



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



**BACTERIÓFAGOS: PROFILAXIS EN GALLINAS  
COMERCIALES DE POSTURA INFECTADAS  
EXPERIMENTALMENTE CON *Salmonella* Enteritidis**

**CAROLINA HAUVA BUSTOS**

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

PROFESOR GUÍA: DRA. CONSUELO BORIE POLANCO. M.V., M.SC.

**SANTIAGO, CHILE**  
**2009**



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



**BACTERIÓFAGOS: PROFILAXIS EN GALLINAS  
COMERCIALES DE POSTURA INFECTADAS  
EXPERIMENTALMENTE CON *Salmonella* Enteritidis**

**CAROLINA HAUVA BUSTOS**

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

NOTA FINAL: .....

	NOTA	FIRMA
PROFESOR GUÍA : DRA. CONSUELO BORIE POLANCO .....	.....	.....
PROFESOR CONSEJERO: DR. HÉCTOR HIDALGO OLATE .....	.....	.....
PROFESOR CONSEJERO: DR. PATRICIO RETAMAL MERINO .....	.....	.....

**SANTIAGO, CHILE**  
**2009**

# ÍNDICE

	Pág.
RESUMEN.....	3
SUMMARY.....	5
INTRODUCCIÓN.....	7
REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA.....	9
HIPÓTESIS.....	28
OBJETIVOS.....	28
MATERIAL Y MÉTODOS.....	29
RESULTADOS.....	36
DISCUSIÓN.....	41
CONCLUSIONES.....	50
BIBLIOGRAFÍA.....	51

## RESUMEN

*Salmonella* Enteritidis (S.E.) se encuentra ampliamente distribuida alrededor del mundo, causando problemas en salud pública y pérdidas económicas para los países, particularmente para la industria avícola. Las aves de corral son el principal reservorio de este enteropatógeno y dentro de los productos avícolas, el huevo presenta una mayor importancia epidemiológica en los brotes causados por esta bacteria. Debido a que las medidas de control no han sido lo suficientemente satisfactorias y, producto del desarrollo de resistencia a antimicrobianos, renace el interés por el uso de bacteriófagos líticos como una herramienta terapéutica y profiláctica.

El objetivo de este estudio fue determinar si una mezcla de tres bacteriófagos líticos, administrados de manera profiláctica, era capaz de disminuir la incidencia de infección y el recuento (UFC/g) de S.E. en el tracto reproductivo (ovario y oviducto) de gallinas infectadas experimentalmente. Para ello, se utilizaron 80 gallinas comerciales de postura Hy Line Brown, de 22 semanas de edad, las que se dividieron de manera aleatoria en cuatro grupos; control negativo (A, no recibió fagos ni S.E.), control de inocuidad de fago (C, solo se le administraron fagos), control de infección (B, solo desafiadas con S.E.) y grupo terapia (D, fagos y S.E.). Las aves pertenecientes a los grupos C y D, recibieron por tres días consecutivos una dosis de  $10^{11}$  UFP/cada fago/mL (MOI  $10^3$ ), por vía oral forzada y al cuarto día del ensayo, las gallinas de los grupos B y D, fueron desafiadas con S.E. a una dosis total de  $2,4 \times 10^8$  UFC, por vía oral. Al décimo día post infección se procedió al sacrificio de las aves, para la obtención de muestras separadas de ovario y oviducto, las que se analizaron mediante bacteriología cualitativa y cuantitativa (UFC/g).

La bacteriología cualitativa reveló a nivel de ovario, un 43,3% de positividad en el grupo control de infección, mientras que en el grupo tratado con bacteriófagos el porcentaje alcanzó un 30%, reducción (13,3%) que no fue estadísticamente significativa ( $p=0,2839$ ). Situación similar ocurrió en tejido oviductal, en donde la incidencia de S.E. en el grupo control de infección (23,3%) y en el grupo que recibió fagos (10%), no presentaron diferencias estadísticamente significativas ( $p=0,1659$ ).

En cuanto a la bacteriología cuantitativa, el tratamiento con bacteriófagos no logró disminuir significativamente el recuento de S.E. a nivel oviductal ( $p=0,1007$ ), mientras que en ovario, la utilización profiláctica del cóctel de fagos redujo significativamente ( $p=0,0489$ ) la colonización de la bacteria, al compararlo con los recuentos del grupo control de infección ( $0,95$  versus  $0,31$  UFC  $\log_{10}$ ).

Las aves pertenecientes al grupo control de inocuidad de fago, se observaron asintomáticas durante toda la experiencia y no presentaron lesiones patológicas macroscópicas al momento de la necropsia.

De acuerdo a los resultados obtenidos en este trabajo, se concluye que la utilización profiláctica de una mezcla de tres bacteriófagos líticos, en gallinas de postura no fue eficaz en reducir la incidencia de infección ni los recuentos de S.E. en tejidos reproductivos, exceptuando la colonización a nivel ovárico (recuento). La actividad lítica de estos virus demostrada sólo en el tejido ovárico, sugiere que una mayor investigación es necesaria para determinar el verdadero aporte de la utilización de bacteriófagos como biocontroladores de S.E. en gallinas de postura.

## SUMMARY

*Salmonella* Enteritidis (S.E.) is widely distributed around the world, causing problems in public health and economic losses for countries, particularly for the poultry industry. Poultry are the main reservoir of this enteropathogen and among the avian products, the egg presents the greatest epidemiological importance in outbreaks caused by this bacterium. Because control measures have not been sufficiently successful, and because the development of antimicrobial resistance, rekindled interest in the use of lytic bacteriophages as a therapeutic and prophylactic tool.

The aim of this study was to determine if a mixture of three lytic bacteriophages, administered prophylactically, was capable of reducing the incidence of infection and the S.E. count (CFU/g) in the reproductive tract (ovary and oviduct) of experimentally infected laying hens. For this purpose, 80 commercial Hy Line Brown laying hens were used, of 22 weeks old. They were divided randomly into four groups: negative control (A, that didn't receive neither phage, nor S.E.), phage safety control (C, they only received phages), infection control (B, only challenged with S.E.) and phage therapy group (D, they received S.E. and phages). The birds of C and D groups were inoculated a three days consecutive dose of  $10^{11}$  PFU/each phage/mL (MOI  $10^3$ ), by oral route and the fourth day, the birds of B and D groups, were orally challenged with S.E. with a total dose of  $2.4 \times 10^8$  CFU by the oral route. The tenth day post infection, the birds were sacrificed, to obtain separate samples of ovary and oviduct, which were analyzed using qualitative and quantitative bacteriology (CFU/g).

Qualitative bacteriology showed a 43.3% of positive ovary in the infection control group, while in the group treated with bacteriophages the percentage of positives reached a 30%, this reduction (13.3%) wasn't significant ( $p = 0.2839$ ). A similar situation was observed in oviduct tissues, where the incidence of S.E. in the infection control group (23.3%) compared with the phage therapy group (10%), wasn't significant ( $p = 0.1659$ ).

In the quantitative bacteriology, the phage therapy didn't significantly reduce the S.E. count in the oviductal tissue ( $p = 0.1007$ ), whereas in the ovary, the prophylactic use

of phage cocktail reduced significantly ( $p = 0.0489$ ) the S.E. colonization, compared with the infection control group (0.95 CFU  $\log_{10}$  versus 0.31).

The birds of phage safety control group were observed asymptomatic, during all the experience and they didn't showed macroscopic pathological lesions at the necropsy.

According to the results obtained in this study, it can be conclude that the prophylactic use of a phage cocktail in laying hens, didn't reduce the incidence of infection, neither the S.E. counts in reproductive tissues, excepting the ovaric tissue colonization (S.E. count). The phages lytic activity in ovaric tissue demostrated in this study, clearly makes necessary to suggest to deep into the research of the real contribution of the use of bacteriophages as biocontrol S.E. in laying hens.

## INTRODUCCIÓN

En la actualidad, las enfermedades transmitidas por los alimentos, continúan siendo un grave problema en salud pública a nivel mundial. Estas producen grandes daños económicos tanto en países desarrollados, como subdesarrollados y existe una mayor preocupación con respecto al tema, debido al aumento de enfermedades emergentes graves, entre ellas, Salmonelosis.

En Chile, la presencia de *Salmonella* es endémica, siendo *Salmonella enterica* serotipo Enteritidis (*Salmonella* Enteritidis o S.E.) uno de los serotipos aislado con mayor frecuencia en humanos, animales y alimentos. Entre los últimos, destacan los productos avícolas como el huevo y sus derivados, pues son los que presentan una mayor importancia epidemiológica, en comparación a la carne, ya que por motivos culinarios muchas de las preparaciones que contienen huevo, no incluyen una cocción adecuada a diferencia de la carne de pollo que generalmente se consume cocida. Es por ello que las aves de postura tienen un importante rol en la epidemiología de esta zoonosis, pues ellas son las que contaminan el huevo con este patógeno, ya sea mediante transmisión vertical (transovárica), horizontal (por contacto directo del huevo con heces contaminadas) o ambas a la vez.

Hasta la fecha existen numerosas medidas de control que han sido utilizadas en aves, sin embargo ninguna de ellas ha logrado la eficiencia esperada, toda vez que la enfermedad continúa considerándose endémica y emergente. Estudios recientes, efectuados en aves jóvenes experimentalmente infectadas con S.E., utilizan bacteriófagos líticos (virus capaces de infectar bacterias y producir su lisis), como una alternativa terapéutica y profiláctica promisorio. Estos estudios han demostrado que los bacteriófagos, independiente de la vía de administración (oral, aerosol, intramuscular), logran llegar y permanecer por un tiempo en diversos órganos. De esta forma, la fagoterapia ha logrado reducir la incidencia y colonización de dicha bacteria a nivel cecal y de órganos como hígado y bazo. Sin embargo, no existe información disponible sobre la presencia y efectividad lítica de estos virus a nivel de tejido reproductivo en gallinas, por lo que se desconoce si la fagoterapia podría tener importancia en disminuir la contaminación interna de los huevos.

De esta forma, surge la idea de estudiar el uso de bacteriófagos líticos en gallinas de postura, como una medida profiláctica, que logre controlar la colonización y multiplicación de S.E. en tejido reproductivo y por consiguiente, obtener una disminución en la contaminación interna de los huevos. De ocurrir así, este hallazgo científico será un importante avance en Medicina Veterinaria Preventiva y salud pública ya que pondrá a disposición de la industria avícola un manejo alternativo y/o complementario, tendiente al mejoramiento de la calidad sanitaria de los huevos destinados al consumo humano.

## REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA

El Género *Salmonella* pertenece a la Familia Enterobacteriaceae y sus microorganismos corresponden a bacilos Gram negativos, que se comportan como patógenos intracelulares facultativos. Antiguamente, se aceptaba taxonómicamente la existencia de múltiples especies de *Salmonella*, pero hoy en día, se reconocen solo dos especies clasificadas de acuerdo a sus características bioquímicas generales; *Salmonella bongori* y *Salmonella enterica*, esta última a su vez se divide en seis subespecies: *enterica*, *salamae*, *arizonae*, *diarizonae*, *indica* y *houtenae* (Tindall *et al.*, 2005). Según el esquema clásico de Kauffman-White basado en antígenos somáticos (O), flagelares (H) y capsulares (Vi), las cepas se clasifican en más de 2.500 serotipos, de los cuales la subespecie *enterica* representa el 99% de los aislamientos (Parra *et al.*, 2002; Figueroa y Verdugo, 2005).

Estas bacterias se hallan ampliamente distribuidas en la naturaleza, encontrándose en el tracto gastrointestinal de mamíferos domésticos y silvestres, reptiles, aves e insectos (Parra *et al.*, 2002). Según la adaptación que presenta *Salmonella* a su hospedero, se distinguen tres categorías epidemiológicas relacionadas con los serotipos:

- Serotipos que solo afectan al ser humano, como es el caso de *S. Typhi* y *S. Paratyphi*, causando fiebre tifoidea y paratifoidea respectivamente.
- Serotipos altamente específicos a hospederos animales y que raramente producen enfermedad en el ser humano, salvo *S. Dublin* que causa enteritis, septicemia, neumonía y aborto en bovinos y, *S. Cholerae-suis* que provoca septicemia, neumonía y enterocolitis en cerdos. Dentro de esta categoría se incluye también *S. Abortusequi*, *S. Abortusovis* (ambas ocasionando aborto en equinos y ovinos respectivamente), *S. Gallinarum* y *S. Pullorum*, las que causan fiebre tifoidea y pulorosis respectivamente en pollos y pavos (Poppe, 1999).

- Serotipos no adaptados a un hospedero específico, los que causan salmonelosis en el ser humano y en una amplia gama de hospederos animales (Poppe, 1999). Dentro de esta larga lista, de más de 2.300 serotipos, se encuentran *S. Enteritidis*, *S. Typhimurium*, *S. Hadar*, *S. Heidelberg*, *S. Newport*, *S. Infantis*, *S. Agona*, *S. Derby* y *S. Anatum*, entre otros.

La Salmonelosis es una de las enfermedades transmitidas por alimentos (ETA) más común y ampliamente distribuida a nivel mundial. Constituye un importante problema en salud pública, representando elevados costos en muchos países (WHO, 2007). Según una estimación del Centro de Control y Prevención de Enfermedades de Estados Unidos (CDC), las infecciones causadas por *Salmonella* generan 1,4 millones de casos clínicos, 15.000 hospitalizaciones y, 400 muertes cada año en ese país (Gast, 2007). Además, en Dinamarca se calcula que el costo por infecciones causadas por *Salmonella* en el ser humano, asciende a 15,5 millones de dólares anuales, mientras que el programa de control y erradicación de la infección en animales destinados al consumo humano, tiene un costo anual de 14,1 millones de dólares, valor que sin embargo, es considerado una ganancia, ya que se estima una reducción de 25,5 millones de dólares, por concepto de pérdidas ocasionadas por incumplimiento laboral y tratamientos médicos (Gutiérrez *et al.*, 2008).

La infección por *Salmonella* se produce después de la ingestión de alimento o agua contaminada y, aunque la exposición a éste patógeno es frecuente, se requiere de un inóculo aproximado de  $10^6$  a  $10^8$  bacterias, para el desarrollo de la enfermedad sintomática en el ser humano (Sánchez y Cardona, 2003), la que se manifiesta como un episodio de enterocolitis autolimitante (Gutiérrez *et al.*, 2008). No obstante, la manifestación de enfermedad clínica en niños, ancianos o personas inmunodeprimidas puede ser fatal (Breytenbach, 2004). El periodo de incubación es generalmente de 8 a 72 horas y los síntomas que comúnmente se observan son diarrea acuosa, dolor abdominal, náuseas y fiebre, los que se resuelven entre 4 a 10 días, sin embargo, la diarrea puede ser severa y el paciente puede requerir hospitalización (Gutiérrez *et al.*, 2008). El estado de portador puede durar semanas a meses y el tratamiento con antibióticos sólo se recomienda en casos severos o en pacientes de riesgo (Poppe, 1999).

Los alimentos contaminados de origen animal son fuente de un importante número de infecciones en el ser humano. A su vez, los productos de origen avícola han sido la principal fuente, pero no la única, de las llamadas salmonelas no adaptadas a hospedero específico (Poppe, 1999) y dentro de ellas, los serotipos *S. Enteritidis* y *S. Typhimurium*, se asocian con mayor frecuencia a las aves de corral (Breytenbach, 2004).

