS), flagelos, fimbrias y proteínas de superficie. La bacteria sin su receptor específico no puede ser atacada.
- 2.- Inyección del ácido nucleico al interior de la bacteria.
- 3.- Expresión de los genes virales tempranos del bacteriófago y síntesis de las proteínas tempranas, la mayoría implicada en la replicación del genoma del virus y en disminuir la biosíntesis bacteriana, disminuyendo la síntesis de ARN y proteínas.
- 4.- Replicación del genoma del bacteriófago.
- 5.- Expresión de las proteínas tardías del bacteriófago implicadas en la formación de nuevas partículas virales y lisis de la bacteria hospedera.
- 6.- Ensamblaje de las partículas virales (cabeza, cola y genoma).
- 7.- Lisis de la bacteria hospedera y liberación de la nueva progenie de bacteriófagos.

Figura N° 1: Ciclo lítico de un bacteriófago



Fuente: <http://users.rcn.com/jkimball.ma.ultranet/BiologyPages/L/Luria.html>, 2004.

La habilidad de los bacteriófagos de lisar bacterias al final de su ciclo es la piedra angular que sustenta la idea de usar los bacteriófagos como agentes terapéuticos

(Skurnik y Strauch, 2006). La fagoterapia tiene diversas ventajas y desventajas. Dentro de las ventajas se describen:

- Crecimiento exponencial de las partículas virales con una dosis, ya que el fago se multiplica en el sitio de infección bacteriana. El tipo de cinética de los fagos se diferencia de los antimicrobianos en su capacidad de replicación, con lo cual se logran efectos sólo con un pequeño inóculo inicial. Al respecto, se pueden distinguir infecciones fágicas primarias, o sea infección de la bacteria por el inóculo inicial (fagoterapia pasiva) e infecciones fágicas secundarias, entendiendo ésta como la infección de las bacterias por los bacteriófagos producidos de las lisis de células ya infectadas (progenie viral). El incremento en el número de bacteriófagos vía replicación, se denomina fagoterapia activa. La cinética de la terapia activa, tiene un paralelismo con la dinámica de población de modelos ecológicos predador-presa y de modelos epidemiológicos huésped-parásito (Payne y Jancen, 2003).
- Alta especificidad frente a células bacterianas. Algunos estudios de toxicidad en animales de experimentación (pollos, ratones) se han realizado con fagos, no mostrando efectos tóxicos ni reacciones adversas en los animales (Gill *et al.*, 2006; Xie *et al.*, 2005). Además, se le reconoce ser inocuo para el hombre, toda vez que recientemente se aprobó el uso como aditivo en alimentos de consumo humano (Bren, 2007). Se han realizado estudios de ingeniería genética para corroborar si un bacteriófago puede entrar y lisar a una célula mamífera. Para esto, se ha introducido en el genoma fágico un gen de una proteína de un adenovirus capaz de adherirse a integrinas (receptor) presentes en células eucariotas. Si bien, el fago híbrido logró entrar a la célula mamífera, no fue capaz de replicarse, con lo que se pudo concluir que la especificidad del fago no es dada sólo por un receptor específico, sino también por la maquinaria enzimática bacteriana (Dabrowska *et al.*, 2005). Gorski *et al.*, (2003), plantean una hipótesis sobre la acción beneficiosa de ciertos bacteriófagos en células cancerígenas. Observaron que fagos que contienen una proteína en particular, son capaces de adherirse a integrinas presentes en células de melanoma murino y humano, donde la unión indujo una inhibición de la metástasis “*in vitro*”.

- **Mantenimiento de bacteriófagos por largos periodos en la circulación sanguínea.** En 1996, Merrill *et al.*, descubren bacteriófagos mutantes, denominados “bacteriófagos de larga circulación” que son capaces de resistir la acción del sistema retículo-endotelial (encargado de la remoción de los virus del hospedero), situación que les permitiría mantenerse activos por mayor tiempo en circulación.
- **Reducción de infecciones secundarias.** Según Sklar y Joerger (2001), es posible que el tratamiento con bacteriófagos reduzca la incidencia de infecciones secundarias bajo ciertas condiciones. En el estudio realizado por Xie *et al.* (2005) el grupo de pollos tratados con bacteriófagos mostró resistencia a otras enfermedades intestinales, como por ejemplo infección de la bursa. En este caso, la explicación podría ser que el tratamiento con bacteriófagos es tan específico que no afecta otros microorganismos, lo que mantiene un favorable balance de la flora bacteriana intestinal (Xie *et al.*, 2005).
- **Resistencia bacteriana.** Las bacterias pueden generar mutaciones que expresen resistencia frente a los fagos líticos (Carlton, 1999). Respecto a este tema, Skurnik y Strauch (2006) señalan que en una población bacteriana de 10^6 a 10^8 bacterias, hay una alta posibilidad de encontrar bacterias mutantes fago resistentes, cuyo receptor mutado no es reconocido por el virus. Esta situación no siempre es desventajosa, ya que si el receptor mutado correspondiera a un factor de virulencia (por ejemplo LPS), la bacteria podría disminuir e incluso perder su virulencia. Por otra parte, los fagos también experimentan mutaciones y algunos pueden actuar sobre las mutaciones bacterianas. Por ejemplo, la cola mutada de un fago puede envolver a un receptor mutado de una bacteria, o el ADN mutado de un fago puede escapar de la lisis por endonucleasas de bacterias mutadas. También se ha desarrollado la estrategia de administrar mezclas de fagos, con lo cual se minimiza la posibilidad de que la bacteria desarrolle resistencia a un bacteriófago en particular y a su vez de encontrar alguna bacteria fago resistente. En relación a este tema, los antibióticos tienen una clara limitación, ya que son estables, químicos inmutables, y por lo tanto no son capaces de adaptarse a mutaciones bacterianas y por ende, se vuelven obsoletos (Carlton, 1999).

La utilización de bacteriófagos también presenta desventajas:

- Se debe usar bacteriófagos sólo cuando exista una concentración bacteriana alta para que éstos puedan replicarse y lisar las bacterias. Si se administran de forma apresurada tenderán a inactivarse por falta de bacterias y se necesitarán mayores concentraciones posteriores (Payne y Jancen, 2003).
- Los bacteriófagos son capaces de inducir respuesta inmune humoral y celular en los organismos vivos. Se han encontrados anticuerpos neutralizantes contra bacteriófagos en el suero de distintas especies animales y calostro de vacas que no han sido estimuladas por fagoterapia. Sólo algunos bacteriófagos son antigénicos y presentan altas frecuencias de anticuerpos anti-fago, situación que parecería ser una desventaja en la fagoterapia. La reacción fago-anticuerpo depende del tiempo y la dosis de fagos (Dabrowska *et al.*, 2005), así Carlton (1999) sugirió administrar altas dosis de fagos para compensar la neutralización por los anticuerpos.
- Los bacteriófagos también actúan con el sistema inmune innato. Esta interacción es muy importante para su remoción en organismos superiores, pudiendo dar origen a baja eficiencia de la fagoterapia (Dabrowska *et al.*, 2005). Se reconoce que este puede ser el mayor problema en la eficacia de la terapia ya que se ha demostrado que una vez administrados los fagos, éstos se reducen en más del 90% en el sistema circulatorio y, aunque se ha postulado que los anticuerpos pueden ser el mayor factor de eliminación de los fagos, se ha determinado en ratones nunca expuestos a bacteriófagos, que el sistema retículo-endotelial es suficiente y altamente efectivo en la remoción de los bacteriófagos (Merril *et al.*, 1996).
- Existencia de barreras físico químicas que disminuyen la interacción bacteria-fago. Un ejemplo de ello se ha observado en terapias donde el fago ha sido administrado vía oral, donde el ambiente gastrointestinal determina que no se produzca el encuentro efectivo entre el bacteriófago y la cepa desafío (Sklar y Joerger, 2001), ya que el bacteriófago puede tener problemas estructurales por las enzimas y condiciones de pH que se

encuentran en el tracto gastrointestinal (Higgins *et al.*, 2007a). Sin embargo, existen experiencias en las cuales los bacteriófagos no fueron inactivados en el tracto gastrointestinal y se pudieron replicar exitosamente en su hospedero (Toro *et al.*, 2005). De todas formas, la neutralización ácida del estómago antes de la administración de los bacteriófagos parece ser un importante factor para la viabilidad de ellos (Atterbury *et al.*, 2007; Higgins *et al.*, 2007a). Estudios han demostrado que la translocación de los bacteriófagos a la sangre es menos efectiva cuando provienen del estómago que cuando provienen de otras secciones del tracto gastrointestinal. Se conoce que algunos bacteriófagos no pueden persistir si se exponen a pH 2 y frente a pH 3 a 7 disminuye su título. Sin embargo, la sensibilidad a bajos valores de pH depende del tipo de bacteriófago (Dabrowska *et al.*, 2005).

En el caso de las bacterias de vida intracelular, como *Salmonella*, ésta al invadir su célula blanco, es protegida de la acción de los bacteriófagos, por esta razón, es que en el estudio de Sklar y Joerger (2001) donde realizan control de *Salmonella* a través de fagoterapia, describen que la bacteria debe ser eliminada antes de invadir las células de su huésped animal.

- Al parecer, el pobre conocimiento acerca de la cinética de los fagos resulta ser otro gran problema (Dabrowska *et al.*, 2005), ya que se deben considerar ciertos parámetros críticos para la fagoterapia, tales como la tasa de adsorción del fago, la cantidad de replications, el periodo de latencia, la dosis inicial de fagos y su eliminación por el sistema retículo endotelial entre otros (Skurnik y Strauch, 2006).
- Problemas en la percepción de los consumidores en relación a la presencia de un “virus” en los alimentos. Esta situación estaría siendo resuelta por Borysowski *et al.* (2006) quienes están utilizando como terapia, proteínas fágicas purificadas (endolisinas) que son las responsables de lisar la célula bacteriana.

Conociendo tanto las ventajas y desventajas de los bacteriófagos, Levin y Bull (2004), plantean que la fagoterapia sólo necesita bajar el número de bacterias infectantes a niveles donde las defensas de los hospederos sean capaces de controlar la situación y que es necesario conocer algunos pre-requisitos antes de hacer ensayos en fagoterapia:

- 1.- La terapia no debe ser ocupada antes de que la biología del fago en cuestión se entienda bien en relación a su hospedero.
- 2.- La preparación del fago debe tomar en cuenta los requisitos de seguridad; es decir, estar libre de bacterias y de sus componentes (endotoxinas).
- 3.- La preparación de fagos debería contener partículas fágicas infectivas, y por ende, validar las condiciones de almacenamiento del producto.
- 4.- El receptor del fago debería ser conocido. En una población bacteriana de 10^6 a 10^8 bacterias hay una alta posibilidad de encontrar mutantes fago-resistentes espontáneas, deficientes en el receptor o con un receptor alterado.
- 5.- La eficacia de la fagoterapia debería ser analizada previamente en un modelo animal ya que cada bacteriófago puede comportarse diferente *in vivo*.

▪ **Investigaciones sobre el uso de bacteriófagos**

El 18 de Agosto de 2006, la FDA (“Food and Drug Administration”) aprobó el uso de una preparación de seis bacteriófagos líticos (LMP-102) para ser utilizado en carnes y productos avícolas listos para comer (“Ready to Eat”), como un agente antimicrobiano contra *Listeria monocytogenes*. Este es el primer paso de la FDA en la regulación del uso de bacteriófagos como aditivos alimenticios, ya que ellos ya estaban aprobados en Estados Unidos sólo para aplicaciones como pesticidas. Actualmente, aún no está permitido el uso de bacteriófagos como “antibioticoterapia” (Bren, 2007).

Diversos estudios de fagoterapia se han realizado para el control de múltiples patógenos, tanto en alimentos como en el sector industrial y clínico. Estos estudios

varían en cuanto a sus resultados, pero la mayoría de ellos tiene a su haber resultados promisorios.

Leverentz *et al.* (2003) lograron reducir las concentraciones de *Listeria monocytogenes* de melones y manzanas infectadas experimentalmente; para ello ocuparon una mezcla de bacteriófagos que logró reducir la contaminación bacteriana de 2,0 a 4,6 unidades logarítmicas (\log_{10}) en los melones en comparación con sus controles. En las manzanas, la reducción fue menor a 0,4 unidades logarítmicas (\log_{10}).

Por otra parte, dado que la carne bovina puede ser contaminada con *E. coli* 0157 durante el beneficio de los animales, se realizó un estudio en el cual el objetivo fue eliminar la bacteria o reducir su incidencia. Para realizar la investigación se inocularon 18 piezas de carne de vacuno con la bacteria y 9 de ellas fueron tratadas con una mezcla de 3 fagos. Como resultado se obtuvo que en 7 de ellas hubo una completa reducción de la bacteria y en las 2 muestras positivas, los recuentos fueron menores a 10 UFC/ml (O'Flynn *et al.*, 2004).

Modi *et al.* (2001), estudiaron la habilidad de S.E. para sobrevivir en presencia de bacteriófagos durante la producción de queso Cheddar y su posterior almacenamiento. Para ello, se inoculó 1 ml de una dosis de 10^4 UFC/ml de S.E. en leche cruda y pasteurizada, la cual fue utilizada para el procesamiento del producto y, luego se agregó 1 ml de los bacteriófagos en una concentración de 10^8 UFP/ml. Los resultados demostraron que la adición de fagos disminuyó el recuento bacteriano en 1 ó 2 \log_{10} en el queso procesado con leche cruda o pasteurizada y, después de 89 días de almacenamiento no se encontró la bacteria en el queso proveniente de leche pasteurizada. Sin embargo, en el día 99 de almacenamiento, en los 2 tipos de quesos sin tratamiento se encontró 10^3 UFC/g de S.E. y, en el proveniente de leche cruda con fagos se obtuvo 50 UFC/g.

