



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

**BIOCONTROL DE *Salmonella* Enteritidis EN AVES
MEDIANTE EL USO DE BACTERIÓFAGOS**

ISABEL MARGARITA ALBALA MORENO

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

RESUMEN

Salmonella Enteritidis continúa siendo una zoonosis emergente tanto en Chile como en el mundo entero, principalmente asociada al sector avícola. Los productores de aves han realizado esfuerzos para implementar medidas de control y prevención frente a este enteropatógeno, sin embargo estas medidas aún no han mostrado la eficiencia esperada. En la actualidad en el sector avícola se están realizando novedosas investigaciones sobre el uso de bacteriófagos líticos como biocontroladores frente a patógenos de importancia en salud pública.

El objetivo de este trabajo fue demostrar la eficiencia de tres bacteriófagos líticos frente a la colonización de SE en pollos SPF experimentalmente infectados, estudiando su administración solos o en asociación y diferentes vías de administración.

En una primera experiencia se formaron 5 grupos de 30 pollos SPF de 10 días de edad cada uno, estos fueron tratados con fagos, individuales y en asociación (mezcla) con una MOI de 10^3 UFP y posteriormente las aves fueron desafiadas con $8,5 \times 10^5$ UFC/ml de SE. A los 20 días de edad las aves recibieron eutanasia, obteniendo muestras individuales de intestino y pool de órganos (hígado, corazón y bazo), para bacteriología cualitativa y cuantitativa. Los grupos controles fueron: uno tratado solo con fagos, otro que recibió solo cepa desafío y un tercer grupo que no recibió tratamiento ni desafío.

En una segunda experiencia se formaron 3 grupos de 22 pollos libres de *Salmonella* spp y provenientes de madres no vacunadas. Al día 9 de edad, dos grupos recibieron una mezcla de los tres fagos (MOI 10^3 cada uno), uno por aerosol y otro por agua de bebida. Un día después, los tres grupos fueron desafiados con $9,6 \times 10^5$ UFC/ml de SE. A los 10 días post infección las aves recibieron eutanasia obteniendo muestras individuales de intestino y pool de órganos (hígado, corazón y bazo), para bacteriología cualitativa y cuantitativa.

En la primera experiencia, solo las aves tratadas con la mezcla de fagos (58,6%) y el fago 3 de forma individual (53,3%) disminuyeron significativamente el número de aves infectadas ($P=0,0154$ y $P=0,0099$ respectivamente) comparado con el grupo control de infección (86,6%). Mediante bacteriología cuantitativa se demostró que la terapia con mezcla, fago 1 y fago 3 redujeron el recuento de SE en contenido intestinal, desde 10^8 UFC/g hasta 10^5 /UFC/g. El fago 2 logró una menor disminución en los recuentos (10^7 UFC/g).

En relación a las vías de administración, la bacteriología cualitativa reveló diferencias estadísticas en el total de aves infectadas solo en el grupo de aves que recibió la mezcla de fagos por vía aerosol ($P= 0,0084$) donde se logró un nivel de infección de 72,7% comparado con el 100% de infección detectado en el grupo control. En las aves que recibieron la mezcla de fagos en el agua de bebida se detectó un nivel de infección del 90,9%. En relación al recuento bacteriano las aves tratadas con fagos por ambas vías, aerosol y agua de bebida, lograron reducir significativamente SE a nivel intestinal ($P < 0,01$ y $P < 0,05$ respectivamente), mientras que solo la terapia por agua de bebida fue capaz de disminuir los recuentos a nivel sistémico ($P= 0,014$).

El grupo que solo recibió fago y el grupo control sano no evidenciaron algún tipo de alteración clínica ni lesiones macroscópicas a la necropsia, hecho que aseguró la inocuidad de los fagos, y de las vías de administración y descartó una posible contaminación entre los grupos experimentales.

Con los resultados obtenidos se concluye que la terapia preventiva de fagos podría constituir una herramienta promisorio para el biocontrol de *Salmonella* Enteritidis en el sector avícola, disminuyendo la incidencia y la colonización intestinal y sistémica. A pesar que quedan desafíos pendientes respecto a la incorporación de partículas virales en animales, esta experiencia sugiere que la fagoterapia es una medida fácil y económica para ser aplicada a gran escala en la producción aviar.

1) INTRODUCCIÓN

En Chile y en el mundo, *Salmonella enterica* serotipo Enteritidis (SE) continúa siendo un problema para la salud pública. Esta enfermedad, considerada re-emergente, se ha caracterizado por la presencia de cepas multiresistentes y su fuerte asociación epidemiológica con el sector avícola. Por ello, los esfuerzos se han dirigido hacia el estudio de diversas medidas de control, siendo las más utilizadas la vacunación, exclusión competitiva, prebióticos, bioseguridad y antimicrobianos. Estas medidas, solas o en asociación, no han logrado los resultados esperados.

La búsqueda de nuevas estrategias de control que puedan efectivamente dar una solución al problema, ha sido un desafío para las ciencias veterinarias, toda vez que se trata de una zoonosis. En este contexto, reapareció una antigua forma de enfrentar las infecciones bacterianas, denominada fagoterapia, es decir el tratamiento con virus que lisan específicamente bacterias.

La fagoterapia, intenta prescindir del uso y abuso de antimicrobianos, así como también resolver la infección sin crear los elevados niveles de resistencia que se observan frente a las drogas tradicionales. Innovadores estudios comprueban y avalan la eficiencia de bacteriófagos con actividad lítica frente a *Salmonella*, no sólo en terapias alternativas a los antimicrobianos sino también como medida preventiva en animales y de biocontrol en alimentos. La eficiencia de la fagoterapia depende entre otras cosas, de la vía de administración (oral, respiratoria, intramuscular e intravenosa), del título de fagos en relación a la cantidad de bacterias (multiplicidad de infección), de las dosis de fagos (monodosis o multidosis) y número de fagos (solos o en asociación).

En Chile, se han aislado fagos nativos con actividad lítica *in vitro* e *in vivo* frente a cepas de *Salmonella enterica* serotipo Enteritidis, siendo sus resultados iniciales muy alentadores para la industria avícola.

En el modelo *in vivo*, aún queda por determinar si la eficiencia de una asociación de fagos (“mezcla”) sería igual o superior que la obtenida con fagos individuales y, evaluar diferentes vías de administración que sean lo más eficientes y prácticas posibles para el sector avícola. De comprobarse esto, nuestro país estaría frente a una nueva alternativa para el control de SE, responsable de una zoonosis que, a pesar de los esfuerzos, sigue causando numerosos problemas en la salud pública y en el ámbito avícola nacional.

2) REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA

A) ASPECTOS GENERALES

Salmonella es una enterobacteria aislada por primera vez desde cerdos en 1885, por los Dres; Daniel Salmon y Theobald Smith (Zinsser, 1967). El Género *Salmonella* pertenece a la Familia Enterobacteriaceae y corresponden a bacilos Gram negativos, anaerobios facultativos (Krieg y Holt, 1984). Desde un punto de vista taxonómico, se le reconocen dos especies, *Salmonella enterica* y *Salmonella bongori*; a su vez *S. Enterica* presenta seis subespecies que son, *Enterica*, *Arizonae*, *Diarizonae*, *Salamae*, *Houtenae* e *Indica*. Por ejemplo *Salmonella Enterica* serotipo Enteritidis (SE) (Tindall *et al*, 2005). Según el esquema de Kauffman-White se puede clasificar *Salmonella* mediante tres tipos de antígenos para su serotipificación: Antígeno O (somático), que corresponde a la porción polisacárida, ubicada en la pared celular, Antígeno H (flagelar), proteína termolábil de los flagelos y, finalmente Antígeno Vi (capsular) que corresponde a un polisacárido termolábil (Hagan y Bruner, 1992). Según características antigénicas se describen al menos 2400 serotipos (Tindall *et al*, 2005).

Se han aislado además un gran número de hospederos por todo el mundo, permitiendo así que la adaptación a distintos nichos evolutivos explique que las cepas de *Salmonella* tengan una gran diversidad, tanto fenotípica como genotípica (Fierer y Guiney, 2001). Esta bacteria tiene la propiedad de multiplicarse dentro de los macrófagos lo cual la convierte en una bacteria intracelular facultativa, y se ha descrito su capacidad para producir un efecto citotóxico en macrófagos de ratas, induciendo muerte celular apoptótica (Shwann *et al*, 2000).

La flora bacteriana normal del intestino generalmente bloquea los sitios de unión que existen en la pared intestinal para *Salmonella* pero factores estresantes que puedan alterar esta flora, tales como deprivación de agua, una dieta inadecuada, enfermedades concomitantes, estrés asociado al transporte o una terapia antimicrobiana, facilitan un ambiente adecuado para el establecimiento, replicación y expresión de los factores de virulencia de bacterias patógenas tales como *Salmonella* y de esta manera se incrementa la susceptibilidad de un individuo de sufrir una septicemia.

Dentro de los pasos que se pueden describir en el proceso infeccioso que causa este enteropatógeno cabe mencionar: adhesión, resistencia a los mecanismos de defensa, replicación, invasión y finalmente daño al hospedero.

Salmonella, establece un estrecho contacto con el borde en cepillo del epitelio intestinal. El contacto entre la bacteria y las microvellosidades induce una degeneración de las microvellosidades con elongación, edema y crecimiento, en un proceso llamado “*ruffling*” (rizado). Aquí, los efectores actúan con las proteínas de la célula hospedadora y se produce un cambio en el citoesqueleto de actina de esta, se producen cambios morfológicos que causan un fenómeno llamado invasión donde la célula internaliza la bacteria. Se ha demostrado que *Salmonella* se une e invade preferencialmente las células en las placas de Peyer del intestino delgado, pero también puede ser encontrada en enterocitos no fagocíticos.

Una característica esencial de la patogenicidad de *Salmonella* es que ésta responde a la presencia de la célula hospedera por activación de un sistema especializado de secreción de proteínas denominado tipo III (SSTT), que permite secretar e inyectar proteínas de patogenicidad en el citosol de la célula hospedera.

Los genes de virulencia de *Salmonella* están codificados en dos grupos distintos y son conocidos como Islas de Patogenicidad 1 y 2 (SPI-1 y SPI-2). Los genes codificados en la isla SPI-1 están asociados a la penetración inicial de *Salmonella* a la mucosa intestinal, mientras que los genes de SPI-2 se asocian a la fase sistémica de infección (Figueroa y Rodríguez, 2005).

El SSTT es responsable de liberar una proteína llamada SopB (“*Salmonella* outer protein”), que a nivel intestinal es la responsable de la formación de la vacuola que contendrá a *Salmonella*, también de la fusión de ésta a la célula epitelial intestinal y por otro lado, se relacionaría con la respuesta inflamatoria y la acumulación de fluidos a nivel del lumen intestinal, asociados con la presentación de cuadros de diarrea (Terebiznik *et al*, 2002)

En el tejido linfoide, bajo las células M de las placas de Peyer, *Salmonella* es fagocitada por los macrófagos de la zona y se replica dentro de la vacuola fagocítica, utilizando los macrófagos para diseminarse dentro del tejido linfoide, donde se acumula y replica en hígado, bazo y órganos abundantes en células fagocíticas. *Salmonella* tiene antígenos presentes que juegan un rol importante en su patogénesis, así la invasividad de la bacteria esta determinada por el tipo y número de polisacáridos presentes en el antígeno somático O (Hagan y Brunner 1992).

La actividad del lípido A (endotoxina) de la pared celular participa en el proceso de septicemia, y entre sus efectos se puede señalar fiebre, hemorragias, leucopenia, leucocitosis, hipotensión, “shock”, hipoglicemia, entre otros. Además *Salmonella* tiene una enterotoxina similar a la enterotoxina termolábil de *E.coli* (LT) que estaría involucrada en la pérdida de fluidos hacia el lumen intestinal. *Salmonella* es capaz de infectar distintos tipos de animales, tales como reptiles, aves, mamíferos y también seres humanos. Según su hospedero se puede clasificar esta bacteria en distintos grupos: un primer grupo, *Salmonella* Typhi y *Salmonella* Paratyphi A y C, serotipos que solo afectan al hombre. En un segundo grupo aquellos serotipos que se han adaptado a hospederos animales específicos, tales como *Salmonella* Dublín, *Salmonella* Cholerasuis, *Salmonella* Abortus equi y, finalmente, un tercer grupo constituido por serotipos no adaptados, capaces de producir alteraciones tanto en hombres como en animales, a éste pertenecen *Salmonella* Typhimurium, *Salmonella* Enteritidis y *Salmonella* Anatum entre otras (Radostits *et al*, 2002).

Salmonella Enteritidis produce en aves cuadros con escasa signología clínica; en aves adultas, los signos son leves o incluso pueden pasar desapercibidos, pero éstos son mucho más evidentes en aves jóvenes, pudiendo presentarse altas tasas de mortalidad y retraso en el crecimiento. *Salmonella* Enteritidis fagotipo 4 (SE PT4), se asocia con altos niveles de invasividad y mortalidad en pollos recién nacidos (Barrow, 1993).

En bovinos la salmonelosis puede presentarse a nivel entérico o bien ser de carácter septicémico, pudiendo incluso tener como consecuencia abortos (Radostits *et al*, 2002).

En animales inmunodeprimidos, la infección por *Salmonella* se disemina más allá de los ganglios mesentéricos, estableciéndose en las células reticuloendoteliales del hígado, y desde ahí, se disemina al torrente sanguíneo. Muchos animales sobreviven a la etapa aguda de la enfermedad y se transforman en portadores crónicos, eliminando la bacteria de manera intermitente desde la vesícula biliar, focos de infección en la pared intestinal y, ocasionalmente, desde la leche.

Por otro lado, hoy en día los animales de compañía tales como perros, gatos y mascotas exóticas, cumplen un importante rol en la transmisión de esta bacteria, ya que también actúan como portadores sanos de *Salmonella* (Sánchez *et al*, 2002).

Entre diciembre del 2003 y septiembre del 2004, un estudio realizado en 10 estados de EE.UU, demostró la asociación entre casos de salmonelosis por *Salmonella*

Typhimurium multiresistente, y la tenencia de mascotas exóticas tales como roedores; de los 22 pacientes encuestados, el 59% de ellos (13) había tenido relación directa con este tipo de animales (Swanson *et al*, 2007).

En seres humanos las infecciones por *Salmonella* pueden manifestarse de cuatro formas diferentes: enteritis, fiebre entérica, colonización asintomática y septicemia.

La enteritis es la forma más común de presentación y es causada por numerosos serotipos de *Salmonella*, siendo uno de ellos *Salmonella* Enteritidis.

Salmonella Typhi es responsable de la enfermedad febril conocida como fiebre tifoidea, que junto la fiebre paratífica pueden ser mantenidas en seres humanos como portadores y el reservorio de ésta sería en la mayoría de los casos, la vesícula biliar. Todas las *Salmonellas* pueden causar septicemia, aunque las infecciones por *Salmonella* Paratyphi, *Salmonella* Typhi, y *Salmonella* Dublin conducen con mayor frecuencia a este estado, siendo los niños, ancianos y enfermos, los más susceptibles.