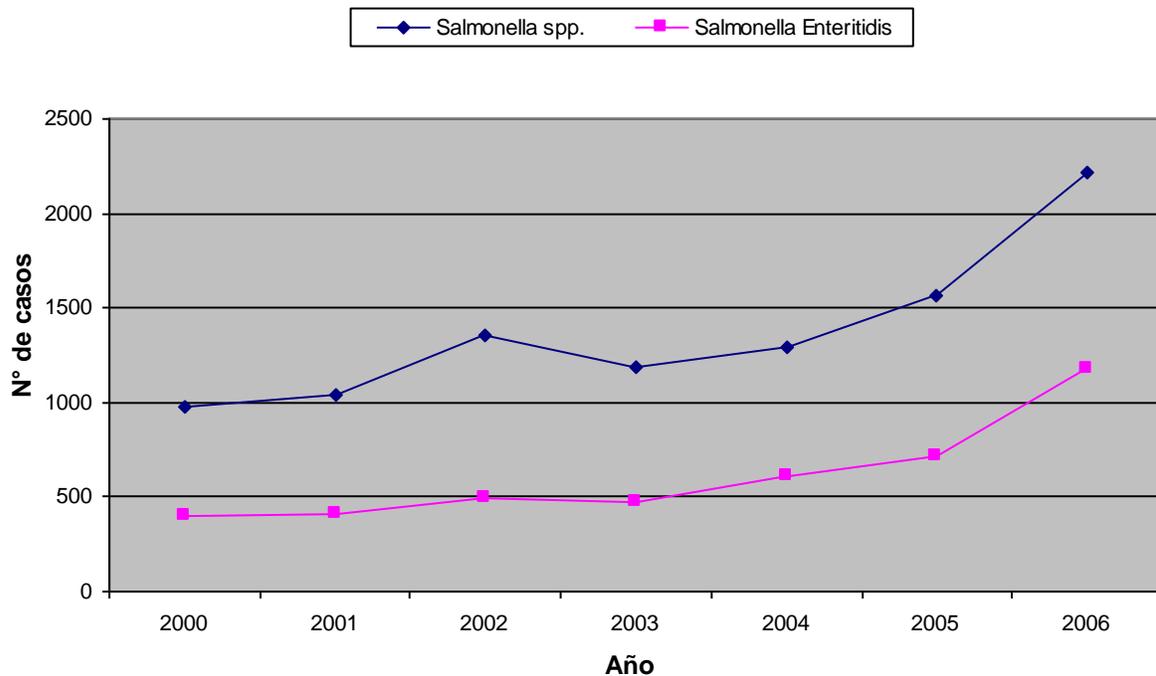
Desde mediados de los ochentas, el número de brotes de salmonelosis en humanos por *Salmonella* Enteritidis se ha incrementado dramáticamente, comenzando inicialmente en países europeos y posteriormente reportándose en todo el mundo (Poppe, 1999; De Buck *et al.*, 2004a). Epidemiólogos en muchos países han atribuido una proporción significativa de este aumento de la incidencia al consumo de huevo contaminado (Gast, 1994) y, análisis epidemiológicos apuntan a los huevos y sus productos, como los principales factores de riesgo en las infecciones por *Salmonella* Enteritidis en los seres humanos (De Buck *et al.*, 2004a). En Estados Unidos de Norte América, aproximadamente un 80% de los brotes por S.E. entre 1985-1999, en que se ha identificado una fuente de alimentos, fueron atribuidos al huevo (Gast, 2007). Huevos crudos o ligeramente cocidos y alimentos que lo contienen en dichas condiciones (mayonesa casera, merengue, "milk shake", "mousse", helados, entre otros) han sido implicados en brotes de salmonelosis (Poppe, 1999).

Esta misma situación comenzó a evidenciarse en Chile durante 1994, en donde las infecciones por *Salmonella* Enteritidis se incrementaron de manera considerable en el norte del país, con cifras que implicaban un 3.000% de aumento sobre los esporádicos casos registrados históricamente, extendiéndose progresivamente hacia el resto del país y, desplazando a *Salmonella* Typhi, que en 1998 sólo alcanzó un 11% de los aislamientos totales, en contraste con *Salmonella* Enteritidis, que en el mismo periodo ocupó el primer lugar de los aislamientos con un 69% del total (Fica *et al.*, 2001).

En el gráfico nº 1 se presentan los casos de salmonelosis confirmados de muestras clínicas por el Instituto de Salud Pública de Chile (ISP) durante el periodo 2000-2006. Existe un aumento sostenido de los casos de salmonelosis humana en el país, excluyendo el año 2003, donde se registró un leve descenso. Cabe destacar que el serotipo *Salmonella* Enteritidis es el principal agente de ETA, constituyendo casi el 50%

del total de serotipos registrados por el ISP durante los años en que se recopiló la información (Figuroa, 2007).

Gráfico n° 1: Número de casos de *Salmonella spp.* y *Salmonella* Enteritidis en aislamientos clínicos, según año. Laboratorio de Referencia. Chile 2000-2006.



Fuente: (Figuroa, 2007)

Unos de los casos más emblemáticos y que causaron gran alarma pública en el país, fueron los brotes de salmonelosis que se produjeron en marzo de 1998, en donde más de una cincuentena de asistentes a dos fiestas de matrimonio realizadas en Santiago, sufrieron toxiinfección por dicha bacteria. En ambos brotes se determinó que se trataba específicamente de *Salmonella* Enteritidis, fagotipo 4, asociada a la mayonesa ocupada en las preparaciones. Estudios posteriores de vigilancia alimentaria desarrollados en la Región Metropolitana han demostrado que, aproximadamente 1 de cada 1.000 muestras de huevos en venta, está contaminada con *Salmonella* Enteritidis (0,09%) y que 7,08% de la carne de ave, está también contaminada por este mismo agente (Alexandre *et al.*, 2000). Pese a lo anterior, a los huevos se les atribuye una mayor

importancia epidemiológica que a la carne de ave, ya que ellos no siempre se consumen con una cocción adecuada a diferencia de la carne, que normalmente lleva asociada un proceso de cocción antes de su consumo. Además, la población estaría más expuesta a la infección por *Salmonella* Enteritidis, debido a la gran cantidad de unidades de huevos que se consumen en el país, ya que según una estimación del Instituto Nacional de Estadística (INE, 2007) la producción de huevos destinados a consumo, en el año 2006 fue de 2.481.816 millones, con un consumo per cápita de 162,7 unidades (ASOHUEVO, 2008).

La evidencia acumulada a través de los años indica que el huevo es la fuente más importante en brotes de Salmonelosis humana causada por *Salmonella* Enteritidis (De Buck *et al.*, 2004a, Messens *et al.*, 2005, Braden 2006, Gast, 2007), por lo que es necesario conocer de que manera esta bacteria logra infectar el huevo, para conseguir establecer medidas de control efectivas contra este patógeno.

### ***Salmonella* Enteritidis y su llegada al huevo**

Las aves de postura se infectan con *Salmonella* Enteritidis mediante transmisión horizontal, por ingesta de alimento contaminado, o vertical, por traspaso de la bacteria de manera transovárica. Las aves también pueden enfrentarse al patógeno, en la máquina incubadora o nacedora, en la cual unos pocos pollos infectados pueden propagar la infección al resto de las aves, así como también es posible que adquieran la bacteria por transferencia de ésta, desde personal encargado del traslado de las aves a la granja o del periodo de crianza. Otras fuentes de transmisión horizontal incluyen la exposición al patógeno por contacto con vectores de *Salmonella*, dentro de los que se incluyen roedores, insectos y aves silvestres, aerosoles suspendidos en el ambiente o partículas de polvo que transportan la bacteria (Poppe, 1999).

El resultado de la infección es dependiente de la dosis infectante y de la edad, siendo las aves jóvenes mucho más susceptibles, mientras que las aves adultas generalmente no presentan signos clínicos, sin embargo, sirven como portadores intestinales de la infección por largos periodos de tiempo (Breytenbach, 2004),

describiéndose incluso, la persistencia de la colonización intestinal a las 18 semanas post inoculación, en gallinas infectadas experimentalmente (Gast, 1994).

Después de la colonización del epitelio intestinal, mediante adhesinas, *S. Enteritidis* es capaz de invadir y llegar a diversos órganos internos dependiendo de la invasividad de la cepa (Gast, 1994). Así por ejemplo, Gast y Beard (1990) inocularon 155 gallinas de postura White Leghorn de entre 22 y 88 semanas de edad, con *Salmonella* Enteritidis fagotipo 13a, con una dosis de  $10^9$  UFC (unidades formadoras de colonias) por vía oral. Posteriormente, una fracción de las aves fue seleccionada de manera aleatoria, para ser sacrificadas semanalmente y obtener muestras de ciegos, hígado, bazo, ovario y oviducto, las que fueron analizadas mediante bacteriología cualitativa (tabla nº 1). Los autores del ensayo obtuvieron reaislamiento bacteriano en todos los órganos en las primeras dos semanas post inoculación (p.i.), en diferentes proporciones: 89% en ciegos, 89% en hígado, 91% en bazo y un 34% tanto en ovario como oviducto. El reaislamiento de S.E., en los mismos órganos, pero a las 22 semanas post inoculación fue: 8% en ciegos, 3% en hígado y bazo, 8% en ovario y 5% en oviducto.

Tabla nº 1: Aislamiento de *Salmonella* Enteritidis (S.E.), desde órganos internos de gallinas inoculadas por vía oral a distintos tiempos post infección (p.i.).

Muestras positivas a S.E./ total muestras (%)					
Semanas p.i.	Ciegos	Hígado	Bazo	Ovario	Oviducto
1	19/20 (95)	20/20 (100)	20/20 (100)	14/20 (70)	12/20 (60)
2	21/25 (84)	19/24 (79)	20/24 (83)	1/24 (4)	3/24 (13)
3	15/40 (38)	14/40 (35)	11/40 (28)	3/40 (8)	3/40 (8)
4-5	14/30 (47)	7/30 (23)	4/29 (14)	3/29 (10)	1/30 (3)
22	3/40 (8)	1/40 (3)	1/40 (3)	3/40 (8)	2/40 (5)

Fuente: Gast y Beard, 1990

En un estudio realizado por López (2007), en donde se estableció el inicio de la colonización intestinal y sistémica en pollos White Leghorn de 7 días de edad, inoculados

experimentalmente con *Salmonella* Enteritidis (dosis de  $10^4$  y  $10^5$  UFC), se determinó que la colonización sistémica, ocurre extremadamente rápido en las aves, pudiendo reaislarse S.E. a las 3 horas post infección desde muestras de un “pool” de hígado, bazo y corazón. En este estudio no se analizaron tejidos reproductivos.

Una infección sistémica por este patógeno, puede dar lugar a la colonización de ovario y oviducto, los que pueden infectarse independientemente el uno del otro (De Buck *et al.*, 2004a). Okamura *et al.*, (2001) inocularon por vía endovenosa *Salmonella* Enteritidis con una dosis de  $5 \times 10^6$  UFC, a 19 gallinas de postura White Leghorn de 33-37 semanas de edad, para producir una infección sistémica. Las aves fueron sacrificadas a los 4 y 7 días post inoculación, para la obtención de muestras de tejido ovárico e hisopados de los distintos segmentos de oviducto (infundíbulo, mágnium, istmo y útero). Adicionalmente, se recolectaron muestras sanguíneas a los días 1, 2, 4 y 7 post infección, en las que fue posible el reislamiento bacteriano en un 58%, 37%, 16% y 22% de las aves respectivamente. Los resultados arrojados por el análisis bacteriológico de las muestras de tejido reproductivo, se presentan en la tabla nº 2.

Tabla nº 2: Reislamiento de *Salmonella* Enteritidis desde ovario y torulados oviductales de gallinas infectadas, a los 4 y 7 días post inoculación (p.i.).

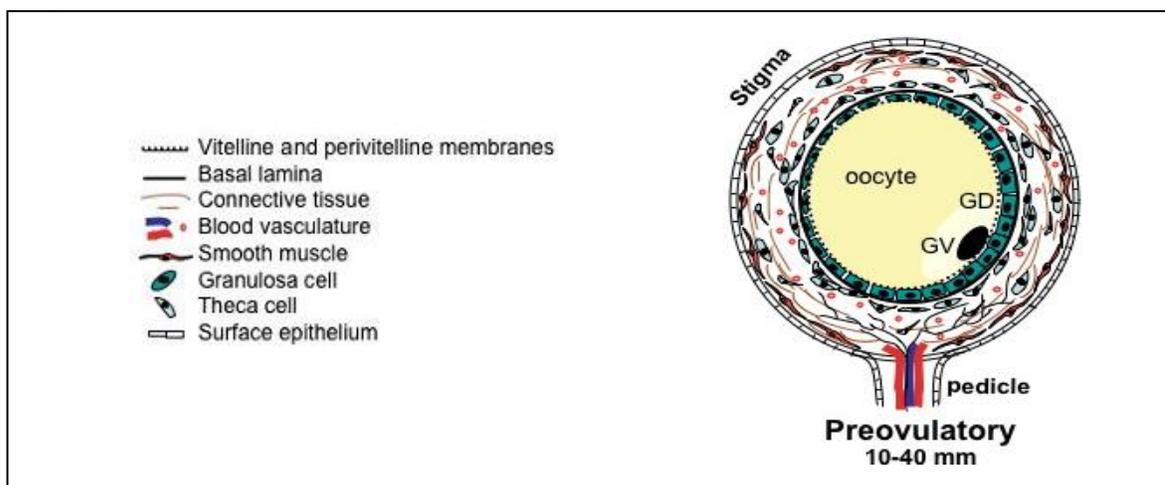
Muestras positivas a S.E./total muestras (%)					
Días p.i.	Ovario	Infundíbulo	Mágnium	Istmo	Útero
4	8/10 (80)	1/10 (10)	1/10 (10)	1/10 (10)	1/10 (10)
7	9/9 (100)	2/9 (22,2)	2/9 (22,2)	5/9 (55,5)	1/9 (11,1)

Fuente: Okamura *et al.*, 2001

Se ha sugerido que la propagación vía hematógena hacia los folículos ováricos (figura nº 1), ocurre gracias a la gran cantidad de vasos sanguíneos terminales que posee la membrana basal de las células de la teca, depositándose S.E. cerca de este sitio, para luego penetrar dicha membrana y tomar contacto con las células de la granulosa, en donde la bacteria es capaz de invadir y multiplicarse al interior de ellas. Posterior a ello,

S.E. tiene la facultad de penetrar la membrana perivitelina y multiplicarse al interior de la yema (De Buck *et al.*, 2004a), la cual es un excelente medio de crecimiento para las bacterias, incluyendo *Salmonella* (Poppe, 1999). En un estudio realizado con codornices inoculadas experimentalmente con S.E. a una dosis de  $10^7$  y  $10^8$  bacterias vía intraperitoneal, se recolectaron muestras de ovario, oviducto (infundíbulo, mágnun, istmo, útero y vagina) a las 24 y 48 horas post inoculación, las que fueron analizadas con tinción inmunohistoquímica; la inmunorreacción en tejido conectivo del estroma ovárico fue positiva en el 83% de las aves inoculadas, ocasionalmente positiva en la membrana de las células de la teca y en algunos folículos, se observó también la tinción en células de la teca y granulosa (Takata *et al.*, 2003).

Figura nº 1: Estructura y componentes de un folículo preovulatorio aviar



Fuente: [www.nd.edu/~avianova/Images/FollicleDevelop.jpg](http://www.nd.edu/~avianova/Images/FollicleDevelop.jpg)

En otro estudio desarrollado con gallinas de postura White leghorn, que estaban en su primer año de actividad reproductiva y que fueron inoculadas experimentalmente con S.E. vía oral, se logró el reaslamiento bacteriano desde folículos preovulatorios en 16 de las 40 aves utilizadas, tras el sacrificio de las aves a intervalos semanales. De esas 16 aves, 10 de ellas presentaron la bacteria sólo en las membranas foliculares (capa granulosa y tecal), 4 en la yema folicular y 2 gallinas tuvieron presente la bacteria en ambos sitios. De acuerdo a estos resultados, los autores sugieren que la contaminación interna del huevo por S.E., puede ocurrir cuando se genera la ruptura del folículo, al

momento de la ovulación, transportando las células de la granulosa la bacteria (Thiagarajan *et al.*, 1994).

