



**UNIVERSIDAD DE CHILE**



FACULTAD DE CIENCIAS VETERINARIAS Y PECUARIAS  
ESCUELA DE CIENCIAS VETERINARIAS

FAGOTERAPIA PREVENTIVA COMO BIOCONTROL DE  
*Salmonella* Enteritidis EN GALLINAS DE POSTURA  
EXPERIMENTALMENTE INFECTADAS

**JOHN QUIROGA ARDILES**

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

**PROFESOR GUÍA: DRA. CONSUELO BORIE POLANCO, MV.; M.Sc.**

SANTIAGO, CHILE  
2009



# UNIVERSIDAD DE CHILE



FACULTAD DE CIENCIAS VETERINARIAS Y PECUARIAS  
ESCUELA DE CIENCIAS VETERINARIAS

## FAGOTERAPIA PREVENTIVA COMO BIOCONTROL DE *Salmonella* Enteritidis EN GALLINAS DE POSTURA EXPERIMENTALMENTE INFECTADAS

### JOHN QUIROGA ARDILES

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

NOTA FINAL: .....

		NOTA	FIRMA
PROFESOR GUÍA	: CONSUELO BORIE POLANCO	.....	.....
PROFESOR CONSEJERO	: MARÍA LUISA SÁNCHEZ CHONG	.....	.....
PROFESOR CONSEJERO	: HÉCTOR HIDALGO OLATE	.....	.....

SANTIAGO, CHILE  
2009

Esta memoria de título fue financiada por el proyecto **FONDECYT N° 1080291**:  
“Control de *Salmonella* Enteritidis en avicultura: bacteriófagos en aves de postura y alimentos  
derivados de la industria avícola”

*A mi querida familia,  
especialmente a mis padres,*

*Ana y Juan*

## **AGRADECIMIENTOS**

*A mi profesora guía, Dra. Consuelo Borie, muchas gracias por haberme permitido formar parte de este proyecto y especialmente de este grupo de trabajo, por la confianza entregada y la paciencia en los momentos más difíciles. Gracias por su incondicional presencia durante todo este estudio, así como sus consejos, críticas y sugerencias, los cuales no sólo permitieron concluir con éxito esta memoria, sino también ampliar mis conocimientos y criterio profesional.*

*A mi profesora consejera, Dra. María Luisa Sánchez, agradezco infinitamente todo el apoyo entregado durante el desarrollo de la investigación y la minuciosa corrección de esta memoria de título. Pero, por sobre todo, agradezco sinceramente su amistad, sus consejos y la generosidad con la cual me entregó conocimientos y experiencias. Éstos marcaron de manera muy profunda mi paso por la facultad y estarán siempre presentes en el difícil e interminable proyecto de crecimiento profesional y humano.*

*A la Dra. María Antonieta Jara y al Dr. Carlos Navarro, muchas gracias por todas las sugerencias entregadas y la siempre atenta disposición para resolver las distintas dudas que surgieron durante el trabajo. Sus palabras de aliento y buen humor lograron que cada jornada de trabajo finalizara con una especial gratificación... una sonrisa (y más de una buena carcajada).*

*Al Dr. Sergio Ramírez, por su generosa asesoría, la cual fue esencial para la implementación inicial del estudio y el manejo de las aves. Al Dr. Héctor Hidalgo, por los aportes entregados en el área avícola y la corrección de esta memoria de título. A la Dra. Valeria Rojas, por su ayuda en el desarrollo del análisis estadístico y su siempre buena disposición para atender nuestras numerosas dudas en aquel complejo tema. A todos los profesores que, en forma directa o indirecta, apoyaron el desarrollo de este estudio y que, producto de mi desconsiderada falta de memoria, no fueron nombrados explícitamente en estas páginas; reciban, por favor, mi más sincero agradecimiento.*

*A todos los funcionarios del Dpto. Medicina Preventiva Animal, muchas gracias por su fundamental e invaluable ayuda, sin la cual no habría sido posible desarrollar este estudio. Agradezco de todo corazón las largas horas de trabajo que dedicaron casi exclusivamente a este proyecto, su amistad y sus consejos. No podría dejar de mencionar a Don Humberto Antilef, Teresita Heredia, Carlos Campos, Patricio Toledo, Pamela Muñoz y Estelita Arellano. También agradezco la gentil ayuda recibida de Ramón Molina (Dpto. Patología Animal), Manuel Carreño (Dpto. Patología Animal), Octavio González*

*(Dpto. Fomento Producción Animal) y la de todos los funcionarios del área de transporte, cuya cooperación permitió la adquisición y traslado del material, las aves y su alimento durante todo el período de trabajo. Agradezco además a Fernanda Urrutia, Marcela Peñaloza y Patricia Molina, personal de biblioteca, cuya buena voluntad y paciencia facilitaron enormemente la búsqueda de información bibliográfica y la escritura de esta memoria.*

*A los alumnos y futuros médicos veterinarios, Srta. María José Aguirre y Sr. Francisco Guevara, por la generosa y desinteresada ayuda prestada durante el procesamiento de muestras en el laboratorio, lo cual significó el sacrificio de largas horas de estudio y descanso. También agradezco sinceramente a mi compañera de trabajo, la Dra. Carolina Hauva, cuya amistad, comprensión, carácter conciliador y paciencia, fueron pilares fundamentales para el desarrollo de este estudio.*

*Para finalizar, doy el mayor agradecimiento a toda mi familia, especialmente a mis padres, no sólo por haberme dado la oportunidad de estudiar esta incomprendida carrera, sino también por apoyarme incondicionalmente durante todo este proceso. A mi abuela, hermanos, sobrinas, cuñada y tíos; todos, junto al constante cariño y preocupación, supieron entender mi ausencia y debieron soportar pacientemente el mal carácter y ansiedad que, imprevistamente, surgieron en este individuo durante los años de estudio. También agradezco a todos mis amigos, los cuales me acompañaron con incondicional cariño y paciencia por esta senda conjuntamente caminada. A todos los nombrados en este último párrafo dedico humildemente este escrito, ya que sin su apoyo no habría sido posible concluir esta carrera y esta memoria de título con el alto nivel de gratificación personal que actualmente tienen para mí... espero llegar algún día a recompensar, al menos en parte, todo el cariño y apoyo que me han brindado durante estos años.*