En el sector industrial avícola, se han empleado bacteriófagos como herramienta para reducir *Salmonella* en carcasas de pollos Broiler. En una primera experiencia, se

obtuvieron muestras de agua proveniente del enjuague de carcasas previamente contaminadas con 0,5 ml de diferentes dosis de S.E. ($0,92 \times 10^0$, 10^1 , 10^2 y 10^3 UFC/ml) y tratadas con 0,5 ml de diferentes dosis de bacteriófagos (10^6 a 10^{10} UFP/ml). En una segunda experiencia, las muestras fueron carcasas de pollos inoculadas con 31 UFC ó 20 UFC de S.E. y enfrentadas por vía aerosol a una dosis de 5,5 ml del bacteriófago que varió entre 10^4 a 10^{10} UFP/ml. El resultado de la primera experiencia, fue que altas concentraciones del bacteriófago, 10^{10} UFP, reducen significativamente ($p < 0,05$) la recuperación de S.E., entre un 50 a 100% en relación al control, sin considerar la dosis de S.E. inoculada. En cuanto a la segunda experiencia, las carcasas contaminadas con 31 UFC de S.E. y tratadas con $5,5 \times 10^{10}$ UFP/ml de los bacteriófagos (5,5 ml de bacteriófagos por carcasa), presentaron un 85% de reducción en la frecuencia de recuperación de S.E. v/s el control. Cuando las carcasas fueron inoculadas con 20 UFC de S.E. y tratadas con $5,5 \times 10^8$ o 10^{10} UFP/ml del bacteriófago (5,5 ml de bacteriofagos por carcasa), la recuperación de la bacteria se redujo en un 93%. Estos resultados sugieren que es deseable ocupar altas concentraciones de bacteriófagos; hasta el momento no hay evidencias que sugieran no utilizar altas concentraciones de bacteriófagos en seres vivos (Higgins *et al.*, 2005).

Otro estudio dentro del mismo sector avícola es el realizado por Goode *et al.*, (2003), quienes estudiaron la efectividad de una aplicación de bacteriófagos líticos en la reducción de *Salmonella* y *Campylobacter* en la piel de pollos. En la primera experiencia, trozos de piel de pollo se inocularon en la superficie con S.E. en una dosis de 10^3 UFC/ cm^2 y, a la mitad de éstas se les administró los bacteriófagos (10^3 UFP/ cm^2) también en la superficie. Para realizar la bacteriología cuantitativa (UFC/g) se obtuvieron muestras de tres áreas de cada porción de piel de pollo antes del tratamiento y después de 24 y 48 horas post-tratamiento. Los resultados señalaron que cuando se administraron los fagos con una Multiplicidad de Infección de 1 (MOI, relación de cantidad de bacteriófagos por cada bacteria), el recuento bacteriano decreció significativamente ($p < 0,01$) desde $3,91 \log_{10}$ UFC/ cm^2 a $3,27 \log_{10}$ después de 24 horas y, a $2,96 \log_{10}$ UFC/ cm^2 después de 48 horas. En una experiencia posterior, piezas de piel de pollos fueron inoculadas de la misma forma anterior con $3,7 \log_{10}/\text{cm}^2$ de S.E. y

los fagos fueron inoculados para alcanzar una MOI de 100 ó 1000. Los resultados indicaron diferencias significativas ($p < 0,01$), ya que en el grupo control se encontró $4,66 \log_{10}/\text{cm}^2$ de S.E., mientras que en los grupos tratados se obtuvo 2,83 y $1,92 \log_{10}/\text{cm}^2$, respectivamente dependiendo de la MOI utilizada, siendo el recuento más bajo el correspondiente a la MOI más alta. A continuación, se realizó una tercera etapa en la cual las piezas de piel fueron inoculadas con S.E. ($10^2 \text{ UFC}/\text{cm}^2$) y con fagos en una MOI de 10^5 . En este caso el recuento promedio del grupo control fue de $2,03 \log_{10}$, mientras que en el grupo tratado no se aisló la bacteria. La experiencia con *Campylobacter jejuni* demostró resultados similares.

Por último, los autores demostraron que la aplicación de bacteriófagos específicos para S.E. puede proteger a las carcasas contra la contaminación con otros serotipos de la bacteria. Para ello, inocularon piezas de piel de pollo con $10^2 \text{ UFC}/\text{cm}^2$ de S. Heidelberg y S.E. y fueron tratadas con los fagos con una MOI de 10^7 . Los resultados indicaron que el recuento de S. Heidelberg en el grupo control fue $2,07 \log_{10}/\text{cm}^2$ y, en el grupo tratado el recuento bacteriano fue 0. En el caso de S.E., esta disminuyó de $2,23 \log_{10}/\text{cm}^2$ en el grupo control a $0,3 \log_{10}/\text{cm}^2$ en las piezas tratadas (Goode *et al.*, 2003).

En el ámbito clínico también se han realizado estudios sobre fagoterapia. Por ejemplo, se realizó un estudio para controlar la presencia intestinal de *Campylobacter jejuni* en pollos Broiler. Loc Carrillo *et al.*, (2005) inocularon pollos Broiler de 18 días de edad con 1 ml de una dosis de $3 \log_{10}$ a $8 \log_{10} \text{ UFC}/\text{ml}$ de 2 diferentes cepas de *Campylobacter jejuni*. El tratamiento con bacteriófagos fue de 1 ml administrado por vía oral a los 25 días de edad en dosis de $5, 7$ y $9 \log_{10} \text{ UFP}/\text{ml}$. Las aves fueron sacrificadas cada 24 horas y se realizó un recuento bacteriano y viral en el contenido cecal y contenido intestinal. También se obtuvieron muestras de hígado, corazón, páncreas y riñón, para conocer si es posible recuperar la bacteria o los bacteriófagos a partir de un homogenizado de estos órganos. En promedio, los resultados encontrados arrojaron una reducción en el recuento de *C. jejuni* entre $0,5$ y $5 \log_{10} \text{ UFC}/\text{g}$ de contenido cecal, dependiendo de la combinación de fagos y cepas bacterianas,

concentración de fago y del tiempo transcurrido entre la última dosis de fago y las necropsias. En cuanto a los títulos de bacteriófagos encontrados en el contenido cecal en los grupos tratados, estuvieron en el rango de 3,2 a 6,5 \log_{10} UFP/g; esto es consistente con los títulos encontrados en portadores naturales de bacteriófagos (pollos Broiler comerciales, rango entre 3 y 6,9 UFP/g de contenido cecal). En los órganos internos no hubo recuperación viral.

Este mismo año, Xie *et al.* (2005), estudiaron el efecto del bacteriófago Esc-A contra la diarrea causada por *Escherichia coli* en pollos y lo comparan con una terapia antibiótica. Para el ensayo utilizaron 3 grupos de 250 pollos cada uno. El primer grupo recibió 10^5 UFP de bacteriófagos vía oral diariamente; el siguiente grupo recibió Cloromicetina en una dosis de 1 mg/10g de peso; el grupo 3 no recibió tratamientos y correspondió al grupo control. Los porcentajes de muerte y diarrea fueron medidos durante 3 semanas. El grupo tratado con el bacteriófago presentó menor ($p < 0,01$) incidencia de diarrea en comparación con el grupo no tratado (26% v/s 51,6 %). Durante la primera semana, el grupo que recibió bacteriófagos presentó una mortalidad de 1,2% mientras que el grupo control presentó un 14%. En cambio, el grupo tratado con el antibiótico fue menos eficiente, ya que las diarreas se presentaron en el 36% de los animales con una mortalidad de 6%. En la segunda semana, el grupo tratado con bacteriófagos no mostró diarrea, mientras que el grupo control y el grupo tratado con antibiótico alcanzaron el 25%. El porcentaje de mortalidad en la segunda semana fue 5 veces mayor en el grupo no tratado (14,8%) en comparación con el grupo que recibió la terapia con bacteriófagos y dos veces mayor que el grupo control. En la tercera semana del ensayo, sólo en el grupo tratado con antibiótico se observó diarrea y en ninguno de los grupos hubo muerte por la bacteria.

Al año siguiente (Septiembre 2006), se publicó un estudio en el cual el objetivo fue evaluar la eficacia de la fagoterapia para controlar los casos ocurridos naturalmente de mastitis subclínica bovina causada por *Staphylococcus aureus* durante el periodo de lactancia en vacas Holstein en producción. Para el tratamiento, los animales se seleccionaron por su historial de recuento de células somáticas y mastitis por la bacteria

implicada en el estudio. Los animales fueron asignados aleatoriamente para el grupo tratado con bacteriófagos o el grupo que recibió un placebo, y cada grupo separado por partos, frecuencia de aislamiento de la bacteria, y número de cuartos afectados; además, cada subgrupo se dividió en primíparas y multíparas. El régimen de tratamiento consistió en 10 ml de una infusión intramamaria de bacteriófagos, a una concentración de $1,25 \times 10^{10}$ UFP/ml en solución salina, por 5 días consecutivos. El control negativo (placebo) recibió una solución salina por la misma cantidad de días. Muestras de leche de cada cuarto fueron colectadas asépticamente de todas las vacas tratadas entre los 2 y 7 días, 9 a 14 días, 16 a 21 días y 23 a 28 días después del término del tratamiento. Los resultados no fueron alentadores: en el grupo tratado con bacteriófagos, el 16,7% de los casos (cuartos) fueron negativos a la bacteria, mientras que en el grupo que recibió placebo todos los cuartos fueron positivos. Otro objetivo de este ensayo fue la determinación del efecto de los bacteriófagos en cuartos mamarios sanos. Como respuesta se obtuvo que el bacteriófago siguió difundiendo en la leche por más de 36 horas post infusión, sin embargo, no hubo diferencias significativas en el número de células somáticas entre los grupos que recibieron los fagos y los que recibieron un placebo. A las 12 horas post tratamiento hubo un aumento significativo ($p < 0,002$) en las células somáticas entre los grupos tratados y no tratados, aumentando 3 \log_{10} , como respuesta inmune a la administración de fagos (Gill *et al.*, 2006).

▪ **Uso de bacteriófagos en infecciones por *Salmonella* spp.**

Sklar y Joerger, en el año 2001, realizaron un ensayo en el cual utilizan bacteriófagos aislados desde aguas municipales, efluentes de campo y camas de pollos para combatir S.E.

Los ensayos animales fueron 5 y se utilizaron pollos Broiler recién nacidos vacunados contra S.E. e inoculados al primer día de edad con la cepa desafío. Cada ensayo consideró grupos con tratamiento con bacteriófagos y dos grupos controles; un control negativo, el cual no fue infectado con S.E. *nal*^r y no recibió bacteriófagos y un

control positivo que fue inoculado vía oral con 10^4 UFC de *S.E. nal^r* al día de edad, pero no recibieron el tratamiento con bacteriófagos. Todas las aves fueron sacrificadas mediante dislocación cervical el día 14 de edad, obteniendo muestras de ciegos. Se estudiaron distintas variables para llegar a determinar cual era la mejor forma de administración de los bacteriófagos, que lograrse una disminución del recuento de *S.E.* en ciegos. En el primero de sus estudios se midió el efecto de una dosis única de 4 bacteriófagos en forma individual. Cada ave recibió vía oral 10^8 UFP del respectivo virus 3 horas p.i. con *S.E. nal^r*. Los resultados en este ensayo no demostraron diferencias en el recuento de *S.E.* entre ciegos del grupo control y grupos tratados con bacteriófagos. Esto se explicaría porque la dosis de bacteriófagos fue insuficiente. Para contrastar este estudio, los autores investigaron el efecto de administrar una mezcla de bacteriófagos. Para ello las aves fueron divididas en 2 grupos controles y 5 grupos con tratamiento con bacteriófagos; el grupo 1 recibió a través de la comida una mezcla de 3 bacteriófagos en una concentración entre 1 y 2×10^7 UFP de cada uno de ellos. Tres grupos recibieron el bacteriófago en forma individual a través del alimento, a una concentración de 10^7 UFP/g. El último grupo recibió la mezcla de fagos 3 días antes de la necropsia (y no 3 horas p.i. como los otros grupos). Se obtuvieron diferencias significativas entre los grupos que recibieron bacteriófagos (solos o en asociación) y el grupo control, sin embargo las diferencias en el promedio de UFC/g fue menos que $1 \log_{10}$, valor que fue considerado escaso (Sklar y Joerger, 2001).

En el año 2005 también se realizó un estudio ocupando una mezcla de bacteriófagos, en dosis única como agente terapéutico. Para esta experiencia se utilizó una mezcla de 3 bacteriófagos líticos contra *S.E.* fagotipo 4 (PT4) que fueron aislados de gallinas. Se infectaron 3 grupos de 30 aves en el primer día de vida con cepas de *S.E.* PT4 mediante el método de transmisión horizontal para simular condiciones naturales; las aves sembradoras (“seeder”) fueron infectadas con 10^8 UFC de la cepa desafío y se mantuvieron 3 días en contacto con el resto de las aves susceptibles. Posterior a los 3 días, las aves “seeder” fueron eliminadas y se obtuvieron hisopados cloacales del resto de las aves para conocer si existió transmisión horizontal. En los grupos de aves susceptibles se logró un rango de infección entre 93 a 100%. Posteriormente, al día 7 de

edad, fue administrada una dosis de cada bacteriófago correspondiente a 10^{11} UFP vía oral (“cocktail” de 3 bacteriófagos). Cinco aves de cada grupo fueron sacrificadas y necropsiadas cada 5 días de intervalo (días 5, 10, 15, 20 y 25 post tratamiento). La experiencia demostró que el tratamiento con la mezcla de bacteriófagos redujo 3,5 veces las concentraciones de S.E. (UFC/g) en el contenido cecal de las aves comparado con el grupo control, pero estas diferencias no fueron significativas, excepto para las muestras analizadas en el día 20 post tratamiento ($p = 0,0620$). Cuando se intentó el aislamiento de los bacteriófagos en los órganos (hígado y bazo), las aves de los 3 grupos fueron negativas, en cambio, en el ciego se encontraron los virus desde el día 5 post tratamiento al día 20 (Fiorentin *et al.*, 2005).