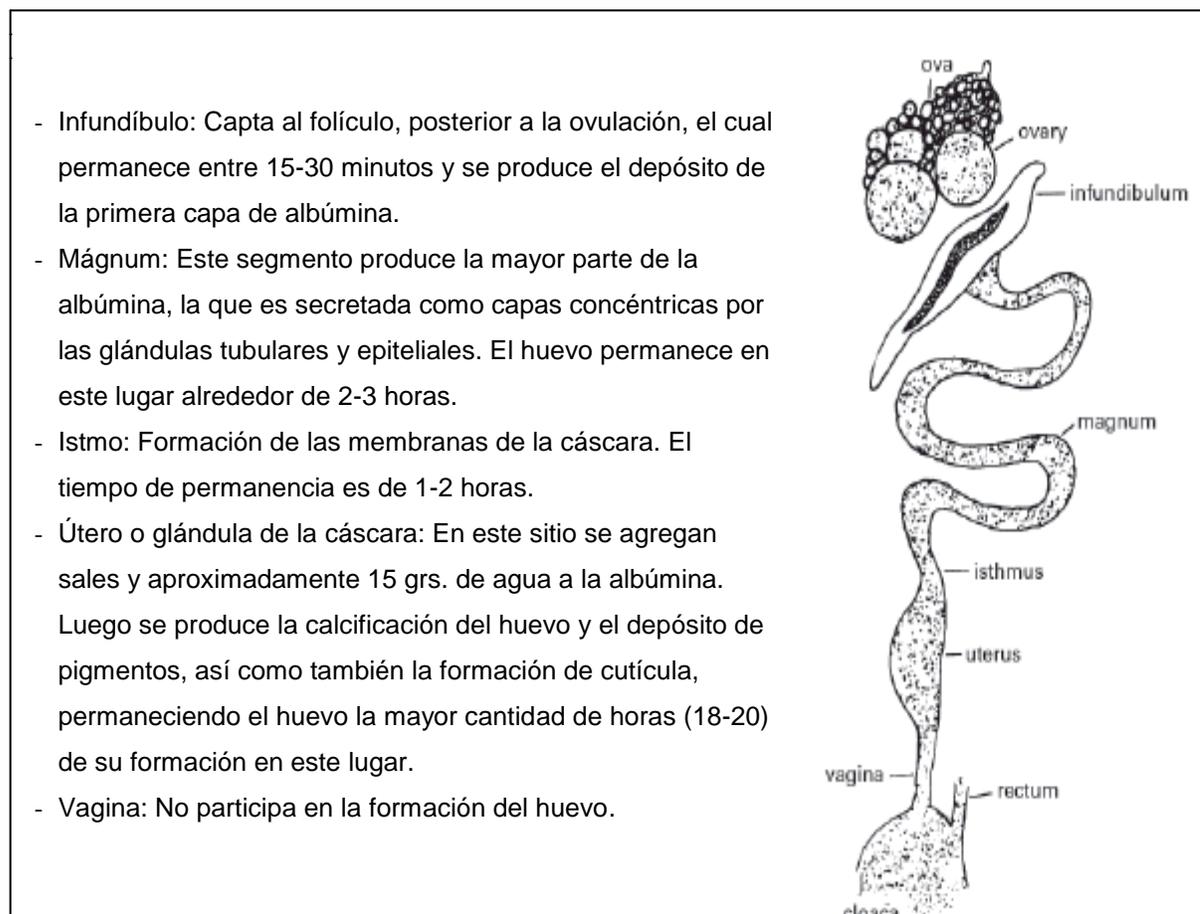
Adicionalmente, S.E. se ha encontrado en la superficie mucosa y dentro de células epiteliales oviductales de gallinas infectadas naturalmente. En un estudio realizado por Hoop y Pospischil (1993), se muestrearon tres parvadas de gallinas de postura, infectadas naturalmente e implicadas en brotes de Salmonelosis humana. Treinta y siete aves en total, de uno y dos años de edad, fueron sacrificadas para la obtención de muestras de ovario y oviducto, las que se analizaron mediante cultivo bacteriano y tinción inmunohistoquímica. En 10 de las 37 gallinas (27%) fue posible aislar S.E. a nivel de ovario y oviducto, mientras que por inmunohistoquímica 6 de las 7 aves fueron positivas a S.E. en oviducto, encontrándose la bacteria al interior de las células epiteliales, lumen y glándulas tubulares de ese tejido.

Estos resultados fueron, preliminarmente, interpretados solamente como el resultado de una infección ascendente desde cloaca. Actualmente se acepta que ésta no es la única opción de acceso de la bacteria a oviducto, por lo que, además de la colonización de oviducto tras una infección sistémica, se describe que el huevo en formación, que adquirió la infección desde tejidos ováricos colonizados, puede transportar la bacteria hacia oviducto, previo a la deposición de la cáscara, así como también se ha propuesto la infección de oviducto mediante la translocación bacteriana desde peritoneo vía macrófagos (De Buck *et al.*, 2004a). Esto fue posible de obtener mediante la inoculación intraperitoneal de S.E. con una dosis de  $10^7$  y  $10^8$  UFC en codornices, en donde a través de tinción inmunohistoquímica, se logró visualizar la inmunorreacción en la superficie mucosa, epitelio, lámina propia y serosa de todos los segmentos del oviducto (Takata *et al.*, 2003), señalados en la figura n° 2. No obstante, en un estudio realizado por Keller *et al.*, (1995), en el cual se inocularon gallinas de postura de 23-25 semanas de edad, con S.E. (dosis de  $10^8$  UFC) vía oral, no se obtuvo reaislamiento bacteriano desde cavidad peritoneal de las aves infectadas.

Mediante infección experimental de gallinas con *Salmonella* Enteritidis, también ha sido posible aislar la bacteria a nivel de oviducto. Es así como De Buck *et al.*, (2004b) lograron demostrar la invasión y multiplicación de S.E. en cultivos celulares de glándulas

tubulares, tanto de istmo como mágnium de gallinas de postura, los que presentaron una cantidad de bacteria intracelular significativamente mayor a las 4 y 24 horas de incubación. La invasión de la bacteria en los mismos tejidos, fue confirmada de manera *in vivo*, inoculando S.E fagotipo 4 (dosis de  $5 \times 10^7$  UFC), vía endovenosa a tres gallinas comerciales de postura, de 20 semanas de edad, las que fueron sacrificadas a los 4 días post infección, para la obtención de muestras de mágnium e istmo. En este estudio además, fue posible apreciar que el istmo presentó un número mayor de bacterias intracelulares, en el ensayo *in vivo* y una mayor facilidad de invasión en el ensayo *in vitro*, en comparación al mágnium, por lo que los autores sugieren que *Salmonella* Enteritidis se adapta mejor a ese segmento del oviducto (figura n° 2)

Figura n° 2: Anatomía del tracto reproductivo de gallina



Fuente: [www.thepoultrysite.com/.../EQHfigure1.gif](http://www.thepoultrysite.com/.../EQHfigure1.gif)

Poco se conoce acerca de los mecanismos de colonización de *Salmonella* a nivel de oviducto (De Buck *et al.*, 2004a). En un estudio *in vitro* donde se investigó el rol de la fimbria tipo 1 en la interacción de S.E. con oviducto, se determinó mediante ELISA (“enzyme-linked immunosorbent assay”) que, 17 de las 56 cepas bacterianas fueron capaces de adherirse a secreción istmal, obtenida de gallinas comerciales de postura de 22-40 semanas de edad. La unión se vio significativamente disminuida frente a la adición de un 1% de manosa (inhibe la adhesión de fimbria tipo 1) y no fue posible detectarla, al utilizar la cepa mutante *fimD* S1400/94 (no expresa fimbria tipo 1), lo que confirma que dicha unión ocurre mediante este tipo de adhesina. Adicional a esto, se realizó otro ensayo de adhesión, en donde se extrajo el oviducto de gallinas, para luego incubar el istmo en una solución que contenía  $5 \times 10^6$  UFC/mL de cuatro aislados de S.E. Mediante tinción inmunohistoquímica fue posible observar que la adhesión de S.E. al istmo se produjo exclusivamente en las glándulas tubulares y que, en cultivos adicionados con manosa, la unión al tejido fue significativamente inhibida. Con estos resultados los autores sugieren que *Salmonella* Enteritidis, localizada en las glándulas tubulares del istmo, puede ser transportada fácilmente hacia el huevo en formación, debido a la afinidad que presenta la bacteria a la secreción istmal, puesto que es ella quien genera las fibras de las membranas de la cáscara; ésta localización al interior del huevo es favorable para la bacteria, ya que se encuentra más o menos protegida de los factores antimicrobianos presentes en la albúmina (De Buck *et al.*, 2003).

La contaminación del huevo por *Salmonella* Enteritidis puede ocurrir por penetración de la bacteria a través de la cáscara, cuando ésta toma contacto, durante o después de la ovoposición, con heces contaminadas o por infección directa de yema, albúmina, membranas de la cáscara o cáscara, antes de la ovoposición, desde tejido reproductivo infectado (Poppe, 1999; De Buck *et al.*, 2004a). La ruta más frecuente de infección aún no logra esclarecerse (Messens *et al.*, 2005), sin embargo existe una relación inconsistente entre la contaminación de la cáscara del huevo por *Salmonella* Enteritidis y el contenido del huevo (De Buck *et al.*, 2004a). Análisis bacteriológicos de huevos provenientes de gallinas infectadas experimentalmente, no lograron establecer una relación entre el traspaso fecal de la bacteria y su presencia en el contenido del huevo, lo que sería un indicio de que la contaminación interna del huevo es más probable

de ocurrir, a partir de tejido reproductivo infectado, que por penetración de la bacteria a través de la cáscara del huevo (De Buck *et al.*, 2004a).

Después de la ovoposición, la cáscara del huevo puede adquirir contaminación a partir de todas las superficies donde toma contacto y la magnitud está directamente relacionada con la limpieza de esas superficies. Se describe que *Salmonella*, presente en la cáscara del huevo, puede morir rápidamente durante el almacenamiento, sin embargo, si bien la carga bacteriana disminuye a través del tiempo cuando los huevos son almacenados a 4°C, S.E. logra sobrevivir por cuatro semanas. Adicional a esto, *Salmonella* es capaz de multiplicarse en la superficie de la cáscara, a 25°C, ya que las heces logran proveer los nutrientes requeridos para ello (Messens *et al.*, 2005).

El huevo posee tres barreras físicas que previenen la penetración bacteriana; una capa proteínica hidrófoba (cutícula) que ocluye los poros presentes en la cáscara, la propia cáscara del huevo y las membranas de la cáscara que separan la albúmina de la cáscara del huevo. Múltiples factores afectan o influyen sobre la probabilidad que tienen las bacterias para penetrar el huevo a través de la cáscara, dentro de ellos se encuentran la temperatura diferencial entre el huevo y el ambiente, en donde se observa un porcentaje de contaminación y una tasa de penetración más rápida, cuando el huevo está más cálido que el ambiente, ya que se favorece el arrastre de la bacteria a través de los poros, como resultado de la presión negativa que se genera. La carga bacteriana presente en las heces, también influye sobre la contaminación del huevo, describiéndose una mayor frecuencia cuando existe una mayor cantidad de unidades formadoras de colonias (UFC) por gramo de heces, así como también influyen la temperatura y humedad relativa ambiental, incrementándose el nivel de penetración, cuando éstas aumentan. La cutícula es la primera defensa en el huevo contra la infección bacteriana, pero en los primeros minutos después de la ovoposición, usualmente está húmeda e inmadura, por lo que es poco efectiva en la prevención de la penetración bacteriana. Además, no es un aspecto inherente de la cáscara del huevo y se ha visto que una pequeña fracción de huevos (3,5%) carece de cutícula, un 8% no la posee en su extremo aguzado o romo y se ha demostrado que la cutícula de muchos huevos a lo largo del ciclo de postura, estuvo ausente o incompleta. Estudios en donde se removió la cutícula por abrasión o se alteró la superficie del huevo mediante lavado químico, han obtenido un incremento en la

penetración bacteriana, sin embargo algunos autores cuestionan la eficiencia de la cutícula, como primera línea de defensa frente a la penetración bacteriana. La calidad de la cáscara del huevo también incide en la penetración bacteriana, encontrándose una mayor probabilidad de penetración de *Salmonella*, en huevos con baja gravedad específica y por lo tanto, con cáscara más delgada, así como también aumenta la frecuencia de penetración por S.E., cuando existen grietas en la superficie de la cáscara (Messens *et al.*, 2005).

Como se ha demostrado, S.E. es un patógeno que utiliza como principal reservorio a las aves, donde el consumo inadecuado (crudo o semicrudo) de huevos contaminados, se asocia a graves problemas en salud pública y a grandes pérdidas económicas para los países y la industria avícola. La prevención de ETA en humanos, tal como *Salmonella*, ha dependido históricamente de salvaguardar la integridad microbiológica de los productos alimenticios o la descontaminación de ellos antes de su consumo. En los últimos años se han ampliado los esfuerzos para obtener productos avícolas seguros, prestando una mayor atención a los factores relacionados con el manejo de las aves durante el ciclo reproductivo y cuya meta es obtener productos de origen avícola seguros para el consumo humano, minimizando las oportunidades para la introducción, persistencia y transmisión de *Salmonella* a los lotes de aves (Gast, 2007). Al respecto, la Medicina Veterinaria ha buscado, mediante estudios científicos, diversas medidas de prevención y control frente a esta bacteria, entre las que se pueden mencionar programas de vacunación, exclusión competitiva, medidas sanitarias, terapia antimicrobiana, entre otras.

En el ámbito nacional, a raíz de los brotes producidos durante el año 1998 en Chile, asesores de la Asociación de Productores de Huevo (ASOHUEVO) junto a médicos veterinarios del Servicio Agrícola Ganadero (SAG), crearon un plan nacional de control de *Salmonella*, dentro del que se incluye el monitoreo en planteles de reproductoras y ponedoras, mediante serología y aislamiento bacteriano, medidas de control básicas como bioseguridad, uso de exclusión competitiva, vacunación, eliminación (cuando es factible) o tratamiento con antimicrobianos de lotes positivos, entre otras (González y Correa, 1998).

El objetivo de vacunar gallinas ponedoras es reducir o incluso suprimir completamente la colonización del huevo. En la actualidad existen dos tipos de vacunas contra *Salmonella*; vacunas muertas y vivas, las que confieren cierto nivel de protección (De Buck *et al.*, 2004a). La administración de bacterinas más un adyuvante, vía subcutánea o intramuscular ha sido vinculada con una reducción significativa en el aislamiento de *Salmonella* Enteritidis desde heces, órganos internos y huevos de gallinas desafiadas oralmente con la bacteria, pero una de las limitaciones de las vacunas muertas es la incapacidad que tienen de producir una inmunidad celular efectiva. Una protección de mayor eficacia y duración es producida al utilizar vacunas vivas contra *Salmonella*, posiblemente como resultado de una presentación de antígenos más relevantes, al sistema inmune y de manera más prolongada en el tiempo. Sin embargo, cabe destacar que ningún tipo de vacuna ha logrado prevenir completamente la infección (Gast, 2007).

Otra estrategia de control utilizada, es la prevención de la colonización intestinal de *Salmonella*, mediante el uso de prebióticos, probióticos y otros aditivos alimentarios (De Buck *et al.*, 2004a). Los probióticos corresponden a microorganismos viables suplementados en el alimento, que mejoran el balance microbiano intestinal, promueven la maduración e integridad del intestino, tienen efecto antagónico con bacterias patógenas y son inmunomoduladores. Dentro de los efectos benéficos se incluyen además, el mantenimiento de microflora normal en intestino por exclusión competitiva, aumento en la ingesta de alimento y neutralización de enterotoxinas. Los prebióticos se definen como carbohidratos no digeribles, beneficiosos para el hospedero, ya que estimulan de manera selectiva el crecimiento bacteriano en tracto gastrointestinal (Dunkley *et al.*, 2008).

Con respecto a las medidas sanitarias, varias de las recomendaciones específicas son características comunes de casi todos los programas de control de *Salmonella*. Dentro de ellas incluyen la obtención de huevos fértiles o pollos provenientes solamente de parvadas reproductoras libres de *Salmonella spp.*, limpieza y desinfección (particularmente con compuestos fenólicos y amonio cuaternario) de los galpones entre parvadas, implementación de un plan de control de roedores e insectos y monitoreo periódico, estrictas medidas de bioseguridad, utilización de alimento peletizado que no contenga proteína animal y agua de buena calidad microbiológica (Gast, 2007).

Pese a todos los esfuerzos que ha realizado el sector avícola en implementar estas medidas de control, los resultados no han sido lo suficientemente buenos, por lo que es necesario seguir la búsqueda de nuevas alternativas que permitan, en alguna medida contribuir en ello. De acuerdo a esto, cabe destacar que recientes estudios sobre el uso de bacteriófagos, son presentados como una promesa terapéutica y profiláctica en el control de infecciones bacterianas (Skurnik y Strauch, 2006).