SALMONELLA ENTERITIDIS EN CHILE

Las infecciones por *Salmonella* Enteritidis se comienzan a registrar en el mundo en la década de los 80, extendiéndose en forma progresiva y pandémica (Fica *et al*, 2001). Constituyen hoy una gran preocupación mundial, no solo por su compleja epidemiología y re-emergencia, sino también por el aumento de cepas multiresistentes que dificultan el abordaje terapéutico y permiten la transferencia de genes de resistencia a antimicrobianos, entre diferentes poblaciones bacterianas. Chile no se encuentra ajeno a esta situación.

Se ha evidenciado un cambio en el clásico patrón de presentación que durante años tuvo a *Salmonella* Typhi y en menor grado a *Salmonella* Paratyphi como principales etiologías. Este cambio epidemiológico, caracterizado por la declinación de casos de fiebre tifoidea se debería principalmente al mayor desarrollo económico y tecnológico presentado por el país, con medidas tendientes a romper la cadena de transmisión, contándose hoy en día con un adecuado abastecimiento de agua potable, manejo de excretas y medidas básicas de higiene (Fica *et al*, 2001).

A partir de 1994, las infecciones aparecen en forma epidémica en el norte del país, con un aumento del 3.000% por sobre los casos que se presentaban esporádicamente hasta el año 1993, de 0,35 casos cada 100.000 habitantes a una presentación de 3 casos cada 100.000 habitantes en 1994, y sobre 5 casos en 1998 (Fica *et al*, 2001).

Actualmente las infecciones por *Salmonella* Enteritidis son consideradas endémicas en nuestro país e involucran alimentos en su cadena de transmisión, específicamente con aquellos derivados del sector avícola. La carne, el huevo y sus derivados constituyen los principales alimentos asociados, que por un mal manejo en la cadena de producción y elaboración, favorecen la acción de toxinas termolábiles y la replicación bacteriana. (Fica *et al*, 2001). Alexandre *et al* (2000) en un estudio realizado entre los años 1998-1999 en la Región Metropolitana, demostraron que un 7,08 % de las carnes de ave y menudencias de pollo y un 0,09% de los huevos analizados estaban contaminados con SE. A partir de 1994, el Servicio de Salud Metropolitano del Ambiente (SESMA) inicia una vigilancia epidemiológica de los brotes de enfermedades transmitidas por los alimentos, (ETA). Tanto en muestras de alimentos como de deposiciones, se investigó la presencia de bacterias, hongos, parásitos, toxinas y virus; como conclusión se señala que *Salmonella* no Typhi (*S. Enteritidis* y *S. Typhimurium*) junto con *Staphylococcus aureus* fueron los principales microorganismos asociados en brotes de la Región Metropolitana durante el año 2000 (Prado *et al*, 2002).

Desde el año 1998, frente a la sucesiva aparición de brotes de *Salmonella*, los avicultores productores de huevos, la Asociación de Médicos Veterinarios Especialistas en Avicultura (AMEVEA) y el Servicio Agrícola Ganadero (SAG), del Ministerio de Agricultura, elaboraron un plan nacional de control de *Salmonella*, que involucra una vigilancia tanto para plantales de ponedoras como reproductoras, y un conjunto de medidas básicas de control para plantales positivos y negativos a este patógeno. En este plan se señalan las normas de manejo que debieran implementarse, entre las cuales se encuentran, vacunación con cepas muertas, exclusión competitiva, y uso de antimicrobianos (González y Correa, 1998). Además según los datos del Instituto de Salud Pública (ISP) *Salmonella* Enteritidis es el serotipo mas prevalente en aislamientos clínicos, seguida por *S. Typhimurium* y *S. Typhi*. Respecto a los aislamientos no clínicos el serotipo mas prevalente fue *Salmonella* Anatum, desplazando a un tercer lugar al serotipo Enteritidis (ISP).

Por su compleja epidemiología que incluye la excreción fecal con la consecuente contaminación ambiental, y la existencia de variados reservorios animales, tanto domésticos como silvestres. Las estrategias de prevención y control aparecen como únicas herramientas para el control de esta zoonosis. Para develar la real magnitud de los reservorios distintas investigaciones se han realizado en Chile, dentro de estas se pueden mencionar a Toro *et al*, (1999), quienes realizaron estudios para determinar el estado sanitario de 100 palomas (*Columba Livia*) de vida libre en la ciudad de Santiago, encontrando un 3% de ellas con aislamiento de *Salmonella* spp a partir del contenido intestinal.

En el mismo ámbito, Borie *et al*, (2002) estudiaron diversos roedores sinantrópicos de la Región Metropolitana como reservorios de *Salmonella* spp, encontrando un 5,44% de animales con cultivos positivos. Paralelamente, se han realizado trabajos sobre resistencia de cepas de *Salmonella* spp aisladas de aves y cerdos de la Región Metropolitana. En un total de 94 cepas de aves y 60 de cerdos, el 77% de los aislados aviares presentaron resistencia antimicrobiana a por lo menos un antimicrobiano de los 13 analizados mientras que en el caso de los cerdos, un 83% de las cepas fueron multiresistentes. En cerdos la resistencia a quinolonas llegó hasta un 40% (Bravo, 2004). Chile, al igual que a nivel mundial presenta altos niveles de multiresistencia en cepas de *Salmonella* spp, aisladas de animales de abasto, situación que limitaría su uso como medida profiláctica frente a *Salmonella* en la producción animal. Según las últimas estadísticas del Instituto de Salud Pública de Chile (ISP) 2005, de un total de 838 cepas estudiadas en todo el país, presentaron resistencia a ácido nalidíxico, ampicilina, amoxicilina, cloranfenicol, trimetoprim-sulfametoxazol.

MEDIDAS DE CONTROL FRENTE A *SALMONELLA* ENTERITIDIS EN AVES

Se han desarrollado numerosas estrategias para reducir la contaminación de los alimentos por parte de patógenos zoonóticos. Entre las diferentes medidas que se han adoptado se pueden mencionar, selección de líneas genéticas resistentes a la colonización bacteriana (Kaiser y Lamont 2001); dosificación de antibióticos en semen de pavo para prevenir la transmisión vertical (Donoghue *et al*, 2004).

Para el control de *Salmonella* Enteritidis en aves se han llevado a cabo distintas estrategias, como las anteriormente expuestas, pero dentro de las más utilizadas figuran:

1) Exclusión competitiva y Probióticos:

Proceso mediante el cual la flora bacteriana normal de un animal adulto se establece tempranamente en el neonato, para de esta manera, reducir el número de *Salmonella* y otros patógenos susceptibles de colonizar el intestino. Su uso se remonta a 1908, donde cultivos de *Lactobacillus* spp fueron usados como prevención en la diarrea “de los viajeros” (Sánchez *et al*, 2002).

La microflora se encuentra ausente en el intestino de los pollos recién nacidos, pero en las primeras horas de vida esta microflora se establece y comienza a cumplir sus funciones, entre las que se encuentran: obstrucción física de los receptores para patógenos entéricos, competencia por nutrientes esenciales, producción de ácidos grasos volátiles que limitan el crecimiento de patógenos entéricos, y modulación del sistema inmune. Además, se les describe la producción de ciertas vitaminas, participación en los procesos de digestión alimentaria y constituir una barrera natural contra el eventual daño que puedan producir bacterias que ingresen al organismo (Koenen *et al*, 2004; Schneitz, 2005). A pesar que el mecanismo de acción no se ha dilucidado por completo es sabido que los ácidos grasos volátiles producidos por las bacterias benéficas, particularmente el ácido propiónico, pueden ser de importancia en la disminución de los recuentos de *Salmonella* a nivel intestinal (Nisbet *et al*, 1996).

La adición de lactosa en el agua o alimento de los pollos recién nacidos, ofrece una ventaja ya que estos observan sólo una actividad traza de la lactasa en su intestino, dando así paso para que la lactosa llegue hasta ciego y actúe la microflora sobre ésta; de ahí la importancia de seleccionar para un probiótico bacterias fermentadoras de lactosa, para así obtener los ácidos grasos volátiles mencionados anteriormente (Hume *et al*, 1992). Los probióticos son preparaciones que contienen microorganismos viables capaces de alterar la flora intestinal produciendo efectos beneficiosos sobre la salud del hospedero. En este grupo se encuentra por ejemplo *Saccharomyces boulardii*, levadura con alto contenido de manosa en su pared celular, que es capaz de unirse a fimbrias tipo 1 de cepas de *Salmonella*, disminuyendo así su adherencia al tejido intestinal.

La administración de esta levadura junto con el alimento en pollos broiler, logró reducir significativamente la colonización de *Salmonella* desde un 70% en los controles positivos hasta un 20 % y 5 % en las aves tratadas con 1 y 100 gr de *Saccharomyces boulardii* por cada kilo de alimento respectivamente (Line *et al*, 1998). Sin embargo, cabe mencionar que no todas las cepas de *Salmonella* spp tienen sitio de unión para este azúcar y por ello, este método ha presentado resultados variables.

2) Vacunación:

Se han ensayado tanto el uso de vacunas vivas como de bacterinas. La aplicación de las primeras otorgan una protección mas duradera en el tiempo, asociado posiblemente a la presencia de antígenos relevantes que estimularían el sistema inmune humoral y celular y de los cuales carecerían las bacterinas (Barrow, 1991; Holt *et al*, 2003), Barrow (1993) describe la importancia de la vía de administración de la vacuna, así la administración oral de una bacterina de *S. Typhimurium* en pollos se habría mostrado poco eficaz por no estimular adecuadamente la inmunidad de la mucosa intestinal. Existen planteles en los que suelen utilizarse sistemas mixtos en lo que respecta a medidas de control y es así que la eficiencia de la inmunoprofilaxis se puede incrementar con la asociación de exclusión competitiva (Methner *et al*, 2001).

3) Prebióticos:

Los prebióticos se definen como ingredientes de alimentos que afectan beneficiosamente al huésped por una estimulación selectiva del crecimiento y/o actividad de un limitado grupo de bacterias benéficas a nivel intestinal, existen distinto tipo de aditivos, tanto para los alimentos como para el agua de bebida para crear un ambiente adverso para esta bacteria (Heres *et al*, 2004).

El efecto antibacteriano atribuido al oligosacárido manosa se debería a la estimulación del crecimiento de anaerobios obligados a nivel intestinal y con ello, aumento en la producción de ácidos grasos volátiles que disminuyen el pH e inhiben el óptimo desarrollo de *Salmonella*. Dentro de los prebióticos se encuentran detergentes naturales conocidos como saponinas extraídas del árbol *Quillaja saponaria* que han logrado disminuir la infección con *Salmonella* de un 90 % a un 54 %, en pollitos dosificados con 300 ppm en el alimento (Toro *et al*, 2001).

4) Antimicrobianos:

Actualmente el uso de antimicrobianos tiene variados fines. Se utilizan en distintos tipos de producciones como terapia para determinadas patologías, como profilaxis, y como promotores del crecimiento. El aumento en las últimas décadas de la utilización de dosis subterapéuticas como promotores del crecimiento, situación que facilitó que se desarrollara el fenómeno de resistencia bacteriana. A nivel mundial existe una gran preocupación frente a su uso, ya que desde la aparición de cepas multiresistentes como la emblemática *Salmonella Typhimurium DT104*, una cepa pentaresistente, existen numerosos reportes de la transmisión de esta cepa desde animales infectados al hombre (Sánchez *et al*, 2002).

En el 2005 San Martín, *et al* (2005) aislaron 94 cepas de *Salmonella* desde distintas granjas avícolas de Chile, de ellas 39 demostraron ser resistentes para quinolonas y fluoroquinolonas. Los patógenos resistentes limitan las opciones terapéuticas, conduciendo a fracasos en los protocolos de tratamientos, aumentando así la morbilidad y mortalidad de los pacientes (Akkina *et al*, 1999).

El escenario actual del control y prevención de *Salmonella* enfrenta grandes desafíos, siendo el principal encontrar una sustancia o producto que sumado a las medidas anteriormente descritas, otorgue mejores resultados. En este contexto, el uso de bacteriófagos parece una medida alentadora frente a esta situación.

5) BACTERIOFAGOS

Descubiertos por F.W. Twort en 1915, se pueden definir como virus que parasitan e infectan células bacterianas, interfieren en su metabolismo y causan su lisis; por esta razón se les denomina como fagos líticos. Cada tipo de fago tiene como blanco una bacteria específica. En contraste con los fagos líticos, existen aquellos que son lisogénicos; éstos actúan infectando la célula bacteriana, integrando su propio genoma a la célula hospedera y quedando en estado de latencia como profago por extensos períodos (lisogenia). Si su hospedero se enfrenta a un ambiente adverso, este profago puede activarse y reiniciar su ciclo como fago lítico y así, en algún momento producir la lisis bacteriana (Górski y Weber-Dabrowska, 2005).

El ciclo infectivo de un bacteriófago lítico se inicia con la adsorción o unión a la bacteria. Para lograr este propósito los fagos pueden utilizar como receptores la cápsula bacteriana, diferentes partes del lipopolisacárido (LPS), flagelos, fimbrias y otras proteínas de superficie. Posteriormente a la unión del fago con la bacteria, éste le inyecta su genoma para comenzar a producir un ambiente adecuado para su multiplicación y por otro lado, la lisis bacteriana, inherente a este proceso (Skurnik y Strauch, 2006). Este fenómeno explica que las partículas virales sean consideradas como autoreplicativas. Su mecanismo lítico desde un punto de vista ecológico, se basa en el sistema depredador/presa y desde un punto de vista epidemiológico, como un modelo huésped-parásito (Górski y Weber-Dabrowska, 2005).

En la naturaleza, los fagos existen en gran cantidad y son altamente ubicuos. Así, se han aislado desde sistemas acuáticos, en cantidades que van desde 10^4 Unidades Formadoras de Placa (UFP) a más de 10^8 UFP/ml, en sedimentos de agua fresca en rangos de 0.65 UFP a 3×10^9 UFP/g, y en ambientes marinos sobre 12×10^9 UFP. En el suelo, se han encontrado concentraciones de 0.7 UFP a 2.7×10^8 UFP/g, donde la relación Fago: Bacteria puede llegar a ser 100 (Górski y Weber-Dabrowska, 2005).

Los bacteriófagos también se encuentran naturalmente en la cavidad oral e intestino de seres humanos sanos, donde los títulos pueden llegar a ser mayores a 10^7 UFP/g, atribuyéndoles un rol en la restricción de las poblaciones bacterianas presentes en esos sistemas. Se postula que cumplen un papel fundamental en el sistema inmune, no solo participando en la eliminación de bacterias patógenas, sino que además inhibiendo reacciones inmunes de carácter local, tales como procesos inflamatorios producidos por antígenos bacterianos (Górski y Weber-Dabrowzka, 2005).

En un principio, los fagos líticos se utilizaron como agentes terapéuticos. Así, su primer uso data del año 1919 donde se comprobó su eficacia frente a Disentería por *Shigella* spp en un Hospital Pediátrico Francés (Sulakvelidze *et al*, 2001). Luego de estos promisorios resultados, se continuó su utilización tanto en medicina humana como veterinaria, usando variadas preparaciones comerciales disponibles en esa fecha. Sin embargo, con el pasar del tiempo se presentaron algunos inconvenientes, como; un estrecho rango de hospederos, presencia de contaminantes tóxicos incluyendo endotoxinas, deficiencia de estabilidad y viabilidad de los preparados y fenómenos de resistencia de las bacterias frente a ellos (Sulakvelidze *et al*, 2001). Junto con todos estos problemas y, sumado al descubrimiento y eficacia de los antibióticos, a la fagoterapia se le restó importancia como medida terapéutica.