A diferencia de lo observado en fagoterapias de dosis única, los resultados obtenidos cuando se administran varias dosis de bacteriófagos como terapia suelen ser diferentes. Toro *et al.*, (2005) emplearon 3 bacteriófagos específicos contra *Salmonella* Typhimurium (S.T.) para reducir la colonización en pollos SPF experimentalmente infectados. Las aves recibieron 6 dosis orales de $5,4 \times 10^6$ UFP/0,5ml/ave de una mezcla de bacteriófagos desde el día 4 de vida hasta el día 10. En el día 7 de edad, los pollos fueron desafiados con 0,5 ml de una suspensión de S.T. que contenía $2,4 \times 10^5$ UFC/ml. El día 11 de edad todas las aves fueron eutanasiadas, obteniendo muestras de contenido y pared del íleon, y ciegos para bacteriología cuantitativa (UFC/g) y un “pool” de órganos internos consistente en bazo e hígado para bacteriología cualitativa. Como resultado se observó una reducción del recuento bacteriano en el íleon de los pollos tratados con bacteriófagos, (1,1 UFC/ml v/s 81,8 UFC/ml en el control) y en los ciegos (500 UFC/ml v/s 3000 UFC/ml en el control).

Dentro de otras variables medidas por Sklar y Joerger (2001) se encuentra el efecto de diferentes rutas de entrega de los bacteriófagos. Para el estudio, un grupo de aves recibió los bacteriófagos mezclados con alimento, a una concentración de 10^7 UFP/g de comida administrada *ad libitum* durante toda la experiencia. El otro grupo recibió los bacteriófagos a través del agua de bebida puesta en plato durante solo los primeros 4 días de vida, a una concentración de 10^7 UFP/ml. Los resultados no fueron

significativos, pero la ruta de la comida parece producir los más bajos promedios de recuento cecal ($0,9 \times 10^5$ UFC/g al administrarlos en la comida v/s $9,6 \times 10^5$ UFC/g al administrarlos en el agua).

Uno de los factores más relevantes en relación al éxito de la fagoterapia se refiere a la dosis viral administrada en relación a la dosis bacteriana (multiplicidad de infección o MOI). Sklar y Joerger (2001) enfrentaron una mezcla de bacteriófagos administrada *ad libitum* durante la experiencia (2×10^9 UFP/g de alimento) frente a aves infectadas con 10^4 UFC ó 10^8 UFC de S.E. Como resultado, se encontraron diferencias significativas en el recuento promedio de S.E., entre los controles y las aves tratadas con fagos e infectadas con 10^8 UFC de S.E. *nal'*, no existiendo diferencia en las aves infectadas con 10^4 UFC. Huff *et al.* (2006), también realizaron un estudio en relación a esta variable. Los autores desafiaron pollos de 7 días de edad con 6×10^4 UFC de *E.coli* y a continuación las aves fueron tratadas con diferentes títulos de bacteriófagos (4×10^8 , 10^6 , 10^4 y 10^2 UFP). En una segunda experiencia, similar a la anterior, el desafío se realizó con 9×10^4 UFC de *E.coli* y, el tratamiento con bacteriófagos fue con 3×10^8 , 10^6 , 10^4 y 10^2 UFP. Los resultados fueron similares en las 2 experiencias, ya que sólo la dosis más alta de bacteriófagos (10^8 UFP, MOI 10^4) redujo la mortalidad desde 48 y 47% a 7% en ambos estudios.

Actualmente, se han publicado variados estudios en relación a la fagoterapia, uno de ellos fue el conducido por Atterbury *et al.* (2007), en el cual se utilizan bacteriófagos específicos contra diferentes serotipos de *Salmonella* que colonizan ciegos de pollos Broiler. Para este estudio se seleccionaron bacteriófagos específicos contra S.E., *Salmonella* Hadar y S.T. El ensayo se realizó en tres grupos de pollos, un grupo para cada serotipo de *Salmonella* y, cada grupo fue dividido en cuatro subgrupos; el primero de ellos fue el control de infección, el segundo grupo fue control de bacteriófagos y los dos últimos grupos recibieron el desafío y el tratamiento con los bacteriófagos correspondientes a cada serotipo de *Salmonella*. Los grupos desafiados, recibieron vía oral 1 ml de una suspensión con $8 \log_{10}$ UFC/ml a los 36 días de edad. Los bacteriófagos fueron administrados al día siguiente y fueron inoculadas dos dosis, 9 ó 11

\log_{10} UFP. Tres animales fueron sacrificados cada día por 6 o 3 días dependiendo de la dosis de bacteriófagos inoculada y, de cada animal en particular se removieron los ciegos para recuento bacteriano y de bacteriófagos. Los resultados observados indicaron que cuando se administró 1 ml de $9 \log_{10}$ UFP/ ml de bacteriófagos no hubo reducción significativa de la colonización de *Salmonella* en el ciego en ninguno de los grupos de aves tratadas, a pesar de que hubo un incremento significativo en el título de los virus en el contenido cecal después de 24 horas de la inoculación. Cuando se inoculó 1 ml de una suspensión de bacteriófagos con una concentración de $11 \log_{10}$ UFP/ml, se siguió el tratamiento por sólo 3 días y, con esta dosis se obtuvieron reducciones significativas en la colonización cecal por S.E. ($1,53 \pm 2,38$ UFC/g v/s control $5,77 \pm 1,85$ UFC/g) y por S.T. ($3,48 \pm 1,88$ UFC/ g v/s control $5,67 \pm 0,41$ UFC/g). No hubo reducción significativa entre el grupo tratado y el grupo control cuando el desafío fue con *Salmonella* Hadar.

Otro estudio reciente, lo constituye la investigación realizada por Higgins *et al.* (2007a). En este trabajo se seleccionaron una mezcla de bacteriófagos adaptados al ambiente gastrointestinal, los cuales fueron evaluados *in vivo* en pavos desafiados con S.E. En la primera experiencia, un grupo de aves fue desafiado con 10^4 UFC de S.E. vía oral y recibieron $2,5 \times 10^9$ UFP de la mezcla de fagos por la misma vía. A su vez, otro grupo recibió hidróxido de magnesio 30 minutos antes del tratamiento con bacteriófagos como “buffer” para controlar la acidez del proventrículo. Diez pavos de cada grupo fueron eutanasiados a las 6, 12, 24 y 48 horas después del tratamiento, con el fin de obtener muestras cecales para bacteriología cuantitativa (UFC/g). En la segunda experiencia los pavos recibieron una dosis de $1,6 \times 10^4$ UFC de S.E. y 48 horas después $7,5 \times 10^9$ UFP de bacteriófagos. Un grupo recibió bacteriófagos más hidróxido de magnesio y otro lo mismo, con la diferencia que éste recibió la mezcla de virus durante 24 horas cada 6 horas. Al día siguiente las aves fueron eutanasiadas para calcular UFC/g de S.E. en el contenido cecal. Los resultados demostraron que en la primera experiencia hubo una baja en los recuentos bacterianos, pero las diferencias no fueron significativas en ninguno de los tiempos medidos. Adicionalmente, 48 horas post tratamiento el grupo control declinó las UFC/g de 21,329 a 5,189 y en el grupo que

recibió los bacteriófagos en combinación con el “buffer”, S.E. aumentó, de 4,064 a 227,527 UFC.

En los resultados de la segunda experiencia tampoco se obtuvieron diferencias significativas, por lo que la administración de los bacteriófagos en forma repetida no redujo la recuperación de S.E. Los autores postulan como explicación que la interacción del buffer con los bacteriófagos no permitió que estos se pudieran adherir a sus células hospederas y proliferar. El por qué no funcionó la repetición de las dosis de los bacteriófagos, pudo darse por el estrés que sufrieron los animales por las administraciones repetidas y, posiblemente por la inmunosupresión del grupo; además hubo cambios de comportamiento como canibalismo, lo cual no sucedió en los otros grupos (Higgins *et al.*, 2007a).

Ensayos *in vitro* e *in vivo* se han realizado para comparar distintos bacteriófagos en su habilidad para reducir S.E. Filho *et al.* (2007), compara bacteriófagos aislados desde granjas de pollos comerciales y de plantas de tratamiento de aguas municipales, solos o en combinación con probióticos. En el primero de los experimentos, se estudiaron los bacteriófagos producidos *in vitro*; para ello cada cultivo contuvo 8×10^3 ó 8×10^6 UFC/ml de S.E. y un ml de los diferentes aislados de bacteriófagos en diluciones que estuvieron en un rango de 10^9 a 10^5 UFP/ml. En los resultados, se reveló que usando la dosis de 10^3 UFC/ml, tanto los bacteriófagos provenientes de pollos comerciales o de plantas de tratamiento de aguas en todas sus diluciones, fueron capaces de reducir significativamente la bacteria ($p < 0,05$) en comparación con el control, en cambio, cuando se utilizó la dosis de 10^6 UFC/ml, sólo las diluciones de bacteriófagos provenientes de pollos comerciales fueron capaces de reducir significativamente la bacteria después de 2 horas de incubación, no así después de 6 horas. Sin embargo, los bacteriófagos provenientes de plantas de tratamiento de aguas, en todas sus diluciones fueron eficaces al reducir S.E. en 5 a 6 log₁₀, después de 2 o 6 horas de incubación y, al colocar 10^9 UFP/ml de los virus en el cultivo con la bacteria, la recuperación de esta fue nula.

En la segunda experiencia se utilizaron pollos de un día de edad, los cuales fueron desafiados con 3×10^3 UFC de S.E. vía oral. Las aves se dividieron en 4 grupos; el primero fue el control, por lo que no recibió tratamiento. El segundo recibió cloacalmente los bacteriófagos de plantas de tratamiento de aguas en una dosis de 10^9 UFP/pollo, una hora después del desafío. El tercer grupo fue tratado con la misma dosis y vía de bacteriófagos, pero además se agregó 2×10^6 UFC de probiótico vía cloacal 2 horas después del desafío. El último grupo recibió sólo el probiótico vía cloacal (2×10^6 UFC) 2 horas post desafío. Los animales fueron eutanasiados 24 horas después del tratamiento, se recolectaron las tonsilas cecales para análisis cualitativo de la bacteria. En cuanto a los resultados, estos demostraron que ambos tratamientos, bacteriófagos o probiótico, reducen significativamente la recuperación de la bacteria ($p < 0,05$) en relación con el control (control: 80%; bacteriófagos: 36%; probiótico: 48%). Cuando los tratamientos son dados en conjunto, también hubo una reducción significativa de la bacteria (36%), pero no hubo un efecto aditivo.

En la última experiencia, los autores estudiaron la efectividad de los bacteriófagos al administrarlos vía oral. Para ello, pollos de un día de edad fueron desafiados con 9×10^3 UFC de S.E. y, una hora después fueron tratados con 10^8 UFP de bacteriófagos, con la diferencia de que un grupo recibió los fagos provenientes de la planta de tratamiento de aguas, otro recibió los fagos provenientes de pollos comerciales y el último grupo recibió la mezcla de ambos. Los animales fueron eutanasiados 24 o 48 horas después del tratamiento y se obtuvieron tonsilas cecales para bacteriología cualitativa. Los resultados señalaron que los 2 tipos de bacteriófagos o la combinación de ellos fueron capaces de reducir significativamente ($p < 0,05$) la recuperación de la bacteria 24 horas después del tratamiento. Se encontró una disminución en la incidencia de infección de hasta un 55% v/s el control donde se obtuvo un 100% de infección, sin embargo, 48 horas después del tratamiento no se encontraron reducciones significativas en la incidencia (Filho *et al.*, 2007).

Chile no se ha quedado atrás en cuanto al estudio de control de *Salmonella* utilizando bacteriófagos. En el año 2004, Santander y Robeson, estudiaron a los

bacteriófagos como protección contra la infección por S.E y *Salmonella Pullorum* (S.P.). Para ello ocuparon el nemátodo *Caenorhabditis elegans* como modelo animal, por su susceptibilidad a la infección y posterior muerte producida por estas bacterias. Para el ensayo se utilizaron los bacteriófagos $f3a$ S.E. y $f3a$ S.P., activos contra S.E. y S.P., respectivamente. Los resultados fueron promisorios, ya que al incorporar los bacteriófagos a los nemátodos, y posteriormente enfrentarlos con la bacteria, se redujo significativamente la mortalidad de los nemátodos en relación a los animales controles. Por los resultados obtenidos, los autores sugirieron que este tipo de bacteriófagos pueden ser usados en pollos para la profilaxis contra la contaminación con S.E. en conjunto con otras medidas de control (Santander y Robeson, 2004).

En el mismo año, Borie *et al.*, (2004), realizaron un estudio preliminar, para el cual se ocuparon 15 pollos Broiler inoculados a los 10 días de edad con diferentes dosis del bacteriófago $f3\alpha$ S.E. Después de 10 días de la inoculación se efectuó el sacrificio de las aves y se procedió al reaislamiento de la cepa desafío a partir del intestino y un “pool” de órganos (hígado, corazón y bazo). En relación a los resultados obtenidos se indica que al inocular el bacteriófago con una multiplicidad de infección de 1 UFP, disminuyó en forma significativa ($p < 0,05$) el número de aislamientos de S.E. desde el “pool” de órganos v/s el grupo control, pero no así desde intestino. El fago administrado a una multiplicidad de infección de 10^1 UFP disminuyó significativamente el aislamiento de la cepa a nivel intestinal v/s el control ($p < 0,05$) no ocurriendo lo mismo en los órganos internos.