***“El agradecimiento es la memoria del corazón”***

***(Lao-Tsé)***

# INDICE DE CONTENIDOS

	Página
<b>INTRODUCCIÓN</b> .....	<b>1</b>
<b>REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA</b> .....	<b>3</b>
I. ANTECEDENTES GENERALES.....	3
II. EPIDEMIOLOGÍA.....	4
III. PATOGENIA.....	7
IV. INFECCIÓN DE LOS HUEVOS.....	10
IV.1. Contaminación superficial y penetración a través de la cáscara	10
IV.2. Contaminación asociada al tracto reproductivo	12
V. MEDIDAS APLICADAS PARA EL CONTROL DE <i>S. Enteritidis</i> EN AVICULTURA.....	16
V.1. Vacunas	16
V.2. Control de la colonización gastrointestinal	18
V.3. Medidas de bioseguridad	19
V.4. Antimicrobianos	21
VI. BACTERIÓFAGOS.....	22
VI.1. Generalidades	22
VI.2. Uso de bacteriófagos en la industria de alimentos	25
VI.3. Fagoterapia en modelos animales	29
VI.3.1. Fagoterapia contra bacterias entéricas: <i>E. coli</i> y <i>Campylobacter</i>	29
VI.3.2. Fagoterapia contra <i>Salmonella</i>	31
VI.3.3. Fagoterapia a nivel nacional	33

<b>OBJETIVOS</b> .....	<b>36</b>
I.  OBJETIVO GENERAL.....	36
II. OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	36
<b>MATERIAL Y MÉTODOS</b> .....	<b>37</b>
1.  Animales	37
2.  Cepa desafío	37
3.  Bacteriófagos	38
4.  Cálculo de la dosis mínima infectante (DMI)	38
5.  Grupos de aves	39
6.  Bacteriología	40
6.1. Bacteriología cualitativa	40
6.2. Bacteriología cuantitativa	41
7.  Normas de bioseguridad	42
8.  Análisis estadístico	43
<b>RESULTADOS</b> .....	<b>44</b>
I.  CÁLCULO DE LA DOSIS MÍNIMA INFECTANTE (DMI).....	44
II. EFICIENCIA DE FAGOTERAPIA ORAL EN GALLINAS DE POSTURA COMERCIALES...	45
<b>DISCUSIÓN</b> .....	<b>48</b>
<b>CONCLUSIONES</b> .....	<b>64</b>
<b>BIBLIOGRAFÍA</b> .....	<b>65</b>



## RESUMEN

*Salmonella* Enteritidis (*S. Enteritidis*) continúa siendo un enteropatógeno de importancia en la industria avícola y en salud pública, debido a su condición zoonótica. Pese a los esfuerzos realizados en ambos sectores para su control, la bacteria continúa generando brotes de salmonelosis en la población humana, asociados principalmente al consumo de huevos inadecuadamente preparados. Debido a la limitada eficacia de las medidas de control actualmente aplicadas, el uso de bacteriófagos líticos muestra un potencial uso como medida de biocontrol de *S. Enteritidis* en la industria avícola. No obstante, a pesar de los exitosos resultados obtenidos tras su aplicación en pollos broiler y pollas de reposición, su uso aún no ha sido evaluado en aves de postura adultas.

El objetivo de este trabajo fue determinar la eficacia de una terapia preventiva con bacteriófagos, para el control de la colonización intestinal de *S. Enteritidis*, en gallinas de postura experimentalmente infectadas.

Para esto, gallinas Hy-Line Brown de 22 semanas de edad libres de *Salmonella*, fueron tratadas durante 3 días seguidos con una mezcla de 3 bacteriófagos líticos, a una dosis de  $10^{11}$  UFP/cada fago/ave y, un día después de la última dosis de bacteriófagos, fueron desafiadas con *S. Enteritidis* *nal<sup>r</sup> rif* ( $2,4 \times 10^8$  UFC/dosis/ave). Además, se consideró un grupo control de infección, el cual sólo recibió la cepa desafío. Diez días post infección bacteriana, las aves fueron sacrificadas, obteniéndose muestras individuales de ambos ciegos, las cuales fueron sometidas a bacteriología cualitativa y cuantitativa (recuento bacteriano). Adicionalmente, los huevos ovipuestos durante la experiencia por el grupo control de infección y el grupo sometido a fagoterapia, fueron recolectados y procesados para detectar la presencia de *S. Enteritidis* (bacteriología cualitativa).

Los resultados de la bacteriología cualitativa de ciegos fueron iguales entre el grupo tratado con bacteriófagos y el grupo control de infección, lográndose en ambos una incidencia de infección cecal del 96,67%. Por otra parte, los recuentos bacterianos a nivel cecal fueron menores en el grupo que recibió la fagoterapia ( $2,402 \log_{10}$  UFC/g), respecto al grupo control de infección ( $2,978 \log_{10}$  UFC/g), pero no se hallaron diferencias significativas entre estos resultados ( $p = 0,0961$ ).

Durante la experiencia, no fue posible el aislamiento de *S. Enteritidis* en los huevos frescos recolectados de los grupos experimentales. No obstante, se logró su aislamiento a partir de una muestra de huevos internos (presentes en el oviducto al momento de la eutanasia) del grupo control de infección. Adicionalmente, el porcentaje de postura gallina/día, promediado durante los 10 días post infección, fue estadísticamente menor en el grupo control de infección, respecto al grupo de aves que recibió la fagoterapia ( $p = 0,0054$ ).

Los resultados del presente estudio demuestran que, bajo el modelo experimental utilizado, los bacteriófagos no fueron capaces de reducir en forma significativa la colonización cecal de *S. Enteritidis* en gallinas de postura. Sin embargo, dado los buenos resultados obtenidos a nivel nacional e internacional en aves jóvenes, sería importante investigar los posibles factores que determinaron la falta de efectividad del tratamiento en aves adultas, con el objetivo de mejorar los resultados de la fagoterapia en este modelo animal. De este modo, en la medida que la fagoterapia en aves adultas sea perfeccionada, podría proyectarse como una herramienta adicional para el control de la salmonelosis en la industria avícola.

## SUMMARY

*Salmonella* Enteritidis (*S. Enteritidis*) remains as an important enteropathogen in poultry industry and public health, due to its zoonotic condition. Despite efforts in both areas for its control, the bacteria continues to generate outbreaks of salmonellosis in human population, mainly associated with consumption of improperly prepared eggs. Due to the limited effectiveness of control measures currently being implemented, lytic bacteriophages show a potential use as biocontrol of *S. Enteritidis* in the poultry industry. However, despite the successful results after implementation in broilers and replacement pullets, has not been evaluated in laying hens.

The aim of this study was to determine the effectiveness of prophylactic therapy with bacteriophages to control intestinal colonization by *S. Enteritidis* in experimentally infected laying hens.