Los estudios continuaron casi exclusivamente en Europa del este, principalmente en la ex Unión Soviética y Polonia. Con el paso del tiempo, el abuso de antimicrobianos en el área de la salud pública y de la producción animal hizo inevitable la aparición de resistencia bacteriana y con ello la imperiosa necesidad de encontrar sustancias, químicas o biológicas, que pudieran controlar las enfermedades sin inducir una resistencia. Entonces renace la antigua idea de utilizar fagos como terapia frente a enfermedades bacterianas. Los pioneros en realizar fagoterapia en modelos animales, fueron William Smith y sus colegas, del Institute for Animal Disease Research in Houghton, Gran Bretaña. Iniciaron sus estudios en infecciones experimentales con *E. coli* en ratones, donde observaron que una dosis única de fagos redujo el recuento de esta bacteria. Posteriormente lo repitieron en terneros, corderos y cobayos infectados con una cepa diarreogénica de *E. coli*, donde la fagoterapia logró reducir la presencia de dicha bacteria en el tracto digestivo y además, síntomas asociados como, pérdidas de fluidos. Obtuvieron, en este estudio una sobrevivencia del 100% de los animales infectados (Sulakvelidze *et al*, 2001).

Estos resultados marcaron un hito importante en los estudios de la Europa occidental, impulsando así la investigación científica sobre fagoterapia en animales infectados con bacterias multiresistentes, tales como *Pseudomonas aeruginosa*, *Acinetobacter* spp y *Klebsiella* spp.

Mientras tanto, en Europa del Este los rusos trabajaban con fagoterapia frente a niños con disentería, cuyos resultados demostraron una disminución de la incidencia en el grupo tratado, comparado con el grupo que solo recibió un placebo, donde los valores reportados fueron 3,8 veces más altos. Se estudiaron también fagos contra *Shigella*, *Klebsiella*, *Pseudomonas*, *Proteus*, *E.coli*, *Staphylococcus*, *Streptococcus* y *Salmonella*, todos ellos demostraron éxito en pacientes.

Entre las ventajas de los bacteriófagos por sobre los antimicrobianos se puede mencionar: su alta especificidad de huésped, a diferencia de las drogas antimicrobianas que afectan tanto flora normal como patógena, interfiriendo en el balance microbiano y dejando al paciente más susceptible a infecciones secundarias; también es importante recalcar el hecho de que el aislamiento de fagos es un proceso relativamente rápido, mientras que el desarrollo de nuevos antibióticos demora mucho más tiempo y, finalmente, que los fagos no han demostrado ser tóxicos para animales, seres humanos, ni para plantas (Sulakvelidze *et al*, 2001; Summers, 2001; Fiorentin *et al*, 2005; Xie *et al*, 2005; Toro *et al*, 2004; Skurnik y Strauch, 2006).

Se sabe que los fagos solo reconocen células bacterianas ya que presentan especificidad de receptores superficiales que solo están en las bacterias; además, Dabrowska *et al*, 2005 postulan que la especificidad se asocia también al metabolismo bacteriano y que los fagos necesitan de la maquinaria intracelular específica bacteriana para su replicación. Esta maquinaria sería más importante en la especificidad de las bacterias ya que experiencias de ingeniería genética que incorporan el ADN del receptor superficial bacteriano al genoma del fago, no lograron la multiplicación fágica al interior de células mamíferas, ni su lisis a pesar que el ADN pudo ser internalizado.

No existe hasta la fecha ningún estudio en la literatura que señale que los fagos puedan interactuar con células de mamíferos, pero recientemente Górski *et al*, 2003 postulan que algunos bacteriófagos poseen una secuencia denominada KGD (Lys-Arg-Gly), este tripéptido se uniría a distintos tipos de integrinas que están presentes en diferentes tipos celulares, tales como plaquetas, monocitos, algunos linfocitos y células neoplásicas; se produciría así una disminución en la actividad celular.

Los bacteriófagos en la actualidad están siendo considerados en distintos ámbitos, tales como; el área clínica (fagoterapia), el área de la industria alimentaria para el control y prevención de patógenos transmitidos por alimentos (biocontroladores) y otra novedosa utilización que se le ha descrito a los bacteriófagos es su uso como potencial tratamiento de residuos líquidos y aguas de desecho, contribuyendo con esto a disminuir el impacto ambiental de la contaminación.

FAGOS COMO BIOCONTROLADORES:

En alimentos se ha estudiado la eficiencia de los bacteriófagos frente a un gran número de patógenos que producen enfermedades transmitidas por los alimentos (ETA) y se encuentran presentes en ellos, tales como *Listeria Monocytogenes*, *Campylobacter jejuni*, *Salmonella* Enteritidis y *Escherichia coli*, entre otras.

Destaca su uso en el control de *Salmonella* Enteritidis en la producción y almacenamiento de queso Cheddar; Modi *et al*, (2001) contaminaron simultáneamente leche cruda y pasteurizada con una dosis de 10^4 UFC/ml de una cepa de SE y posteriormente colocaron una dosis de 10^8 UFP/ml del bacteriófago SJ2. El uso del fago, tanto en leche cruda como pasteurizada, redujo los conteos de SE en 1 a 2 unidades logarítmicas durante la fabricación de los quesos. Respecto al almacenamiento posterior del queso, a los 99 días a 8°C, se evidenció la presencia de SE en aquellos que carecían de bacteriófago, con una concentración de 10^3 UFC/g, mientras que en los quesos que fueron elaborados con leche pasteurizada adicionada de fago, la bacteria no se encontró después del día 89, demostrando que los fagos, tanto en leche cruda como pasteurizada, son capaces de controlar la sobrevida de esta Enterobacteria en el queso.

Un estudio en alimentos de origen vegetal, en cortes de melón, experimentalmente infectados, demostró que la aplicación de una mezcla de bacteriófagos específicos contra *Listeria monocytogenes*, fue capaz de reducir en aproximadamente 2 unidades logarítmicas (\log_{10}) el número de esta bacteria, y posteriormente continuó inhibiendo el crecimiento por 2 días más desde su aplicación. Cuando las muestras se encontraban almacenadas a 10°C, a los 7 días ya existía una diferencia de más de 4 unidades logarítmicas entre las muestras tratadas y aquellas que no lo fueron (Leverentz *et al*, 2001).

En alimentos de origen animal, Goode *et al*, 2003 inocularon pieles de pollo con una cepa de *Campylobacter jejuni*, en una dosis de 10^4 UFC/cm² y posteriormente las trataron con un bacteriófago en una dosis de 10^6 UFP/cm², obteniendo una reducción del recuento bacteriano superficial en el 95 % de las muestras.

Por otro lado se demostró que en embutidos de pollo que fueron contaminados experimentalmente con *Salmonella* Typhimurium DT104 y posteriormente tratados con dos tipos de bacteriófagos diferentes, estos fueron capaces de disminuir 1,8 y 2,1 unidades logarítmicas (log₁₀) respectivamente (Whichard *et al*, 2003).

La eficacia de una mezcla de tres fagos contra *E.coli* 0157:H7 inoculada experimentalmente en muestras de carne, fue demostrada al constatar que de las 9 muestras en estudio, en 7 de ellas no se pudo recuperar la cepa y en las dos restantes los recuentos fueron menores a 10 UFC/ml (O'Flynn *et al*, 2004).

Estudios en aguas de lavado provenientes de carcasas de pollo, experimentalmente inoculadas y tratadas posteriormente con el fago PHL4 en dosis variables, redujeron entre un 50 y 100% la recuperación de *Salmonella* Enteritidis, dependiendo de la concentración bacteriana inoculada previamente. Resultados similares se observaron en carcasas de pavo que estaban naturalmente infectadas con *Salmonella* Enteritidis (Higgins *et al*, 2005).

De acuerdo a los estudios presentados anteriormente, se concluye que el uso de bacteriófagos en alimentos, constituyen una buena alternativa como biocontroladores. Entre sus ventajas se puede mencionar que los fagos se encuentran en la naturaleza ampliamente repartidos y en forma abundante, pueden ser rápidamente aislados, son de fácil y económica preparación, y aplicación, no tóxicos para células eucariotas, y no afectan la calidad organoléptica de los alimentos, son autoreplicativos, presentan una amplia tolerancia frente a distintos rangos de pH, tienen efectos variables frente al stress térmico, pero se describe que éstos siempre son más termotolerantes que la mayoría de las bacterias (Hudson *et al*, 2005; Greer, 2005; Huff *et al*, 2005).

Entre sus desventajas hay que considerar, su limitado rango de hospederos, la presencia de bacterias mutantes fago resistentes, necesitar altas concentraciones bacterianas para su adsorción y consecuente multiplicación, la presencia de barreras físicas naturales en los alimentos, posible transducción de características genéticas indeseables hacia poblaciones bacterianas presentes en el alimento, posibilidad de lisogenia, antigenicidad, y la percepción del consumidor frente a esta nueva alternativa (Greer, 2005).

Estas desventajas están siendo resueltas por innovadoras investigaciones que utilizan solo las proteínas líticas específicas de los fagos (endolisinas), en vez del bacteriófago completo (Boryzowski *et al*, 2006).

Recientemente en agosto del 2006, fue aprobado por la “Food and Drug Administration” (FDA) y por el USDA, el uso de un preparado de 6 bacteriófagos específicos contra *Listeria monocytogenes*, como aditivo alimenticio para productos cárneos y subproductos de la industria avícola. Este producto demostró ser efectivo contra 170 cepas distintas de esta bacteria y se le exige que aparezca en la etiqueta de los alimentos que los contienen. Pese a lo anterior aún no existe su aprobación como “terapia antimicrobiana” u otro tipo de usos (FDA, 2007).

FAGOS EN EL ÁREA CLÍNICA: FAGOTERAPIA

Los bacteriófagos representan una alentadora alternativa frente a numerosas patologías de etiología bacteriana, ya que la cada vez más peligrosa resistencia de estos patógenos a las drogas antimicrobianas hacen de los fagos una herramienta que no se debe menospreciar.

Xie *et al*, en el 2005 realizaron una experiencia comparativa entre la fagoterapia y la terapia con antimicrobianos en pollos infectados con *E.coli* diarreogénica. Trabajaron con dos grupos de aves, uno recibió fagos junto con el alimento y el otro recibió Cloromicetina, evaluando las muertes y los casos de diarrea a las tres semanas post tratamiento. El grupo tratado con bacteriófago tuvo una baja incidencia de diarrea comparado con el grupo que recibió el antimicrobiano (26 versus 36%), además las muertes disminuyeron en un 1,2% y 6%, respectivamente. Los autores señalan que las aves que recibieron el tratamiento con bacteriófago fueron más resistentes a otras enfermedades intestinales que aquellos pollos que recibieron la droga; esto debido a que los fagos son capaces de mantener el balance de la flora intestinal por su alta especificidad de hospedero. Esto último, sumado a la mejoría en la tasa de conversión alimentaria y aumento del peso de los pollos comparado con el grupo que recibió antibiótico, eventualmente podría ser considerado como una ventaja más de la fagoterapia.

Wagenaar *et al*, 2005 desarrollaron estudios en el ambiente clínico con fagos frente a diarreas por *C. jejuni* en pollos que recibieron una dosis de 10^5 UFC a los 10 días de edad. Cinco días después de haber sido desafiados, las aves recibieron bacteriófagos por 6 días consecutivos, en dosis que variaron desde 9×10^9 hasta 1×10^{10} UFP. Las aves tratadas mostraron una reducción en el recuento de 3 unidades logarítmicas comparado con el grupo control que no recibió bacteriófago. Otro grupo de investigadores estudiaron dos bacteriófagos como terapia para reducir la colonización por *Campylobacter jejuni* en pollos broiler. Estas aves se inocularon a los 18 días de edad vía oral con 1 ml de dos cepas diferentes de *C. jejuni*, en dosis desde $3 \log_{10}$ hasta $8 \log_{10}$ UFC, luego de 6 días post desafío fueron tratadas con uno de los dos bacteriófagos en estudio, en dosis desde $5 \log_{10}$, hasta $9 \log_{10}$ UFP. Se les realizó la necropsia con intervalos de 24 horas, desde el día 25 de vida para evidenciar la reducción en la colonización tanto a nivel intestinal como de órganos internos. Los resultados encontrados arrojaron una reducción en el recuento de *C. jejuni* entre 0.5 y $5 \log_{10}$ UFC/gr de contenido cecal, dependiendo de la combinación de fagos y cepas bacterianas, de la concentración de fago y del tiempo transcurrido entre la última dosis de fago y las necropsias (Carrillo *et al*, 2005).

Barrow *et al*, 1998 aislaron desde aguas de alcantarillado fagos líticos contra *Escherichia coli*, los cuales fueron utilizados en terneros y pollos infectados con la cepa *E.coli*. H247, la cual produjo un cuadro septicémico. Se demostró que la bacteria en ausencia del fago produjo un 100% de mortalidad en los pollos, pero la administración intramuscular de una concentración de 10^6 UFC de la cepa y 10^6 UFP del bacteriófago R, no produjo mortalidades. Por otro lado, la administración de una menor cantidad de fago (10^4 UFP) también fue capaz de dar una significativa protección a las aves, lo cual demuestra una multiplicación *in vivo* del bacteriófago. Esta misma terapia fue utilizada en terneros privados de calostro, los cuales fueron desafiados vía oral, con 10^{10} UFC de la cepa *E.coli* H247 e inoculados 8 horas después vía intramuscular con una dosis de 10^{10} UFP del bacteriófago en estudio. A los tres días post infección, se realizó la eutanasia de los terneros; de los cuatro animales inoculados, solo uno había manifestado la enfermedad y en el cual se encontraron bacterias mutantes resistentes a la acción del fago R.

Un estudio realizado el año 2006, comprobó la eficacia de la fagoterapia contra mastitis subclínica causada por *Staphylococcus aureus*. Se seleccionaron 24 vacas, con cultivos positivos a *S. aureus* y se dosificaron por vía intramamaria con 10 ml de un bacteriófago denominado K, en una dosis de 1.25×10^{10} UFP; las dosis de fagos fueron administradas una vez al día, durante 5 días consecutivos. Posterior a esto, se tomaron muestras desde el día 2, en diferentes intervalos hasta el día 28 post tratamiento. Finalmente se evidenció que de los 18 cuartos en estudio, solo 3 de ellos, (16.7%) fueron negativos a la presencia de *Staphylococcus aureus*. Estos resultados no fueron estadísticamente significativos atribuyéndose, al menos parcialmente, la inactivación del fago en la leche de la glándula mamaria (Gill *et al*, 2006).

La eficiencia de los fagos depende de muchos factores, entre estos se pueden destacar que la multiplicidad de infección utilizada sería un factor fundamental en la respuesta del organismo animal frente a la terapia o el biocontrol con bacteriófagos. Entendiendo multiplicidad de infección (MOI) como la razón entre la concentración de fagos y de bacterias. Así altas dosis serían mucho más eficientes que aquellas más bajas.