Dos años después, se realizó una experiencia en la cual se utilizaron pollos SPF, los cuales a los 10 días de edad recibieron por vía oral una mezcla de 3 bacteriófagos líticos (10^8 UFP/ml), aislados de muestras fecales y aguas servidas del sector avícola nacional. Seis horas después de la inoculación de la dosis de bacteriófagos fueron desafiados con una dosis de $8,3 \times 10^5$ UFC de S.E. *nal^r rif^r*. El sacrificio de las aves se realizó 10 días después y, de la necropsia se obtuvieron muestras de intestino completo y “pool” de órganos (hígado, bazo, corazón) para el reaislamiento la cepa desafío. Esta mezcla logró disminuir la incidencia y el recuento de S.E. en el intestino de pollos, ya

que la cepa desafío se reisló en un 60% en los pollos tratados, mientras que en el control el reislamiento alcanzó el 80%. Además esta mezcla de bacteriófagos disminuyó el recuento promedio en el intestino desde 8,4 log₁₀ a 5,7 log₁₀ (Borie *et al.*, 2006).

Considerando que el uso de bacteriófagos constituiría una herramienta efectiva para el control de *Salmonella* y, que en Chile se haya demostrado su efectividad en el control de S.E. en pollos SPF experimentalmente infectados, parece interesante determinar el efecto de los bacteriófagos en pollos comerciales, esperando que el efecto complementario entre los anticuerpos maternos y los bacteriófagos, disminuyan el número de aves infectadas, así como también reduzcan el recuento de *Salmonella* a nivel cecal.

OBJETIVO GENERAL

Determinar la efectividad de una mezcla de bacteriófagos sobre la colonización de *Salmonella* spp. en aves comerciales, provenientes de madres vacunadas.

OBJETIVOS ESPECÍFICOS

1.- Determinar la efectividad de la vacunación materna frente al desafío temprano de *Salmonella* Enteritidis en pollos comerciales.

2.- Determinar la efectividad de la vacunación materna asociada a una terapia con bacteriófagos, en la incidencia de la infección por *Salmonella* Enteritidis en pollos comerciales.

3.- Cuantificar la reducción cecal de *Salmonella* Enteritidis en pollos comerciales, provenientes de madres vacunadas, dosificados con una mezcla de bacteriófagos.

MATERIALES Y MÉTODOS

- Diseño experimental

El presente trabajo se efectuó como parte del proyecto Fondecyt 1060569 “Biocontrol de *Salmonella* spp. en Medicina Veterinaria mediante el uso de Bacteriófagos.” Durante el primer año de este proyecto (2006) se determinó que el uso de una mezcla de 3 bacteriófagos fue más eficiente que su dosificación en forma individual y que la vía de administración en aerosol produjo los mejores resultados. Por esta razón, este estudio continuó con la metodología que obtuvo los mejores resultados y fue realizada en su totalidad en el Departamento de Medicina Preventiva Animal, Facultad de Ciencias Veterinarias y Pecuarias de la Universidad de Chile.

- Aves

Se utilizaron pollas comerciales de reposición Leghorn de un día de edad, provenientes de madres vacunadas contra S.E. de un plantel de aves de postura de la Región Metropolitana. Las aves se mantuvieron en la unidad de animales experimentales, del Departamento de Medicina Preventiva Animal, durante el transcurso de todo el estudio. Al segundo día de vida, se obtuvo un “pool” de muestras fecales por jaula (10 jaulas con 15 aves cada una), las cuales se sometieron a la técnica de Reacción de Polimerasa en Cadena (PCR) para corroborar la ausencia de *Salmonella* spp. Al quinto día de vida, para corroborar la presencia de anticuerpos maternos contra S.E., se obtuvo suero de 5 aves por punción cardiaca, los cuales fueron analizados por la técnica de ELISA (Idexx) por un laboratorio privado (Agrovet).

A las aves les fue proporcionado alimento comercial sin antibióticos y agua *ad libitum* durante todo el tiempo que se mantuvieron en la unidad de animales experimentales. Además se mantuvieron las condiciones de temperatura y humedad necesarias para el buen desarrollo de la especie.

El tamaño de cada grupo experimental (30 aves) se obtuvo considerando que el aislamiento de *Salmonella* es $P = 0,8$ (de acuerdo a ensayos anteriores) con un error de $\pm 0,15$ y un nivel de confianza de 95%.

- Cepa desafío

Se utilizó una cepa nativa de *Salmonella* Enteritidis de origen aviar, donada en el año 2002 por la Dra. Irma Acevedo, del Laboratorio de Bacteriología del Servicio Agrícola Ganadero (SAG). Desde entonces la cepa ha recibido 9 pasajes (P-9) en pollos para exacerbar su virulencia. Se seleccionó una mutante espontánea con resistencia a ácido nalidíxico (*nal^r*) y rifampicina (*rif^r*) (S.E. *nal^r rif^r*) en el Laboratorio de Bacteriología del Instituto de Biología de la Universidad Católica de Valparaíso.

- Bacteriófagos

Se utilizó una mezcla de 3 bacteriófagos líticos nativos, denominados fagos E2, E16 y F18, aislados de aguas residuales de plantas avícolas de la V Región. Los bacteriófagos fueron aislados, caracterizados y preparados por el Dr. James Robeson de la Pontificia Universidad Católica de Valparaíso. La dosis utilizada correspondió a una multiplicidad de infección (MOI) de 10^3 UFP, la cual fue suspendida en agua destilada estéril y dosificada a los pollos (aproximadamente 10 ml/pollo) mediante aerosol con una gota inferior a 20 μm (Desvac®).

- Dosis Mínima Infectante (DMI)

Para determinar la dosis mínima infectante, se utilizaron 40 pollas comerciales de reposición Leghorn provenientes de un plantel con vacunación contra S.E. A los 7 días de edad, se separaron en 4 grupos de 10 pollas cada uno y se mantuvieron en cubículos separados. Cada grupo fue inoculado con diferentes dosis de *Salmonella* Enteritidis *nal^r rif^r* P-9. El inóculo se preparó cultivando la cepa (S.E. P-9) en caldo común durante 24 horas a 37°C. Luego, se ajustó por turbidez al tubo N° 0.5 del Nefelómetro Mc Farland ($1,5 \times 10^8$ bacterias/ml) con suero fisiológico estéril, a partir del cual se realizaron diluciones teóricas al décimo en suero fisiológico, desde 10^6 hasta 10^3 bacterias/ml. Las

4 diluciones preparadas fueron inoculadas por vía oral forzada (foto N°1) en aves de 7 días de edad.

Para determinar las Unidades Formadoras de Colonias/ml (UFC/ml) presentes en el inóculo, se procedió a realizar un recuento bacteriano en placas de agar XLD (Difco®) adicionado de ácido nalidíxico (Laboratorio Chile, 20 µg/ml) y rifampicina (Laboratorio Chile, 20 µg/ml).

Foto N° 1: Inoculación oral forzada de S.E. en pollos.



Diez días post inoculación, se realizó el sacrificio de las 40 aves mediante dislocación cervical (Beaver, 2001), extrayendo como muestras el intestino completo y “pool” de órganos internos (hígado, corazón y bazo) para procesarlas en forma individual. Estas muestras se depositaron en bolsas plásticas limpias, se agregó 100 ml de caldo Rappaport-Vassiliadis (R-V) (Difco®) y se homogeneizó en el equipo Masticator (IUL Instrument) durante 180 segundos. Posteriormente, las muestras se incubaron a 37° C durante 72 hrs resembrando el caldo cada 24 hrs. en placas de agar XLD con antimicrobianos.

La DMI fue aquella mínima concentración bacteriana que logró más de un 85% de infección en las aves, independiente del tipo de muestra (intestino y/o “pool” de órganos internos).

❖ **Determinación de la eficiencia de bacteriófagos en pollos comerciales infectados experimentalmente con S.E.**

- Grupos experimentales: se utilizaron 5 grupos de 30 pollas de reposición Leghorn en cada uno de los grupos (cuadro N°1).

Cuadro N°1: Distribución de grupos experimentales de pollos tratados con bacteriófagos e inoculados con S.E..

Grupo	N° de aves	Anticuerpos maternos	Bacteriófagos (MOI)	Dosis de S.E.
1: Control Negativo	30	+	----	----
2: Control de Infección aves SPF*	30	-	----	1 DMI
3: Control de Infección aves comerciales	30	+	----	1 DMI
4: Terapia con BF en aves SPF*	30	-	10 ³ UFP	1DMI
5: Terapia con BF en aves comerciales	30	+	10 ³ UFP	1 DMI

BF: bacteriófagos; DMI: dosis mínima infectante; MOI: multiplicidad de infección; S.E.: *Salmonella* Enteritidis

(*) Huevos SPF provenientes de la Universidad Austral de Chile, que fueron incubados en el bioterio de Producción Animal, a cargo de la Dra. Mónica Osorio, del Servicio Agrícola y Ganadero de Chile, Ministerio de Agricultura.

En el día 6 de vida, las aves de los grupos con terapia (grupos N° 4 y 5) recibieron la dosis de los 3 bacteriófagos (MOI 10³ de cada uno) vía aerosol 2 veces en el día, con 6 horas de diferencia y, al día 7 de edad se realizó el desafío con 1 DMI de

S.E. en todos los grupos, exceptuando el control negativo (grupo N°1). Las aves de los grupos tratados con bacteriófagos (grupos N° 4 y 5) fueron criadas en una sala experimental completamente separada de los otros grupos para evitar una posible contaminación del resto de las aves con bacteriófagos.

Después de la inoculación con S.E. las aves se mantuvieron bajo estrictas normas de bioseguridad, donde el personal que manejó a las aves tratadas con bacteriófagos fue diferente a los que trabajaron con las aves desafiadas con S.E. pero que no recibieron bacteriófagos.

Las aves fueron sacrificadas 7 días post desafío (14 días de edad), mediante dislocación de la región cervical (Beaver, 2001); se les realizó la necropsia y se obtuvieron muestras individuales de ciegos y un “pool” de órganos internos (hígado, bazo, corazón). Cada muestra individual fue colocada en una bolsa limpia con caldo R-V (Oxoid®) en razón aproximada a 1:100. Con ambos tipos de muestras se procedió a realizar bacteriología cualitativa y con los ciegos se realizó además un estudio de bacteriología cuantitativa (UFC/g) sólo a 15 aves de cada grupo. Todos los análisis bacteriológicos se realizaron siguiendo las pautas recomendadas por Murray y Barton (1993).

- Bacteriología Cualitativa:

Para realizar la bacteriología cualitativa, el contenido de cada bolsa fue homogenizado en un equipo Masticador (IUL Instruments) por 180 segundos e incubado en una estufa a 37°C por 48 y 72 horas. A partir del caldo R-V con 48 horas de incubación se tomaron 3 asadas de su contenido y fueron sembradas en agar XLD (Difco®) con 20 µg/ml de ácido nalidíxico y rifampicina (Arlab®). Cuando la muestra incubada por 48 horas resultó negativa al cultivo, se procedió a resembrar el caldo R-V a las 72 horas de incubación. A toda colonia sospechosa (centro negro y borde transparente) se le realizó una batería bioquímica corta y aglutinación con suero poli A-I y Vi (Difco®).

- Bacteriología Cuantitativa:

Con las muestras cecales se realizó recuento de colonias (UFC/g) de la cepa desafío; para este análisis se utilizó 1 ml del homogenizado en caldo R-V sin incubar, al cual se agregaron 9 ml de agua peptonada tamponada (pH 7.2, Oxoid), a partir de ella se realizaron 4 diluciones al décimo en el mismo medio y de cada dilución se obtuvo 1 ml que se homogenizó con agar XLD con ácido nalidíxico y rifampicina (20 µg/ml). Luego de 24 horas de incubación a 37°C se procedió al recuento de colonias. Aquellas muestras negativas (ausencia de colonias en todas las diluciones) fueron procesadas nuevamente a partir del caldo R-V incubado por 24 horas a 37°C, siguiendo el mismo esquema descrito.

- PCR convencional para la detección de S.E.

Todas las muestras negativas por cultivo tradicional (bacteriología cualitativa) se procesaron para realizar la detección molecular de S.E. mediante PCR convencional (Malorny *et al.*, 2003). Esta técnica se utilizó ya que presenta una mayor sensibilidad (10^1 UFC/ml, Sánchez, 2007) que la del cultivo tradicional (10^3 UFC/ml). Se utilizaron los siguientes cebadores o *primers* (Fermelo®) que amplifican una secuencia asociada al gen *invA* (fragmento de 284 pares de bases):

InvA1: 5'GTG AAA TTA TCG CCA CGT TCG GGC AA 3' (26pb)

InvA2: 5'TCA TCG CAC CGT CAA AGG AAC C3' (22pb)

- *Fase de extracción:* se realizó con un “kit” de extracción de ADN (Genomic DNA Purification Kit, Fermentas®) de acuerdo a las recomendaciones del fabricante. Para realizar la extracción, se obtuvo 200 µL de la muestra a la cual se le adicionaron 400 µL de solución de lisis y se incubó a 65°C en un baño termostático por 5 minutos. Posteriormente, se adicionó 600 µL cloroformo y se sometió a centrifugación (Heraeus®) por 2 minutos a 7.500 x g (10.000 rpm). Al sobrenadante se agregaron 800 µL de solución de precipitación y fue nuevamente centrifugado. A continuación el contenido fue vaciado y el pellet de ADN se disolvió en 100 µL de NaCl, al cual se agregó etanol frío y se mantuvo a -20°C por 10 minutos para lograr la precipitación del ADN.

Cumplido el tiempo, se sometió a una última centrifugación a 7.500 x g (10.000 rpm) por 4 min. Para finalizar el proceso, el etanol fue removido y el ADN fue disuelto en 100 µL de agua libre de nucleasas (Winkler®).

▪ *Mezcla de reacción:* En un microtubo de 0,2 ml se mezclaron 12.5 µl de 2X PCR Master Mix (Fermentas®) con 5 µl de la muestra extraída y 5 µl de cada uno de los 2 *primers*. La mezcla total de 27.5 µl, fue colocada en el termociclador (CLP, USA) donde se realizó la amplificación del ADN de la siguiente forma: denaturación inicial a 95°C por un minuto, seguida por 37 ciclos de denaturación de 95°C por 30 segundos, hibridación o “annealing” de 64°C por 30 segundos y extensión a 72°C por 30 seg. Adicionalmente se realizó una extensión a 72°C por 4 minutos. La mantención del producto del PCR se hizo a 4°C.