For this, 22 weeks old Hy-Line Brown hens free of *Salmonella* were treated for 3 followed days by a mixture of 3 lytic bacteriophages, at a dose of  $10^{11}$  PFU/each phage/hen and one day after last bacteriophages dose, were challenged with *S. Enteritidis nal<sup>r</sup> rif* ( $2.4 \times 10^8$  CFU/dose/hen). Furthermore, it was considered an infection control group, which only received the challenge strain. On day 10 postchallenge, hens were euthanatized, obtaining individual samples of both ceca, which were subjected to qualitative and quantitative bacteriology (bacterial count). In addition, eggs laid during experience by infection control group and group receiving phage therapy, were collected and processed to detect the presence of *S. Enteritidis* (qualitative bacteriology).

Results of cecal qualitative bacteriology were similar between group treated with bacteriophages and infection control group, resulting in both a cecal infection incidence of 96.67%. Furthermore, cecal bacterial counts were lower in the group receiving phage therapy ( $2.402 \log_{10}$  CFU/g), respect infection control group ( $2.978 \log_{10}$  CFU/g), but not significant differences were found between these results ( $p = 0.0961$ ).

During the experiment, was not possible to isolate *S. Enteritidis* in freshly eggs collected from experimental groups. However, its isolation was achieved from a sample of internal eggs (present in oviduct at time of euthanasia) from infection control group. Additionally, percentage hen–day egg production, averaged over 10 days postchallenge, was statistically lower in infection control group, respect hens receiving phage therapy group ( $p = 0.0054$ ).

Results of this study showed that, under experimental model used, bacteriophages were not able to significantly reduce *S. Enteritidis* cecal colonization in laying hens. However, given good national and international results in chickens, would be important to investigate possible factors determining the lack of effectiveness of therapy in adult birds, with objective to improve the results of phage therapy in this animal model. Thus, according as phage therapy in adult birds be improved, could be projected as an additional tool for control of salmonellosis in poultry industry.

## INTRODUCCIÓN

Los brotes de gastroenteritis humana producidos por *Salmonella* Enteritidis se han incrementado dramáticamente en los últimos años a nivel mundial. El mismo patrón epidemiológico ha sido observado en Chile, donde este enteropatógeno ha perdido su carácter esporádico para adquirir una connotación endémica. Estos cambios epidemiológicos han sido asociados, entre otros factores, al consumo de productos avícolas inadecuadamente preparados, donde los huevos juegan un rol fundamental.

Para enfrentar este problema, la industria avícola ha implementado diversas estrategias de control, incluyendo el uso de vacunas, probióticos y antimicrobianos. No obstante, pese a las medidas actualmente aplicadas, la enfermedad aún está presente en los seres humanos e, incluso, la situación actual se ve preocupantemente agravada por el surgimiento de cepas bacterianas resistentes a los antimicrobianos de elección. En respuesta a esta situación, los investigadores nuevamente están enfocando sus investigaciones en el uso de bacteriófagos líticos. Estos virus se caracterizan por atacar en forma específica determinadas especies y cepas bacterianas, siendo inocuos para las células eucariotas. Además son altamente ubicuos, y su obtención y multiplicación *in vitro* es técnicamente fácil y económica.

Como parte del ciclo lítico, los bacteriófagos se unen específicamente a receptores de superficie de la bacteria hospedera e inyectan su material genético. Posteriormente, el material genético inyectado es multiplicado y traducido, a través de la batería enzimática bacteriana, para producir nueva descendencia fágica. Finalmente, el ciclo termina con la destrucción de la bacteria y la consecuente liberación de la progenie fágica al medio.

Diversos autores han comprobado la efectividad de la fagoterapia en el control de diversas bacterias patógenas, tales como *Escherichia coli*, *Campylobacter* spp., *Listeria monocytogenes* y *Salmonella* spp., utilizando variados modelos animales. Así mismo, valiosos aportes han sido desarrollados en la industria de los alimentos.

En el caso de *Salmonella* Enteritidis, diversos estudios realizados a nivel nacional e internacional han demostrado la eficacia de los bacteriófagos, al disminuir la incidencia de infección y los recuentos bacterianos, a nivel cecal y sistémico, en pollos broiler y pollas de

reposición. Sin embargo, hasta la fecha no han sido publicados estudios que confirmen los efectos benéficos de la fagoterapia en gallinas de postura, las cuales juegan un rol esencial en la epidemiología de la salmonelosis humana.

El presente estudio pretende determinar la efectividad de una fagoterapia preventiva en gallinas de postura infectadas experimentalmente con *Salmonella* Enteritidis, con énfasis en el control de la colonización bacteriana a nivel cecal. Con los resultados obtenidos, se espera contribuir a las medidas de control ya existentes contra este enteropatógeno a nivel nacional.

# REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA

## I. ANTECEDENTES GENERALES

El género *Salmonella* es representativo de la familia Enterobacteriaceae y cuenta con sólo dos especies, *Salmonella bongori* y *Salmonella enterica*; esta última se divide en seis subespecies: *enterica*, *salamae*, *arizonae*, *diarizonae*, *houtenae* e *indica*. Para fines prácticos de diagnóstico y epidemiología, la nomenclatura actual se basa en los nombres de los serotipos de la subespecie; de este modo, *Salmonella enterica* subespecie *enterica* serotipo Enteritidis, es denominada *Salmonella* Enteritidis (*S. Enteritidis*) (Tindall, 2005).

*Salmonella* es un bacilo Gram negativo, no esporulado, anaerobio facultativo y que se comporta como patógeno intracelular facultativo. Presenta tres tipos de antígenos (somático O, flagelar H y capsular Vi) cuyas propiedades de aglutinación se emplean para diferenciar a más de 2.500 serotipos, aumentando cada año la lista de Kauffmann–White (Popoff *et al.*, 2003). Para la realización de estudios más detallados de taxonomía y patogenia, los serotipos pueden subdividirse mediante el establecimiento de biotipos y fagotipos. El biotipo es la variación bioquímica entre organismos del mismo serotipo, mientras que el fagotipo expresa la diferente susceptibilidad de cepas del mismo serotipo a la lisis por bacteriófagos (Ward *et al.*, 1987).

Las salmonelas de mayor importancia médica pertenecen a las subespecies *enterica* y *arizonae*, aunque los serotipos de la subespecie *enterica* causan el 99% de las salmonelosis en humanos y animales superiores (Uzzau *et al.*, 2000). Los diversos serotipos tienen diferentes grados de adaptación y patogenicidad para los seres humanos y las especies animales. La fiebre tifoidea, asociada mayoritariamente a *Salmonella* Typhi (*S. Typhi*) y en menor grado a los serotipos de *Salmonella* Paratyphi (*S. Paratyphi*) A, B o C, es una enfermedad sistémica prolongada del hombre con bacteremias cíclicas, que sin intervención se prolonga durante cuatro semanas, usualmente sin mayores complicaciones (Fica *et al.*, 2001).