Huff *et al*, 2006 evaluaron la eficiencia de la administración de dos bacteriófagos para tratar la colibacilosis en pollos. Se desafió a las aves a los 7 días de edad, con una cepa de *E.coli* en una dosis de 6×10^4 UFC, y luego fueron tratadas con dos bacteriófagos en dosis de 4×10^8 , 10^6 , 10^4 y 10^2 UFP (MOI 10^4 , 10^2 , 1 y 0.1 respectivamente). La mortalidad a las tres semanas de edad de las aves controles (no tratadas) fue de 48%, mientras que el tratamiento que recibió fago en la mayor dosis, 10^8 UFP (MOI 10^4), fue la que logró reducir la mortalidad significativamente a un 7% (Huff *et al*, 2006). A pesar que la mayoría de los estudios utilizan elevados títulos de fagos (MOI elevadas), Atterbury *et al*, 2007 señalan que títulos altos pueden producir una mayor proporción de *Salmonella* resistentes, sin embargo esta resistencia no se mantendría por largos periodos de tiempo. Se debe considerar que una dosis única de fagos sería menos efectiva que múltiples dosis. Wagenaar *et al*, (2005) demostraron que la administración de bacteriófagos contra *Campylobacter jejuni* es más eficiente cuando el fago es administrado en los primeros días posteriores a la inoculación con la bacteria.

Otro factor que debiera ser considerado en la efectividad de los fagos es la vía de administración (Skurnik y Strauch, 2006). Un estudio realizado por Huff *et al*, 2003a para demostrar las posibles diferencias entre la vía intramuscular y vía respiratoria (aerosol), en la prevención de infecciones respiratorias en pollos inoculados con *E.coli*,

demonstró que ambas vías lograron reducir el porcentaje de mortalidad, siendo mejor la vía intramuscular.

Los títulos de fagos encontrados en ambos tratamientos fueron muy diferentes. En el caso de la experiencia por vía respiratoria, se detectó la presencia de fago en circulación solo hasta una hora post administración (96 UFP/ml), en cambio en la experiencia por vía intramuscular todos los grupos de aves tenían altos títulos de bacteriófagos (10^4 UFP/ml) hasta las 6 horas posteriores a su administración. En base a estos datos se concluyó que, la eventual ineficiencia del fago en aerosol se debería a que éste no se mantiene en altas concentraciones en circulación. Una vía de administración óptima será aquella que sea capaz de mantener altos títulos de fago en el sitio de infección (Huff *et al.*, 2003a).

Hay que considerar los distintos factores fisicoquímicos que pudiesen afectar la estabilidad de la suspensión de bacteriófagos, tal como, pH. Al respecto Hudson *et al.*, (2005), observaron que los fagos serían estables a pH de 5 a 8, pero a bajas temperaturas este rango se puede extender entre pH de 4 a 10, existiendo una severa disminución en los títulos a pH bajo 3. Una posible solución a este problema sería adicionar a la suspensión de bacteriófago un buffer o un antiácido como CaCO_3 (Atterbury *et al.*, 2007) que proteja al fago si este va a ser administrado por vía oral. La temperatura es otro factor que eventualmente puede afectar la viabilidad de los fagos. Se describe que para el caso de bacteriófagos líticos contra *E.coli*, estos se inactivan a temperaturas de 60 a 75° C, pero dependerá del medio en el cual vengán suspendidos. Generalmente los bacteriófagos resisten más las altas temperaturas que sus bacterias hospederas. La radiación UV también produce una inactivación de los bacteriófagos, ya que se produciría un daño acumulativo a nivel de los ácidos nucleicos de ellos (Hudson *et al.*, 2005).

Finalmente otro factor del cual depende la efectividad de la terapia es la posibilidad que las bacterias experimenten resistencia a los bacteriófagos. El mecanismo teórico de resistencia bacteriana frente a los fagos, podría deberse a mutaciones del ADN, adquisición de genes móviles o infección por fagos lisogénicos que confieren inmunidad (Hudson *et al.*, 2005). En todo caso, la tasa de resistencia bacteriana es más baja que aquella para antimicrobianos. Para evitar este inconveniente es que siempre sería más ventajoso administrar una combinación de fagos que estos de manera individual.

Es así como en la mayoría de las investigaciones, se utilizan mezclas de fagos en vez de fagos individuales (Fiorentin *et al*, 2005; Toro *et al*, 2005; Huff *et al*, 2003b; Sklar y Joerger, 2001; Carrillo *et al*, 2005; O`Flynn *et al*, 2004).

Paralelamente a la resistencia génica, existe la resistencia fenotípica. Las bacterias pueden localizarse en sitios que no son accesibles para el fago, como es lo que ocurre cuando éstas forman biofilms o cuando se encuentran en ambientes cuyas características fisicoquímicas impiden la sobrevivencia del fago.

BACTERIOFAGOS CONTRA *SALMONELLA*

La utilización de fagos líticos contra *Salmonella* ha sido estudiada en diversos modelos animales con la finalidad de disminuir su incidencia o bien reducir el número de este patógeno, de tal manera de controlar la incidencia de la enfermedad en el hombre. Así, Sklar y Joerger, 2001 realizaron cinco experiencias para determinar el efecto de diferentes bacteriófagos contra una cepa de *Salmonella* Enteritidis en pollos. En la primera experiencia evaluaron el efecto de una MOI de 10^4 , sobre el recuento de SE a nivel de los ciegos de las aves; en este caso no existieron diferencias significativas, sin embargo los recuentos de SE disminuyeron. En un segundo experimento los autores evaluaron distintas vías de administración. (Vía oral por agua y alimento) del fago (MOI 10^3), el efecto de una dosis comparada con una terapia de tres monodosis cada dos días, manteniendo una MOI de 10^4 . En ambas experiencias no hubo diferencias estadísticas con el grupo no tratado sin embargo, se observó que la dosificación por alimento y la terapia de monodosis presentaron los menores recuentos promedios de SE en ciegos. Un tercer ensayo lo realizaron administrando fagos en dos vehículos distintos (alimento y agar), manteniendo la MOI de 10^4 , pero la terapia en este caso se dio en los tres primeros días post infección o bien en los tres últimos (días 11, 12 y 13). Aquí la dosificación a través del agar no dio resultado, ya que este no fue bien aceptado por las aves, en el caso de la administración por alimento, a pesar que no hubo diferencias estadísticas, de todas maneras existió una disminución en los recuentos finales. En un cuarto trabajo analizaron tres fagos dosificados de forma individual y una asociación de ellos (“mezcla”). En este caso las diferencias estadísticas fueron significativas logrando reducir el recuento bacteriano a nivel cecal en todos los tratamientos analizados. Un quinto y último ensayo se llevó a cabo probando la eficacia de otra mezcla de fagos administrados en alimento, en este caso con una MOI de 10^5 y otra de 10^1 .

Aquí se trabajó con dos grupos de aves que fueron inoculadas con dosis diferentes de SE, 10^4 UFC y 10^8 UFC respectivamente. En este caso solo hubo diferencias estadísticamente significativas entre el grupo control y el que tenía una MOI de 10^1 , debido a que había una mayor concentración bacteriana (Sklar y Joerger, 2001).

La aplicación de bacteriófagos líticos en muestras de piel de pollos inoculadas experimentalmente con *Salmonella* Enteritidis Fagotipo 4 (10^3 UFC/cm²) a las cuales posteriormente se les aplicó un bacteriófago específico (10^3 UFP/cm²), evidenció la reducción del patógeno en menos de 1 log₁₀ (Higgins *et al*, 2005).

Toro, *et al* en el año 2005, combinaron el uso de bacteriófagos líticos y exclusión competitiva para controlar la colonización de *Salmonella* Typhimurium (ST) en aves. Para esto desarrollaron una mezcla de tres bacteriófagos que fue administrada a las aves por vía oral, antes y después del desafío. Pollitos SPF recibieron vía oral la “mezcla” de fagos (5.4×10^6 UFP/0.5 ml /ave) diariamente durante seis días y luego se desafiaron con 2.4×10^5 UFC de ST /ml. Cuatro días post desafío las aves fueron eutanasiadas. El tratamiento preventivo con fagos produjo una reducción de 6 veces los recuentos de ST en ciego, mientras que el tratamiento simultáneo con exclusión competitiva, redujo además el recuento a nivel sistémico (hígado y bazo). Pese a lo anterior, los autores concluyen que no existió un sinergismo entre fagoterapia y exclusión competitiva.

Para evaluar la capacidad de los fagos posterior a una infección, Fiorentin *et al* (2005), infectaron pollos con cepas de SE PT4 mediante un método de diseminación biológica horizontal (“seeder bird”) y al séptimo día de edad se les administró oralmente una dosis de 10^{11} UFP de tres bacteriófagos diferentes. Luego de cinco días de tratamiento, el grupo tratado con fagos mostró una reducción de 3,5 órdenes de UFC/gr cecal. Las muestras recolectadas a los 10, 15, 20 y 25 días post tratamiento revelaron que las aves tratadas tenían aún menos UFC/gr que el grupo control. Estos resultados demuestran que un tratamiento oral con una mezcla de fagos reduce las concentraciones del enteropatógeno en el contenido cecal de pollos Broiler, disminuyendo con esto la contaminación en los productos derivados de ellos.

Uno de los últimos estudios realizados con bacteriófagos contra *Salmonella* Enteritidis, *S. Hadar* y *S. Typhimurium* (ST) en pollos Broiler demostró una reducción de la colonización cecal ≥ 4.2 log₁₀ de SE y ≥ 2.19 log₁₀ de ST, dentro de las 24 horas post tratamiento. La reducción se hizo más evidente a las 48 horas post tratamiento. Los pollos que habían sido inoculados con *S. Hadar* no respondieron a su bacteriófago específico (Atterbury *et al*, 2007)

En Chile, hasta hoy se ha realizado solo un estudio sobre el posible uso de bacteriófagos para la producción aviar. En éste se verificó la eficacia del bacteriófago $\beta\alpha$ SE sobre la colonización de *Salmonella* Enteritidis en pollos broiler. Se trabajó con grupos experimentales de 15 animales cada uno, donde el grupo 1 se inoculó con una relación bacteria/fago de 1:1, el grupo 2 con una relación 1:10, el grupo 3 constituyó el control de infección de la cepa desafío S.E *nal^r rif^r* (dosis de 4×10^6 UFC/ml) y el grupo 4, que fue inoculado solo con el fago en una dosis 10^7 UFP/ml, (grupo control de inocuidad del fago). Luego de 10 días post inoculación se efectuó la eutanasia de cada una de las aves y se aisló la cepa desafío a partir de intestino y de un “pool” de órganos internos. La administración del fago en una dosis de 10^6 UFP/ml (MOI 1), disminuyó en forma significativa ($p < 0.05$) el número de aislamientos de *Salmonella* desde hígado y corazón vs. el grupo control, no así desde intestino. El fago administrado en una dosis de 10^7 UFP/ ml (MOI 10), disminuyó significativamente los aislamientos de *Salmonella* a nivel intestinal vs el grupo control ($p < 0.05$), no ocurriendo lo mismo en órganos internos. En el grupo control de inocuidad del fago, inoculado con 10^7 UFP/ml, no se observó daño en órganos internos a nivel macroscópico. Los resultados obtenidos permitieron concluir que el uso del bacteriófago $\beta\alpha$ SE es eficaz en disminuir la colonización intestinal y sistémica de pollos desafiados con una cepa de SE (Borie *et al*, 2004).

Estos buenos resultados preliminares sumados a la problemática actual de esta enfermedad en el país permiten sugerir que los bacteriófagos podrían ser utilizados para disminuir la incidencia y el recuento de *Salmonella* Enteritidis en aves comerciales, disminuyendo con ello la contaminación de SE en productos y subproductos de origen aviar.

En Chile, el Servicio Agrícola y Ganadero (SAG), realiza esfuerzos técnicos y financieros en el control y prevención de *Salmonella* dado que es considerada de riesgo para la salud pública, afecta la productividad del sector agropecuario, y su correcto monitoreo podría situar al país en una condición estratégica para las exportaciones. En 1998, el SAG elabora un plan nacional de control de *Salmonella*, que involucra vigilancia en planteles de ponedoras y de aves reproductoras y, además un conjunto de medidas básicas de control para planteles positivos y negativos a esta enterobacteria (González y Correa, 1998).

Los planteles cuyo objetivo sea el mercado internacional deben solicitar su ingreso en los programas PABCO (planteles animales bajo control oficial) y cualquier plantel de postura o producción que solicite dicho ingreso, debe realizar un chequeo inicial para determinar la condición sanitaria respecto a *Salmonella* Enteritidis. De ser positivo, el plantel podrá ser incorporado al programa PABCO, pero como plantel en saneamiento (SAG, 2000).

Dados los grandes esfuerzos económicos y técnicos que han realizado, tanto los organismos gubernamentales como la empresa privada a través de sus profesionales, es un desafío brindar nuevas herramientas que puedan ser un aporte en el control de esta zoonosis. En este contexto dado los buenos resultados obtenidos previamente a nivel nacional se plantea que la terapia preventiva con una mezcla de 3 fagos líticos sería capaz de reducir la colonización y recuento de SE en pollos experimentalmente infectados; independiente de la vía de administración.

OBJETIVOS

Objetivo general:

Uso de bacteriófagos líticos en el control y prevención de *Salmonella* Enteritidis en aves.

Objetivos específicos:

- 1.- Determinar cualitativamente el efecto *in vivo* de 3 bacteriófagos líticos, solos y en asociación, sobre la colonización intestinal y sistémica de *Salmonella* Enteritidis en un modelo aviar.

- 2.- Determinar cuantitativamente el efecto *in vivo* de 3 bacteriófagos líticos, solos y en asociación, sobre la colonización intestinal y sistémica de *Salmonella* Enteritidis en un modelo aviar.

- 3.- Evaluar las vías de administración oral y respiratoria de bacteriófagos en pollos infectados experimentalmente con *Salmonella* Enteritidis.

MATERIAL Y MÉTODOS

DISEÑO: El presente estudio se desarrollo como parte del proyecto FONDECYT N° 1060569, “Biocontrol de *Salmonella* en Medicina Veterinaria mediante el uso de bacteriófagos”, y se realizó en el Laboratorio de Microbiología del Departamento de Medicina Preventiva Animal de la Facultad de Ciencias Veterinarias y Pecuarias de la Universidad de Chile.

A) MATERIAL:

A.1) Animales de Experimentación:

Se trabajó con huevos SPF (libre de patógenos específicos) 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 (SAG), Ministerio de Agricultura. Al día de edad las aves fueron trasladadas a la sala de animales de experimentación del Departamento de Medicina Preventiva Animal de la facultad, y criadas en jaulas bajo condiciones de humedad, temperatura y luminosidad adecuadas para la especie y la edad. La dieta fue en base a alimento preparado sin antibióticos (donado gentilmente por el Dr. Sergio Ramírez), y agua *ad limitum*. Se mantuvieron todas las condiciones de bioseguridad para evitar cualquier contaminación con una cepa de *Salmonella* de campo.

A.2) Cepa Desafío:

Se utilizó una cepa 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). A partir de ella en Laboratorio de Bacteriología del Instituto de Biología de la Universidad Católica de Valparaíso se seleccionó una cepa mutante espontánea con resistencia a Ácido Nalidíxico (*nal^r*) y Rifampicina (*rif^r*).