Para la visualización del producto amplificado, se utilizó una cámara de electroforesis (Apollo Instrumentation) con gel de agarosa (Winkler®) al 2% en buffer Tris acetato EDTA (TAE, Fermentas®), el cual se mezcló de inmediato con 20 µg/ml de Bromuro de etidio (Mercury®). Se obtuvieron 8 µL del producto de PCR, y se mezcló con el buffer de carga (TAE, Fermentas®), el cual contiene glicerol para proporcionar densidad y azul de bromofenol para visualizar la migración del ADN en el gel. La electroforesis se realizó a una velocidad de 90V por 90 minutos o hasta la migración del azul de bromofenol hasta $\frac{3}{4}$ del campo. Como control de tamaño molecular se utilizó un producto de 50bp DNA ladder (Fermentas®), además se utilizó un control positivo (*S.E. nal^r rif^r P-9*) y un control negativo (suero fisiológico). Al finalizar, las bandas de ADN fueron visualizadas en un transiluminador de luz UV (Transiluminator UVP®) y fotografiadas con película Polaroid®.

- Normas de bioseguridad

En el desarrollo de este estudio se trabajó con *Salmonella* no Typhi, por lo que se cumplieron las recomendaciones entregadas por el “Center for Disease Control” (CDC; NHI, 1999) para un nivel 2 de bioseguridad. Para el manejo de las aves se utilizaron overoles desechables, mascarillas, guantes, gorro y botas, que fueron de uso exclusivo

del recinto. Todos los residuos orgánicos sólidos fueron incinerados en la unidad centralizada de incineración de la Facultad de Ciencias Veterinarias y Pecuarias de la Universidad de Chile y los residuos líquidos fueron tratados con 1000 ppm de cloro, para descontaminar y evitar una posible contaminación ambiental o del personal encargado. Como esterilizante de la sala de animales de experimentación se utilizó Asepti-Steryl (Glutaraldehído al 2,5%, Ecolab®). En la técnica de PCR, los geles con bromuro de etidio se manejaron con guantes y se eliminaron a través de incineración.

- Análisis de resultados

Se determinaron las diferencias en la proporción de animales infectados (Bacteriología cualitativa) comparando animales positivos y negativos, independiente del tipo de muestra, mediante la Prueba de Hipótesis de Independencia de X^2 . En el caso de la variable cuantitativa (Bacteriología cuantitativa), las comparaciones fueron realizadas por Análisis de Varianza de un criterio y la prueba de diferencias entre medias de Tukey cuando se observaron diferencias entre los grupos. Para el análisis estadístico de esta variable, toda muestra cuya bacteriología cualitativa fuera positiva pero con bacteriología cuantitativa negativa se le asignó un valor 1 y, muestras negativas en ambos análisis se les asignó valor 0 (Infostat, 2004).

RESULTADOS

La dosis mínima infectante (DMI) correspondió a $2,95 \times 10^5$ UFC/ml. Con ella se logró un 100% de aislamiento de S.E. a nivel intestinal y 60% de aislamiento de en “pool” de órganos internos. Los resultados se detallan en el cuadro N° 2.

El valor promedio de la técnica ELISA informada para los 5 pollos fue de 0,047, valor que fue considerado adecuado de acuerdo al punto de corte de positividad para la técnica (valor < 0,6).

Cuadro N° 2: Bacteriología cualitativa de muestras intestinales y “pool” de órganos internos de pollos experimentalmente infectados con diferentes concentraciones de S.E.

POLLO	Concentración bacteriana UFC/ml							
	10^6		10^5		10^4		10^3	
	Intestino	Órganos	Intestino	Órganos	Intestino	Órganos	Intestino	Órganos
1	(+)	(+)	(+)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)
2	(+)	(-)	(+)	(-)	(-)	(-)	(-)	(+)
3	(-)	(-)	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)
4	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)
5	(+)	(-)	(+)	(+)	(-)	(-)	(+)	(+)
6	(+)	(+)	(+)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)
7	(+)	(-)	(+)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)
8	(+)	(+)	(+)	(+)	(-)	(-)	(-)	(-)
9	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)	(-)	(-)	(-)
10	(+)	(+)	(+)	(+)	(-)	(-)	(-)	(-)
Total aislamientos	90%	60%	100%	60%	30%	20%	30%	40%
Total infectados*	90%		100%		30%		40%	

*Total infectados: animales con cultivo positivo, independiente del tipo de muestra.

En relación a la de eficiencia de bacteriófagos en pollos comerciales experimentalmente infectados con S.E., los resultados de la bacteriología cualitativa se observan en el cuadro N°3. Cuando se analizan los resultados independiente del tipo de muestra, se observa que en los grupos que no recibieron la terapia con bacteriófagos se logró infectar a la totalidad de los animales, mientras que en los grupos tratados con

bacteriófagos, tanto en aves SPF como comerciales, se logró una disminución de la infección de 6,9% y 20% respectivamente (Figura N° 2).

Cuadro N° 3: Detección de S.E. en pollos tratados con bacteriófagos y experimentalmente infectados con S.E., según infección total y por tipo de muestra.

N° de aves*	Grupos	% infección total	% de aves con ciegos positivos	% de aves con órganos positivos
28*	2: Control de Infección aves SPF*	100	96,4	71,4
29*	3: Control de Infección aves comerciales	100	100	62,0
29*	4: Terapia con BF en aves SPF	93,1	86,2	82,7
30	5: Terapia con BF en aves comerciales	80,0	73,3	53,3

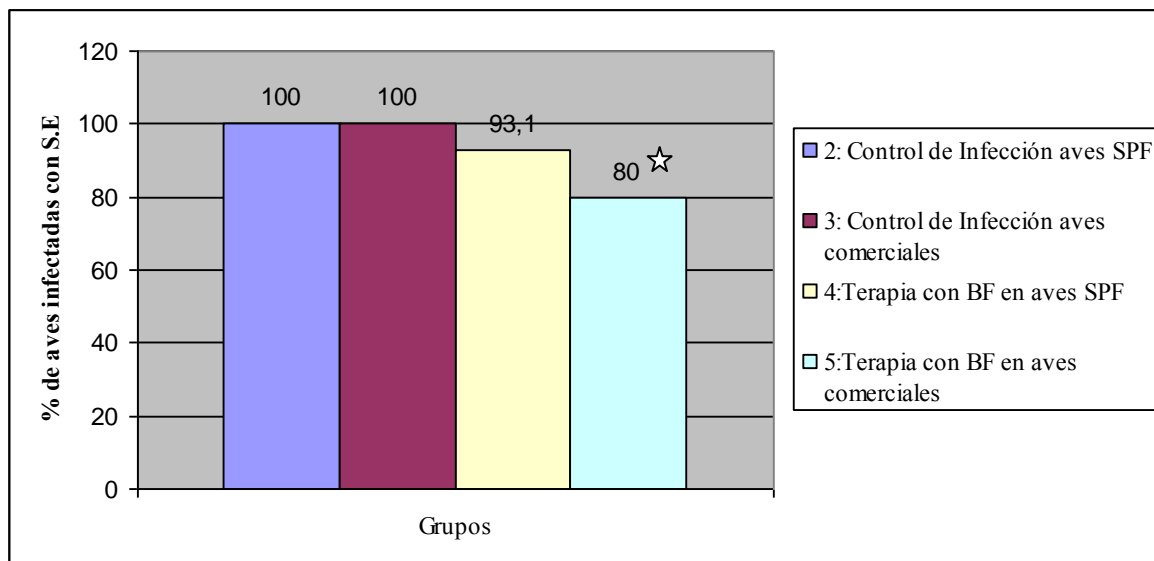
S.E.: *Salmonella* Enteritidis; BF: bacteriófago; SPF: Libre de Patógenos Específicos.

* Eliminación de aves por problemas ajenos al estudio.

Mediante X^2 se determinó que las diferencias establecidas entre los 4 grupos del estudio, en cuanto a la infección total, fueron estadísticamente significativas ($p=0,0066$). Al realizar un análisis comparativo entre grupos, los resultados determinaron diferencias significativas ($p=0,01$) sólo entre el grupo de aves comerciales infectadas con S.E. y aquellas de tipo comercial que recibieron la terapia con bacteriófagos; en el resto de las comparaciones no se detectaron diferencias estadísticas (Figura N°2).

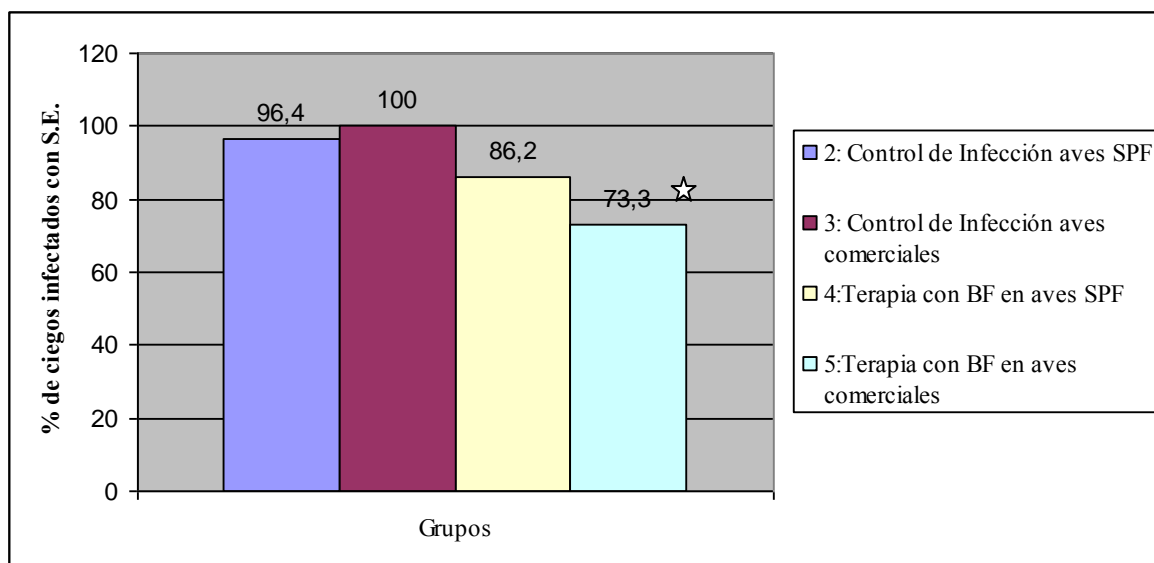
Dependiendo del tipo de muestra, el análisis cualitativo detectó diferencias significativas ($p=0,005$) entre todos los grupos cuando se consideró la muestra cecal (Figura N°3), no así cuando la muestra a analizar fue “pool” de órganos internos (Figura N°4) ($p=0,09$). Las diferencias entre los porcentajes de ciegos positivos fueron significativas solo al comparar los grupos N° 3 y 5, correspondientes al control de infección de aves comerciales y su respectivo tratamiento ($p=0,0028$, Figura N°3).

Figura N° 2: Porcentaje de infección por S.E. en aves comerciales tratadas con bacteriófagos e infectadas experimentalmente, independiente del tipo de muestra.



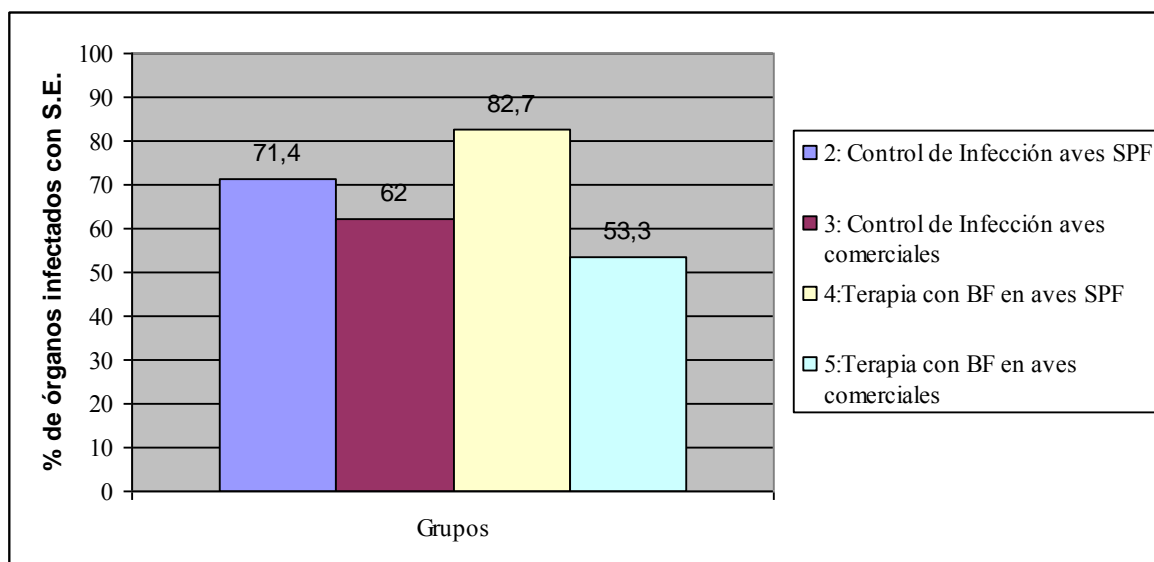
☆ p=0,01

Figura N° 3: Porcentaje de infección por S.E. en aves tratadas con bacteriófagos e infectadas experimentalmente con S.E., según muestra cecal.