Así mismo, existen serotipos altamente adaptados a hospederos animales, como *Salmonella* Gallinarum (aves de corral) y *Salmonella* Abortus–ovis (ovinos), causantes de la tifoidea aviar y de abortos infecciosos en las ovejas, respectivamente, pero sólo ocasionalmente producen infecciones leves o asintomáticas en seres humanos. Existen, sin embargo, serotipos

como *Salmonella Choleraesuis* que causa enfermedad severa en su principal portador, el cerdo, pero también puede causar enfermedad sistémica grave en el hombre. Los serotipos *Salmonella* Enteritidis (*S. Enteritidis*) y *Salmonella* Typhimurium (*S. Typhimurium*) infectan tanto a humanos como a animales, pero en éstos, principalmente en pollos, producen infecciones asintomáticas (Uzzau *et al.*, 2000).

Durante la segunda mitad del siglo XX ocurrieron dos cambios importantes en la epidemiología de la salmonelosis en el mundo; en primer lugar, el surgimiento de infecciones humanas provocadas por el consumo de alimentos contaminados con *S. Enteritidis* y, en segundo lugar, la aparición de cepas de *S. Typhimurium* con resistencia múltiple a antibióticos (Velge *et al.*, 2005).

Los factores responsables del incremento en el número de infecciones por *S. Enteritidis* en las aves no han sido completamente dilucidados, entre otras causas, porque es difícil detectar la infección en pollos aparentemente sanos. Se ha comprobado que *S. Enteritidis* causa infecciones sin signos clínicos aparentes en una amplia gama de especies animales, en las que no se han identificado brotes agudos con mortalidad (Ward *et al.*, 1987). *S. Enteritidis* coloniza el tracto intestinal de las aves, invade los tejidos internos, provoca una respuesta inmune humoral y celular específica, y se deposita en el interior de los huevos, no existiendo evidencia clara de enfermedad clínica asociada con su infección (Gast y Beard, 1993).

## **II. EPIDEMIOLOGÍA**

*Salmonella* spp. se encuentra ampliamente distribuida en el medio ambiente debido a su carácter entérico, lo que le permite alcanzar todos los sitios susceptibles a contaminación fecal, tales como suelos y aguas, donde puede sobrevivir por largos períodos de tiempo (WHO, 2000). Estas bacterias pueden resistir la deshidratación durante un tiempo muy prolongado, tanto en las heces como en alimentos para consumo humano o animal. Del mismo modo, pueden sobrevivir varios meses en salmuera con 20% de sal, sobretodo en productos con un elevado contenido de proteínas y grasas, como algunos embutidos, resistiendo también el ahumado (Acha y Szyfres, 2001).



Las enfermedades causadas por los serotipos de *Salmonella enterica* son especialmente prevalentes en áreas en desarrollo, tales como el sureste de Asia, África y Sudamérica. Los serotipos típicos (*S. Typhi* y *S. Paratyphi*) causan 16 millones de casos estimados y 600.000 muertes alrededor del mundo cada año, asociadas principalmente a pacientes que no reciben tratamiento antimicrobiano adecuado (WHO, 2000). Se adquieren a través de agua o alimentos contaminados, con un período de incubación de 11 días aproximadamente. Su reservorio natural es el hombre, que contamina el ambiente por la excreción intermitente de las bacterias desde la vesícula biliar, siendo los portadores generalmente asintomáticos (Fica *et al.*, 2001).

*S. Enteritidis* es un patógeno entérico que provoca un cuadro de enterocolitis con diarrea, fiebre y dolor abdominal, como su principal manifestación clínica. Esta enfermedad tiene un corto período de incubación que no supera los 3 días y que generalmente se expresa en menos de 24 horas. Su duración es autolimitada, alcanzando en promedio 8 días. La infección por *S. Enteritidis* no tiene un perfil hospitalario, ya que rara vez se acompaña de complicaciones potencialmente letales, siendo básicamente una causa de diarrea de manejo ambulatorio (Fica *et al.*, 2001).

El Centro de Prevención y Control de Enfermedades (CDC) ha calculado que las infecciones por *Salmonella* spp. causan 1,4 millones de enfermos, 15.000 hospitalizaciones y 400 muertes cada año en Estados Unidos, siendo *S. Enteritidis* el serotipo más prevalente. Al respecto, las investigaciones epidemiológicas han implicado al consumo de huevos o alimentos preparados con éstos como los responsables del 80% de los brotes causados por *S. Enteritidis* en Estados Unidos, entre los años 1985 y 1999 (Gast, 2007).

En Chile, las infecciones por *S. Enteritidis* aparecieron dramáticamente en 1994 en el norte del país con cifras aproximadas a un 3.000% de aumento sobre los casos esporádicos registrados históricamente. Esta epidemia se extendió progresivamente hacia el resto del país, abarcando más del 80% de los Servicios de Salud en 1998 (Fica *et al.*, 2001). Así, durante el año 2000, se presentaron en el país 974 casos confirmados de salmonelosis humana a partir de muestras clínicas, de los cuales 402 fueron atribuidos a *S. Enteritidis* (Figueroa, 2007). Actualmente, las infecciones por *S. Enteritidis* son endémicas en nuestro país y han reemplazado a *S. Typhi* como el serotipo de *Salmonella* spp. más prevalente en el ambiente

clínico (Fica *et al.*, 2001). Estudios epidemiológicos de los brotes en Chile también han asociado al huevo y sus derivados como las principales fuentes de infección (Prado *et al.*, 2002).

De acuerdo a De Buck *et al.* (2004c), la proporción de huevos contaminados ovipuestos en un lote de gallinas naturalmente infectadas con *Salmonella* spp. varía considerablemente, siendo en la mayoría de los estudios menor al 0,03%; por otro lado, en gallinas infectadas en forma experimental, el porcentaje de huevos contaminados varía desde 0 hasta un 27,5%.

En la Región Metropolitana, Alexandre *et al.* (2000) estudiaron la presencia de *Salmonella* spp. en muestras de huevos, carnes y menudencias de ave de venta libre, donde se detectó positividad en 1 yema de 1.081 huevos muestreados (0,09%) y el serotipo Enteritidis se detectó en 108 de 1.524 muestras de carne y menudencias de ave (7,08%). A pesar de que la carne de ave aparece contaminada con una mayor frecuencia que las muestras de huevo, tiene menor importancia epidemiológica debido al control microbiológico que ejerce el calor en su preparación. En contraste, la frecuencia de contaminación observada para los huevos podría aparecer de baja magnitud; sin embargo, el gran consumo *per capita* de este producto a nivel nacional, estimado para el 2008 en 175 unidades/habitante/año (Covacevic y Esnaola, 2008), que con una frecuencia desconocida no incluye una cocción adecuada, indica una gran exposición en la población. Adicionalmente, cabe destacar que sólo basta la presencia de un huevo contaminado para comprometer una preparación alimenticia completa; esto determina la fuerte asociación entre la infección y banquetes, en los que mayonesa o huevos parcialmente cocidos han sido servidos luego de permanecer varias horas sin refrigeración desde su preparación, facilitando la replicación bacteriana (Fica *et al.*, 2001).