Los bacteriófagos o también llamados fagos, corresponden a virus que invaden células bacterianas y, en el caso de los bacteriófagos líticos, interrumpen el metabolismo bacteriano y causan su lisis, a diferencia de los bacteriófagos lisogénicos, quienes integran su genoma al del hospedero permaneciendo como profagos (Górski y Weber-Darbrowska, 2005). Los profagos pueden activarse y continuar el ciclo lítico, cuando la bacteria se encuentra en condiciones ambientales adversas (Skurnik y Strauch, 2006). Los grupos de bacteriófagos son variados, con diferente tamaño y morfología, con material genético tipo RNA o DNA, de hebra doble o simple y, al menos un 96% de ellos, pertenecerían al orden Caudovirales (Dabrowska *et al.*, 2005).

Los fagos son muy específicos en reconocer su célula hospedera y no poseen efectos adversos en otros tipos de bacterias (Carlton, 1999; Joerger, 2003; Huff *et al.*, 2004; Skurnik y Strauch, 2006; Hagens y Loessner, 2007), son ubicuos y un gran número de ellos se encuentran en distintos ecosistemas naturales, entre ellos tierra, agua dulce, agua del océano, materia vegetal e incluso alimentos (Hagens y Loessner, 2007). Además, pueden ser aislados desde piel, saliva, heces, entre otros, tanto de humanos como animales y se encuentran presentes en el tracto gastrointestinal como un componente importante de la flora microbiana (Dabrowska *et al.*, 2005), contribuyendo a la eliminación de bacterias nocivas y reducción del número de bacterias comensales, aliviando la carga bacteriana (Górski y Weber-Darbrowska, 2005).

Gracias a la habilidad que tienen los bacteriófagos para lisar células bacterianas y terminar con procesos infecciosos es que surge la idea de utilizar estos virus como agentes terapéuticos (Skurnik y Strauch, 2006). Este concepto fue propuesto poco tiempo después del descubrimiento de los fagos, aproximadamente hace 90 años atrás, cuando en 1919 el microbiólogo franco-canadiense Félix d' Herelle, inicia probablemente el primer

intento de fagoterapia, en un hospital infantil de Francia utilizando bacteriófagos para el tratamiento de disentería en niños, cuyos síntomas cesaron después de la aplicación de una dosis única y todos los pacientes se recuperaron dentro de pocos días (Sulakvelidze *et al.*, 2001). Debido al descubrimiento de los antibióticos, la investigación respecto al uso terapéutico de los fagos se detuvo, pero hoy en día, debido al creciente problema de resistencia a los antimicrobianos, es que renace el interés por la fagoterapia (Hagen y Loessner, 2007).

Si bien los bacteriófagos líticos son similares a los antibióticos, en el sentido de que ambos presentan actividad antibacteriana, los fagos poseen una serie de ventajas respecto a ellos, como por ejemplo: (Sulakvelidze *et al.*, 2001).

- a. Alta especificidad sobre su bacteria blanco, lo que permite instaurar una terapia sin alterar la flora microbiana normal del organismo, evitándose la generación de infecciones secundarias.
- b. Los bacteriófagos tienen la capacidad de replicarse en el sitio de infección y por lo tanto están disponibles mientras sea necesario.
- c. No se han descrito efectos adversos serios, a diferencia de los antibióticos quienes pueden provocar desórdenes intestinales, alergias e infecciones secundarias.
- d. Se describe que la tasa de resistencia es aproximadamente 10 veces menor que los antibióticos.
- e. Las bacterias fago-resistentes pueden permanecer susceptibles a otros fagos que poseen un rango similar de bacterias blanco.
- f. La selección de nuevos fagos es un proceso relativamente rápido, mientras que el desarrollo de nuevos antibióticos es un proceso que consume bastante tiempo e incluso puede tomar varios años.

Una serie de estudios sobre el uso de bacteriófagos en Medicina Veterinaria, han sido realizados. Uno de los primeros trabajos fue desarrollado por W. Smith y colaboradores (Sulakvelidze *et al.*, 2001) quienes demostraron de manera exitosa, la capacidad que presentan los bacteriófagos como terapia curativa, frente a *E. coli*, en ratas, y posteriormente, evidenciaron una disminución del número de bacterias blanco, en el tracto alimentario de terneros, lechones y corderos infectados con *E. coli*, cuando se les

administró una dosis única de fagos específicos contra dicha bacteria. El tratamiento además fue capaz de detener la pérdida de fluidos y todos los animales sobrevivieron a la infección.

En el caso específico de *Salmonella* en aves, los bacteriófagos también han sido empleados como una herramienta efectiva, en el control de esta enterobacteria. En una investigación realizada por Fiorentin *et al.*, (2005) se estudió un cóctel de fagos (CNPSA1, CNPA3 y CNPSA4), como agente terapéutico en pollos Broilers de un día de edad infectados experimentalmente con S.E. Al séptimo día post infección, las aves fueron tratadas por vía oral, con el cóctel de fagos ( $10^{11}$  UFP/mL) y luego 5 aves de cada grupo fueron sacrificadas a diferentes intervalos de tiempo (0, 5, 10, 15, 20, 25 días) post tratamiento (p.t.). Al quinto día p.t. se observó una disminución de 3,5 órdenes de magnitud en las unidades formadoras de colonias de S.E., por gramo de contenido cecal (UFC/g) y las muestras recolectadas en los días siguientes todavía se presentaban con una menor colonización bacteriana, al ser comparadas con las muestras del grupo control de infección. En órganos internos (bazo e hígado) si bien, se observó una disminución de la incidencia de infección, esta diferencia no logró ser estadísticamente significativa.

El mismo año se evaluó la eficacia de dos tratamientos orales (Toro *et al.*, 2005): una mezcla de 3 fagos líticos, S2a, S9 y S11, (suministrados 3 días antes y 2 días después del desafío bacteriano) y exclusión competitiva (E.C., administrada los 3 primeros días de vida de las aves), para reducir la colonización de *Salmonella* Typhimurium (S.T.) en pollos SPF White Leghorn de un día de edad, infectados experimentalmente con una dosis de  $3,9 \times 10^5$  UFC/mL. La bacteriología cuantitativa a nivel de ileon, reveló que en los grupos tratados sólo con E.C. y BF (fagos) asociados a E.C., disminuyó el recuento bacteriano, con respecto a las aves que no recibieron tratamiento (grupo control positivo). Sin embargo, las aves tratadas sólo con BF no presentaron una disminución significativa en el recuento bacteriano, a nivel de dicho tejido. En ciegos se observó una disminución significativa de S.T. (10 veces menor) en los grupos tratados con BF sólo, BF + E.C. y E.C. sola, respecto a las aves que no recibieron tratamiento. En cuanto al recuento bacteriano realizado en muestras de hígado y bazo, fue posible observar una disminución, pero no se encontraron diferencias significativas en los grupos de aves que recibieron tratamiento *versus* el grupo control positivo.

En un estudio análogo, Filho *et al.*, (2007) realizaron dos ensayos en pollos de un día de edad, para demostrar la eficacia del uso de fagoterapia en combinación con un probiótico comercial (Floramax-B11) en el control de S.E. En ambos ensayos, todas las aves empleadas fueron desafiadas con una dosis de  $3 \times 10^3$  UFC de S.E. vía oral. En el primer ensayo, una hora post infección se les administraron intracloacalmente, los bacteriófagos denominados WT45 $\phi$  ( $10^9$  UFP/ave) solos o en combinación con el probiótico, dependiendo del grupo experimental. Ambos tratamientos redujeron significativamente la incidencia de infección de S.E. reislada desde tonsilas cecales, comparados con el grupo control de infección y no se observó un efecto aditivo en la reducción de S.E., al administrar ambos tratamientos (probióticos y fagos). En el segundo ensayo, se utilizaron dos grupos distintos de bacteriófagos (WT45 $\phi$  y CB4 $\phi$ ), los cuales se administraron a una dosis de  $10^8$  UFP/ave, por vía oral, solos o en combinación, una hora después del desafío con S.E. (dosis de  $9 \times 10^3$  UFC) por vía oral. En esta segunda experiencia se observó que los bacteriófagos (solos o en combinación) disminuyeron significativamente el porcentaje de infección a nivel de tonsilas cecales, comparado con el grupo de aves que no recibió ningún tratamiento posterior a la infección experimental con S.E., logrando una mayor reducción cuando ambos grupos de bacteriófagos fueron administrados en conjunto. Cabe señalar que en este estudio no se informan datos sobre infección sistémica.

Otro estudio realizado por Atterbury *et al.*, (2007) demostró que el uso de un bacteriófago de manera terapéutica, redujo significativamente la colonización de S.E. a nivel de ciegos ( $1,53 \pm 2,38$  UFC/g  $\log_{10}$ ), en pollos Broilers comerciales de 36 días de edad, comparados con el grupo control de infección ( $5,77 \pm 1,85$  UFC/g  $\log_{10}$ ). En este ensayo se utilizaron distintas dosis de fago ( $10^9$  o  $10^{11}$  UFP), no encontrándose diferencias significativas entre el grupo de aves tratadas con la menor dosis y el grupo control de infección. Además se midió la presencia de fagos en ciegos y se determinó que ellos fueron removidos rápidamente en ausencia de su bacteria blanco (grupo control sano), estando por debajo del límite de detección después de las 48 horas post tratamiento.

Los estudios descritos, utilizan a los bacteriófagos como terapia curativa frente a la infección por *Salmonella* en aves. Sin embargo, recientes estudios intentan demostrar la eficacia de los bacteriófagos como biocontroladores preventivos en la colonización de

*Salmonella* en aves infectadas experimentalmente. Borie *et al.*, (2008b) realizaron un estudio, en el cual utilizaron bacteriófagos como terapia preventiva frente a S.E. en pollas White Leghorn de 10 días de edad. Las aves recibieron, 24 horas antes del desafío con la bacteria, una mezcla de 3 fagos líticos los cuales se administraron mediante agua de bebida o por aspersión. Los animales fueron sacrificados a los 10 días post infección y se recolectaron muestras de intestino y “pool” de órganos (bazo, hígado y corazón). La bacteriología cualitativa efectuada en muestras de intestino, reveló una disminución significativa en la incidencia de S.E. en los pollos tratados vía aspersión con BF (72,7% de positividad), comparados con las aves del grupo control positivo (100% de infección), no así en el grupo tratado con BF vía agua de bebida, en donde no se evidenciaron diferencias significativas. A nivel de órganos, el tratamiento por agua de bebida presentó una menor incidencia de S.E. (40,9%), en relación al grupo que recibió los fagos vía aspersión (59,1%) y el control positivo (77,2 %). Con respecto al recuento de S.E. a nivel intestinal, ambos tratamientos, vía aspersión o en agua de bebida, (4,04 UFC/g log<sub>10</sub> y 4,25 UFC/g log<sub>10</sub> respectivamente) redujeron significativamente la carga bacteriana, respecto al grupo control de infección (5,67 UFC/g log<sub>10</sub>). Adicionalmente, los autores comprobaron que la terapia preventiva con bacteriófagos (por aspersión), asociada a la administración temprana de un probiótico presentó un porcentaje de infección significativamente menor (38,7%), en relación al del grupo control sin terapia (100%); las terapias administradas por separado, si bien mostraron buenos resultados, combinadas resultaron ser mejor. En lo que respecta a bacteriología cuantitativa cecal, se encontró que las aves tratadas con probiótico más fagos disminuyeron significativamente el recuento de S.E. (0,34 UFC/g log<sub>10</sub>), al compararlas con el grupo control de infección (2,03 UFC/g log<sub>10</sub>) (Borie *et al.*, 2009).

Como se ha señalado a través de la presente revisión bibliográfica, los bacteriófagos, descubiertos hace casi un siglo atrás, vuelven a ser evaluados como una alternativa terapéutica factible y de acuerdo a ello, resulta interesante estudiar su eficacia en la prevención de la colonización de *Salmonella* Enteritidis a nivel de tejido reproductivo (ovario y oviducto), de gallinas de postura. Cabe destacar que hasta la fecha, tanto en la literatura nacional como internacional, no existen precedentes de una investigación, en el ámbito de los bacteriófagos como biocontroladores, de similares características.

## HIPÓTESIS

De acuerdo a la información de la literatura internacional y a lo demostrado por experiencias nacionales previas, se espera que la utilización de una mezcla de 3 bacteriófagos líticos, administrados en forma profiláctica, disminuya significativamente la colonización y el recuento de *Salmonella* Enteritidis, en tejido reproductivo de gallinas de postura infectadas experimentalmente.

## OBJETIVO GENERAL

Determinar la eficacia de la administración de bacteriófagos líticos, como medida profiláctica en gallinas de postura infectadas experimentalmente con *Salmonella* Enteritidis.

## OBJETIVOS ESPECÍFICOS

1. Establecer la dosis mínima infectante (DMI) de la cepa *Salmonella* Enteritidis *nal rif* para gallinas de postura comerciales.
2. Determinar la incidencia de infección y recuentos de *Salmonella* Enteritidis en tejidos reproductivos (ovario y oviducto) de gallinas de postura, infectadas experimentalmente con la cepa *Salmonella* Enteritidis *nal rif* y tratadas previamente con una mezcla de tres bacteriófagos líticos.

# MATERIAL Y MÉTODOS

## 1. Financiamiento

El presente trabajo se efectuó como parte del proyecto Fondecyt N° 1080291 “Control de *Salmonella* Enteritidis en avicultura: Bacteriófagos en aves de postura y alimentos derivados de la industria avícola”. El estudio se realizó en las dependencias del Laboratorio de Microbiología de la Facultad de Ciencias Veterinarias y Pecuarias de la Universidad de Chile.

## 2. Animales

Para el presente estudio, se utilizaron aves de postura comerciales pertenecientes a la línea genética Hy Line Brown de 22 semanas de edad, adquiridas en un plantel de la VII Región del Maule, en el cual no se ha informado la presencia de *Salmonella* y cuyas madres son vacunadas a la semana 14 y 16 de edad. Dichas aves se mantuvieron durante la experiencia, en la unidad de animales de experimentación del Departamento de Medicina Preventiva Animal y se les proporcionó agua *ad libitum* y alimento comercial sin antimicrobianos.

Previo al estudio, las aves fueron sometidas a tres pruebas diagnósticas, para corroborar su negatividad frente a *Salmonella spp.*: Cultivo, Reacción de la Polimerasa en Cadena (PCR, realizada por el Laboratorio de Microbiología), ambas a partir de muestras de un “pool” de heces y Serología (realizada por el Servicio Agrícola Ganadero) a un grupo de 10 aves seleccionadas al azar.

Las aves resultaron negativas a *Salmonella spp.* en todas las pruebas diagnósticas mencionadas, por lo que se dio inicio a la experiencia propiamente tal.

### 3. Cepa desafío

Cepa nativa de *Salmonella* Enteritidis aislada desde tejido reproductivo de gallina, donada por el Servicio Agrícola Ganadero (SAG). De ella, se seleccionó una mutante espontánea, resistente a Ácido Nalidíxico (*nal*) y Rifampicina (*rif*), en la Pontificia Universidad Católica de Valparaíso y a la cual se le han realizado 9 pasajes en aves, para exacerbar su virulencia.

### 4. Bacteriófagos (BF)

Para el estudio se utilizó una mezcla de 3 bacteriófagos (BF) líticos nativos (Fago F18 $\alpha$ , Est2, Est16) suspendidos en agua destilada, los cuales fueron administrados con una multiplicidad de infección (MOI) de  $10^3$  UFP (unidades formadoras de placa)/mL, que corresponde a la cantidad de bacteriófagos ofrecidos por cada bacteria inoculada. Los fagos fueron caracterizados (Robeson *et al.*, 2008) y preparados por el Dr. James Robeson de la Pontificia Universidad Católica de Valparaíso.

### 5. Cálculo de la dosis mínima infectante (DMI)

La dosis mínima infectante se estableció como la menor dosis que lograra el reaislamiento cecal de *Salmonella* Enteritidis *nal rif* en al menos el 90% de las aves.