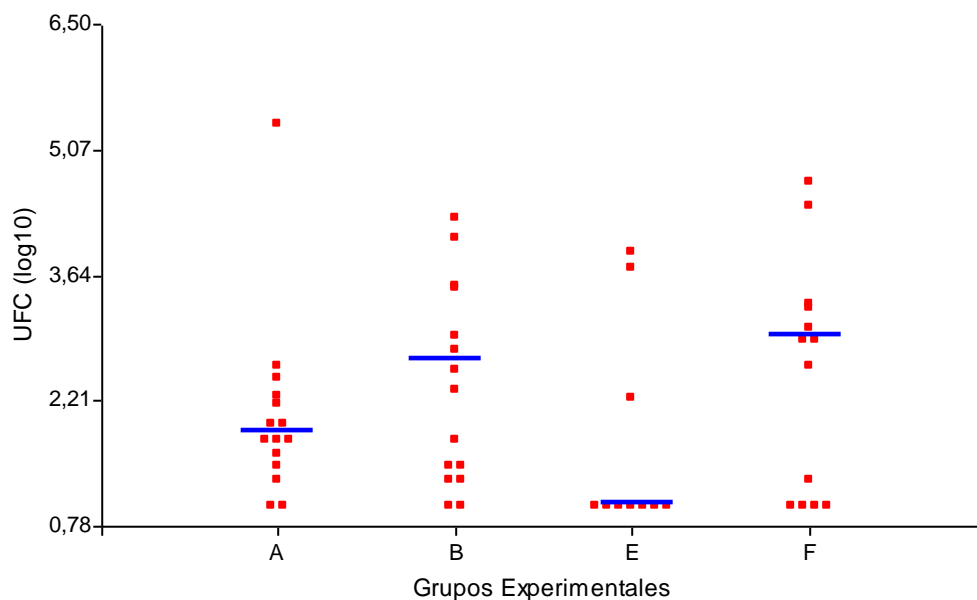
☆ p=0,0028

Figura N° 4: Porcentaje de infección por S.E. en aves tratadas con bacteriófagos e infectadas experimentalmente con S.E., según cultivo de “pool” de órganos internos.



En cuanto a los resultados de la bacteriología cuantitativa, los recuentos de S.E. (UFC \log_{10}/g) entre los grupos N° 3 y 5, correspondientes al control de infección de aves comerciales y su respectivo tratamiento, alcanzaron una reducción de aproximadamente 1 \log_{10} UFC/g, valor no significativo (figura N°5).

Figura N° 5: Recuento cecal de S.E. en aves tratadas con bacteriófagos e infectadas experimentalmente.



Grupos: A: Control infección aves comerciales; B: Control infección aves SPF; E; Terapia con BF en aves comerciales; F: Terapia con BF en aves SPF. Las medias (-) se determinaron considerando sólo los animales que presentaron recuento de S.E.

Los recuentos promedios, las medias estadísticas y los rangos mínimos y máximos encontrados, se detallan en el cuadro N° 4.

Cuadro N° 4: Recuentos promedios y rangos de S.E. en contenido cecal de aves comerciales tratadas con bacteriófagos e infectadas experimentalmente.

Grupos	Promedios UFC log ₁₀ /g*	Rango	Media estadística**
2: Control de infección aves SPF	2,35	1,0 - 4,3	2,35
3: Control de infección aves comerciales	2,03	1,0 - 5,3	2,03
4: Terapia con BF en aves SPF	2,49	1,3 - 4,7	2,16
5: Terapia con BF en aves comerciales	1,68	2,2 – 3,9	1,12

*Recuentos promedios (UFC log₁₀/g) y rangos calculados solo con el número de aves positivas a S.E.

**Media estadística (UFC log₁₀/g) calculada con el total de aves analizadas para recuento (n=15)

El diagnóstico mediante PCR del total de las muestras negativas (n=189) por bacteriología cualitativa, pesquisó sólo una muestra como positiva.

En el grupo control sano (grupo N°1, sin S.E. ni bacteriófagos) no se aisló la bacteria desafío ni se detectó por PCR. Tampoco se observaron alteraciones clínicas, conductuales ni lesiones macroscópicas a la necropsia.

Como resultados complementarios, según datos proporcionados por la Pontificia Universidad Católica de Valparaíso, no se registró contaminación cruzada con bacteriófagos dentro de los grupos experimentales, dado que en las muestras cecales y de órganos internos de las aves que no recibieron la fagoterapia no se observaron placas líticas sugerentes de su presencia.

DISCUSIÓN

La DMI utilizada para inocular pollos comerciales en este estudio fue de $2,95 \times 10^5$ UFC/ml, valor que logró un 100% de infección en las aves. El valor de DMI utilizada es similar a las señaladas en diferentes investigaciones donde se inoculan pollos a una temprana edad. Chambers y Lu (2002), en estudios de vacunación materna contra S.E. utilizan dosis infectante de 10^5 UFC en pollos comerciales obteniendo un 100% de infección cecal. Sklar y Joerger (2001) inocularon vía oral pollos comerciales de un día de vida con 10^4 UFC de S.E. y, para corroborar la infección de las aves, cada 3 días obtuvieron hisopados cloacales, las cuales dieron como resultado la infección del 100% de las aves, 9 días post infección (p.i.). Con dosis menores a 10^4 UFC de S.E. también se ha obtenido la totalidad de animales infectados, así lo demostraron Filho *et al.* (2007) al inocular pollos comerciales con 9×10^3 UFC vía oral.

Otras investigaciones relacionadas con la persistencia o control de S.E han utilizado DMI un poco más altas. Así por ejemplo, Gast y Holt, (1998) administran una dosis de $7,5 \times 10^6$ UFC en pollos de un día para estudiar la persistencia de S.E. y, 7 días después, todos los pollos inoculados fueron positivos a la bacteria en sus órganos internos (hígado y bazo) y ciegos. Con la misma cepa utilizada en este estudio (S.E. *nal^r rif^r*) y con una dosis mas elevada, Borie *et al.* (2004) desafiaron pollos comerciales a los 10 días de vida con 4×10^6 UFC/ml de S.E., alcanzando una infección total sólo de 86,6%. Es probable que esta diferencia en el porcentaje de infección (86,6% v/s 100% en el estudio actual) se deba a que la cepa recibió 6 pasajes más que la usada por Borie *et al.* (2004), aumentando con ello su virulencia. Otra explicación para las diferencias podría ser que las aves comerciales provinieran de un plantel con elevadas tasas de anticuerpos maternos contra S.E., impidiendo en alguna medida la colonización de la bacteria en órganos y/o intestino. Esta última posibilidad no parecería tener gran relevancia, ya que las aves se desafiaron el día 10 de edad (Borie *et al.*, 2004), momento en que los anticuerpos maternos han disminuido en el plasma de los pollos (Hamal *et al.*, 2006).

La DMI de este estudio es igual a la utilizada por Toro *et al.* (2005), pero la bacteria desafío fue *S. Typhimurium* y se administró a pollos SPF. Con esta dosis los autores detectaron un alto porcentaje de aves con sus ciegos infectados, sin embargo, no lograron aislar la bacteria en el “pool” de órganos internos (bazo e hígado). Con la misma cepa utilizada en este estudio, Borie *et al.* (2006) infectaron a pollos SPF con una DMI de $8,3 \times 10^5$ UFC/ml de S.E., alcanzando una incidencia total de infección de 86,6% mientras que en el presente trabajo la incidencia total alcanzó al 100%. Estas diferencias se podrían deber a que en este estudio las aves fueron desafiadas al día 7 de edad mientras que Borie *et al.*, (2006) desafiaron a los 10 días de edad; se sabe que a mayor edad se necesita una mayor dosis infectante (Bjerrum *et al.*, 2003).

Al igual que trabajos internacionales, los resultados obtenidos en esta experiencia de terapia con una mezcla de bacteriófagos en pollos comerciales fue promisorio. Estos resultados eran los esperados, ya que estudios nacionales previos realizados por Borie *et al.*, 2004, y Albala, 2007, utilizando el mismo modelo animal y cepa desafío así también lo demostraron. En este estudio, existieron algunas modificaciones en relación a los dos trabajos nacionales mencionados. Una de ellas correspondió a la edad en que las aves fueron desafiadas con S.E.; los trabajos anteriores desafiaron al día 10 de edad, mientras que en éste estudio se desafió al día 7, ya que en éste día los anticuerpos maternos están en altos niveles plasmáticos. Aunque se conoce que el “peak” de anticuerpos maternos se encuentra al tercer día de vida (Hamal *et al.*, 2006), la inoculación no se realizó tempranamente por problemas de factibilidad técnica y operacional en la inoculación oral forzada en pollos menores de 7 días. Otra modificación al método, fue el día en el cual se realizó el sacrificio de las aves; el presente estudio consideró lo señalado por Bjerrum *et al.* (2003), que indican que es apropiado analizar muestras de ciegos y órganos internos 7 días post infección, ya que este es el día donde se espera el 100% de muestras positivas a *Salmonella* y, no a los 10 días p.i. como se realizó en los trabajos nacionales anteriores.

Otra modificación fue analizar los ciegos en vez del intestino completo, por su mayor concentración de S.E. Así lo demostraron Gast y Holt (1998), donde 7 días

después de inocular pollos con S.E. fue en los ciegos donde encontraron el mayor recuento bacteriano ($7,73 \log_{10}$ UFC) v/s el hígado ($2,7 \log_{10}$ UFC) y el bazo ($3,45 \log_{10}$ UFC). De la misma manera Bjerrum *et al.* (2003), en un modelo experimental para *S. Typhimurium* (S.T) en pollos de un día de edad, determinaron un alto nivel de infección en el ciego con aislamiento permanente hasta el día 31 p.i. , lo que no sucedió con las muestras de intestino delgado. Estos resultados afirman que el contenido cecal provee la mejor evidencia de infección con *Salmonella* a nivel del tracto intestinal, fenómeno también observado en décadas anteriores (Fanelli *et al.*, 1971; Brownell *et al.*, 1969).

Los resultados con relación a la determinación de la respuesta de las aves comerciales, provenientes de madres vacunadas, frente al desafío temprano con S.E. no fueron alentadores. En el grupo de aves comerciales enfrentadas al desafío (grupo N°3) se obtuvo un 100% de infección en las muestras de ciego, mientras que en el grupo de aves SPF (grupo N° 2) desafiadas, se obtuvo un 96,4% de aves con sus ciegos positivos a S.E. Por otro lado, el recuento bacteriano tampoco mostró diferencias significativas entre ambos grupos (grupos N° 2 y 3), con valores que alcanzaron los $2,35 \log_{10}$ UFC para el grupo de aves SPF y $2,05 \log_{10}$ UFC en las aves comerciales desafiadas. Estos resultados sugieren que la protección brindada por los anticuerpos maternos no fue capaz de disminuir la incidencia de infección ni el recuento bacteriano en los ciegos de aves comerciales. Esto podría deberse a bajos niveles de anticuerpos presentes en los pollos desafiados, situación que no pudo ser corroborada, ya que en el estudio no se midieron los anticuerpos maternos de cada ave, sino que se asumió la presencia del promedio de anticuerpos maternos detectado en 5 pollos seleccionados al inicio de la experiencia. La presencia de anticuerpos maternos se determinó mediante la técnica de ELISA (Idexx) en un laboratorio externo (Agrovet); ésta técnica es de amplio uso en el sector avícola ya que entrega resultados óptimos en poco tiempo (Ávila *et al.*, 2006; Bailey *et al.*, 2007; Chambers y Lu, 2002). Por motivos éticos y prácticos se extrajo suero sólo de 5 pollos y no del total de animales analizados. La decisión de obtener los sueros al día 5 de edad, fue tomando en cuenta el trabajo realizado por Hamal *et al.* (2006), quienes demostraron que la Ig Y, inmunoglobulina más representativa, mantiene niveles altos durante la primera semana de vida en pollos comerciales. De hecho, los

resultados de la técnica ELISA lo corroboraron (valor 0,047). El título promedio determinado previamente para las aves, justificó continuar la experiencia con las aves del plantel seleccionado.

Hay que considerar el hecho de que en Chile la vacunación materna se realiza con vacunas muertas, las cuales han mostrado poca efectividad al evaluar la protección brindada por los anticuerpos maternos en la progenie de ellas. Esto fue comprobado en este estudio al igual que Chambers y Lu (2002) y Ávila *et al.* (2006), quienes desafiaron con *Salmonella* a pollos (valor ELISA promedio 0,16) provenientes de madres vacunadas con una vacuna muerta y no redujeron la colonización cecal de *Salmonella*.

A diferencia de lo observado en ciegos, los resultados en cuanto a la colonización de órganos internos fueron exitosos. Se encontró una reducción en la infección del “pool” de órganos internos, desde un 71,4% en las aves SPF a un 62% en las aves comerciales. Estos resultados eran esperables de acuerdo a lo demostrado por Cerquetti y Gherardi (2000), quienes demostraron que las vacunas muertas contra *Salmonella* pueden proteger a los pollos contra la invasión de órganos internos pero fallan en el control de la colonización intestinal responsable de la diseminación del patógeno. Una situación similar aconteció en el trabajo de Ávila *et al.* (2006), donde con bajas dosis infectantes de *Salmonella*, lograron una reducción en la incidencia de infección en el hígado a los 5 días post desafío, alcanzando hasta un 58,3% de reducción dependiendo del protocolo de vacunación de la madre.

En relación a la eficiencia de la terapia con bacteriófagos en aves comerciales, medida por incidencia y recuento, se observó que la terapia fue capaz de disminuir la incidencia de infección en forma significativa ($p= 0,01$) en relación al grupo control de aves comerciales infectadas pero que no recibieron terapia de bacteriófagos (grupo N° 3). La reducción, del orden del 20%, correspondió a la disminución en la infección total de las aves (independiente del tipo de muestra); en las muestras cecales también se determinó una disminución entre ambos grupos, con una reducción de un 26,7%

($p=0,0028$). A nivel internacional se han obtenido disminuciones en la incidencia de infección mediante fagoterapia; Filho *et al.* (2007), obtuvieron un 44% de reducción ($p<0,05$) en la incidencia total de S.E. en ciegos de pollos tratados con una MOI de 10^6 UFP de bacteriófagos administrados por vía cloacal y, de un 55% cuando fueron administrados por vía oral.