Durante el período 2000–2006, se produjo un aumento constante en los casos de salmonelosis humana confirmados a partir de muestras clínicas. Según datos del Instituto de Salud Pública (ISP), durante el año 2006 se presentaron en Chile 2.219 casos confirmados de salmonelosis, de los cuales 1.177 (53,04%) correspondieron al serotipo Enteritidis, mostrando casi un 300% de aumento en los casos respecto al año 2000 (Figuroa, 2007).

La vigilancia epidemiológica realizada por la Secretaría Regional Ministerial (SEREMI) Metropolitana de Salud Ambiental durante el período 2001–2006, reveló una constante disminución de *Salmonella* spp. en las toxiinfecciones estudiadas desde el 2001 (10 brotes

confirmados) hasta el 2004 (0 brotes confirmados), produciéndose un gran alza el 2005 (19 brotes confirmados) y luego volviendo a disminuir el año 2006 (8 brotes confirmados). Durante este período, *S. Enteritidis* concentró el 70% de los serotipos de *Salmonella* aislados a partir de los alimentos analizados por casos de gastroenteritis. Además, al analizar la distribución por meses de los alimentos positivos a *Salmonella* spp. provenientes de toxiinfecciones, se observa que éstos se concentran en los meses de mayor temperatura y disminuyen en los meses de invierno, confirmando que la temperatura es un factor importante frente al número de casos de toxiinfecciones por *Salmonella* spp., al producir la multiplicación exponencial de la bacteria y hacer más fácil su paso al organismo humano (Figuroa, 2007).

### III. PATOGENIA

La infección natural de las aves por *Salmonella* ocurre principalmente por vía oral y la bacteria coloniza el tracto intestinal, con el ciego como sitio primario (Ricke, 2003). Antes de invadir cualquier tipo de célula, la bacteria debe encontrar y adherirse a uno o más tipos celulares del tejido intestinal. Algunos mecanismos de adhesión pueden involucrar varios tipos de fimbrias, cuatro de las cuales están definidas genéticamente: fimbria tipo 1, fimbria codificada por plasmidios, fimbria polar larga y fimbria agregativa delgada. La presencia de por lo menos estos cuatro sistemas fimbriales, sugiere que la adhesión a superficies celulares y no celulares puede ser un paso crítico en la supervivencia de *Salmonella* en el medio ambiente, ya que ésta responde a factores del medio como pH y osmolaridad (Darwin y Miller, 1999).

*Salmonella* debe traspasar barreras e interactuar con las células del hospedero en sitios específicos durante el curso de la infección. Después de su ingestión, la bacteria resiste el ambiente ácido estomacal y coloniza el intestino delgado, penetra las células epiteliales y migra a la lámina propia de la región ileocecal, donde se multiplica en las placas de Peyer, induciendo hiperplasia e hipertrofia retículoendotelial. Se estimulan células inflamatorias y en el caso de la enteritis la infección se limita al tracto gastrointestinal (Sánchez y Cardona, 2003).

*Salmonella* establece un estrecho contacto con el borde en cepillo de las células epiteliales intestinales. Además, las células M, debido a la ausencia del borde en cepillo y glicocálix, representan una puerta de entrada ideal para las enterobacterias. *Salmonella* invade las células del hospedero por un mecanismo conocido como “trigger” (disparo); la bacteria se

acerca y envía señales a las células epiteliales, con lo que las microvellosidades circundantes empiezan a degenerarse con elongación, edema y crecimiento en un proceso llamado “*ruffling*” (rizado) (Figuroa y Verdugo, 2005). Aquí, los efectores interactúan con las proteínas de la célula hospedera para reestructurar el citoesqueleto de actina e inducir cambios morfológicos que finalmente causan que estas células, normalmente no fagocíticas, fagociten la bacteria en un proceso llamado invasión (Sánchez y Cardona, 2003).

Una característica esencial de la patogenicidad de *Salmonella* es su habilidad para engañar a la célula hospedera en una interacción bioquímica denominada de dos vías o conversación cruzada, la cual conduce a la respuesta tanto de la bacteria como de la célula hospedera. *Salmonella* responde a la presencia de la célula hospedera por activación de un sistema especializado de secreción de proteínas llamado tipo III o dependiente de contacto, el cual le permite secretar e inyectar proteínas de patogenicidad al citosol de la célula hospedera. Las proteínas inyectadas frecuentemente reensamblan factores eucarióticos que funcionan como señales de transducción y son capaces de interferir con las vías de señalización de la célula. En el caso de *Salmonella*, la redirección de las señales de transducción celular resulta en la reorganización del citoesqueleto de la célula hospedera, estableciendo nichos subcelulares para la colonización bacteriana y facilitando una estrategia de comunicación altamente adaptada con la célula hospedera (Darwin y Miller, 1999).

*Salmonella* es la única bacteria descrita que contiene dos sistemas de secreción tipo III (SSTIII); estos son maquinarias de translocación proteica, que permiten a las proteínas de patogenicidad bacterianas ser liberadas directamente en el citosol de las células eucariotas. Los dos SSTIII de *Salmonella* son codificados en dos distintos grupos de genes, llamados islas de patogenicidad 1 y 2 (SPI1 y SPI2), los cuales juegan papeles diferentes durante la patogénesis: SPI1 es requerida para la penetración inicial a la mucosa intestinal, mientras que SPI2 es necesaria para los estados subsecuentes de la infección sistémica (Darwin y Miller, 1999).

La SPI1 es requerida para el ingreso de *Salmonella* a la célula hospedera, y se divide en dos grupos de genes que codifican la maquinaria de secreción para invadir la mucosa: *inv*–*spa* y *prg*–*org*; estos genes codifican varias proteínas involucradas en las modificaciones del citoesqueleto, tales como SipA, SopE, SopE2 y SopB (Darwin y Miller, 1999; Figuroa y Verdugo, 2005). El SSTIII dirige la exportación de varias proteínas como ATPasas, proteínas

reguladoras y estructurales, formadoras de canales, lipoproteínas, moléculas efectoras para las células hospederas y chaperonas, entre otras. Algunas de estas proteínas ensamblan transitoriamente una estructura apendicular llamada invasoma, mientras que otras son translocadas a la célula hospedera, donde activan o interfieren con las vías de transducción de señales conduciendo a una variedad de respuestas, dependiendo del tipo celular infectado. En las células no fagocíticas, *Salmonella* induce profundas reestructuraciones del citoesqueleto y “ruffling” de membrana, el cual es acompañado por macropinocitosis que finalmente conduce a la fagocitosis de la bacteria. Por el contrario, en los macrófagos induce efectos citotóxicos, caracterizados por una rápida inhibición del “ruffling” de membrana y la macropinocitosis, seguido por la inducción de muerte celular apoptótica (Van der Velden *et al.*, 2000).