A.3) Bacteriófagos líticos contra S.E:

Se utilizaron tres bacteriófagos nativos, denominados aleatoriamente F1, F2 y F3.

Los F1, F2 y F3 fueron aislados de tres planteles avícolas diferentes, de la V región de Chile Los tres fagos presentaron actividad lítica con formación de placas líticas de gran tamaño frente a la cepa desafío (SE) y otras cepas del mismo serotipo.

El aislamiento, caracterización, preparación y titulación del inóculo se realizaron en el Laboratorio de Bacteriología del Instituto de Biología de la Pontificia Universidad Católica de Valparaíso, a cargo del Dr. James Robeson.

Los fagos se utilizaron en una multiplicidad de infección (MOI) de 10^3 UFP, correspondiendo ésta a la cantidad de fagos por cada bacteria inoculada, en este caso 1000 veces la Dosis Bacteriana Mínima infectante (punto B4).

B) METODOS

B.1) BIOSEGURIDAD:

Debido a que se trabajó con un enteropatógeno zoonótico, fueron consideradas todas las medidas de bioseguridad correspondientes al nivel 2 para *Salmonella* no *Typhi* (CDC, 1999).

El manejo de las aves se realizó con vestimenta protectora (cubrecalzado y buzos desechables, gorros, guantes y protectores faciales). Los residuos orgánicos sólidos tales como la cama de las aves, los restos de alimento y las aves muertas, fueron incinerados previo tratamiento con amonio cuaternario para disminuir la posibilidad de generar aerosoles contaminantes (Metaquat®). El agua de bebida, de desecho y residuos líquidos fueron clorados previo a su eliminación.

Se utilizó asepti-steryl (Ecolab®) como esterilizante respectivamente para su uso en paredes, pisos, mesones, jaulas, techos, de acuerdo a lo recomendado por el fabricante

B.2) ANALISIS BACTERIOLÓGICOS:

El aislamiento e identificación de la cepa desafío se realizó para todos los grupos experimentales. Para este procedimiento, se siguieron las pautas australianas de diagnóstico de *Salmonella* para muestras clínicas (Murray y Barton, 1993) que se describen a continuación:

B.2.a) Bacteriología Cualitativa:

Las muestras se depositaron en bolsas de polipropileno dobles para una primera etapa de enriquecimiento con caldo Rappaport-Vassiliadis (RV) (Difco®), en razón aproximada de 1:100. Las muestras se trituraron y homogeneizaron durante 90 segundos en un homogeneizador de placa (“Masticator”, Arquimed®), para luego incubarse a 37°C por 24, 48 y 72 horas. Cada 24 horas, se tomaron 3 asadas del caldo RV incubado y se realizó la siembra en placas de agar XLD (Difco®), adicionado de Rifampicina (20 µg/ml, Laboratorio Chile®) y Ácido Nalidixico (20µg/ml, Laboratorio Chile®). Las placas se incubaron a 37° C por 24 horas. Una vez obtenidas las colonias sospechosas de *Salmonella* (colonias con centro negro y bordes transparentes) se les realizaron las pruebas bioquímicas tradicionales mediante una batería corta (desaminación de Fenilalanina, desarrollo en Citrato de Simmon’s, presencia de H₂S y fermentación de glucosa y lactosa). Las colonias indicativas de ser *Salmonella* se corroboraron con una prueba rápida de aglutinación, utilizando el antisuero polivalente grupo D₁ (Difco®).

B.2.b) Bacteriología Cuantitativa:

A partir del caldo RV con las muestras incubadas a 37°C por 24 horas se realizaron 4 diluciones al décimo en suero fisiológico estéril. De cada dilución, se sacó 1 ml y se homogenizó con aproximadamente 12 ml de agar XLD a 45°C, adicionado de Ácido Nalidixico y Rifampicina (20 µg/ml). Se vertió, en duplicado, en placas Petri desechables que fueron incubadas a 37°C por 24 hrs. Posteriormente se procedió a contar el número de colonias en cada placa para calcular las unidades formadoras de colonias (UFC).

B.3) ANIMALIZACIÓN DE LA CEPA DESAFÍO:

La animalización de la cepa desafío tuvo como objetivo exacerbar la virulencia de ésta. Se realizaron 6 pasajes en pollos comerciales. Para ello, se preparó una suspensión bacteriana de SE *Nal^r Rif^r* de 24 horas de incubación a 37°C y se ajustó al tubo N°1 del Nefelómetro de M^c Farland (3x10⁸ bacterias /ml). Cada ave se inoculó vía oral con 1 ml de la suspensión ajustada. A los 5 días post desafío, se procedió a la eutanasia del ave, mediante el método de dislocación cervical (Beaver, 2001), se realizó la necropsia y se procedió al reisolamiento de la cepa desafío desde contenido intestinal y un pool de órganos (hígado, corazón y bazo).

El aislamiento e identificación se realizó según lo descrito en el punto B.2.a. Con la cepa aislada desde el “pool” de órganos o de intestino se repitió este proceso 6 veces consecutivas en un pollo cada vez.

B.4) DETERMINACIÓN DE LA DOSIS MÍNIMA INFECTANTE (DMI)

Se consideró como dosis mínima infectante aquella mínima concentración de bacterias capaces de lograr al menos un 90% de aislamiento de la cepa desafío en las muestras, tanto “pool” de órganos como intestino completo.

Para determinar la dosis mínima infectante, se realizó una suspensión en caldo común de SE *Nal^r Rif^r*, animalizada por 9 pasajes en pollos (SE. P-9). Se incubó a 37° C por 24 horas y se ajustó por nefelometría para tener una concentración aproximada de 3×10^8 bacterias/ml; desde esta concentración, se realizaron diluciones al décimo, con suero fisiológico estéril, desde 10^8 hasta 10^1 bacterias/ml. De allí, se utilizaron para las inoculaciones las diluciones correspondientes a 10^7 hasta 10^3 bacterias/ml. Se formaron 5 grupos de 7 pollitos SPF de 10 días de edad cada uno y fueron inoculados vía oral con las 5 dosis teóricas: 10^3 , 10^4 , 10^5 , 10^6 , 10^7 bacterias/ml. Diez días posterior al desafío se realizó la eutanasia de las aves mediante dislocación cervical (Beaver, 2001), se procedió a la necropsia desde donde se obtuvieron las muestras correspondientes a “pool” de órganos (hígado, corazón y bazo) e intestino completo. Luego se realizó el reaislamiento de la cepa desafío según lo descrito en el punto B.2.a. Para corroborar la cantidad de bacterias vivas inoculadas en las aves (10^7 hasta 10^3) se procedió a realizar un recuento bacteriano con el método descrito en el punto B.2.b.

B.5) CONTROL DE INOCUIDAD DE LOS BACTERIOFAGOS:

Con el fin de determinar la inocuidad de los bacteriófagos en estudio, se inocularon vía intraperitoneal y endovenosa los tres bacteriófagos individuales a diferentes grupos de ratones machos CF1 de entre 16 y 18 gr, obtenidos del Instituto de Salud Pública de Chile (ISP).

Se formaron 6 grupos de 4 ratones cada uno (dos grupos para cada fago), a un grupo se les dio a beber agua con (10^8 UFP/ml) de fagos durante tres días, y al otro, se les inoculó vía intraperitoneal con 0,5 ml de la solución de los distintos bacteriófagos (10^8 UFP/ml).

Además, se formó otro grupo de 6 ratones que consistió en un grupo control placebo que fue inoculado con suero fisiológico estéril en la misma dosis y por las mismas vías. El grupo que fue inoculado por vía oral, luego de no evidenciar muerte ni alteración clínica aparente a los 7 días, fue inoculado nuevamente, pero en esta oportunidad por vía endovenosa (vena caudal) con una dosis de 0.2ml de la misma solución de fagos.

Finalmente, todos los grupos de ratones fueron eutanasiados con éter etílico a los 10 días desde la primera inoculación, y se les realizó una necropsia donde se buscaron alteraciones macroscópicas.

Paralelamente, se trabajó con pollos comerciales y pollos SPF de 15 días de edad. Se formaron 6 grupos iguales a los anteriores, pero estos fueron inoculados por vía oral, con 1 ml de 10^8 UFP/ml de cada fago, dos veces, en un intervalo de 24 horas. En este caso se siguió el mismo procedimiento de eutanasia y posterior necropsia que para los ratones.

B.6) EXPERIENCIA N° 1: EFECTIVIDAD DE TRES FAGOS DOSIFICADOS EN FORMA INDIVIDUAL Y ASOCIADOS.

Una vez determinada la dosis mínima infectante y corroborada la inocuidad de los fagos, se procedió al análisis de la efectividad de tres bacteriófagos nativos, solos y en asociación (“mezcla”). Para ello se formaron 7 grupos de 30 pollitos SPF, que fueron distribuidos de la siguiente forma (Tabla N° 1):

Tabla N°1: **Distribución de grupos experimentales**

Grupos	N° de pollos	Tipo de fago	Dosis de fago (MOI) *	Dosis S.E <i>nal^r rif^r</i>
Control negativo	30	-----	-----	-----
Control infección SE	30	-----	-----	1 DMI*
Control fago	30	Mezcla	10^3 UFP	-----
Grupo 1	30	Fago 1	10^3 UFP	1 DMI
Grupo 2	30	Fago 2	10^3 UFP	1 DMI
Grupo 3	30	Fago 3	10^3 UFP	1 DMI
Grupo 4	30	Mezcla	10^3 UFP	1 DMI

*MOI: Multiplicidad de infección.

*DMI: Dosis Mínima Infectante.

Al día 8 de edad, los animales fueron distribuidos en cubículos (salas) separados entre sí, con una carga de 10 pollos por jaula.

Luego, al día 9 y 10 de edad, las aves de los grupos experimentales (grupos 1, 2, 3, 4, y control fago) recibieron por vía oral 1 ml de su respectivo tratamiento con los fagos, suspendidos en suero fisiológico estéril, calculando una multiplicidad de infección de 10^3 UFP (razón Fago: Bacteria). Transcurrido un par de horas de la segunda dosificación (día 10 de edad) se desafió a las aves de los grupos 1, 2, 3 y 4 con una dosis correspondiente a una DMI de SE *Nal^r Rif^r* calculada previamente (punto B.4).

Además, se inoculó al grupo control infección SE por la misma vía y con la misma dosis bacteriana. El grupo control negativo no recibió fagos ni la cepa desafío, siendo sus objetivos corroborar el estado sanitario de las aves durante la experiencia y evidenciar una posible contaminación o transmisión accidental de los fagos o de la cepa desafío entre experimentales.

Los grupos se manejaron de manera independiente. Cada una de las salas disponía de un contenedor de alimento, uno para el agua de bebida, y uno para los desechos líquidos contaminados de tal manera de evitar toda contaminación cruzada entre las salas.

También se estableció un orden para el manejo de las aves (alimentación, limpieza, reposición del agua), siendo el grupo control negativo el primero, seguido por el grupo control fago, control infección y luego los grupos 1, 2, 3 y finalmente el grupo 4.

Diez días después de las respectivas inoculaciones con la cepa desafío (20 días de edad), la totalidad de las aves fueron sometidas a eutanasia mediante el método de dislocación cervical (Beaver, 2001). En primer lugar se realizó la eutanasia de los grupos controles, luego los grupos que habían recibido tratamiento con fagos de manera individual y finalmente el grupo con el tratamiento de mezcla de fagos. Se les realizó la necropsia para obtener dos tipos de muestras de cada ave, una consistente en un pool de órganos (hígado, corazón y bazo) y otra que correspondió a intestino completo, con las cuales se siguió la pauta de aislamiento descrita en el punto B.2.a para el análisis bacteriológico cualitativo y en el punto B.2.b para el análisis bacteriológico cuantitativo.

B.7) EXPERIENCIA N° 2: EFECTO DE LA VIA DE ADMINISTRACION DE FAGOS.

Luego de los resultados obtenidos en la experiencia N° 1, se utilizó el tratamiento con fagos que demostró mayor eficiencia en la experiencia número 1. Para el desarrollo de esta etapa se realizaron 5 grupos de 22 pollos de 1 día de edad provenientes de madres no vacunadas, y libres de *Salmonella* spp. obtenidos del bioterio de crianza del SAG, a cargo de la Dra. Mónica Osorio. Para corroborar su negatividad a *Salmonella*, se realizaron cultivos tradicionales de un pool de deposiciones, mediante la técnica descrita en el punto B.2.a

Los grupos formados y sus respectivos tratamientos se detallan en la Tabla N° 2

Tabla N°2: Distribución de los grupos experimentales

Grupo	N° de aves	Via de administracion de fagos	Dosis Fago (MOI)*	Dosis S.E <i>nal^r rif^f</i>
Control de infección	22	Oral	-----	1 DMI*
Control negativo	7	-----	-----	-----
Fago en aerosol	22	Aerosol	10 ³ UFP	1 DMI
Fago en agua de bebida	22	Agua de bebida	10 ³ UFP	1 DMI

*MOI: Multiplicidad de infección.

*DMI: Dosis Mínima Infectante.

Al igual que en la experiencia anterior, las aves fueron ubicadas en la sala de animales de experimentación del Departamento de Medicina Preventiva Animal, en cubículos separados para cada grupo. Al día 9 de edad, los grupos experimentales recibieron su dosis de fagos, sea en el agua de bebida (previa deprivación de 4 horas) o por vía aerosol (gota < a 0,2 micrómetros, equipo Desvac®), dos veces en el día, una dosis en la mañana y otra en la tarde.

Se consideraron dos grupos placebos que recibieron una solución de agua destilada estéril por vía oral y otro por aerosol.

Luego de 10 días post inoculación de la cepa desafío se realizó la eutanasia de las aves y sus respectivas necropsias para la obtención y procesamiento de los dos tipos de muestras ya señalados, (intestino y pool de órganos) a las cuales se les realizó bacteriología cualitativa y bacteriología cuantitativa de la misma forma que en la experiencia N°1.

RESULTADOS

A la cepa desafío se le exacerbó su virulencia mediante numerosos pasajes en aves comerciales de diferentes edades, trabajando finalmente con la cepa que recibió 9 pasajes. Con esta cepa se calculó la dosis mínima infectante (DMI) que correspondió a $8,3 \times 10^5$ UFC/ml para pollitos SPF, dosis donde se esperaba aislar SE en más del 80% de las muestras intestinales y al menos 40% de los órganos internos.

Una vez determinada la DMI, se solicitó al Instituto de Biología de la Universidad Católica de Valparaíso, el envío de los tres fagos en una concentración de 10^8 UFP/ml de tal manera de lograr una MOI de 10^3 UFP/dosis.

El estudio de inocuidad de los fagos realizado en ratones y pollos demostró que la suspensión de los bacteriófagos en dosis de 10^8 UFP/ml no provocó lesiones macroscópicas, ni alteraciones clínicas evidentes durante los 7 días de observación.