Para realizar este cálculo, se utilizaron tres grupos experimentales de aves (descritas en el punto 2), las que se inocularon por vía oral forzada, con diferentes dosis de la cepa desafío ( $10^7$ ,  $10^8$  y  $10^9$  UFC/mL). Para ello, S.E. *nal rif* se cultivó a 37° C por 24 horas en caldo Luria Bertani (*Difco*®) y luego se traspasó una alícuota de este caldo a un tubo de ensayo con suero fisiológico estéril (S.F.E.), al que se le ajustó su turbidez de acuerdo al tubo N° 1 del Nefelómetro de McFarland ( $3 \times 10^8$  bacterias/mL). A partir de esta suspensión las aves fueron inoculadas con 2,3 mL (para alcanzar una concentración bacteriana teórica de  $6,9 \times 10^8$  UFC) u 8,5 mL (para alcanzar una concentración bacteriana teórica de  $2,55 \times 10^9$  UFC), mientras que las aves inoculadas con una dosis de  $10^7$  UFC, recibieron 3 mL de la suspensión inicial diluida al décimo en S.F.E., para alcanzar una concentración bacteriana teórica de  $9 \times 10^7$  UFC. Posterior a la inoculación

de las aves, se efectuaron 7 diluciones al décimo de la suspensión utilizada, en S.F.E., para realizar el recuento bacteriano (UFC/mL) sobre placas de agar XLD (*Difco*®) con Ácido Nalidíxico (*Arlab*®, 20 µg/mL) y Rifampicina (*Arlab*®, 20 µg/mL) y con ello confirmar la concentración real inoculada.

Al décimo día post infección, todos los animales fueron sacrificados mediante un método químico, utilizando el barbitúrico *T61*® (Laboratorio Intervet), vía intrapulmonar, con una dosis de 2 mL/ave (AVMA, 2001). La necropsia de las aves se efectuó en la sala de necropsia del Departamento de Patología Animal, en donde se recolectaron muestras individuales de ovario, oviducto y ciegos, las que se analizaron mediante bacteriología cualitativa (descrita en el punto 7.1).

## 6. Grupos de aves

Posterior a la determinación de la DMI, se formaron de manera aleatoria cuatro grupos de aves para la realización del ensayo:

<b>Grupo</b>	<b>N° de aves</b>	<b>Dosis bacteriófagos (MOI)*</b>	<b>Dosis S.E. nal rif</b>
<b>A</b> ( <i>control negativo</i> )	10	-----	-----
<b>B</b> ( <i>control de infección</i> )	30	-----	1 DMI
<b>C</b> ( <i>control inocuidad de BF</i> )	10	10 <sup>3</sup> UFP	-----
<b>D</b> ( <i>Terapia con BF</i> )	30	10 <sup>3</sup> UFP	1 DMI

\* MOI: Multiplicidad de infección

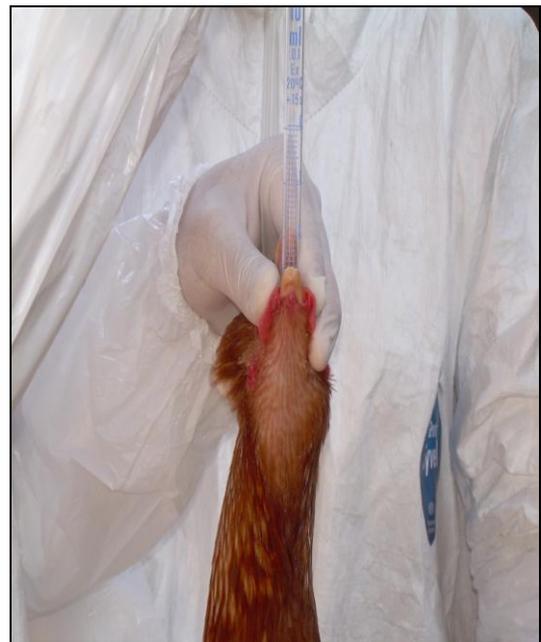
Los tres primeros días de la experiencia, las aves pertenecientes a los grupos C (control de inocuidad de fago) y D (terapia fagos) recibieron diariamente 10<sup>11</sup> UFP/mL (MOI: 10<sup>3</sup> UFP/dosis/fago) de la mezcla de los bacteriófagos, por vía oral forzada con sonda flexible (figura n° 3a). Al cuarto día de experimentación, las aves de los grupos B (control infección) y D (terapia fagos) fueron desafiadas mediante inoculación oral forzada (figura n° 3b), con una DMI de la cepa S.E. *nal rif*. Cabe destacar que cada grupo de

aves se manejó de manera separada y aquellas aves que no recibieron la mezcla de bacteriófagos, se mantuvieron en una sala experimental completamente aislada de aquellas que si la recibieron y fueron asistidas por personal diferente para evitar toda contaminación cruzada.

Figura n° 3: Inoculación oral forzada con bacteriófagos (a) o *Salmonella* Enteritidis (b).



a



b

Al décimo día post desafío, las aves fueron sacrificadas a través de la administración del barbitúrico T61® a una dosis de 2 mL/ave, vía intrapulmonar (AVMA, 2001) y la necropsia se realizó en la sala de necropsia del Departamento de Patología Animal, en donde se obtuvieron muestras individuales de ovario y oviducto, para su posterior análisis bacteriológico cualitativo y cuantitativo. Para evitar contaminación entre ambas muestras al momento de la extracción, primero se obtuvo oviducto y luego ovario.

## 7. Bacteriología

Se realizó siguiendo las pautas recomendadas por Murray y Barton (1993):

### ***Bacteriología Cualitativa***

Cada muestra de tejido reproductivo, ovario y oviducto, fue pesada y colocada individualmente en bolsas plásticas estériles para stomacher (*Whirl Pak, Nasco*®), a las cuales se les adicionó caldo de cultivo Rappaport - Vassiliadis (RV, *Difco*®), en razón aproximada de 1:5. Posteriormente cada muestra se homogenizó en el equipo homogenizador (*IUL Instruments*®) por 180 segundos e incubó en una estufa a 37° C por 72 horas. La siembra a partir de las bolsas homogenizadas se efectuó a las 48 y 72 horas sobre placas de agar XLD (*Difco*®) con Ácido Nalidíxico y Rifampicina (20 µg/mL) (*ArLab*®), las que fueron incubadas a 37° C durante 24 horas, para su posterior lectura. Las colonias sospechosas, es decir aquellas de borde transparente con centro negro, se sometieron a una prueba rápida de aglutinación con suero anti-*Salmonella* grupo D1 (*Difco*®) y batería bioquímica corta (fermentación de azúcares y producción de H<sub>2</sub>S en agar Kligler, utilización de citrato en agar citrato de Simmons y desaminación de la Fenilalanina en agar fenilalanina).

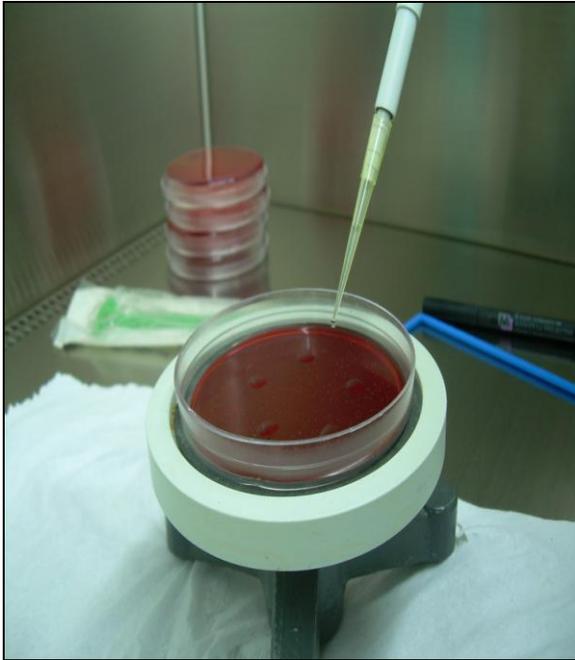
Todas las muestras negativas, fueron sometidas a PCR, para descartar falsos negativos.

### ***Bacteriología Cuantitativa***

Para realizar el recuento de colonias de la cepa desafío en ambos tejidos, se extrajo de manera individual, 1 mL de cada homogenizado en caldo Rappaport-Vassiliadis de las muestras de ovario y oviducto sin incubar y luego se le realizaron 4 diluciones al décimo en agua peptonada tamponada (APT, *Oxoid*®). Posterior a ello, se obtuvieron 100 µL del homogenizado inicial y de cada una de sus diluciones, para ser sembrados por extensión con asas de Digrafsky (figura n° 4) de manera individual en la superficie de placas de agar XLD (*Difco*®) más Ácido Nalidíxico y Rifampicina (20 µg/ml)

(Arlab®). Dichas placas fueron incubadas por 24 horas a 37° C y luego se procedió al recuento de unidades formadoras de colonias (UFC).

Figura n° 4: Siembra en superficie por extensión, con asa de Digrafsky.



*a*



*b*

a: Aplicación de 100  $\mu$ L de muestra, sobre placa con agar XLD adicionado con antibióticos

b: Extensión de la muestra sobre la superficie de la placa, mediante asa de Digrafsky

## 8. Normas de Bioseguridad

Para el manejo de los grupos experimentales y el trabajo de laboratorio, se utilizaron las normas recomendadas por el Centro de Control y Prevención de Enfermedades (CDC, 2007) de Estados Unidos para un nivel de bioseguridad 2, correspondiente a *Salmonella* no Typhi. Dentro de ellas, se incluye el uso de vestimenta desechable (overoles con gorro, protectores faciales, guantes de látex, cubrebotas y manguillas cubrebrazos), el mantenimiento de los animales de experimentación en dependencias de uso exclusivo para fines experimentales, acceso restringido al personal

autorizado, uso de señales de advertencia de riesgo biológico, utilización de desinfectantes, tales como, alcohol yodado, cloro, derivados del amonio cuaternario, glutaraldehído y descontaminación de material antes de su eliminación, mediante autoclavado.

Posterior a la eliminación de las aves, se realizó la desinfección del lugar donde residieron, utilizando un derivado del amonio cuaternario (*Metacuat*®) en pisos, paredes y jaulas y posteriormente, se aplicó glutaraldehído al 2,5% (*Aseptic-Steryl*, *Ecolab*®) en aspersión, como esterilizante. Los desechos líquidos recibieron un tratamiento de cloración (1000 ppm) previo a su evacuación y los desechos sólidos, dependiendo de su naturaleza, se incineraron o se descontaminaron mediante autoclavado, antes de ser eliminados.

## **9. Análisis Estadístico**

Los resultados de la bacteriología cualitativa de los grupos B y D, se expresaron como proporciones de positividad y sus diferencias fueron sometidas a la prueba de independencia con  $X^2$ . Los resultados de la bacteriología cuantitativa de esos mismos grupos, se expresaron como unidades logarítmicas ( $\log_{10}$ ) y sus diferencias se estudiaron mediante un análisis de varianza (ANDEVA) de un criterio (Infostat, 2004).

## RESULTADOS

### 1.a. Dosis mínima infectante (DMI):

Para establecer la dosis mínima infectante, definida como la menor dosis que logre el reaslamiento cecal en al menos el 90% de las aves, se analizaron muestras de ciegos y tejido reproductivo (ovario y oviducto) obtenidas al décimo día post infección de gallinas infectadas con diferentes dosis de S.E. Los resultados de la bacteriología cualitativa se exponen en la tabla n° 3.

Tabla n° 3: Aislamiento de *Salmonella* Enteritidis, desde ciegos y tejido reproductivo de gallinas infectadas experimentalmente con distintas dosis de la bacteria.

% muestras positivas a <i>Salmonella</i> Enteritidis			
Dosis total (UFC)	Ciegos	Ovario	Oviducto
$9 \times 10^7$	90	0	0
$6,9 \times 10^8$	100	25	50
$2,5 \times 10^9$	100	50	50

Como se observa en la tabla n° 3, en todas las dosis utilizadas fue posible obtener una infección cecal igual o superior al 90%, sin embargo solamente en las dosis de  $10^8$  y  $10^9$  UFC se logró reaislar *Salmonella* Enteritidis, a partir de tejidos reproductivos (ovario y oviducto). Por lo anterior, se decidió trabajar con la concentración bacteriana correspondiente a  $10^8$  UFC.

### 1.b. Dosis de S.E. y bacteriófagos:

La DMI de S.E. *nal rif* que finalmente se utilizó para la experiencia propiamente tal fue de  $2,4 \times 10^8$  UFC/ave (dosis total en 3,5 mL), con la que se logró infectar a un 96,6% de las aves a nivel cecal. De acuerdo a esto, la dosis de la mezcla de bacteriófagos líticos que se empleó, fue de  $10^{11}$  UFP/dosis/fago, que corresponde a una MOI de  $10^3$  UFP.

## 2. Bacteriología Cualitativa:

Los resultados se presentan a continuación en la tabla n° 4 y gráfico n° 2.

Tabla n° 4: Aislamiento de *Salmonella* Enteritidis a los 10 días post infección, desde tejido reproductivo de gallinas infectadas experimentalmente y tratadas con bacteriófagos.

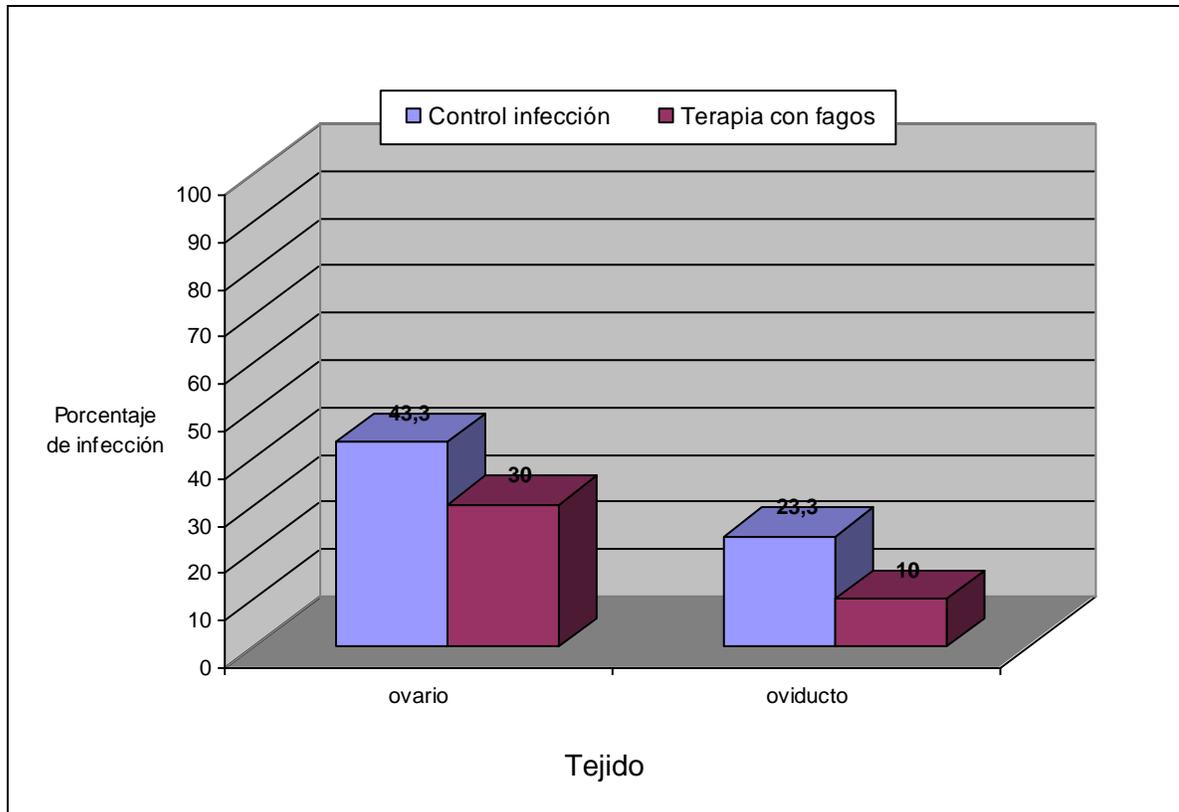
---

<b>Grupo</b>	<b>N° muestras positivas a S.E./total</b>	
	<b>Ovario</b>	<b>Oviducto</b>
B (control infección)	13/30	7/30
D (S.E + fagos)	9/30	3/30

Como se aprecia en la tabla n° 4 y gráfico n° 2, en 13/30 (43,3%) aves del grupo control de infección fue posible reaislar *Salmonella* Enteritidis a nivel de ovario, mientras que en el mismo tejido, se obtuvo un porcentaje de infección menor 9/30 (30%), en las aves pertenecientes al grupo D, quienes recibieron la terapia profiláctica con bacteriófagos y posteriormente fueron desafiadas con S.E.; ésta diferencia no fue estadísticamente significativa ( $p= 0,2839$ ). En cuanto a las muestras de oviducto, en el grupo control de infección fue posible reaislar la bacteria en 7/30 (23,3%) aves, *versus* 3/30 (10%) aves del grupo D (S.E. + fagos), no encontrándose una diferencia significativa entre ambos grupos ( $p= 0,1659$ ).