Los mecanismos de patogenicidad mediante los cuales *Salmonella* induce diarrea y septicemia no han sido descritos aún en forma detallada, aunque parece ser un fenómeno complejo que involucra diversos factores de virulencia. Al respecto, se ha demostrado la presencia de una enterotoxina en *S. Typhimurium* y *S. Typhi*, similar a la enterotoxina de *Vibrio cholerae* y a la toxina termolábil de *Escherichia coli*; no obstante, ya que ésta es producida en bajos niveles por las cepas de *Salmonella*, su rol en la patogénesis de la enfermedad ha sido cuestionado. Se cree que la invasión facilitaría la liberación de la toxina al interior de la célula hospedera, donde alcanzaría su blanco intracelular: la enzima adenilato ciclasa. La enterotoxina de *Salmonella* gatilla una respuesta secretoria asociada a un incremento en los niveles de AMP cíclico (AMPc) y Prostaglandina E<sub>2</sub> (Sears y Kaper, 1996). Aún cuando los niveles de AMPc se encuentran elevados en las células epiteliales infectadas, también es posible hallar niveles elevados de AMPc en la lámina propia del intestino infectado, asociados con la liberación de proteínas efectoras o con la estimulación de la adenilato ciclasa por prostaglandinas producidas durante la respuesta inflamatoria (Zhang *et al.*, 2003).

Actualmente se sabe que la proteína efectora SopB/SigD tiene actividad de inositol fosfato fosfatasa, por lo que genera una gran cantidad de fosfolípidos de inositol e inositol fosfato que participan en las vías de señalización y en los cambios del citoesqueleto; además, esta proteína se encuentra involucrada en la secreción de fluidos al extracelular, al estimular la secreción de cloro. *Salmonella* induce la migración de neutrófilos y macrófagos, y así la liberación de citoquinas proinflamatorias como IL8, GM-CSF, TNF $\alpha$  e IFN $\gamma$ , que reclutan células fagocíticas y están involucradas en el proceso diarreico; también se reconoce un factor

quimioatrayente, aún no caracterizado, conocido como PEEC (*“pathogen–elicited epithelial chemoattractant”*). La respuesta inflamatoria también conlleva a la liberación de prostaglandinas, incremento de la permeabilidad vascular, estimula la producción de AMPc y la secreción activa de sodio, cloro y líquidos que, en combinación con la pérdida de integridad de la mucosa intestinal, produce diarrea en el caso de la enteritis (Figueroa y Verdugo, 2005).

#### **IV. INFECCIÓN DE LOS HUEVOS**

La contaminación de los huevos por *S. Enteritidis* puede ser causada por la penetración a través de la cáscara desde las heces contaminadas, después o durante la oviposición, o bien por contaminación directa de la yema, albúmina, membranas de la cáscara o cáscara antes de la oviposición, debido a la colonización de los órganos reproductivos (De Buck *et al.*, 2004c).

##### **IV.1. Contaminación superficial y penetración a través de la cáscara**

Un amplio rango de serotipos ha sido recuperado desde la cáscara de los huevos, incluyendo *S. Enteritidis*, lo que representa una amenaza potencial a la salud pública, al igual que la contaminación del contenido de los huevos (De Louvois, 1993).

La contaminación superficial del huevo puede ser consecuencia de la infección del tracto reproductivo bajo o de contaminación fecal, siendo esta última poco frecuente, ya que durante la oviposición se produce la eversión de la vagina a través del tracto alimentario en aves sanas; además, la extensión del revestimiento cloacal crea una hendidura en el tracto alimentario, reduciendo la oportunidad de contaminación fecal de la cáscara (De Buck *et al.*, 2004c). El modo más probable de contaminación natural es el enfriamiento húmedo de los huevos recién ovipuestos, desde la temperatura corporal de la gallina a la temperatura ambiental, en presencia de contaminación fecal sobre la superficie de la cáscara (Cox *et al.*, 2000). Sin embargo, la contaminación fecal podría tomar lugar en el medio ambiente inmediatamente después de la oviposición, a través de los poros o trizaduras en la cáscara (De Buck *et al.*, 2004c). La gallina transporta elementos del suelo y heces al interior del nido, materiales que contienen diversos microorganismos incluyendo *Salmonella* spp. Así mismo, los huevos ovipuestos sobre la humedad, nidos sucios o sobre el suelo, presentan una mayor contaminación superficial (Cox *et*

*al.*, 2000). De este modo, los protocolos higiénicos aplicados en los galpones de aves y durante la manipulación de los huevos, se convierten en un factor crítico (De Buck *et al.*, 2004c).

No obstante, cabe destacar que el espectro de serotipos de *Salmonella* aislados desde la superficie del huevo no siempre coinciden con los aislados en su contenido, siendo estos últimos casi exclusivamente Enteritidis (De Buck *et al.*, 2004c). Por otra parte, Gast *et al.* (2005), no hallaron correlación entre la duración de la eliminación fecal de *Salmonella* y la frecuencia de contaminación de huevos.

Parece existir una significativa variabilidad en la penetración de *Salmonella* a través de la cáscara entre distintos huevos. La calidad de la cáscara (Sauter y Petersen, 1974), presencia de cutícula (Board y Halls, 1973), pH (Sauter *et al.*, 1977), número de poros, (Walden *et al.*, 1956), humedad (Gregory, 1948), temperatura y presión de vapor (Graves y Maclaury, 1962) son algunos de los factores que podrían afectar este parámetro.

La cutícula es la primera defensa contra la penetración bacteriana, no obstante, los primeros minutos tras la oviposición está húmeda e inmadura, siendo menos efectiva para prevenir la penetración bacteriana a través de la cáscara (Padron, 1990; Miyamoto *et al.*, 1998).

También se ha descrito que el enfriamiento natural de los huevos recién ovipuestos puede favorecer la penetración bacteriana a través de los poros. Fromm (1959) demostró que, cuando el huevo es ovipuesto en un ambiente más frío que la temperatura interna del ave, este desarrolla una presión negativa. Padron (1990) indicó que, con una temperatura ambiental de 24 °C, los huevos alcanzan esta temperatura dentro de 90 minutos, ocurriendo la mayor disminución de temperatura (3,5 °C) dentro de 10 minutos post oviposición. Sin embargo, se desconoce si este diferencial de temperatura sería suficiente para producir una presión negativa que lleve a la penetración bacteriana a través de los poros libres de cutícula.