RESULTADOS EXPERIENCIA N°1

Los resultados del análisis bacteriológico cualitativo se detallan en la tabla N°1

Tabla N° 3: Detección de *Salmonella* Enteritidis en pollos SPF dosificados con los bacteriófagos F1, F2, F3 solos o en asociación

Tratamiento	n° aves positivas (%)*	n° órganos positivos (%)	n° intestinos positivos (%)
Control Infección	26 (86,6)	14(46,6)	22(73,3)
Mezcla F1,F2,F3	17 (58,6)	7(24,1)	15(51,7)
Fago 1	23 (85,1)	11(40,7)	23(85,1)
Fago 2	21 (70,0)	14(46,6)	21(70,0)
Fago 3	16 (53,3)	11(36,6)	14(46,6)

* Algunas aves se detectaron (+) solo por PCR implementada en el laboratorio de microbiología: grupos control infección (n=2), mezcla(n=3), fago 2(n=3) y fago 3(n=1).

En el grupo control de infección se detectaron 26/30 animales positivos a SE independiente del tipo de muestra; en intestino se aisló la bacteria en 22/30 y en órganos 14/30. En el grupo de aves que recibieron la mezcla de fagos hubo un total de 17/29 aves infectadas, de ellas en 7/29 se aisló la cepa desafío desde órganos y 15/29 desde intestinos. En el grupo tratado con fago 1, el total de aves positivas a SE fue de 23/27, con aislamientos de 11/27 en órganos y 23/27 en intestinos. En el caso del grupo que

recibió el fago 2, las aves positivas a SE fueron 21/30 en total, de estas 14/30 se les aisló la bacteria desde órganos y 21/30 desde intestinos. Finalmente, en el grupo fago 3, 16/30 pollos fueron positivos a SE, de los cuales 11/30 presentaron aislamiento desde órganos y a 14/30 aislamientos desde intestinos (Ver figuras 1, 2 y 3).

Gráfico N°1: Porcentaje de infección en pollos desafiados con SE y tratados con bacteriófagos F1, F2, F3 y su mezcla..

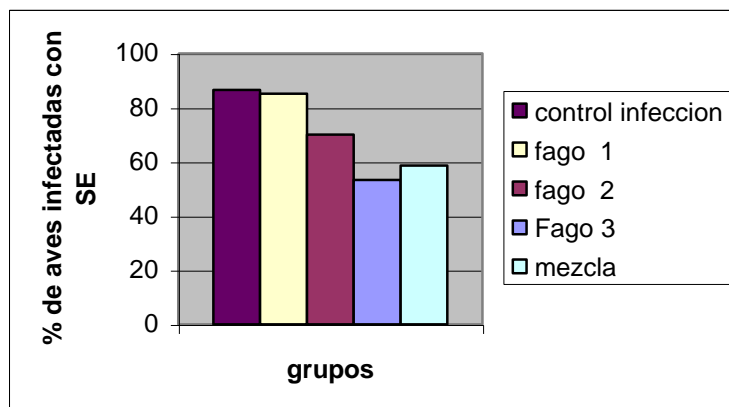


Gráfico N°2: Porcentaje de pollos desafiados con SE y tratados con bacteriófagos F1, F2 y F3, y con una mezcla de ellos, según cultivo de pool de órganos.

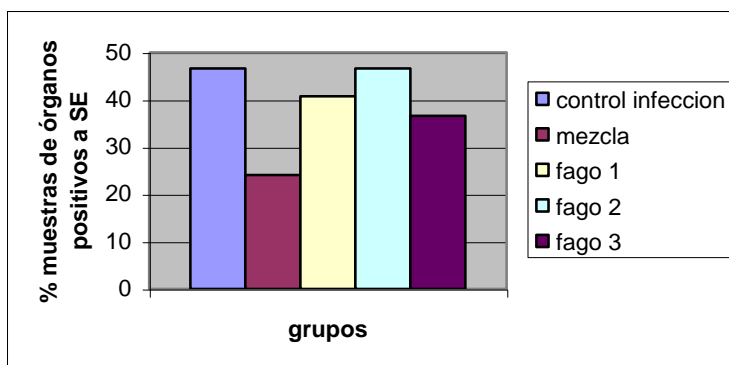
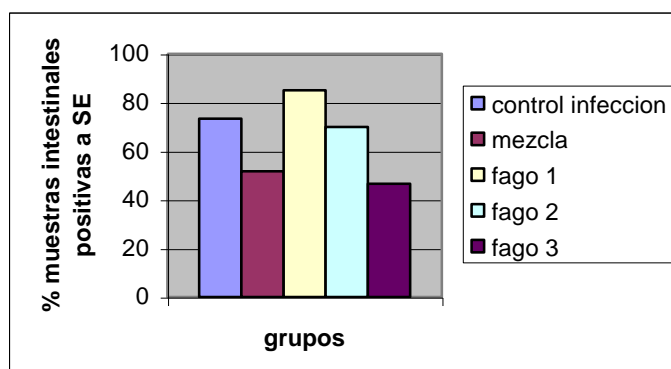


Gráfico N°3: Porcentaje de pollos desafiados con SE y tratados con bacteriófagos F1, F2, F3 y mezcla, según cultivo de contenido intestinal.



Mediante Chi Cuadrado se demostró que el número total de aves infectadas (independiente de la muestra) y tratadas con la mezcla de fagos ($P= 0,0154$) y con Fago 3 ($P= 0,0099$) son significativamente inferiores al grupo control, no encontrando diferencias estadísticas en los grupos tratados con Fago 1 ($P= 0,8723$) y Fago 2 ($P= 0,1172$).

El resultado bacteriológico cuantitativo de aquellos animales infectados (cultivo (+) /PCR (+)), demostró que en las aves que recibieron la mezcla de fagos se logró reducir el recuento de SE en intestino, de $8.47 \log_{10}$ a $5.69 \log_{10}$ de la misma manera que los Fagos 1 y 3 ($5.81 \log_{10}$ y $5.92 \log_{10}$ respectivamente); en las aves tratadas con el Fago 2, se disminuyó el recuento levemente desde $8,47 \log_{10}$ a $7.59 \log_{10}$. Ningún tratamiento logró reducciones importantes del recuento de SE en órganos. Estos resultados son parciales y se les realizó análisis estadístico, ya que hubo aves infectadas según la bacteriología cualitativa que no presentaron desarrollo en la bacteriología cuantitativa.

En el grupo Control Fago, que solo recibió la mezcla de 3 fagos no se observaron alteraciones clínicas ni lesiones macroscópicas hasta el día 10 post infección, asegurando con ello su inocuidad. En el grupo Control sano, que no recibió fago ni cepa desafío no se detectó la cepa desafío ni fagos, descartando la posibilidad de contaminación entre grupos experimentales.

RESULTADO EXPERIENCIA N°2

Para esta etapa se seleccionó la mezcla de fagos 1,2 y 3 en dosis de 10^8 UFP cada uno. En esta experiencia se utilizaron pollitos libres de anticuerpos maternos y libres de *Salmonella* spp. de acuerdo a los resultados del coprocultivo y PCR. La DMI calculada para ellos correspondió a: 9.6×10^5 UFC/ml.

Los resultados de la bacteriología cualitativa se presentan en la tabla N°4.

Tabla N°4: Detección de *Salmonella* Enteritidis en pollitos dosificados con una mezcla de bacteriófagos por diferentes vías de administración.

Tratamiento	n° aves positivas (%)*	n° órganos positivos (%)	n° intestinos positivos (%)
Control Infección	22 (100)	17 (77,2)	22 (100)
Aerosol	16 (72,7)	13 (59,1)	16 (72,7)
Agua de bebida	20 (90,9)	9 (40,9)	20 (90,9)

*Algunas aves se detectaron (+) solo por PCR implementada en el laboratorio de Microbiología. Control infección (6 en órganos), en aerosol (1 en órganos), y agua de bebida (1 en órganos).

En el grupo control infección se detectaron todas las aves infectadas (independiente del tipo de muestra), 17/22 muestras positivas en órganos y 22/22 en intestinos. En el grupo que recibió el fago por vía aerosol, 16/22 aves fueron positivas, de las cuales 13/22 lo fueron en órganos y 16/22 en intestinos. Finalmente para el grupo que recibió la mezcla en el agua de bebida, 20/22 aves se les aisló SE y de estas 9/22 fueron en órganos y 20/22 en intestinos (Ver figuras 4, 5 y 6).

Gráfico N°4: Porcentaje de aves infectadas con SE según vía de administración de una mezcla de bacteriófagos.

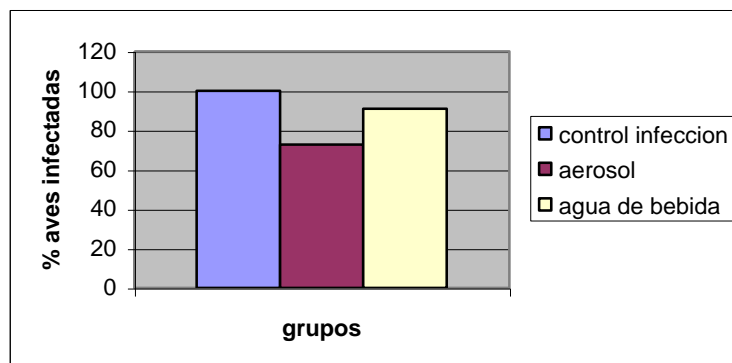


Gráfico N°5: Porcentaje de aves infectadas con SE y tratadas con bacteriófagos por aerosol y agua de bebida, según cultivo de pool órganos.

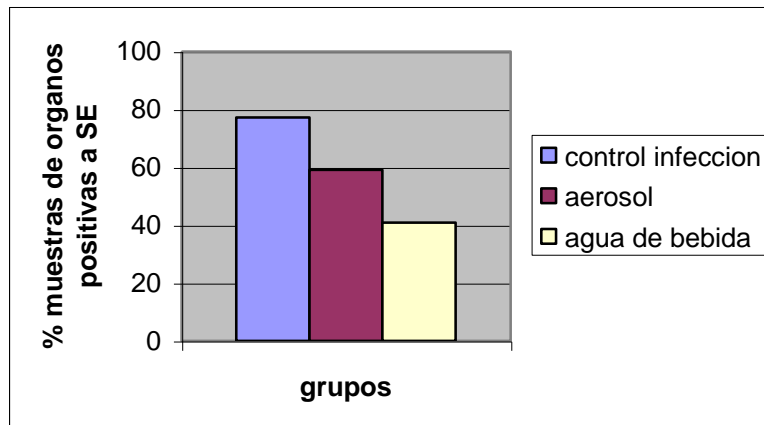
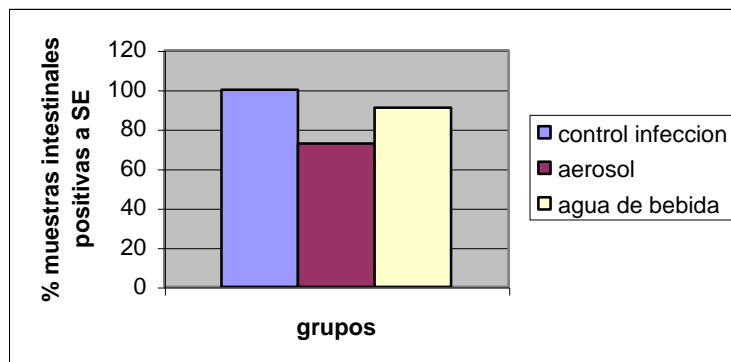
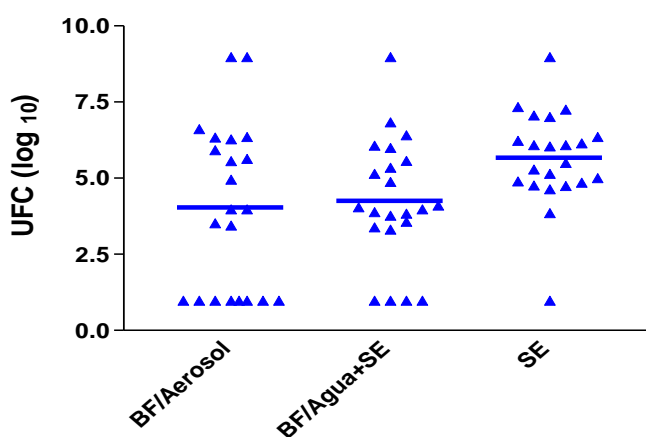


Gráfico N°6: Porcentaje de aves infectadas con SE y tratadas con bacteriófagos por aerosol y agua de bebida, según cultivo de contenido intestinal.



El análisis estadístico de los resultados de la bacteriología cualitativa (figura 4) reveló diferencias estadísticas del total de aves infectadas entre los tres grupos ($P= 0,0186$), correspondiendo esta diferencia al grupo que recibió la mezcla de fagos por vía aerosol ($P= 0,0084$). El análisis según tipo de muestra evidenció en órganos (figura 5) una diferencia significativa entre los tres grupos de aves ($P= 0,0494$), correspondiendo dicha diferencia sólo al grupo de aves que recibieron fagos por el agua de bebida ($P= 0,014$). Por otro lado, la detección de SE en intestinos reveló diferencias significativas entre los tres grupos de aves ($P= 0,0480$), correspondiendo dicha diferencia al grupo que recibió fagos por vía de aerosol ($P= 0,0084$).

Gráfico N°7: Recuento de SE en intestino de pollos desafiados y tratados con una mezcla de bacteriófagos por dos vías de administración.



*BF: bacteriófago SE: *Salmonella* Enteritidis

El análisis bacteriológico cuantitativo reveló que ambos tratamientos, por aerosol ($P < 0,01$) y por agua de bebida ($P < 0,05$) redujeron significativamente el recuento de SE a nivel intestinal (Gráfico N°7), mientras que en órganos no hubo diferencias significativas respecto al grupo control de infección. Los recuentos promedios de SE en intestino del grupo control de infección y en los grupos que recibieron fagos por aerosol y agua de bebida fueron: $5,67 \log_{10}$, $4,04 \log_{10}$ y $4,25 \log_{10}$ respectivamente. En órganos los recuentos promedios de SE fueron de $4,68 \log_{10}$, $3,97 \log_{10}$ y $3,16 \log_{10}$, para grupo control de infección, grupo aerosol y grupo agua de bebida respectivamente.

Los grupos controles que recibieron placebo (agua y aerosol sin fago) y los grupos control sano y control de fagos se observaron normales, sin alteraciones clínicas ni lesiones macroscópicas a la necropsia. En estos grupos no se aisló la cepa desafío por lo tanto se descarta la contaminación entre los grupos experimentales.

DISCUSIÓN

La dosis mínima infectante utilizada para infectar los pollos SPF ($8,3 \times 10^5$ UFC/ml) fue similar a la utilizada por Toro *et al.*, (2005) en el mismo modelo animal, obteniendo altos porcentajes de aislamiento y de recuento bacteriano en las muestras de contenido intestinal y en menor grado desde órganos internos, esto último se debería a que la cepa trabajada no es muy invasiva (40% de infección en órganos) y su comportamiento de menor invasividad se ha observado en otras experiencias realizadas con la misma cepa (Toro *et al.*, 2001; Borie *et al.*, 2004). Por otro lado en investigaciones sobre eficiencia de vacunas contra *Salmonella* en modelos aviáres, las DMI suelen ser similares a los resultados del presente trabajo. La dosis mínima infectante logró un alto porcentaje de infección en las aves desafiadas (86,6%) así como también un elevado número de muestras de contenido intestinal positivas al cultivo (73,3%), sin embargo en órganos se logró menos del 50% de colonización, hecho que comprueba que la cepa utilizada no es tan invasiva como otras. La invasividad se podría mejorar realizando mayor número de pasajes en aves, para exacerbar la virulencia; en este estudio no se pudo utilizar una cepa con mayor número de pasajes ya que en un estudio paralelo realizado en el Laboratorio de Biología de la Pontificia Universidad Católica de Valparaíso, se encontró menor sensibilidad al fago en cepas con más de 9 pasajes en pollos. Pese a lo anterior, el porcentaje de infección obtenido en este estudio fue adecuado, considerando que un animal infectado fue que presentará un cultivo positivo a SE, independiente del tipo de muestra (intestino y/o “pool” de órganos).