En cuanto a los resultados en la incidencia a nivel sistémico, los valores indicaron una disminución de un 8,7% en las aves comerciales que recibieron el tratamiento, diferencia que no fue significativa. Fiorentin *et al.* (2005), al administrar 10^{11} UFP de una mezcla de bacteriófagos a pollos contaminados con S.E. no obtienen disminución de la bacteria en el ciego, sin embargo, a nivel sistémico, obtuvo reducciones del orden de 40% en el hígado y bazo a los 10 días p.i., que tampoco fueron significativas.

En relación al análisis del recuento bacteriano cecal en las aves, al igual que lo señalado por Sklar y Joerger (2001), se observó que el grupo que recibió terapia (grupo N° 5) presentó una leve disminución de aproximadamente $1 \log_{10}$ en relación al grupo control (grupo N° 3) ($1,12 \log_{10}$ UFC/ml v/s $2,03 \log_{10}$ UFC/ml). La disminución observada, aunque no significativa ($p>0,05$), se podría deber a la terapia con fagos y no al efecto complementario con anticuerpos maternos, toda vez que no se observó diferencias entre las aves SPF (sin anticuerpos maternos) y las aves comerciales provenientes de madres vacunadas que no recibieron bacteriófagos.

Fiorentin *et al.* (2005), ocupando una mezcla de bacteriófagos no obtienen diferencias estadísticas en los recuentos cecales de pollos, excepto el día 20 p.i. donde se observó una reducción de $1,84 \log_{10}$ de S.E. En base a estos valores de reducción de *Salmonella*, Sklar y Joerger (2001), señalan que el tratamiento con bacteriófagos puede tener un impacto medible, pero la reducción en el recuento de *Salmonella* es pequeña. Sin embargo, otros estudios han demostrado que es posible obtener mayores reducciones en el recuento de S.E. a nivel cecal; Atterbury *et al.* (2007), administraron una MOI de 10^6 UFP de bacteriófagos para tratar diferentes serotipos de *Salmonella* en pollos de 36

días de vida, obteniendo reducciones significativas ($p= 0,0000001$) del orden de $4,24 \log_{10}$ UFC/g de S.E. y $3,79 \log_{10}$ UFC/g de S.T. ($p=0,000001$) dos días después del tratamiento con fagos. De la misma manera, Higgins *et al.* (2007a), obtuvieron reducciones de $16,927$ UFC/g de S.E. en el contenido cecal de pavos desafiados y tratados con una MOI de 10^5 UFP de bacteriófagos seis horas después del tratamiento; doce horas después del tratamiento la reducción fue de $9,857$ UFC/g y, a las 24 horas la reducción fue de $24,748$ UFC/g de S.E. en el contenido cecal, sin embargo ningún resultado obtuvo significancia estadística.

La escasa disminución en el recuento cecal obtenido aquí podría deberse a diversas situaciones, entre ellas, el día en que se realizó el recuento (7 días p.i.). Fiorentin *et al.* (2005) plantea que los bacteriófagos una vez administrados pueden ser efectivos en cortos periodos, ya que el ciclo lítico de un fago dura menos de 30 minutos, por lo tanto si no hay suficiente cantidad de fagos para lisar todas las bacterias, ellas pueden volver a multiplicarse en el mismo lugar, lo que implica que al momento de la cuantificación bacteriana, esta se puede encontrar en niveles altos a pesar de haber recibido el tratamiento con fagos. Esto pudo haber ocurrido en la experiencia de Filho *et al.* (2007), donde el tratamiento vía oral forzada con 10^8 UFP de un fago en particular o la combinación de dos tipos de fagos, redujo la recuperación de S.E. de las toncilas cecales 24 horas después del tratamiento, pero no se observaron diferencias 48 horas después. También se debe indicar que en las investigaciones donde se han obtenido disminuciones en los recuentos, los resultados se han obtenido desde las 6 horas a los 3 días post tratamiento (Higgins *et al.*, 2007a; Atterbury *et al.*, 2007), por lo que se puede concluir que en la experiencia actual pudo ser muy tardía la evaluación de la variable cuantitativa (UFC/g).

Otra explicación podría deberse a que la MOI utilizada en este estudio fuera insuficiente (10^3 UFP), considerando que en los trabajos donde se obtuvieron disminuciones en el recuento de S.E., las MOI utilizadas fueron de 10^5 y 10^6 UFP (Higgins *et al.*, 2007a; Atterbury *et al.*, 2007). Huff *et al.* (2006) observan que con mayores MOI se obtienen mejores resultados en la reducción de la mortalidad en pollos

infectados con *E.coli*. Estos resultados sugieren que sería positivo realizar una experiencia administrando MOI más altas para tratar S.E. en pollos comerciales, lo cual no tendría efectos negativos para los animales por la demostrada inocuidad de los bacteriófagos (Gill *et al.*, 2006; Xie *et al.*, 2005). Por otra parte, Albala (2007), quien utilizó la misma dosis infectante e idéntica MOI, pero en pollos SPF, obtuvo mejores resultados en cuanto a la disminución del recuento bacteriano, alcanzando una reducción de 1,63 log₁₀ UFC/g; parece importante destacar que sólo un fago de los tres utilizados por Albala (2007) fue idéntico al analizado en el presente estudio. Los nuevos fagos podrían presentar menos actividad lítica *in vivo*, explicando con ello las diferencias en el recuento de S.E.

Otra explicación de la escasa disminución en el recuento podría deberse a problemas de dinámica entre los bacteriófagos y las bacterias. Algunos autores señalan que el ambiente gastrointestinal no conduce al encuentro productivo entre el bacteriófago y la cepa desafío o, que es posible que muchas de las bacterias en el ciego, no han crecido o estén en un estado fisiológico donde no expresen el receptor para los fagos (Sklar y Joerger, 2001). Es por esta razón que en estudios donde se ha realizado la comparación entre la eficiencia en la disminución de *Salmonella* con bacteriófagos *in vivo* e *in vitro* han existido diferencias sustanciales, como es el caso de Filho *et al.* (2007) quienes aplicaron bacteriófagos con gran actividad lítica *in vitro* y observaron escasa actividad lítica *in vivo*. Otro caso es el de Atterbury *et al.* (2007), quienes también realizaron estudios *in vitro* de los bacteriófagos utilizados en sus experiencias, determinando que S.E. disminuyó 2,2 log₁₀ UFC/ml *in vitro* y, al realizar el estudio *in vivo* con el mismo bacteriófago, la bacteria disminuyó en promedio 4 log₁₀ UFC/ml. Estos resultados indican que la dinámica de los bacteriófagos puede ser muy variable y, por esta razón sería interesante realizar un estudio complementario de la eficiencia de los 3 bacteriófagos utilizados en el presente estudio para observar el comportamiento de ellos *in vitro*, sobre todo en lo que se refiere a estabilidad frente a pH y temperatura.

Por último, otra explicación para la leve reducción en el recuento cecal, lo constituye el hecho que algunas bacterias puedan haber presentado resistencia hacia

alguno de los fagos, como lo explican Atterbury *et al.*, (2007). Estos autores realizaron un estudio donde determinaron la presencia de bacterias fago resistentes tanto en el grupo control como en los grupos de aves que recibieron un tratamiento con una mezcla de bacteriófagos, obteniendo diversos porcentajes de resistencia (1,9 a 89,9%).

Los resultados del presente trabajo inspiran a seguir en la investigación con este tipo de biocontrolador, ya que puede contribuir de manera eficaz al control de S.E. en aves comerciales y, en conjunto con otras medidas implementadas por el sector avícola, se podría llegar a controlar este enteropatógeno causante de serios problemas de salud pública a nivel nacional.

CONCLUSIONES

1.- Pollos comerciales, provenientes de madres vacunadas, presentan el mismo nivel de infección que pollos SPF, al ser desafiados con $2,95 \times 10^5$ UFC de S.E., independiente del tipo de muestra.

2.- Pollos comerciales, provenientes de madres vacunadas, presentan menor infección sistémica, que aves SPF, pero similar colonización y recuento cecal de S.E. al ser desafiados con una misma dosis infectante.

3.- La fagoterapia preventiva realizada en pollos comerciales, provenientes de madres vacunadas, fue capaz de disminuir la incidencia de infección por S.E., independiente del tipo de muestra.

4.- En pollos comerciales, la incidencia de infección por S.E. a nivel cecal, es disminuida significativamente por la fagoterapia, no afectando la infección a nivel sistémico.

5.- La fagoterapia preventiva en pollos comerciales infectados experimentalmente con S.E., redujo levemente el recuento cecal.

6.- Los pollos comerciales, provenientes de madres vacunadas, presentan mejor respuesta con la fagoterapia preventiva que las aves SPF sin inmunidad materna, frente a un desafío experimental con S.E.

BIBLIOGRAFÍA

ALBALA, I. Biocontrol de *Salmonella* Enteritidis en aves mediante el uso de bacteriófagos. Tesis (Médico Veterinario). Santiago. Chile. Universidad de Chile, Facultad de Ciencias Veterinarias y Pecuarias, 2007. 53 h.

ALEXANDRE, M.; POZO, C.; GONZALEZ, V.; MARTÍNEZ, MC.; PRAT, S.; FERNÁNDEZ, A.; FICA, A.; FERNÁNDEZ, J.; HEITMANN, I. 2000. Detección de *Salmonella enteritidis* en muestras de productos avícolas de consumo humano en la Región Metropolitana. *Rev. Méd. Chile.* 128: 1075-1083.

ALTEKRUSE, S.; BAUER, N.; CHANLONGBUTRA, A.; DESAGUN, R.; NAUGLE, A.; SCHLOSSER, W.; UMHOLTZ, R.; WHITE, P. 2006. *Salmonella* Enteritidis in Broiler chickens, United States, 2000-2005. *Emerging Infectious Disease*, www.cdc.gov/eid vol. 12: 1848-1852.

ATTERBURY, R.J.; VAN BERGEN, M.A.P.; ORTIZ, F.; LOVELL, M.A.; HARRIS, J.A.; DE BOER, A.; WAGENAAR, J.A.; ALLEN, V.M.; BARROW, P.A. 2007. Bacteriophage therapy to reduce *Salmonella* colonization of broiler chickens. *Appl. Environ. Microbiol.* 73: 4543-4549.

ÁVILA L.; NACIMENTO, V.; SALLE, C.; MORAES, H. 2006. Effects of probiotics and maternal vaccination on *Salmonella* Enteritidis infection in Broiler chicks. *Av. Dis.* 50: 608-612.

BAILEY, J.S.; ROLÓN, A.; HOFACRE, C.L.; HOLT, P.S.; WILSON, J.L.; COSBY, D.E.; RICHARDSON, L.J.; COX, N.A. 2007. Intestinal humoral immune response and resistance to *Salmonella* challenge of progeny from breeders vaccinated with killed antigen. *Int. J. Poult. Sci.* 6: 417-423.

BARROW, P.A. 2007. Salmonella infections: immune and non-immune protection with vaccines. *Avian Pathol.* 36: 1-13.

BEAVER. 2001. Report of the AVMA panel on euthanasia. *J. Am. Vet. Med. Assoc.* 218: 669-696.

BJERRUM, L.; ENGBERG, R.M.; PEDERSEN, K. 2003. Infection models for Salmonella Typhimurium DT110 in day-old and 14-day-old broiler chickens kept in isolators. *Avian Dis.* 47: 1474-1480.

BORIE, C.; ALBALA, I.; SÁNCHEZ, M.L. ; MORALES, A. ; NAVARRO, C. ; RETAMALES, J. ; ROBESON, J. 2006. Bacteriófagos: biocontrol de *Salmonella* en aves. XVIII Congreso Latinoamericano de Microbiología, 23-26 de Octubre, Pucón, Chile. p32.

BORIE, C.; ZURITA, P.; SANTANDER, J.; KRÜEGER, E.; SÁNCHEZ, M.L. ; RAMÍREZ, S.; ROBESON, J. 2004. Efecto del bacteriófago β 3 α SE sobre la colonización de *Salmonella* Enteritidis en un modelo de aves. XIX Congreso Panamericano de Ciencias Veterinarias. 24-28 de Octubre, Buenos Aires, Argentina.

BORYSOWSKI, J.; WEBER-DABROWSKA, B.; GORSKI, A. 2006. Bacteriophage endolysins as a novel class of antibacterial agents. *Exp. Biol. Med (Maywood).* 231: 366-377.

BRADEN, C. 2006. *Salmonella enterica* serotype Enteritidis and eggs: A national epidemic in the United States. *Clin. Infect. Dis.* 43:512-517.

BREEDERS, R. 2000. Antibióticos promotores del crecimiento. *Industria Avícola.* 14-18.

BREN, L. 2007. FDA Approves use of bacteriophages to be added to meat and poultry products. *Gastroenterology*. 131: 1370-1372.

BROCKHURST, M; FENTON, A; ROULSTON, B; RAINEY, P. 2006. The impact of phages on interspecific competition in experimental population of bacteria. *BMC Ecology*. 13: 6-19

BROWNELL, J.R.; SADLER, W.W.; FANELLI, M.J. 1969. Factors influencing the intestinal infection of chickens with Salmonella Typhimurium. *Avian Dis*. 13:804-816.

CARLTON, R. 1999. Phage therapy: past history and future prospect. *Arch. Immunol. Ther. Exp.* 47:267-274.

CARTER, M.E. Enterobacteria. En: CARTER, G.R. Diagnostic Procedures in Veterinary Bacteriology and Mycology. Cuarta edición. USA. Charles C Thomas.1984. pp 92-110.

CDC/NIH. CENTERS FOR DISEASE CONTROL AND PREVENTION, NATIONAL INSTITUTES OF HEALTH. 1999. Biosafety in microbiological and biomedical laboratories [en línea] < <http://www.cdc.gov/od/ohs/biosfty/bmbl4/bmbl4toc.htm> > [consulta: 10-03-2007]

CERQUETTI, M.C.; GHERARDI, M.M. 2000. Orally administered attenuated *Salmonella enteritidis* reduces chickens cecal carriage of virulent *Salmonella* challenge organisms. *Vet. Microbiol.* 76: 185-192.