Padron (1990) demostró la penetración de *S. Typhimurium* a través de la cáscara de huevos incubables, provenientes de reproductoras de 35 semanas de edad. Los huevos fueron expuestos durante 10 minutos, por medio de aspersión ( $2,5 \times 10^6$  células/mL) en su parte más ancha o por contacto directo con cama de nido contaminada ( $17 \times 10^6$  células/g). Los huevos fueron posteriormente desinfectados e incubados bajo condiciones normales durante 19 días.

Luego de este período, las membranas corioalantoideas y los sacos vitelinos fueron cultivados en caldo infusión cerebro–corazón. El aislamiento de la bacteria a partir de las membranas corioalantoideas y sacos vitelinos, respectivamente, fueron: 100 y 83% para el grupo aspersión, y 59 y 29% para grupo contacto. Estos resultados muestran que, aunque la humedad aumentó la penetración de *S. Typhimurium* a través de la cáscara, su presencia no es indispensable para que ésta ocurra, pudiendo suceder si los huevos toman contacto con superficies contaminadas. Además, se demostró que la penetración bacteriana puede ocurrir tan rápidamente, que ni la recolección frecuente ni la rápida sanitización de los huevos previene completamente la contaminación. Por lo tanto, para la obtención de huevos incubables libres de *Salmonella*, debería ponerse especial atención en el manejo y sanitización de los nidos.

Barrow y Lovell (1991) desafiaron gallinas con  $10^8$  UFC/dosis/ave de *S. Enteritidis* fagotipo 4 (PT4), por vía oral, logrando su reaislamiento en el 6% de los huevos enteros (cáscaras y contenido), pero sólo en el 0,3% cuando muestrearon sólo el contenido. Cabe destacar que en el 30% de las gallinas la bacteria logró colonizar el ovario, por lo cual, en base a la escasa cantidad de huevos contaminados internamente, los autores concluyeron que la contaminación sería principalmente resultado de la deposición de la bacteria sobre la cáscara.

Las membranas de la cáscara (interna y externa) ofrecen cierto grado de protección contra la penetración bacteriana, pero a pesar de este efecto protector varios estudios han demostrado una rápida y profunda penetración por parte de varias bacterias, incluyendo *Salmonella* (Cox *et al.*, 2000). Himathongkham *et al.* (1999) infectaron huevos mediante inmersión por 5 segundos en un cultivo con  $10^8$  UFC/mL de *S. Enteritidis*, siendo posteriormente incubados por 3 horas a 20 °C; tras la incubación, se logró aislar la bacteria en el 85% de las membranas de la cáscara. Así mismo, Williams *et al.* (1968) demostraron que la penetración de la cutícula y la cáscara por *Salmonella* ocurre casi inmediatamente en algunos huevos (6 minutos luego de la exposición de la cáscara), alcanzando las membranas.

#### **IV.2. Contaminación asociada al tracto reproductivo**

La mayoría de los investigadores coinciden en que la contaminación interna del huevo ocurre mayoritariamente como consecuencia de la infección sistémica de la gallina y la consiguiente colonización del ovario y el oviducto. Además, han observado la capacidad de



*S. Enteritidis* para adaptarse a los tejidos reproductivos, ya que una serie de pasajes *in vivo* en aves adultas y el posterior reaislamiento de la bacteria desde estos tejidos, resulta en una mayor eficacia del patógeno para contaminar los huevos (Gast *et al.*, 2003a). No obstante, cabe destacar que la habilidad de las distintas cepas de *S. Enteritidis* para invadir órganos como el hígado y el bazo, aunque indica una infección sistémica que podría alcanzar también a los órganos reproductivos, no siempre se correlaciona con la contaminación interna de los huevos (Gast y Beard, 1992b). Es más, la presencia de este patógeno en los tejidos reproductivos no es suficiente para garantizar la contaminación de los huevos a una alta frecuencia. Una característica común en la mayoría de los estudios de infección experimental ha sido la baja incidencia de contaminación de los huevos, aún cuando las aves han recibido altas dosis orales de *S. Enteritidis* (Keller *et al.*, 1995; Gast y Holt, 2001; Gast *et al.*, 2002).

La mayoría de los autores identifican a la albúmina como el compartimiento más frecuentemente contaminado por *S. Enteritidis* (Gast y Beard, 1990b; Shivaprasad *et al.*, 1990; Humphrey *et al.*, 1991; Gast y Beard, 1993), aunque estudios más recientes han detectado una mayor incidencia de infección en la yema (Gast y Holt, 2000; Gast *et al.*, 2002).

La contaminación de la yema sería resultado de la infección ovárica, mientras que la contaminación de la albúmina se llevaría a cabo durante el pasaje y formación del huevo en el oviducto. Ambos órganos reproductivos pueden ser infectados en forma independiente, al mismo tiempo o uno antes que el otro (De Buck *et al.*, 2004c). Por otra parte, la cáscara y sus membranas son producidas en el tracto reproductivo bajo, sitio que también puede ser colonizado por *S. Enteritidis* durante el desarrollo del huevo; al respecto, algunos estudios han mostrado a estos compartimentos como los sitios más frecuentemente infectados por la bacteria (Miyamoto *et al.*, 1997; Okamura *et al.*, 2001). Incluso, la localización sobre la superficie interna de la cáscara pone a la bacteria en una posición favorable, ya que la membrana interna retiene los factores antimicrobianos de la albúmina dentro del huevo (De Buck *et al.*, 2004c).

La infección sistémica de *S. Enteritidis* en gallinas de postura puede llevar a la colonización del ovario y/o el oviducto. Infecciones experimentales por vía oral han permitido el aislamiento de la bacteria desde las capas celulares circundantes a la yema en los folículos preovulatorios, lo cual sugiere que las capas celulares de la granulosa de los folículos podrían ser un sitio de colonización, preferido por cepas invasivas de *S. Enteritidis* para la infección del

ovario (Thiagarajan *et al.*, 1994). Por otra parte, la bacteria podría llegar por vía sanguínea a la membrana basal de las células de la teca, desde donde podría penetrarla y alcanzar la yema, después de invadir las células de la granulosa o migrando entre ellas, y atravesar la capa perivitelina, ya que la bacteria mostró ser capaz de penetrar la membrana vitelina y multiplicarse en la yema, tras ser depositada experimentalmente sobre yemas intactas (Gast y Holt, 2001).

La infección intravaginal tiende a ascender sólo a la parte baja del oviducto, pero puede causar la contaminación de los huevos en formación, tomando ésta lugar en el istmo, útero, vagina o cloaca, pero muy raramente en zonas altas del oviducto o los ovarios (Miyamoto *et al.*, 1997; Okamura *et al.*, 2001). Actualmente, está ampliamente aceptado que, antes de la oviposición, los huevos en formación pueden sufrir infección descendente desde los tejidos ováricos, infección ascendente desde la vagina y cloaca, e infección lateral desde los tejidos superiores del oviducto (Keller *et al.*, 1995).