Cabe destacar que todas aquellas muestras negativas a *Salmonella* Enteritidis, se analizaron mediante PCR, no encontrándose muestras positivas adicionales.

Gráfico n° 2: Porcentaje de infección a nivel de tejido reproductivo (ovario y oviducto) de gallinas inoculadas con *Salmonella* Enteritidis y tratadas con bacteriófagos.



Es relevante señalar que en ninguna de las aves de los grupos experimentales se observó algún tipo de sintomatología sugerente de enfermedad entérica y/o sistémica y, a la necropsia, no se encontraron lesiones patológicas macroscópicas. Adicionalmente, tanto las aves del grupo A (control negativo), como C (control de inocuidad del fago), resultaron negativas a S.E., lo que demuestra el buen manejo de los animales y descarta la posibilidad de contaminación cruzada entre los grupos experimentales.

A título complementario, en una experiencia paralela, se observó que de los aproximadamente 540 huevos recolectados durante los 10 días post infección en las aves del grupo B, solamente en un “pool” de 10 huevos en formación, obtenidos desde oviducto al momento de la necropsia, fue posible reaislar S.E. En los huevos recolectados de los grupos restantes no se aisló la bacteria.

### 3. Bacteriología Cuantitativa:

En las tablas n° 5 y 6 se presentan las medias estadísticas de los recuentos bacterianos y los rangos mínimos y máximos observados, para las muestras de ovario y oviducto en ambos grupos experimentales. Para realizar el análisis de varianza (ANDEVA) de un criterio, los resultados de la bacteriología cuantitativa (UFC/g) se transformaron en unidades logarítmicas ( $\log_{10}$ ). A todas las muestras en donde no se observó desarrollo bacteriano, al momento del recuento, pero que resultaron positivas a la bacteriología cualitativa, se les asignó arbitrariamente un valor 1 (anexos n° 1 y 2), para realizar el ANDEVA.

Tabla n° 5: Recuentos bacterianos (UFC/g  $\log_{10}$ ) de *Salmonella* Enteritidis en ovario de gallinas infectadas y tratadas con bacteriófagos.

<b>Grupo</b>	<b>Media aritmética ovario (UFC/g <math>\log_{10}</math>) (*)</b>	<b>Valores recuentos mínimos y máximos (UFC/g) (**)</b>
B (control infección)	0,95	$6,0 \times 10^2 - 1,5 \times 10^7$
D (S.E. + fagos)	0,31	$2,0 \times 10^1$

(\*) Media calculada con el total de la población (30 gallinas/grupo)

(\*\*) Los valores consideran sólo a las aves donde existió recuento bacteriano

Los valores de recuentos mínimos y máximos de muestras de ovario del grupo B, se obtuvieron considerando solo las aves en donde fue posible realizar el recuento bacteriano (5 gallinas de 30), mientras que el valor para el grupo D, se obtuvo a partir de la única gallina que presentó recuento.

Tabla n° 6: Recuentos bacterianos (UFC/g log<sub>10</sub>) de *Salmonella* Enteritidis en oviducto de gallinas infectadas y tratadas con bacteriófagos.

<b>Grupo</b>	<b>Media aritmética oviducto (UFC/g log<sub>10</sub>) (*)</b>	<b>Valores recuentos mínimos y máximos (UFC/g)</b>
B (control infección)	0,42	1,3 x 10 <sup>3</sup> – 2,1 x 10 <sup>4</sup> (**)
D (S.E. + fagos)	0,10	< 10 <sup>3</sup> (***)

(\*) Media calculada con el total de la población (30 gallinas/grupo)

(\*\*) Los valores señalados consideran sólo a las aves donde existió recuento bacteriano

(\*\*\*) Muestras donde no se obtuvo recuento bacteriano, pero con bacteriología cualitativa positiva, se asumió un valor < 10<sup>3</sup> UFC debido a la sensibilidad de la técnica

Los valores de recuentos mínimos y máximos de muestras de oviducto del grupo B, se obtuvieron considerando solo las aves en donde fue posible realizar el recuento bacteriano (2 gallinas de 30), mientras que en el grupo D, no se logró hacer recuento en ninguna de las 30 gallinas, sin embargo 3 de ellas resultaron positivas a la bacteriología cualitativa. Debido a que la sensibilidad de la técnica de la bacteriología cuantitativa es  $\geq 10^3$  UFC/g., se asumió que esas 3 muestras tenían una carga bacteriana menor a 10<sup>3</sup> UFC/g.

Al comparar las medias estadísticas del grupo control de infección *versus* grupo terapia (S.E. + fagos), se visualizó que tanto a nivel de ovario como oviducto existió una disminución en los recuentos de UFC, en las aves que recibieron tratamiento profiláctico con la mezcla de bacteriófagos. Mediante el análisis de varianza, fue posible determinar que la reducción en los recuentos bacterianos a nivel de ovario, fue estadísticamente significativa (p=0,0489), a diferencia de oviducto, en donde no existió diferencia (p=0,1007).

## DISCUSIÓN

El objetivo del presente estudio, fue determinar la efectividad de una terapia profiláctica con bacteriófagos líticos, en la prevención de la colonización de *Salmonella* Enteritidis a nivel del tracto reproductivo de gallinas de postura comerciales de 22 semanas edad. Para ello, fue necesario establecer una dosis mínima infectante (DMI), que correspondió a  $2,4 \times 10^8$  UFC/ave, concentración acorde a otros trabajos realizados en gallinas de postura, infectadas con este patógeno por vía oral (Shivaprasad *et al.*, 1990; Keller *et al.*, 1995; Kinde *et al.*, 2000).

Al momento de realizar el cálculo de la DMI, pese a que la dosis de S.E. de  $10^9$  UFC obtuvo un mayor porcentaje de infección en ovario (50%), en comparación a la dosis de  $10^8$  UFC (25%), se optó por utilizar esta última, ya que solamente con ella fue posible el reaislamiento de la bacteria en un “pool” de huevos internos (extraídos desde oviducto al momento de la necropsia).

Con la dosis de S.E. administrada, fue posible reaislar la bacteria a nivel cecal, en un 96,6% de las aves al décimo día post infección, similar a los resultados obtenidos por Borie *et al.*, (2009), quienes infectaron por vía oral, pollas de 7 días, con ésta misma cepa ( $2,95 \times 10^5$  UFC/mL), obteniendo un 100% de infección cecal a los 7 días post infección. El porcentaje de infección en ciegos obtenido en gallinas, a nivel internacional, ha sido similar al de este estudio. Así Keller *et al.*, (1995) al inocular gallinas de postura de 23 y 25 semanas de edad por vía oral, con la cepa *Salmonella* Enteritidis fagotipo 8 (dosis de  $10^8$  UFC), alcanzaron un 100% de infección (cecal e intestinal) entre los días 9 y 12 post infección. Asimismo, Gast y Beard (1990) obtuvieron un 95% de infección cecal, al dosificar  $10^9$  UFC de la cepa *Salmonella* Enteritidis fagotipo 13a, en gallinas de postura White Leghorn, de entre 20 y 88 semanas de edad.

En cuanto a la incidencia de infección de tejidos reproductivos, en el grupo control de infección sólo se logró un 43,3% en ovario y un 23,3% en oviducto, a los 10 días post inoculación. Si bien ésta cepa, S.E. *nal rif*, es capaz de llegar a diversos órganos internos como hígado, bazo y corazón (López, 2007; Borie *et al.*, 2008a; Borie *et al.*, 2008b; Borie *et al.*, 2009), su capacidad invasiva a nivel de ovario y oviducto fue moderada, a pesar de

que se aisló inicialmente desde tejidos reproductivos de una gallina infectada naturalmente. Investigaciones realizadas con otras cepas de *Salmonella* Enteritidis, en estudios de infección experimental en gallinas de postura, han logrado mayores porcentajes de infección: 70%-50% en ovario y 60%-36,6% en oviducto (Gast y Beard, 1990; Gast *et al.*, 2004). Cabe señalar que en ambos trabajos se utilizó una mayor dosis de la cepa desafío ( $10^9$  UFC), la que fue administrada en ambos casos por vía oral, a diferencia de Okamura *et al.*, (2001), quienes lograron un 100% de infección a nivel de ovario y un 55% en oviducto, a los 7 días post infección, inoculando gallinas de postura con S.E. ( $5 \times 10^6$  UFC) por vía endovenosa,. En contraste, Kinde *et al.*, (2000) obtuvieron menores porcentajes de infección en tejido reproductivo, que en el presente trabajo, alcanzando sólo un 29% de infección en órganos reproductivos (ovario y oviducto) de gallinas ponedoras de 27 semanas de edad inoculadas con  $10^8$  UFC de S.E. por vía oral. De acuerdo a numerosas investigaciones, la infección por *Salmonella* Enteritidis a nivel de ovario, es más frecuente que en oviducto (Gast y Beard, 1990; Okamura *et al.*, 2001; Gast *et al.*, 2004), lo que podría atribuirse a la gran irrigación que presenta la membrana basal de las células de la teca (De Buck *et al.*, 2004a), favoreciendo con ello, la llegada de la bacteria a ovario.

Estos resultados de moderada infección sistémica concuerdan además, con los obtenidos en estudios nacionales previos, en donde se utilizó la misma cepa desafío del presente trabajo. Fue así como López, (2007) inoculando pollos de siete días de edad, con S.E. (dosis de  $10^4$  UFC) por vía oral, reaisló la bacteria desde “pool” de órganos internos (bazo, hígado y corazón) entre el día 1 y 12 post infección, con valores que oscilaron entre un 0 y 60%. Asimismo, Borie *et al.*, (2008b, 2009) no lograron un porcentaje de infección sistémica superior al 62%, a los 10 días post inoculación, en “pool” de órganos internos (hígado, bazo y corazón), en pollos SPF de 10 días de edad, desafiados con S.E. (aproximadamente con una dosis de  $10^5$  UFC).

Para poder evaluar de mejor manera, la eficacia de cualquier terapia sobre órganos reproductivos (ovario y oviducto), sería necesario aumentar el porcentaje de infección en los tejidos de las aves del grupo control de infección. Esto eventualmente podría ocurrir exacerbando la virulencia de la cepa, mediante un mayor número de pasajes en aves, específicamente seleccionando la cepa aislada a nivel de tejido

reproductivo (ovario y oviducto). Gast *et al.*, (2003) obtuvieron un mayor porcentaje de contaminación interna de huevos, al realizar 3 pasajes de la cepa desafío en dichos órganos, por lo que se puede suponer que la bacteria mejoró su capacidad invasiva e incrementó la incidencia de infección a nivel de tejido reproductivo. Esto, sin embargo, no resultó factible de realizar, ya que en un trabajo paralelo realizado por el Laboratorio de Biología de la Pontificia Universidad Católica de Valparaíso, se encontró una menor sensibilidad a los bacteriófagos en cepas que tenían más de 9 pasajes en pollos (Albala, 2007). Otra alternativa, podría ser la utilización de una mayor dosis infectante, lo que se descartó, ya que existen algunos reportes de mortalidad y disminución de la postura de huevos en gallinas infectadas experimentalmente con S.E. a una dosis de  $10^8$  UFC (Shivaprasad, *et al.*, 1990; Kinde *et al.*, 2000).

Es dable pensar también, que quizás se detectó un bajo porcentaje de positividad en el grupo control de infección, debido a la sensibilidad del cultivo tradicional de *Salmonella* ( $\geq 10^3$  UFC/g). Este factor se descartó ya que todas aquellas muestras negativas fueron sometidas a la Reacción de la Polimerasa en Cadena (PCR), técnica con alto nivel de sensibilidad (Gast, 2007), y ninguna de ellas resultó positiva.

En cuanto a la incidencia de infección, a nivel de ovario y oviducto en el grupo de gallinas tratadas previamente con bacteriófagos y posteriormente desafiadas con S.E., no se logró una disminución estadísticamente significativa, sin embargo, fue posible distinguir una reducción de un 13% tanto en ovario (43% *versus* un 30%) como en oviducto (23% *versus* un 10%). Estos porcentajes son levemente mayores a los obtenidos por Borie *et al.*, (2009) quienes reportaron un 8,7% de reducción de S.E. en “pool” de órganos internos (hígado, bazo y corazón) de pollos desafiados con S.E. y tratados con el mismo cóctel de fagos utilizados en este estudio. Asimismo, Fiorentin *et al.*, (2005) al utilizar de manera terapéutica una mezcla de bacteriófagos en pollos de 7 días de edad, desafiados con S.E., obtuvieron reducciones en la incidencia de infección sistémica (hígado y bazo), que no fueron estadísticamente significativas. Por el contrario, Borie *et al.*, (2008b) si lograron disminuir significativamente el porcentaje de infección en “pool” de hígado, bazo y corazón, en un 36% en pollos de 10 días de edad, a los cuales se les administró de forma profiláctica, una mezcla de tres bacteriófagos líticos contra S.E., de los cuales, sólo uno de ellos coincide con los empleados en el presente estudio. Cabe señalar que a la fecha,

no existen reportes que utilicen bacteriófagos como biocontroladores de S.E., a nivel de tejidos reproductivos en aves adultas, por lo que no existen referencias, para hacer las comparaciones correspondientes.

Buscando la correlación de infección entre ovario y oviducto de una misma gallina, se observó que de las 13 aves pertenecientes al grupo control de infección, que presentaron ovarios positivos a *Salmonella* Enteritidis (por bacteriología cualitativa o cuantitativa), solo 7 de ellas también poseían oviductos positivos. Ninguna de las 30 aves de este grupo, presentó infección únicamente a nivel de oviducto (anexos n° 1 y 2). Estos resultados concuerdan parcialmente con los obtenidos por Keller *et al.*, (1995) y Kinde *et al.*, (2000), quienes lograron obtener infección en ambos tejidos reproductivos (ovario y oviducto) independientemente el uno del otro. Situación totalmente opuesta se produjo en el grupo tratado con bacteriófagos, en donde ninguna de las gallinas, fue positiva a *Salmonella* Enteritidis de manera simultánea en ambos tejidos (ovario y oviducto).

En cuanto a los recuentos de S.E. (UFC/g), a nivel de tejido reproductivo en el grupo control de infección, se puede decir que hubo una baja concentración bacteriana, tanto en ovario (media aritmética = 0,95 UFC/g log<sub>10</sub>) como oviducto (media aritmética = 0,42 UFC/g log<sub>10</sub>). Okamura *et al.*, (2001), obtuvieron recuentos máximos de 4,29 UFC/g log<sub>10</sub> en ovario y 5,17 UFC/g log<sub>10</sub> en oviducto, al infectar por vía endovenosa, gallinas White Leghorn con S.E. (dosis de 5 x 10<sup>6</sup> UFC). El menor recuento observado podría explicarse por la baja invasividad de la cepa utilizada (López, 2007; Borie *et al.*, 2008b; Borie *et al.*, 2009) y también por la vía de administración, ya que Okamura *et al.*, (2001) utilizaron la vía endovenosa, que produce una rápida infección sistémica, mientras que en el presente estudio, las aves fueron inoculadas por vía oral, para obtener una mayor aproximación a lo que ocurre en infecciones naturales por S.E.