CHACANA, P.A.; TERZOLO, H.R. 2006. Protection conferred by a live Salmonella Enteritidis vaccine against fowl typhoid in laying hens. *Avian Dis*. 50: 280-283.

CHAMBERS, J.R.; LU, X. 2002. Probiotics and maternal vaccination for *Salmonella* control in Broiler chickens. *J. Appl. Poult. Res.* 11: 320-327.

CUMMINGS, J.; MACFARLANE, G.; ENGLYST, H. 2001. Prebiotic digestion and fermentation. *Am. J. Clin. Nutr.* 73: 415-420.

DABROWSKA, K.; SWITALA-JELEN, K.; OPOLSKI, A.; WEBER-DABROWSKA, B.; GORSKI, A. 2005. Bacteriophage penetration in vertebrates. *J. Appl. Microbiol.* 98: 7-13.

DARWIN, K ; MILLER, V. 1999. Molecular basis of the interaction of *Salmonella* with the intestinal mucosa. *Clin. Microbiol. Rev.* 12: 405-428.

DOYLE, M.P.; ERICKSON, M.C. 2006. Reducing the carriage of foodborne pathogens in livestock and poultry. *Poult. Sci.* 85: 960-973.

FANELLI, M.J.; SADLER, W.W.; FRANTI, C.E.; BROWNELL, J.R. 1971. Localization of Salmonellae within the intestinal tract of chickens. *Avian Dis.* 15:366-375.

FICA, A.; ALEXANDRE, M.; PRAT, S.; FERNÁNDEZ, A.; FERNÁNDEZ, J.; HEITMANN, I. 2001. Cambios epidemiológicos de las salmonelosis en Chile: desde *Salmonella typhi* a *Salmonella enteritidis*. *Rev. Chil. Infect.* 18: 85-93.

FIGUEROA, J. Descripción y análisis de las acciones realizadas por los servicios públicos (salud animal y salud pública), frente a salmonelosis humana. Tesis (Médico Veterinario). Santiago. Chile. Universidad de Chile, Facultad de Ciencias Veterinarias y Pecuarias, 2007. 98 h.

FILHO, R.L.; HIGGINS, J.P.; HIGGINS, S.E.; GAONA, G.; WOLFENDEN, A.D.; TELLEZ, G.; HARGIS, B.M. 2007. Ability of bacteriophages isolated from different sources to reduce *Salmonella enterica* serovar Enteritidis in vitro and in vivo. *Poult. Sci.* 86: 1904-1909.

FIorentin, L.; VIEIRA, N.; BARIONI, W. 2005. Oral treatment with bacteriophages reduces the concentration of *Salmonella enteritidis* PT4 in caecal contents of Broilers. *Avian Pathol.* 34: 258-263.

GAST, R. 1994. Understanding *Salmonella enteritidis* in laying chickens: the contributions of experimental infections. *Int. J. Food Microbiol.* 21: 107-116.

GAST, R. K.; BEARD, C.W. 1990. Production of *Salmonella enteritidis*-contaminated eggs by experimentally infected hens. *Avian Dis.* 34:438-446.

GAST, R.K.; [HOLT, P.S.](#) 1998. Persistence of *Salmonella enteritidis* from one day of age until maturity in experimentally infected layer chickens. *Poult. Sci.* 77:1759-1762.

GILL, J.J.; PACAN, J.C.; CARSON, M.E.; LESLIE, K.E.; GRIFFITHS, M.W.; SABOUR, P.M. 2006. Efficacy y pharmacokinetics of bacteriophage therapy in treatment of subclinical *Staphylococcus aureus* mastitis in lactating dairy cattle. *Antimicrob. Agents Chemother.* 50: 2912-2918.

GONZALEZ, N.; CORREA, J.M. 1998. Plan nacional de control de *Salmonella* en la avicultura chilena. *TecnoVet.* 4:13-15.

GOODE, D.; ALLEN, V.M.; BARROW, P.A. 2003. Reduction of experimental *Salmonella* and *Campylobacter* contamination of chicken skin by application of lytic bacteriophages. *Appl. Environ. Microbiol.* 69: 5032-5036.

GORSKI, A.; DABROWSKA, K.; SWITALA-JELE, K.; NOWACZYK, M.; WEBER-DABROWSKA, B.; BORATYNSKI, J.; WIETRZYK, J.; OPOLSKI, A. 2003. New insights the possible role of bacteriophages in host defense and disease. [en línea] *Med. Immunol.* 2:2. <<http://www.medimmunol.com/content/2/1/2>> [consulta: 10-10-2007].

HAMAL, K.R.; BURGESS, S.C.; PEVZNER, I.Y.; ERF, G.F. 2006. Maternal antibody transfer from dams to their egg yolks, egg white and chickens in meat lines of chickens. *Poult. Sci.* 85: 1364-1372.

HIGGINS, J.P.; HIGGINS, K.L.; GUENTHER, W.; HUFF, W.; DONOGHUE, A.M.; DONOGHUE, D.J.; HARGIS, B.M. 2005. Use of a specific bacteriophage treatment to reduce *Salmonella* in poultry products. *Poult. Sci.* 84: 1141-1145.

HIGGINS, S.E.; HIGGINS, J.P.; BIELKE, L.R.; HARGIS, B.M. 2007a. Selection and application of bacteriophages for treating *Salmonella enteritidis* infection in poultry. *Int. J. Poult. Sci.* 6: 163-168.

HIGGINS, J.P.; HIGGINS, S.E.; VICENTE, J.L.; WOLFENDEN, A.D.; TELLEZ, G.; HARGIS, B.M. 2007b. Temporal effects of lactic acid bacteria probiotic culture on *Salmonella* in neonatal Broilers. *Poult. Sci.* 86: 1662-1666.

HOLZAPFEL, W.; SCHILLINGER, U. 2002. Introduction to pre- and probiotics. *Food Res. Intern.* 35: 109-116.

HUFF, W.E.; HUFF, G.R.; RATH, N.C.; DONOGHUE, A.M. 2006. Evaluation of the influence of bacteriophage titer on the treatment of colibacillosis in broiler chickens. *Poult. Sci.* 85: 1373-1377.

INFOSTAT (2004). *InfoStat versión 2004.* Grupo InfoStat, FCA, Universidad Nacional de Córdoba, Argentina.

KRAMER, T.T. 1973. The immunologic response of birds. *Avian Dis.* 17:208-213.

LEVERENTZ, B.; CONWAY, W.; CAMP, M.; JANISIEWICZ, W.; ABULADZE, T.; YANG, M.; SAFTNER, R.; SULAKVELIDZE, A. 2003. Biocontrol of *Listeria monocytogenes* on fresh-cut produce by treatment with lytic bacteriophages and a bacteriocin. *Appl. Environ. Microbiol.* 69: 4519-4526.

LEVIN, R.; BULL, J. 2004. Population and evolutionary dynamics of phage therapy. *Nat. Rev. Microbiol.* 2: 166-173.

LOC CARRILLO, C; ATTERBURY, R.J.; EL-SHIBINY, A.; CONNERTON, P.L.; DILLON, E.; SCOTT, A.; CONNERTON, I.F. 2005. Bacteriophage therapy to reduce *Campylobacter jejuni* colonization of Broiler chickens. *Appl. Environ. Microbiol.* 71: 6554-6563.

MALORNY, B., HOORFAR, J., BUNGE, C., HELMUTH, R. 2003. Multicenter validation of the analytical accuracy of *Salmonella* PCR: towards an international standard. *Appl. Environ. Microbiol.* 69: 290-296.

MERRIL, C.; BISWAS, B.; CARLTON, R.; JENSEN, N.; CREED, G.; ZULLO, S.; ADHYA, S. 1996. Long-circulating bacteriophages as antibacterial agents. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 93: 3188-3192.

MODI, R.; HIRVI, Y.; HILL, A.; GRIFFITHS, M.B. 2001. Effect of phage on survival of *Salmonella enteritidis* during manufacture and storage of cheddar cheese made from raw and pasteurized milk. *J. Food Prot.* 64: 927-933.

MURRAY, C.J.; BARTON, M. 1993. Salmonellosis Bacteriology. In: Australian Standard Diagnostic Techniques for Animal Disease. L.A. Corner and T.J. Baugust (Eds). Australia. pp 3-8.

NASSAR, T.J.; AL-NAKHLI, H.M.; AL-OGAILY, Z.H. 1994. Use of live and inactivated *Salmonella enteritidis* phage type 4 vaccines to immunise laying hens against experimental infection. *Rev. Sci. Tech.* 13: 855-867.

O'FLYNN, G.; ROSS, R.P.; FITZGERALD, G.F.; COFFEY, A. 2004. Evaluation of a cocktail of three bacteriophages for biocontrol of *Escherichia coli* O157:H7. *Appl. Environ. Microbiol.* 70: 3417-3424.

PATTERSON, J.A.; BURKHOLDER, K.M. 2003. Application of prebiotics and probiotics in poultry production. *Poult. Sci.* 82: 627-631.

PAYNE, R.; JANCEN, V. 2003. Pharmacokinetic principles of bacteriophage therapy. *Clin. Pharmacokinet.* 42: 315-325.

PRADO, V.; SOLARI, V.; ALVAREZ, I.; ARELLANO, C.; VIDAL, R.; CARREÑO, M.; MAMANI, N.; FUENTES, D.; O'RYAN, M.; MUÑOZ, V. 2002. Situación epidemiológica de las enfermedades transmitidas por alimentos en Santiago de Chile: Periodo 1999-2000. *Rev. Méd. Chile.* 130: 495-501.

RADOSTITS, O.; GAY, C.; BLOOD, D.; HINCHCLIFF, K. 2002. Medicina Veterinaria. Tratado de las enfermedades del Ganado Bovino, Ovino; Caprino y Equino. Vol I. Novena Edición en español. Mc Graw-Hill Interamericana de España.

SANCHEZ, P. Uso de la Reacción de Polimerasa en Cadena en el diagnóstico de *Salmonella* Enteritidis en tejidos y contenido intestinal en pollos experimentalmente infectados. Tesis (Médico Veterinario). Santiago. Chile. Universidad de Chile, Facultad de Ciencias Veterinarias y Pecuarias, 2007. 68 h.

SANCHEZ, M.; CARDONA, N. 2003. Mecanismos de interacción de *Salmonella* con la mucosa intestinal. *Asociación Colombiana de Infectología.* 7: 22-29.

SANTANDER, J.; ROBESON, J. 2004. Bacteriophage prophylaxis against *Salmonella enteritidis* and *Salmonella pollorum* using *Caenorhabditis elegans* as an assay system. *Electron. J. Biotechnol.* 7: 206-209.

SERRANO, L. 2000. Biodisponibilidad y farmacocinética de antibacterianos: quinolonas. *Avicultura Profesional.* 18: 21-24.

SOLOMON, J.B. 1968. Immunity to *Salmonella gallinarum* during ontogeny of the chicken. II. Induction of tolerance or priming by single doses of live or killed bacteria. *Immunol.* 15:207-218.

SKLAR, I.; JOERGER, R. 2001. Attempts to utilize bacteriophage to combat *Salmonella Enterica* Serovar Enteritidis infection in chickens. *J. Food Safety* 21: 15-29.

SKURNIK, M. ; STRAUCH, E. 2006. Phage therapy: facts and fiction. *International J. Med. Microbiol.* 296: 5-14.

SNOEYENBOS, G.H.; WEINACK, O.M.; SOERJADI-LIEM, A.S.; MILLER, B.M.; WOODWARD, D.E.; WESTON, C.R. 1985. Large-scale trial to study competitive exclusion of *Salmonella* in chickens. *Avian Dis.* 29: 1004-1011.

SULAKVELIDZE, A.; ALAVIDZE, Z.; MORRIS, G. 2001. Bacteriophage therapy. *Antimicrob. Agents Chemother.* 45: 649-659.

THITARAM, S.N.; CHUNG, C.H.; DAY, D.F.; HINTON, A.; BAILEY, J.S.; SIRAGUSAS, G.R. 2005. Isomaltooligosaccharide increases cecal *Bifidobacterium* population in young Broiler chickens. *Poult. Sci.* 84: 998-1003.

TINDALL, B.J.; GRIMONT, P. A. D.; GARRITY, G. M.; EUZEBY, J. P. 2005. Nomenclature and taxonomy of the genus *Salmonella*. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 55:521-524.

TODAR, K. 2002. Mechanisms of bacterial pathogenicity: Endotoxins. [en linea] <<http://www.textbookofbacteriology.net/endotoxin.html>> [consulta: 10-11-2007].

TORO, H.; PRICE, B.; McKEE, F.; HOERR, F.J.; KREHLING, J.; PERDUE, M.; BAUERMEISTER, L. 2005. Use of bacteriophages in combination with competitive exclusion to reduce *Salmonella* from infected chickens. *Avian Dis.* 49: 118-124.

XIE, H.; ZHUANG, X.; KONG, J.; MA, G.; ZHANG, H. 2005. Bacteriophage Esc-A is an efficient therapy for Escherichia coli 3-1 caused diarrhea in chickens. *J. Gen. Appl. Microbiol.* 51: 159-163.

WHO. World Health Organization. 2006. Drug resistant Salmonella. [en linea]: <http://www.int/mediacentre/factsheets/fs139/en/> [consulta: 10-11-2007].

WOODWARD, M.J.; GETTINBY, G.; BRESLIN, M.F.; CORKISH, J.D.; HOUGHTON, S. 2002. The efficacy of Selenvac, a *Salmonella enterica* subsp. Enterica serotype Enteritidis iron-restricted bacterin vaccine, in laying chickens. *Avian Pathol.* 31: 383-392.

WRAY, C. y DAVIES, R.H. 2000. Control ambiental de Salmonella. *Avicultura Profesional.* 18: 18-21.