En la mayoría de los estudios realizados sobre fagoterapia se prefiere utilizar una asociación de dos o más bacteriófagos, de tal manera de disminuir al máximo posible la presencia de bacterias mutantes resistentes (O’Flynn *et al.*, 2004; Toro *et al.*, 2005; Higgins *et al.*, 2005; Tanji *et al.*, 2005; Carrillo *et al.*, 2005; Atterbury *et al.*, 2007). También se espera que estas asociaciones demuestren un mayor efecto en la disminución de la infección y del recuento bacteriano en los animales tratados, es así como Sklar y Joerger, (2001) en pollos infectados experimentalmente con SE, al utilizar una mezcla de fagos y comparándolo con la administración individual de ellos, observan que si bien no hay diferencias significativas en la eficiencia de los grupos tratados con fagos, la mezcla reduce fuertemente los recuentos bacterianos de SE a nivel cecal.

Así, con la mezcla de fagos lograron disminuir los recuentos de SE desde $88,3 \times 10^5$ UFC/g (grupo control infección) a $19,9 \times 10^5$ UFC/g, mientras que con los fagos dosificados individualmente obtuvieron en promedio $36,43 \times 10^5$ UFC/g.

En el presente estudio si bien la terapia preventiva con la mezcla de los tres bacteriófagos logró disminuir significativamente el porcentaje de aves infectadas a diferencia de los fagos 1 y 2 administrados independientemente, no fue diferente de lo observado en el grupo de aves tratadas con el fago 3 administrado de forma individual. Este resultado sugiere que el éxito obtenido con la mezcla de fagos se le puede atribuir mas bien al fago 3 que a los dos restantes, sin embargo se seleccionó la mezcla para continuar con las experiencias, basados en que esta produce menor número de bacterias resistentes, que cada uno en forma individual (resultados obtenidos del Laboratorio de bacteriología del instituto de Biología de la Pontificia Universidad Católica de Valparaíso).

Estos resultados plantean la necesidad de continuar la búsqueda de fagos líticos contra SE de tal manera de potenciar la buena actividad lítica demostrada por el fago 3. La disminución de la infección tanto en las aves tratadas con la mezcla de fagos como con el fago 3 individual revela la utilidad promisorio de esta alternativa, ya que de las 30 aves desafiadas por grupo, otorgó protección a 9 y 10 pollos respectivamente. Esta herramienta, sumada a otras alternativas de control podría mejorar notablemente los niveles de eficiencia de tales medidas.

La eficiencia de los fagos, mezcla y fago 3, fue diferente dependiendo del tipo de muestra analizada. La actividad lítica de la mezcla de fagos en los órganos de las aves experimentalmente infectadas con SE, fue mayor (24,1% de positividad) que aquella observada en los órganos de las aves tratadas solo con el fago 3 (36,6% de positividad), mientras que a nivel intestinal los resultados se invirtieron, siendo mejor para el fago 3 (46,6% de positividad) que para la mezcla (51,7% de positividad). Al analizar los resultados de recuento de SE en contenido intestinal, se observó, comparado con el grupo control de infección, que los tratamientos con mezcla, fagos 1 y 3 lograron reducir los recuentos en 2,78, 2,66, y 2,55 unidades logarítmicas respectivamente. La reducción observada en los recuentos a nivel intestinal, de las aves tratadas con el fago 2 fue solo de 0,88 unidades logarítmicas.

En órganos, el recuento bacteriano no demostró importantes diferencias entre el grupo control y las aves que recibieron fagos en todas sus formas. Los resultados de los recuentos obtenidos en esta experiencia no fueron analizados mediante estadística ni tampoco pueden ser comparados con estudios similares ya que no en todos los animales infectados (bacteriología cualitativa) se logró realizar el recuento correspondiente. Una posible explicación a este hecho sería que se redujo la viabilidad bacteriana en la solución salina fisiológica en que se realizó la dilución de las muestras; en algunos trabajos internacionales donde se han realizado recuentos de SE, se utilizan buffer tamponado o bien un medio de enriquecimiento como diluyente (Atterbury *et al*, 2007; Fiorentin *et al* 2005; Sklar y Joerger, 2001; Toro *et al* 2005). Sin embargo, otros autores no han observado problemas al usar solución salina fisiológica como medio de dilución para *Salmonella* spp (Gast *et al*, 2005). Otra posible explicación es la sensibilidad del cultivo tradicional de *Salmonella* utilizado en esta experiencia.

La sensibilidad es de 10^3 UFC/g, por lo tanto toda muestra que se encuentre bajo este límite podría no ser pesquizada en el recuento por exceso de dilución. Además, la cantidad de muestra obtenida a partir del caldo RV (1ml) para realizar las diluciones podría haber sido insuficiente (Gast *et al*, 2005). Otra posibilidad sería una falta de homogenización de las diluciones previo al traspaso de éstas al agar correspondiente.

Uno de los factores que pueden influir fuertemente en los resultados exitosos de las fagoterapias se refiere a la vía de administración de los fagos. Se sabe que los bacteriófagos son capaces de atravesar el epitelio intestinal y difundir hacia el torrente sanguíneo, realizando una fagemia breve, en ausencia de su bacteria blanco (Górski y Weber-Dabrowska, 2005). Desde la sangre, pueden llegar hacia múltiples tejidos tales como linfonodos mesentéricos, e incluso llegar a cerebro ya que los fagos son capaces de atravesar la barrera hematoencefálica (Barrow *et al*, 1998), hígado, bazo e intestino (Górski y Weber-Dabrowska, 2005), probablemente buscando la célula bacteriana específica para adherirse y multiplicarse. Entonces, la mejor vía de administración será aquella que logre una rápida llegada del fago al tejido infectado por la bacteria, en concentraciones lo suficientemente elevadas para lograr lisar la mayor cantidad de células blanco posibles. Así, se ha descrito la llegada de bacteriófagos a circulación solo cinco minutos después de que éste es administrado por vía rectal, siendo por esta vía donde se describe que los títulos encontrados en sistema circulatorio son hasta 5 veces mayores que aquellos encontrados cuando el bacteriófago es dosificado por vía oral.

Esto sugiere que existen fagos que son capaces de llegar a circulación más bien por difusión que vía sistema linfático (Dabrowska *et al*, 2005).

Respecto a la segunda experiencia que se realizó, no se utilizaron en esta oportunidad pollos SPF por motivos ajenos al desarrollo de la investigación. Se utilizaron pollos comerciales provenientes de madres libres de *Salmonella* spp y sin vacunación por lo tanto, se presumió que estos no tenían anticuerpos maternos contra *Salmonella*, ni tampoco estaban infectados. Los resultados arrojados por el coprocultivo de los pollos fueron negativos a la presencia de esta bacteria. En este trabajo se analizaron dos vías de administración diferentes, aerosol y agua de bebida. En el análisis bacteriológico cualitativo, los grupos de aves que recibieron fagos vía aerosol demostró ser más eficiente en disminuir el número de aves infectadas (27,3%) de aves libres de SE, en comparación con el grupo control de infección (100%) de aves infectadas, independiente del tipo de muestra, mientras que el grupo que recibió la mezcla de fagos en el agua de bebida disminuyó solo un 9,1% de aves libres de SE el total de aves infectadas.

Las diferencias entre el grupo aerosol y agua de bebida, pueden deberse a que los títulos del fago se mantienen mas altos al ser administrados vía aerosol, donde el fago penetra no sólo por la vía respiratoria sino también por la mucosa conjuntival y por la vía oral, “autoinoculación” oral por acicalamiento. Por el contrario, cuando estos se dosifican por agua de bebida, si la totalidad del agua no es consumida por las aves los fagos no son ingeridos por completo. Por la vía oral los fagos se pueden ver afectados por las condiciones fisicoquímicas del medio ambiente (Huff *et al*, 2002; Górski y Weber-Dabrowska, 2005). La actividad lítica de los fagos puede verse disminuida ya que hay que considerar los distintos factores fisicoquímicos que pudiesen afectar la estabilidad de la suspensión de bacteriófagos, tales como, pH del tejido intestinal. Se ha demostrado que los fagos disminuyen su viabilidad si son sensibles a ambientes ácidos, así se describe que la penetración de estos hacia la sangre es menos efectiva cuando es desde el estómago, que si el fago proviene de otro segmento del sistema gastrointestinal (Dabrowska *et al*, 2005). Al respecto Hudson *et al*, (2005), observaron que los fagos serían estables a pH de 5 a 8, pero a bajas temperaturas este rango se puede extender entre pH de 4 a 10, existiendo una severa disminución en los títulos a pH bajo 3.

Una posible solución a este problema sería adicionar a la suspensión de bacteriófago un buffer o un antiácido como CaCO_3 (Atterbury *et al*, 2007) que proteja al fago si este va a ser administrado por vía oral. Respecto al comportamiento de los fagos a nivel intestinal se corrobora lo que otras investigaciones han demostrado (Huff *et al*, 2003a), siendo la vía aerosol nuevamente la más eficiente en la reducción de las muestras positivas, desde un 100% de intestinos positivos a solo un 72,7 %.

Sin embargo las diferencias observadas a nivel de órganos muestran que en este caso los fagos administrados por agua de bebida son más eficientes que cuando estos son dosificados por vía aerosol, con un 59,1% y un 40,9% en las reducciones respectivamente. Estos resultados obtenidos a nivel de órganos pueden deberse a que el fago vía agua de bebida llega antes a intestino encontrándose con su blanco y es capaz de sobrevivir e impedir de mejor manera el paso de la bacteria a nivel sistémico que cuando este es administrado vía aerosol. En relación a la bacteriología cuantitativa, se comprobó que independiente del tipo de muestra, hubo diferencias significativas en ambos tipos de tratamientos respecto del control, pero la disminución en los recuentos fue mayor en el grupo que recibió los fagos vía aerosol. Analizando los recuentos obtenidos para órganos se observa que a pesar que no hay diferencias significativas entre tratamientos y el control las mayores reducciones se obtuvieron al administrar la mezcla de fagos vía agua de bebida ($3,16 \log_{10}$), comparado con $4,68 \log_{10}$ para grupo control infección. En el caso de los resultados obtenidos en los recuentos en contenido intestinal, se observó que la vía aerosol fue la más eficiente al disminuir los recuentos promedios de SE ($4,04 \log_{10}$) en comparación con aquellos del grupo control infección ($5,67 \log_{10}$).

Además de los buenos resultados obtenidos en la terapia preventiva con los fagos analizados, es interesante destacar que ellos fueron inocuos en las aves y ratones que fueron dosificados con altas dosis y por diferentes vías. En estos animales no se observaron cambios conductuales que permitieran sugerir un posible efecto negativo del fago, tampoco se presentaron lesiones macroscópicas a nivel intestinal ni a nivel sistémico cuando se les realizó la necropsia. Estudios previos de rango de hospedero demostraron que estos fagos no son capaces de lisar bacterias de flora normal proveniente de aves sanas (Pontificia Universidad Católica de Valparaíso, comunicación personal Dr. James Robeson).

La inocuidad de los fagos ha sido documentada a través de varios ensayos realizados en seres humanos y animales (Sulakvelidze *et al*, 2001). En otras investigaciones, donde se utilizaron bacteriófagos como terapia en distintos modelos animales demostraron que estos no presentaron ningún grado de toxicidad. (Sulakvelidze *et al*, 2001; Summers, 2001; Fiorentin *et al*, 2005; Xie *et al*, 2005; Toro *et al* 2004; Skurnik y Strauch, 2006). Además Sulakvelidze *et al*, 2001 describieron que no se reportaron efectos nocivos en terapias realizadas en seres humanos contra disentería por *Shigella* spp.

Xie *et al*, 2005 realizaron un estudio de toxicidad del bacteriófago *Esc- A* en pollos, comparando dos grupos de aves, uno que recibió alimento con fago y un segundo grupo que recibió alimento mas un antibiótico (cloromicetina). A los pollos del primer grupo se les administró una dosis de 10^5 UFP del fago por vía oral durante dos semanas; a los del segundo grupo se les dio 1 mg del antibiótico y se mantuvieron en cubículos para evidenciar su comportamiento y letalidad. A las dos semanas, ningún pollo alimentado con bacteriófago murió, además estos no presentaron signos clínicos de enfermedad y mantuvieron su peso promedio.

Los resultados de este estudio demuestran que los bacteriófagos son una innovadora herramienta a considerar en el control de *Salmonella* Enteritidis en el sector de la producción avícola. Además no hay que descartar futuras investigaciones para el control de otros patógenos que afecten distintos rubros de la producción agropecuaria donde el Médico Veterinario pueda contribuir a la salud pública del país.

CONCLUSIONES

Tras el análisis de los resultados obtenidos en este estudio, se puede concluir que:

- A) La administración de tres bacteriófagos líticos, solos y en asociación, contra *Salmonella* Enteritidis sería eficaz en disminuir la colonización intestinal y sistémica de pollos desafiados con esta cepa.
- B) Los tres bacteriófagos líticos en estudio, fueron capaces de reducir los recuentos intestinales y sistémicos de *Salmonella* Enteritidis en pollos previamente desafiados con esta cepa.
- C) La administración de una mezcla de los tres fagos, dosificada por vía aerosol fue mas eficiente en disminuir la colonización intestinal y sistémica en aves experimentalmente infectadas con la cepa desafío.
- D) La dosificación de una mezcla de fagos por vía agua de bebida logró disminuir la colonización de *Salmonella* Enteritidis a nivel sistémico, mejor que cuando esta mezcla fue administrada vía aerosol.
- E) La dosificación de una mezcla de fagos por vía aerosol logró disminuir la colonización de *Salmonella* Enteritidis a nivel intestinal, mejor que cuando esta mezcla fue administrada vía agua de bebida.
- F) El análisis bacteriológico cuantitativo revelo que ambos tratamientos, por aerosol y por agua de bebida redujeron significativamente el recuento de SE a nivel intestinal.
- G) Los bacteriófagos demostraron ser inocuos y no producir ningún tipo de alteración en el comportamiento de las aves, además no produjeron alteraciones macroscópicas evidenciables cuando se les realizó la necropsia.
- H) Ninguna de las dos vías que fueron probadas en este estudio provoco algún trastorno a las aves.

BIBLIOGRAFIA

AKKINA, J.; HOGUE, A.; ANGULO, F., JONSON, R.; PETERSEN, K.; SAINI, P.; FEDORKA-CRAY, P.; SCHLOSSER, W. 1999. Epidemiologic aspects, control, and importance of multiple-drug resistant *Salmonella typhimurium* DT104 in the United States. JAVMA. 214(6): 790- 797.