Adicionalmente, en el grupo que sólo recibió S.E., de las 13 aves con ovario positivo, solo en 5 de ellas fue posible realizar recuento bacteriano, mientras que a nivel de oviducto, de las 7 gallinas positivas, solo en 2 de ellas se obtuvieron recuentos de S.E. Esta situación demuestra nuevamente la pobre colonización de la cepa a nivel de tejido reproductivo, ya que la sensibilidad de la bacteriología cuantitativa, determina que se

pueden detectar concentraciones bacterianas superiores o iguales a  $10^3$  UFC/g. (\*).

La utilización de la mezcla de tres bacteriófagos líticos (grupo D), redujo numéricamente el recuento de *Salmonella* Enteritidis en 0,32 UFC/g  $\log_{10}$  a nivel de oviducto y fue efectiva en prevenir la colonización de la bacteria en ovario, ya que disminuyó significativamente el recuento de UFC ( $p=0,0489$ ), comparadas con el grupo control de infección. Sólo se logró realizar recuento en 1 de las 9 gallinas infectadas a nivel de ovario y no fue posible llevar a cabo el conteo de S.E. en ninguna de las 3 gallinas con oviducto positivo, situación dada nuevamente por la baja contaminación bacteriana y la sensibilidad de la técnica ( $\geq 10^3$  UFC). Estos resultados, comparados con los obtenidos en otros estudios, donde se analizan órganos internos como indicadores de infección sistémica, resultan ser más alentadores. Toro *et al.*, (2005), señalaron que la reducción del recuento de *S. Typhimurium* en pollos tratados con un cóctel de fagos, antes y después del desafío con la bacteria, no fue significativa en “pool” de órganos (hígado y bazo). Asimismo Borie *et al.*, (2008b) tampoco lograron reducir significativamente los recuentos de S.E., en “pool” de órganos internos (hígado, bazo y corazón) de pollos de 10 días de edad tratados previamente con una mezcla de bacteriófagos líticos.

La disminución del recuento de S.E. en ovario es relevante, principalmente por dos motivos: 1) se sabe que la incidencia de infección interna del huevo, en gallinas inoculadas experimentalmente con S.E., es mayor a nivel de yema que albúmina (Gast y Holt, 2000a; Gast *et al.*, 2002; Okamura *et al.*, 2001) y a su vez, el ovario es el punto de contaminación de la yema (De Buck *et al.*, 2004a) y 2) la magnitud de la multiplicación de S.E., cuando infecta yema es directamente proporcional a la concentración inicial en el tejido (Gast y Holt 2000b). De ahí la importancia que presentan los fagos al lograr exitosamente disminuir la carga bacteriana a nivel de ovario, ya que de esta manera sería posible obtener una menor cantidad del patógeno en yema y con ello, disminuiría la probabilidad de que la multiplicación de S.E. alcance niveles peligrosos.

---

(\*) Comunicación personal Dra. Consuelo Borie. Laboratorio Microbiología FAVET, Universidad de Chile.

Los resultados del presente estudio no son los esperados, de acuerdo a los exitosos resultados obtenidos con este mismo cóctel de fagos dosificados por aspersión en pollos (Borie *et al.*, 2009). Cabe señalar que los bacteriófagos pueden administrarse por diferentes vías, entre ellas, se encuentran la vía aerógena (aspersión), intracloacal, intramuscular y oral. Independiente de la vía de administración, el fago es capaz de translocarse al torrente sanguíneo (fagemia) y con ello llegar a distintos tejidos (Borie *et al.*, 2008b; Borie *et al.*, 2009). En el presente estudio se tomó la determinación de utilizar la vía oral, ya que en la investigación realizada por Borie *et al.*, (2008b), donde los fagos fueron dosificados a pollos por agua de bebida, se logró una reducción significativa en la incidencia de infección en “pool” de órganos internos (hígado, bazo y corazón), al contrario de lo que sucedió cuando los fagos fueron administrados por aspersión. Si bien en el presente estudio, dos de los fagos aplicados son diferentes, uno de ellos (f18 $\alpha$ ), fue el mismo empleado en la investigación de Borie *et al.*, 2008b, por lo que se esperaba que también realizara fagemia en aves adultas y con ello alcanzar sus tejidos reproductivos (ovario y oviducto).

Obviamente, para que se produzca el encuentro bacteria-fago el requisito mínimo que debe cumplirse, es que el virus llegue al sitio de infección, por lo que éstos resultados pueden explicarse tal vez, porque los bacteriófagos no lograron alcanzar de manera importante el tejido reproductivo, a pesar de que se administraron a una elevada concentración (MOI=  $10^3$  UFP), de acuerdo a los buenos resultados obtenidos en trabajos nacionales previos (Borie *et al.*, 2008b; Borie *et al.*, 2009). Asimismo, Atterbury *et al.*, (2007) lograron reducir significativamente la colonización cecal de *Salmonella* Enteritidis, en pollos Broilers de 38 días de edad, al utilizar una MOI de  $10^3$  UFP, a diferencia de lo ocurrido cuando administraron una multiplicidad de infección de  $10^1$  UFP, en donde los resultados obtenidos no fueron estadísticamente significativos. Huff *et al.*, (2005) lograron incluso, disminuir en un 100% el porcentaje de mortalidad por colibacilosis, en pollos de 7 días de edad, cuando administraron los bacteriófagos a elevada MOI ( $10^0$  versus  $10^4$  UFP).

Esta situación también podría darse, debido a que la viscosidad y el gran número de bacterias presentes en el tracto alimentario de las aves adultas (a diferencia de los pollos), ejercieron una barrera mecánica impidiendo una exitosa difusión del fago hacia el

sistema circulatorio (Joerger, 2003). Adicionalmente, en el trabajo desarrollado por Borie *et al.*, (2009), es posible visualizar que en aquellos pollos a los cuales se les administró al primer día de edad, un producto comercial de exclusión competitiva (Broilact®, a base de bacterias benéficas que colonizan en tracto digestivo de aves sanas adultas), los bacteriófagos alcanzaron órganos internos en un número menor de animales (29%), comparados con el grupo que solo fue tratado con fagos (46,6%).

Dentro de las condiciones adversas que genera el ambiente digestivo, debe considerarse también el acelerado tránsito intestinal que presentan las aves. Estudios al respecto han determinado que, al administrar oralmente un marcador no absorbible (óxido crómico) en búhos, es posible detectarlo en excremento en un lapso de 2,5 horas después de la ingestión, mientras que la mayor parte del compuesto se recuperó en aproximadamente 24 horas (Duke, 1999). Asimismo, Higgins *et al.*, (2007), utilizando óxido férrico como marcador de pasaje alimentario, detectaron el compuesto en heces entre 1 y 3 horas, después de administrarlo en pollos de un día de edad. Adicionalmente, Atterbury *et al.*, (2007) observaron que los fagos administrados contra S.E. fueron eliminados rápidamente desde el intestino de pollos de 36 días de edad, en ausencia de su bacteria blanco, encontrándose por debajo del límite de detección después de las 48 horas. Con estos antecedentes es factible suponer que los fagos al ser administrados a las 72, 48 y 24 horas antes del desafío con la bacteria, tal vez no fueron capaces de permanecer en altos títulos, siendo eliminados por la motilidad intestinal (Fiorentin *et al.*, 2005). Esta posibilidad, sin embargo, parece ser poco probable, ya que las dosis de bacteriófagos suministradas en el presente estudio, fueron bastante elevadas ( $10^{11}$  UFP/fago/día) lo que, en cierta medida, podría contrarrestar esta situación.

La posibilidad de que los bacteriófagos compartan su actividad lítica con otro tipo de bacterias intestinales es descartada, ya que ellos no presentaron ningún efecto lítico sobre las bacterias presentes en un producto comercial de exclusión competitiva (Broilact®) (Borie *et al.*, 2009), ni tampoco sobre 298 cepas de enterobacterias residentes, obtenidas desde intestino de aves adultas (Borie *et al.*, 2008b).

Otro factor implicado en el éxito de la fagoterapia es el pH y la temperatura del ambiente (Greer, 2005). Generalmente el pH del jugo gástrico de las aves, varía entre 0,5

y 2,5, mientras que el pH intestinal se encuentra entre 5,6-7,2 y la temperatura corporal de pollo es en promedio de 41,7°C, pero varía entre 40,6 y 43,0°C (Duke, 1999). Se ha demostrado que ciertos bacteriófagos no sobreviven cuando son expuestos a pH 2,0 y decrecen en número con pH entre 3,0 y 7,0, sin embargo, la sensibilidad a valores bajos de pH depende de la especie de bacteriófagos (Dabrowska *et al.*, 2005). Tras la caracterización de los tres bacteriófagos utilizados en el presente estudio, se observó tolerancia entre pH 4,0 a 11,0, a excepción del bacteriófago f18 $\alpha$  que presentó baja tolerancia incluso a pH 2,0. Algunos autores, tratando de contrarrestar la acidez del proventrículo, han utilizado antiácidos previo o simultáneo a la administración de los fagos, tales como carbonato de calcio e hidróxido de magnesio (Higgins *et al.*, 2007; Atterbury *et al.*, 2007). Esta estrategia, aunque aún controvertida, podría ser considerada como una alternativa, para mejorar la sobrevivencia de los bacteriófagos en el tracto gastrointestinal, en estudios futuros. En cuanto a la temperatura, estudios *in vitro* con bacteriófagos específicos contra *E. coli* han establecido que la inactivación térmica ocurre generalmente entre los 60 y 75°C (Hudson *et al.*, 2005). Luego de la caracterización de los tres bacteriófagos utilizados en el trabajo actual, se determinó que uno de ellos, mostró labilidad sobre los 41°C en el título y actividad lítica contra S.E., no obstante, los fagos restantes, fueron resistentes a esta condición, incluso a temperaturas mayores a 68°C, por lo que se descarta la posibilidad de que éstos hayan sido inactivados por acción térmica dentro del tracto alimentario de las aves.

Otra alternativa que quizás explicaría la baja actividad lítica de los fagos, podría ser debido una respuesta inmunológica. En el presente estudio, si los fagos administrados lograron translocarse desde intestino hacia el sistema circulatorio, existe la probabilidad de que ellos hayan sido neutralizados por anticuerpos anti-fago preexistentes (Carlton, 1999; Dabrowska *et al.*, 2005). Dada la condición de ubicuidad que presentan estos virus, es dable sospechar que las gallinas comerciales utilizadas en el estudio, pudieron haber estado expuestas en su plantel de origen a bacteriófagos similares a los utilizados, sobretodo considerando que el aislamiento de los fagos se realizó, a partir de aguas residuales de planteles comerciales avícolas. En efecto, bacteriófagos naturales son capaces de inducir respuesta inmune humoral e incluso se han detectado anticuerpos fago-neutralizantes, que no han sido estimulados por fagoterapia, en suero de diferentes especies animales y en calostro bovino. No obstante, la respuesta inmune varía

enormemente entre fagos; algunos no estimulan la producción de anticuerpos, mientras que otros lo hacen frecuentemente (Dabrowska *et al.*, 2005). Por lo tanto, la eliminación o neutralización de los fagos por anticuerpos preexistentes, no se puede asegurar fehacientemente como una de las causas de la baja eficacia presentada en este estudio, más aún si se utilizó una elevada dosis de bacteriófagos, ya que esto es señalado como una estrategia para compensar la neutralización por anticuerpos (Carlton, 1999).

Por otro lado, si bien se describe que el desarrollo de bacterias fago resistentes puede obstaculizar la eficacia de la fagoterapia, en el presente estudio, la utilización de una mezcla de tres bacteriófagos líticos (F18 $\alpha$ , Est2, Est16), tuvo por finalidad disminuir la probabilidad de selección de cepas S.E. resistentes a un bacteriófago en específico, tal como lo señalan aquellos autores que optan por esta alternativa (Fiorentin *et al.*, 2005; Higgins *et al.*, 2005; Huff *et al.*, 2005; Toro *et al.*, 2005; Filho *et al.*, 2007; Borie *et al.*, 2008b; Borie *et al.*, 2009), no obstante, existen algunas investigaciones exitosa que utilizaron fagos de manera individual (Atterbury *et al.*, 2007; Borie *et al.*, 2008a). Para obtener una mayor claridad respecto al impacto de la resistencia bacteriana, podría incluirse en estudios futuros, un análisis comparativo entre las cepas bacterianas expuestas al fago y la cepa original, para determinar la susceptibilidad a los bacteriófagos.

Finalmente, los resultados de este trabajo no coinciden con la eficacia demostrada por los bacteriófagos en el control de S.E. en pollos, de acuerdo a lo informado a nivel nacional (Borie *et al.*, 2008a; Borie *et al.*, 2008b; Borie *et al.*, 2009) e internacional (Toro *et al.*, 2005; Atterbury *et al.*, 2007; Filho *et al.*, 2007). Sin embargo, no se descarta el desarrollo de nuevas investigaciones, basadas en la reducción del recuento de éste patógeno, obtenido a nivel ovárico y orientadas hacia la selección y caracterización de bacteriófagos con mayor capacidad invasiva a nivel de tracto reproductivo de gallinas ponedoras.

## CONCLUSIONES

- a. La cepa S.E. *nal rif* p-9 presenta moderada invasividad, específicamente en tejido reproductivo de gallinas.
- b. La administración preventiva de una mezcla de tres bacteriófagos líticos, no logra disminuir la incidencia (bacteriología cualitativa) de infección de *Salmonella* Enteritidis, en ovario y oviducto de gallinas ponedoras comerciales.
- c. La aplicación profiláctica de una mezcla de tres bacteriófagos líticos, no disminuye significativamente el recuento (bacteriología cuantitativa) de *Salmonella* Enteritidis a nivel de oviducto, pero sí en ovario de gallinas infectadas experimentalmente.

## BIBLIOGRAFÍA

**ALBALA, I.** 2007. Biocontrol de *Salmonella* Enteritidis en aves mediante el uso de bacteriófagos. Memoria para optar al título profesional de Médico Veterinario. Santiago, Universidad de Chile, Facultad de Ciencias Veterinarias y Pecuarias. 55p.

**ALEXANDRE, M.; POZO, C.; GONZÁLEZ, V.; MARTÍNEZ, M.; PRAT, S.; FERNÁNDEZ, A.; FICA, A.; FERNÁNDEZ, J.; HEITMANN, I.** 2000. Detección de *Salmonella enteritidis* en muestras de productos avícolas de consumo humano en la Región Metropolitana. Rev. Méd. Chil. 128(10):1075-1083.

**ASOHUEVO. ASOCIACIÓN DE PRODUCTORES DE HUEVO.** 2008. [consulta en línea] <<http://www.asohuevo.cl/asociados/industria/produccion.php>> [consulta: 24 noviembre 2008].

**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. 73(14):4543-4549.

**AVMA. AMERICAN VETERINARY MEDICAL ASSOCIATION.** 2001. Report of the AVMA. Panel on Euthanasia. J. Am. Vet. Med. Assoc. 218(6):669-696.

**BORIE, C.; ZURITA, P.; SÁNCHEZ, M.; ROJA, V.; SANTANDER, J.; ROBESON, J.** 2008a. Prevención de la infección por *Salmonella enterica subespecie enterica* serotipo Enteritidis (*Salmonella* Enteritidis) en pollos mediante un bacteriófago. Arch. Med. Vet. 40:197-201.

**BORIE, C.; ALBALA, I.; SÁNCHEZ, P.; SÁNCHEZ, M.; RAMÍREZ, S.; NAVARRO, C.; MORALES, M.; RETAMALES, J.; ROBESON, J.** 2008b. Bacteriophage treatment reduce *Salmonella* colonization of infected chickens. Avian Dis. 52(1):1-11.

**BORIE, C.; SÁNCHEZ, M.; NAVARRO, C.; RAMÍREZ, S.; MORALES, M.; RETAMALES, J.; ROBESON, J.** 2009. Aerosol spray treatment with bacteriophages and competitive exclusion reduces *Salmonella* Enteritidis infection in chickens. *Avian Dis.* 53(2):250-254.

**BRADEN, C.** 2006. *Salmonella enterica* serotype Enteritidis and eggs: a national epidemic in the United States. *Clin. Infect. Dis.* 43(4):512-517.