ALEXANDRE, M.; POZO,C.; GONZALEZ, V.; MARTINEZ, M.C.; PRAT, S.; FERNANDEZ, A.; FICA, A.; FERNANDEZ, J.; HEITMANN,I. 2000. Detección de *Salmonella enteritidis* en muestras de productos avícolas de consumo humano en la región Metropolitana. Rev. med. Chile.128 (10):

ATTERBURY, R.; VAN BERGEN, M.; ORTIZ, F.; LOVELL, M.; HARRIS, J.; DE BOER, A.; WAGENAAR, J.; ALLEN, V.; BARROW, P.; 2007. Bacteriophage therapy to reduce *Salmonella* colonization of Broiler chickens. Appl. Environ Microbiol. In Press.

BARROW, P.; HASSAN, J.; BERCHIERI, A, 1990. Reduction in faecal excretion of *Salmonella Typhimurium* strain F98 in chickens vaccinated with live and killed *S. Typhimurium* organisms. Epidemiol. Infect. 104:413-426.

BARROW, P. 1991. Experimental infection of chickens with *Salmonella* Enteritidis. Avian. Pathol. 20: 145-153.

BARROW, P. 1993. *Salmonella* control-past, present and future. Avian. Pathol. 22:657-669.

BARROW, P.; LOVELL, M.; BERCHIERI, A. 1998. Use of lytic bacteriophage for control of experimental *Escherichia coli* septicemia and meningitis in Chickens and Calves. Clin Diagn Lab Immunol.5(3):294-298.

BEAVER, B. 2001. Report of the AVMA panel on euthanasia. JAVMA, 218(5):669-695.

BORIE, C.; SANCHEZ, M.L.; JARA, M.A.; PEDROZO, S.; PRADO, V.; ACUNA, M.; CATTAN, P. 2002. Roedores Sinantropicos de la Región Metropolitana como reservorios de *Salmonella spp* y de *E.coli* enterohemorrágico. In: XIX Congr. Chil. Infect. Santiago, Chile.17-19. noviembre. P. 71.

BORIE, C.; ZURITA, P.; SANTANDER, J.; KRUEGER, E.; SÁNCHEZ, M.L.; RAMÍREZ, S.; ROBESON, J. 2004. Efecto del bacteriófago F3α SE sobre la colonización de *Salmonella* Enteritidis en un modelo aviar. XIX Panamerican Congress of Veterinary Science, octubre, Buenos Aires, Argentina.

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

BRAVO, V. 2004.Utilización de *Salmonella* spp. en el monitoreo de la resistencia bacteriana en cerdos y aves. Tesis de grado, Medicina Veterinaria. U. de Chile. P.52.

CARRILLO, L.; 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(11): 6554-6563.

CDC, 1999 Biosafety in microbiological and biomedical laboratories. U.S Department of Health and Human Services. 4th Edition.

DABROWSKA, K.; SWITALA-JELEN, K.; OPOLSKI, A.; WEBER-DABROWSKA, B.; GORSKI, A; 2005. Bacteriophage penetration in vertebrates. Journal of Applied Microbiology. 98:7-13.

DONOGHUE. A.M., P.J.BLORE, K. COLE, N.M.LOSKUTOFF, and D.J.Donoghue, 2004. Detection of *Campylobacter* or *Salmonella* in turkey semen and the ability of poultry semen extenders to reduce their concentrations. Poult. Sci. 83:1728-1733.

FDA. FOOD AND DRUG ADMINISTRATION. 2007. Bacteria-Eating Virus Approved as Food Additive. FDA Consumer Magazine. 41(1).

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(2): 85-93.

FIERER, J.; GUINEY, D. 2001. Diverse virulence traits underlying different clinical outcomes of *Salmonella* infection. J. Clin. Invest. 107(7): 775-780.

FIGUEROA, M.; RODRIGUEZ, A. 2005. Mecanismos moleculares de patogenicidad de *Salmonella* sp. Rev. Latinoam. Microbiol. 47(1-2): 25-42.

FIORENTIN, L.; VIEIRA, N. D.; BARIONI, W.; 2005. Oral treatment with bacteriophages reduces the concentration of *Salmonella Enteritidis* PT4 in caecal contents of broilers. Avian. Pathol. 34(3)258-263.

GAST, R.K.; HOLT, P.S.; MURASE, T. 2005. Penetration of *Salmonella* Enteritidis and *Salmonella* Heidelberg into egg yolks in an in vitro contamination model. Poult.Sci.84:621-625.

GILL, J.J.; PACAN, J.C.; CARSON, M.E.; LESLIE, K.E.; GRIFFITHS, M.W.; SABOUR, P.M. 2006. Efficacy and pharmacokinetics of bacteriophages therapy in treatment of subclinical *Staphylococcus aureus* mastitis in lactating dairy cattle. Antimicrob. Chemother. 50(9): 2912-2918.

GONZALEZ, N.; CORREA, J.M. 1998. Plan nacional de control de *Salmonella* en la avicultura chilena. TecnoVet. 4(2):13-15.

GOODE, D.; ALLEN, V. M.; BARROW, P. 2003. Reduction of experimental *Salmonella* and *campylobacter* contamination of chicken skin by application of lytic bacteriophages. Appl. Environ. Microbiol. 69(8): 5032-5036.

GÓRSKI, A.; WEBER-DABROWSKA, B.; 2005. The potential role of endogenous bacteriophages in controlling invading pathogens. *Cell.Mol.Life.Sci.*62.511-519.

GÓRSKI, A.; DABROWSKA, K.; SWITALA-JELE, K.; NOWACZYK, M.; WEBER-DABROWSKA, B.; BORATYNSKI, J.; WIETRZYK, J.; OPOLSKI, A. 2003. New insights into the possible role of bacteriophages in host defense and disease. *Medical. Immunol.*

GREER, G. 2005. Bacteriophage control of foodborne bacteria. *Journal of food protection.* 68(5): 1102-1111.

HAGAN, W.; BRUNER, D. 1992. Hagan and Bruner's microbiology and infectious diseases of domestic animals. 8th ed. Cornell University Press. New York, U.S.A. 951p.

HERES, L.; ENGEL, H. A. P.; URLINGS, J.A. WAGENAAR.; F.VAN KNAPEN, 2004. Effect of acidified feed on susceptibility of broiler chickens to intestinal infection by *Campylobacter* and *Salmonella*. *Vet. Microbiol.* 99:259-267.

HIGGINS, J. P.; HIGGINS, S.E.; GUENTHER, K. L.; 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.

HUDSON, J. A.; BILLINGTON, C.; CAREY-SMITH, G.; GREENING, G. 2005. Bacteriophages as biocontrol agents in food. *J. of Food. Protection.* 68(2):426-437.

HUFF, W.; HUFF, G.; RATH, N.; BALOG, J.; XIE, H.; MOORE, P.; DONOGHUE, A. 2002. Prevention of *Escherichia coli* respiratory infection in Broiler chickens with bacteriophage(SPR02). *Poultry Sci.*81:437-441.

HUFF, W.; HUFF, G.; RATH, N.; BALOG, J.; DONOGHUE, A. 2003a. Evaluation of aerosol spray and intramuscular injection of bacteriophage to treat an *Escherichia coli* respiratory infection. *Poult. Sci.*82:1108-1112.

HUFF, W.; HUFF, G.; RATH, N.; BALOG, J.; DONOGHUE, A. 2003b. Bacteriophage treatment of a severe *Escherichia coli* respiratory infection in broiler chickens. *Avian. Dis.* 47:1399-1405.

HUFF, W.E, G. R. HUFF, N.C. RATH, J.M. BALOG, and A. M. DONOGHUE, 2005. Alternatives to antibiotics: Utilization of Bacteriophage to treat colibacillosis and prevent foodborne pathogens. *Poult. Sci.* 84:655-659.

HUFF, W.; HUFF, G.; RATH, N.; DONOGHUE, A. 2006. Evaluation of the influence of bacteriophage titer on the treatment of colibacillosis in broiler chickens. *Poult. Sci.* 85(8): 1373-1377.

HOLT, P.; GAST, R.; KELLY-AEHLE, S, 2003. Use of a live attenuated *Salmonella Typhimurium* vaccine to protect hens against *Salmonella Enteritidis* infection while undergoing molt. *Avian. Dis.* 47:656-651.

HUME, M.; KUBENA, R.; BEIER, R.; HINTON, A.; CORRIER, D.; DELOACH, J. 1992. Fermentation of [¹⁴C] lactose in broiler chicks by cecal anaerobes. *Poult. Sci.* 71: 1464-1470.

ISP. INSTITUTO DE SALUD PUBLICA DE CHILE.

KAISER, MG.; LAMONT, S.J., 2001. Genetic Line Differences in Survival and Pathogen Load in Young Layer Chicks after *Salmonella enterica* Serovar Enteritidis Exposure. *Poult. Sci.* 80:1105-1108.

KOENEN, M.E., J. KRAMER, R. VAN DER HULST, L. HERES, S. H. M. JEURISSEN, and W. J. A. BOERSMA, 2004. Immunomodulation by probiotic lactobacilli in layer- and meat- type chickens. *Poult. Sci.* 45:355-366.

KRIEG, N.; HOLT, J. 1984. Bergey's manual of systematic bacteriology. Williams & Wilkins. Baltimore. USA. v. 1.

LINE, J.; BAILEY, J.; COX, N.; STERN, N.; TOMPKINS, T. 1998. Effect of yeast-supplemented feed on *Salmonella* and *Campylobacter* populations in broilers. *Poult. Sci.* 77: 405-410.

LEVERENTZ, B.; CONWAY, WS.; ALAVIDZE, Z.; JANISIEWICZ, WJ.; FUCHS, Y.; CAMP, MJ.; CHIGHLADZE, E.; SULÑAKVELIDZE, A. 2001. Examination of bacteriophages as a biocontrol method for *Salmonella* on fresh-cut fruit: a model study. *J. Food prot.* 64(8): 1116-1121.

METHNER, U.; BERNDT, A.; STEINBACH, G, 2001. Combination of competitive exclusion and immunization with an attenuated live *Salmonella* vaccine in chickens. *Avian. Dis.* 45:631-638.

MODI, R.; HIRVI, Y.; GRIFFITHS, M. 2001. Effects of phage on survival of *Salmonella* Enteritidis during manufacture and storage of cheddar cheese made from raw and pasteurized milk. *J. Food. Prot.* 64(7):927-33.

MURRAY, C.J; BARTON, M. 1993. Salmonellosis bacteriology. In: Australian standard diagnostic techniques for animal diseases. L.A. Corner and T. J. Baugust (Eds). Australia. pp. 3-8.

NISBET, D.; CORRIER, D.; RICKE, S.; HUME, M.; BIRD, J.; DELOACH, J. 1996. Cecal propionic acid as biological indicator of the early establishment of a microbial ecosystem inhibitory to *Salmonella* in chicks. *Anaerobe.* 2:345:350.

O'FLYNN, G.; ROSS, R.; FITZGERALD, G.; COFFEY, A. 2004. Evaluation of a cocktail of three bacteriophages for biocontrol of *Escherichia coli* O157:H7. *Applied and environmental Microbiology.* 70(6): 3417-3424.

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. Med. Chile.*

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.

SAG. SERVICIO AGRÍCOLA Y GANADERO. 2000. Planteles avícolas bajo control oficial (PABCO) manual de procedimientos. [en línea]. <http://www.sag.gob.cl/Framearea.asp?cod=12> [consulta: 20-07-2007].

SANCHEZ, S.; HOLFACRE, CH.; LEE, M.; MAURER, J.; DOYLE, M. 2002. Animal sources of salmonellosis in humans. JAVMA. 221(4): 492-497.

SKLAR, I.; JOERGER, R. 2000. Attempts to utilize bacteriophage to combat *Salmonella* enterica serovar Enteritidis infection in chickens. journal of food safety. 21:15-29.

SCHNEITZ, C. 2005. Competitive exclusion in poultry- 30 years of research. Food control 16:657-667.

SAN MARTIN, B.; LAPIERRE, L.; TORO, C.; BRAVO, V.; CORNEJO, J.; HORMAZABAL, J.C.; BORIE, C. 2005. Isolation and molecular characterization of quinolone resistant *Salmonella* spp. From poultry farms. Vet.Microbiol.110: 239-244.

SCHWAN, W.; HUANG, X.; KOPECKO, D. 2000. Differential bacterial survival, replication, and apoptosis-inducing ability of *Salmonella* serovars within human and murine macrophages. Infect. Immune. 68(3): 1005-1013.

SWANSON, S.J.; SNIDER, C.; BRADEN, C, R.; BOXRUD, D. 2007. Multidrug-resistant *Salmonella* enterica serotype Typhimurium associated with pet rodents. New England journal of Medicine. 356:21-29.

SKURNIK, M.; STRAUCH, E.; 2006. Phage therapy: Facts and fiction. Inter. J. Med. Microbiol. 296(1):5-14.

SULAKVELIDZE, A.; ALAVIDZE, Z.; MORRIS, G.; 2001. Bacteriophage therapy. Antimicrobial agents and chemotherapy. 45 (3): 649-659.

SUMMERS, W.; 2001. Bacteriophage Therapy. Annu. Rev. Microbiol.55:437-451.

TANJI, Y.; SHIMADA, T.; FUKUDOMI, H.; MIYANAGA, K.; NAKAI, Y.; UNNO, H.; 2005. Therapeutic use of phage cocktail for controlling *Escherichia coli* O157:H7 in gastrointestinal tract of mice. Journal of Bioscience and Bioengineering. 100(3): 280-287.

TEREBIZNIK, M.; VIEIRA, J.; MARCUS, S.; SLADE, A.; YIP, C.; TRIMBLE, W.; MEYER, T.; FINLAY, B.; GRINSTEIN, S. 2002. Elimination of host cell PtdIns

(4, 5) P2 by bacterial SigD promotes membrane fission during invasion by Salmonella. Nat. Cell Biol.4:766-773.

TINDALL, B.J.; GRIMONT, P. A. D.; GARRITY, G. M.; EUZEBY, J. P. 2005. Nomenclature and taxonomy of the genus *Salmonella*. International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology. 55:521-524.

TORO, H.; SAUCEDO, C.; BORIE, C.; GOUGH, E.; ALCAINO, H. 1999. Health status of free-living pigeons in the city of Santiago. Avian. Pathol. 28: 619-623.

TORO, H.; BORIE, C.; CESAREO, M.; SAN MARTIN, R. 2001. A possible immunomodulatory effect of saponins from *Quillaja saponaria* in chickens. In: Proceedings Of the fiftieth Western Poultry Disease Conference. California USA. 24-26 march, 2001. University of California, Davis, California. pp. 171-174.

TORO, H.; PRICE, S.B.; MCKEE, S.; 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.

WAGENAAR, J.; VAN BERGEN, M.; MUELLER, M, A.; WASSENAAR, T.; CARLTON, R. 2005. Phage therapy reduces *Campylobacter jejuni* colonization in broilers. Vet. Microbiol.109: 275-283.

WICHARD, J.M.; SRIRANGANATHAN, N.; PIERSON, F.W. 2003. Suppression of *Salmonella* growth by wild-type and large-plaque variants of bacteriophage Felix O1 in liquid culture and on chicken frankfurters. J. Food. Prot. 66(2): 220-225.

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.

ZINSSER, F. 1967. *Salmonella* y Salmonelosis. Microbiología de Zinsser. 3^a ed. Unión tipográfica editorial hispano-americana. México D.F. México. pp. 686-693.