**BREYTENBACH, J.** 2004. *Salmonella* control in poultry. Intervet International. [en línea] <<http://www.safe-poultry.com/documents/ControlofSalmonellainPoultry-August2004.pdf>> [consulta: 13 noviembre 2008].

**CARLTON, R.** 1999. Phage therapy: past history and future prospects. *Arch. Immunol. Ther. Exp.* 47(5):267-274.

**CDC, NIH. CENTRES FOR DISEASE CONTROL AND PREVENTION, NATIONAL INSTITUTES OF HEALTH.** 2007. Biosafety in microbiological and biomedical laboratories. [en línea] <[http://www.cdc.gov/od/ohs/biosfty/bmb15/BMBL\\_5th\\_Edition.pdf](http://www.cdc.gov/od/ohs/biosfty/bmb15/BMBL_5th_Edition.pdf)> [consulta: 18 noviembre 2008].

**DABROWSKA, K.; SWITALA-JELEN, K.; OPOLSKI, A.; WEBER-DABROWSKA, B.; GÓRSKI, A.** 2005. Bacteriophage penetration in vertebrates. *J. Appl. Microbiol.* 98(1):7-13.

**DE BUCK, J.; VAN IMMERSEEL, F.; MEULEMANS, G.; HAESBROUCK, F.; DUCATELLE, R.** 2003. Adhesion of *Salmonella enterica* serotype Enteritidis isolates to chickens isthmal glandular secretion. *Vet. Microbiol.* 93(3):223-233.

**DE BUCK, J.; VAN IMMERSEEL, F.; HAESBROUCK, F.; DUCATELLE, R.** 2004a. Colonization of the chicken reproductive tract and egg contamination by *Salmonella*. *J. Appl. Microbiol.* 97:233-245.

**DE BUCK, J.; PASMANS, F.; VAN IMMERSEEL, F.; HAESEBROUCK, F.; DUCATELLE, R.** 2004b. Tubular glands of the isthmus are the predominant colonization site of *Salmonella* Enteritidis in the upper oviduct of laying hens. *Poult. Sci.* 83(3):352-358.

**DUKE, G.** 1999. Digestión aviar. En: SWENSON, M.; REECE, W. (Eds.). Fisiología de los animales domésticos de Dukes. Editorial Limusa. México. 428-436p.

**DUNKLEY, K.; CALLAWAY, T.; CHALOVA, V.; McREYNOLDS, J.; HUME, M.; DUNKLEY, C.; KUBENA, L.; NISBET, D.; RICKE, S.** 2008. Foodborne *Salmonella* ecology in the avian gastrointestinal tract. *Anaerobe.* 15(1-2):26-35.

**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.

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

**FIGUEROA, J.** 2007. Descripción y análisis de las acciones realizadas por los servicios públicos (salud animal y salud pública), frente a salmonelosis humana. Memoria para optar al título profesional de Médico Veterinario. Santiago, Universidad de Chile, Facultad de Ciencias Veterinarias y Pecuarias. 98p.

**FILHO, R.; HIGGINS, J.; HIGGINS, S.; GAONA, G.; WOLFENDEN, A.; TELLEZ, G.; HARRIS, B.** 2007. Ability of bacteriophages isolated from different sources to reduce *Salmonella* enterica serovar Enteritidis *in vitro* and *in vivo*. *Poult. Sci.* 86(9):1904-1909.

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

**GAST, R.; BEARD, C.** 1990. Isolation of *Salmonella enteritidis* from internal organs of experimentally infected hens. *Avian Dis.* 34(4):991-993.

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

**GAST, R.; HOLT, P.** 2000a. Deposition of phage type 4 and 13a *Salmonella enteritidis* strains in the yolk and albumen of eggs laid by experimentally infected hens. Avian Dis. 44(3):706-710.

**GAST, R.; HOLT, P.** 2000b. Influence of the level and location of contamination on the multiplication of *Salmonella enteritidis* at different storage temperatures in experimentally inoculated eggs. Poult. Sci. 79(4):559-563.

**GAST, R.; GUARD-PETTER, J.; HOLT, P.** 2002. Characteristics of *Salmonella enteritidis* contamination in eggs after oral, aerosol, and intravenous inoculation of laying hens. Avian Dis. 46(3):629-635.

**GAST, R.; GUARD-PETTER, J.; HOLT, P.** 2003. Effect of prior serial *in vivo* passage on the frequency of *Salmonella enteritidis* contamination in eggs from experimentally infected laying hens. Avian Dis. 47(3):633-639.

**GAST, R.; GUARD-BOULDIN, J.; HOLT, P.** 2004. Colonization of reproductive organs and internal contamination of eggs after experimental infection of laying hens with *Salmonella Heidelberg* and *Salmonella enteritidis*. Avian Dis. 48(4):863-869.

**GAST, R.** 2007. Serotype-specific and serotype-independent strategies for preharvest control of food-borne *Salmonella* in poultry. Avian Dis. 51:817-828.

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

**GÓRSKI, A.; WEBER-DABROWSKA, B.** 2005. The potential role of endogenous bacteriophages in controlling invading pathogens. Cell. Mol. Life. Sci. 62(5):511-519.

**GREER, G.** 2005. Bacteriophage control of foodborne bacteria. *J. Food Prot.* 68(5):1102-1111.

**GUTIÉRREZ, A.; PAASCH, L.; CALDERÓN, N.** 2008. Salmonelosis y campilobacteriosis, las zoonosis emergentes de mayor expansión en el mundo. *Vet. Méx.* 39(1):81-90.

**HAGENS, S.; LOESSNER, M.** 2007. Application of bacteriophages for detection and control of foodborne pathogens. *App. Microbiol. Biotechnol.* 76(3):513-519.

**HIGGINS, J.; HIGGINS, S.; GUENTHER, K.; HUFF, W.; DONOGHUE, A.; DONOGHUE, D.; HARGIS, B.** 2005. Use of a specific bacteriophage treatment to reduce *Salmonella* in poultry products. *Poult. Sci.* 84(7):1141-1145.

**HIGGINS, S.; HIGGINS, J.; BIELKE, L.; HARGIS, B.** 2007. Selection and application of bacteriophages for treating *Salmonella enteritidis* infections in poultry. *Int. J. Poult. Sci.* 6(3):163-168.

**HOOP, R.; POSPISCHIL, A.** 1993. Bacteriological, serological, histological and immunohistochemical findings in laying hens with naturally acquired *Salmonella enteritidis* phage type 4 infection. *Vet. Rec.* 133(16):391-393.

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

**HUFF, W.; HUFF, G.; RATH, N.; BALOG, J.; DONOGHUE, A.** 2004. Bacteriophage: potential role in food safety. EN: BEIER, R.; PILLAI, S.; PHILLIPS, T.; ZIPRIN, R. (Eds.). Preharvest and postharvest food safety contemporary issues and future directions. Blackwell Publishing. 365-374p.

**HUFF, W.; HUFF, G.; RATH, N.; BALOG, J.; DONOGHUE, A.** 2005. Alternatives to antibiotics: utilization of bacteriophage to treat colibacillosis and prevent foodborne pathogens. *Poult. Sci.* 84(4):655-659.

**INE. INSTITUTO NACIONAL DE ESTADÍSTICA.** 2007. Encuesta de criaderos de aves y de cerdos primer y segundo semestre 2006. [en línea]

<[http://www.ine.cl/canales/chile\\_estadistico/estadisticas\\_agropecuarias/pdf/aves\\_y\\_cerdos\\_2006.pdf](http://www.ine.cl/canales/chile_estadistico/estadisticas_agropecuarias/pdf/aves_y_cerdos_2006.pdf)> [consulta: 24 noviembre 2008].

**INFOSTAT.** 2004. InfoStat, versión 2004. Manual del usuario. Grupo InfoStat. FCA. Universidad Nacional de Córdoba. Editorial Brujas. Argentina. 314 p.

**JOERGER.** 2003. Alternatives to antibiotics: bacteriocins, antimicrobial peptides and bacteriophages. *Poult. Sci.* 82(4):640-647.

**KELLER, L.; BENSON, C.; KROTEC, K.; ECKROADE, R.** 1995. *Salmonella enteritidis* colonization of the reproductive tract and forming and freshly laid eggs of chickens. *Infect. Immun.* 63(7):2443-2449.

**KINDE, H.; SHIVAPRASAD, H.; DAFT, B.; READ, D.; ARDANS, A.; BREITMEYER, R.; RAJASHEKARA, G.; NAGAJA, K.; GARDNER, I.** 2000. Pathologic and bacteriologic findings in 27-week-old commercial laying hens experimentally infected with *Salmonella enteritidis*, phage type 4. *Avian Dis.* 44(2):239-248.

**LÓPEZ, A.** 2007. Descripción de la infección experimental en pollos con una cepa nativa de *Salmonella Enteritidis naf rif* P-9. Memoria para optar al título profesional de Médico Veterinario. Santiago, Universidad de Chile, Facultad de Ciencias Veterinarias y Pecuarias. 63p.

**MESSENS, W.; GRIJSPEERDT, K.; HERMAN, L.** 2005. Eggshell penetration by *Salmonella*: a review. *Worlds Poult. Sci. J.* 61:71-85.

**MURRAY, C.; BARTON, M.** 1993. Salmonellosis bacteriology EN: CORNER, L.; BAUGUST, T. (Eds.). Australian standard diagnostic techniques for animals disease. L.A. Corner and T.J. Baugust (Eds). Australia. 3-8 p.

**OKAMURA, M.; KAMIJIMA, Y.; MIYAMOTO, T.; TANI, H.; SASAI, K.; BABA, E.** 2001. Differences among six *Salmonella* serovars in abilities to colonize reproductive organs and to contaminate eggs in laying hens. *Avian Dis.* 45(1):61-69.

**PARRA, M.; DURANGO, J.; MÁTTAR, S.** 2002. Microbiología, patogénesis, epidemiología clínica y diagnóstico de las infecciones producidas por *Salmonella*. *MVZ-Córdova.* 7(2):187-200.

**POPPE, C.** 1999. Epidemiology of *Salmonella enterica* serovar Enteritidis. En: SAEED, A. M.; GAST, R.; POTTER, M.; WALL, P. (Eds.). *Salmonella enterica* serovar Enteritidis in humans and animals: epidemiology, pathogenesis and control. Blackwell Publishing. 3-18p.

**ROBESON, J.; RETAMALES, J.; BORIE, C.** 2008. Genomic variants of bacteriophages against *Salmonella enterica* serovar Enteritidis with potential application in the poultry industry. *Braz. J. Poult. Sci.* 10(3):173-178.

**SÁNCHEZ, M.; CARDONA, N.** 2003. Mecanismos de interacción de *Salmonella* con la mucosa intestinal. *Asoc. Colom. Infect.* 7(1):22-29.

**SHIVAPRASAD, H.; TIMONEY, J.; MORALES, S.; LUCIO, B.; BAKER, R.** 1990. Pathogenesis of *Salmonella enteritidis* infection in laying chickens. Studies on egg transmission, clinical signs, fecal shedding, and serologic responses. *Avian Dis.* 34(3):548-557.

**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. *Antimicrob. Agents Chemother.* 45(3):649-659.

**TAKATA, T.; LIANG, J.; NAKANO, H.; YOSHIMURA, Y.** 2003. Invasion of *Salmonella* Enteritidis in the tissues of reproductive organs in laying japanese quail: an immunocytochemical study. *Poult. Sci.* 82(7):1170-1173.

**THIAGARAJAN, D.; SAEED, A.; ASEM, K.** 1994. Mechanism of transovarian transmission of *Salmonella enteritidis* in laying hens. *Poult. Sci.* 73(1):89-98.

**TINDALL, B.; GRIMONT, P.; GARRITY, G.; EUZÉBY, J.** 2005. Nomenclature and taxonomy of the genus *Salmonella*. *Inter. J. Syst. Evolut. Microbiol.* 55:521-524.

**TORO, H.; PRICE, S.; McKEE, S.; HOERR, F.; KREHLING, J.; PERDUE, M.; BAUERMEISTER, L.** 2005. Use of bacteriophages in combination with competitive exclusion to reduce *Salmonella* from infected chickens. *Avian Dis.* 49(1):118-124.

**WHO. WORD HEALT ORGANIZATION.** 2007. *Salmonella*: an important foodborne risk. [en línea] <[http://www.euro.who.int/foodsafety/Microbiological/20070516\\_3](http://www.euro.who.int/foodsafety/Microbiological/20070516_3)> [consulta: 5 noviembre 2008].

**ANEXO N°1:** Resultados bacteriología cualitativa y cuantitativa de ovario y oviducto del grupo control de infección.

N° de Ave	Cualitativo Ovario	Cuantitativo Ovario (UFC/g)	Log <sub>10</sub>	Cualitativo Oviducto	Cuantitativo Oviducto (UFC/g)	Log <sub>10</sub>
1	+	<10 <sup>3</sup>	1	-	0	0
2	+	6,1 x 10 <sup>4</sup>	4,785	-	0	0
3	+	<10 <sup>3</sup>	1	+	<10 <sup>3</sup>	1
4	+	6 x 10 <sup>2</sup>	2,778	-	0	0
5	+	<10 <sup>3</sup>	1	+	1,3 x 10 <sup>3</sup>	3,114
6	-	0	0	-	0	0
7	-	0	0	-	0	0
8	+	<10 <sup>3</sup>	1	+	<10 <sup>3</sup>	1
9	-	0	0	-	0	0
10	-	0	0	-	0	0
11	+	<10 <sup>3</sup>	1	-	0	0
12	-	0	0	-	0	0
13	-	0	0	-	0	0
14	-	0	0	-	0	0
15	-	0	0	-	0	0
16	-	0	0	-	0	0
17	+	1,59 x 10 <sup>7</sup>	7,201	+	2,166 x 10 <sup>4</sup>	4,336
18	+	6,3 x 10 <sup>3</sup>	3,799	+	<10 <sup>3</sup>	1
19	-	0	0	-	0	0
20	-	0	0	-	0	0
21	-	0	0	-	0	0
22	+	<10 <sup>3</sup>	1	-	0	0
23	+	<10 <sup>3</sup>	1	+	<10 <sup>3</sup>	1
24	+	1 x 10 <sup>1</sup>	1	+	<10 <sup>3</sup>	1
25	-	0	0	-	0	0
26	-	0	0	-	0	0
27	-	0	0	-	0	0
28	+	<10 <sup>3</sup>	1	-	0	0
29	-	0	0	-	0	0
30	-	0	0	-	0	0

**ANEXO N°2:** Resultados bacteriología cualitativa y cuantitativa de ovario y oviducto del grupo tratado con bacteriófagos.

N° de Ave	Cualitativo Ovario	Cuantitativo Ovario (UFC/g)	Log <sub>10</sub>	Cualitativo Oviducto	Cuantitativo Oviducto (UFC/g)	Log <sub>10</sub>
1	-	0	0	-	0	0
2	+	<10 <sup>3</sup>	1	-	0	0
3	-	0	0	-	0	0
4	-	0	0	-	0	0
5	+	<10 <sup>3</sup>	1	-	0	0
6	-	0	0	+	<10 <sup>3</sup>	1
7	-	0	0	-	0	0
8	-	0	0	-	0	0
9	-	0	0	-	0	0
10	-	0	0	-	0	0
11	+	<10 <sup>3</sup>	1	-	0	0
12	-	0	0	-	0	0
13	-	0	0	-	0	0
14	-	0	0	-	0	0
15	-	0	0	-	0	0
16	-	0	0	-	0	0
17	-	0	0	-	0	0
18	+	<10 <sup>3</sup>	1	-	0	0
19	+	<10 <sup>3</sup>	1	-	0	0
20	-	0	0	-	0	0
21	-	0	0	-	0	0
22	-	0	0	-	0	0
23	+	2 x 10 <sup>1</sup>	1,301	-	0	0
24	+	<10 <sup>3</sup>	1	-	0	0
25	-	0	0	+	<10 <sup>3</sup>	1
26	+	<10 <sup>3</sup>	1	-	0	0
27	-	0	0	-	0	0
28	+	<10 <sup>3</sup>	1	-	0	0
29	-	0	0	-	0	0
30	-	0	0	+	<10 <sup>3</sup>	1