La colonización del oviducto se ha logrado tras la infección experimental por vía oral, intravenosa, intravaginal, intracloacal y aspersion (Miyamoto *et al.*, 1997; Gast *et al.*, 2002). En todos estos estudios se obtuvieron huevos contaminados con *S. Enteritidis*, aunque existen contradicciones sobre la influencia de la vía de exposición en la frecuencia de contaminación de los huevos.

Además, los diferentes segmentos del oviducto podrían diferir en su susceptibilidad a la invasión y colonización de *S. Enteritidis*. La mayoría de los estudios apuntan hacia el istmo como la porción más frecuente y fuertemente contaminada, indicando esto que la bacteria se ha adaptado mejor a éste segmento del oviducto aviar (Keller *et al.*, 1995; Okamura *et al.*, 2001; De Buck *et al.*, 2004a).

Existe escasa información sobre los mecanismos de colonización de *Salmonella* en el oviducto de las gallinas de postura. Varios estudios han investigado el rol de la fimbria tipo 1 en la interacción de *S. Enteritidis* con el oviducto, destacando su papel en la adhesión a la superficie epitelial, así como también a las secreciones de las glándulas del istmo, las que constituyen las membranas de la cáscara; estas últimas, por lo tanto, podrían ser las vías de entrada de *S. Enteritidis* al huevo (De Buck *et al.*, 2004b). Por otra parte, se ha observado una asociación del serovar *Enteritidis* con las células glandulares tubulares del oviducto, tanto en

infecciones naturales como experimentales; esta infección no sólo implica la colonización del lumen glandular, sino también la presencia de la bacteria a nivel intracelular (Keller *et al.*, 1995; De Buck *et al.*, 2004a). *S. Enteritidis* ha sido identificada por estudios inmunohistoquímicos no sólo en la superficie y dentro del epitelio mucoso, sino también más profundamente en las células del estroma del oviducto de codornices japonesas post inoculación intraperitoneal (Takata *et al.*, 2003).

Keller *et al.* (1995) observaron una mayor tasa de contaminación en los huevos en formación, al compararlos con los huevos ovipuestos. Esto sugiere una mayor colonización de los huevos durante su desarrollo, disminuyendo posteriormente debido a factores presentes en el interior del huevo, tales como anticuerpos, enzimas antibacterianas, proteínas secuestradoras de hierro e inhibidores de proteasas bacterianas, controlando al patógeno incluso antes que el huevo sea ovipuesto.

Las gallinas ponen huevos contaminados en forma intermitente, posiblemente debido a la reaparición ocasional de la bacteria desde los tejidos infectados hacia el lumen del oviducto (Keller *et al.*, 1995). La salida de la bacteria al lumen podría ser inducida por estrés, variaciones hormonales y fluctuaciones en la protección inmunológica, entre otros factores; de igual manera se ha demostrado que el estrés inducido en la pelecha forzada causa una mayor eliminación fecal de *S. Enteritidis* (Holt, 1993; Holt y Gast, 2002; Holt, 2003; Moore y Holt, 2006).

Hasta la fecha, no está claro por qué *S. Enteritidis* es el serotipo predominante asociado con gallinas de postura y con huevos, aunque varias hipótesis han sido formuladas. Una explicación posible es que *S. Enteritidis* tendría un mayor tropismo y afinidad por los órganos reproductivos de la gallina respecto a otros serovares (Okamura *et al.*, 2001). Por otra parte, los serovares de *Salmonella* spp. menos agresivos en el tracto reproductivo podrían tener una ventaja sobre otros más agresivos para lograr contaminar los huevos, al no causar lesiones patológicas groseras y, por lo tanto, no afectar la capacidad reproductiva del ave; de este modo, *S. Enteritidis* sería la causa de la pandemia humana de salmonelosis asociada a los alimentos, en parte, por tener la capacidad única de contaminar los huevos sin causar enfermedad aparente en las aves afectadas (Hassan y Curtiss, 1997; Guard-Petter, 2001).

Otra causa posible para la asociación entre los huevos y *S. Enteritidis*, sería la presencia de factores de virulencia en este serovar que aumenten sus posibilidades para alcanzar el ovario o el oviducto durante el curso de la infección; gracias a esto, es posible que *S. Enteritidis* prolongue la fase bacterémica de la infección, o quizá cause septicemia en repetidas ocasiones a causa de la propagación desde los órganos colonizados, tales como el bazo, hacia los órganos reproductivos, tal como se ha descrito para *S. Pullorum* (Wigley *et al.*, 2001). De forma aún más probable, *S. Enteritidis* posee un complejo único de factores de virulencia relacionados con la contaminación del huevo, o posee una regulación única de los mecanismos de virulencia conocidos. Al respecto, se han realizado varias sugerencias sobre la expresión de la fimbria tipo 1 (De Buck *et al.*, 2004b) o la composición del lipopolisacárido (LPS); en relación a este último, la presencia de LPS de alto peso molecular (HMM-LPS) ha sido correlacionado con la contaminación de los huevos, aunque no se conoce si este HMM-LPS interactúa directamente con el tejido reproductivo o los huevos en formación (Guard-Petter, 2001). Por otra parte, Lu *et al.* (2003) sugirieron el rol de un gen de la bacteria sobre la reparación del DNA bacteriano dañado por los factores antimicrobianos de la albúmina y, por tanto, la ventaja de *S. Enteritidis* para sobrevivir en los huevos.

Además, las distintas cepas de *S. Enteritidis* pueden diferir considerablemente en su capacidad para contaminar huevos. Ciertos atributos fenotípicos, tales como la producción de HMM-LPS y el crecimiento a altas densidades celulares, especialmente cuando ambos atributos son expresados conjuntamente por diferentes subpoblaciones bacterianas, se han vinculado con la contaminación de huevos por cepas de *S. Enteritidis* (Guard-Petter, 2001).

## **V. MEDIDAS APLICADAS PARA EL CONTROL DE *S. Enteritidis* EN AVÍCULTURA**

Para el control de *S. Enteritidis*, la industria avícola ha considerado distintas estrategias, entre ellas: uso de vacunas atenuadas e inactivadas, control de la colonización gastrointestinal (prebióticos y probióticos), medidas de bioseguridad y antimicrobianos (Gast, 2007).

### **V.1. Vacunas**

La respuesta inmune de los lotes de aves reduce la duración y la severidad de las infecciones por *Salmonella* y ayuda a prevenir la reinfección. Esta respuesta es la base de los

esfuerzos realizados para proteger a las aves contra la infección mediante la vacunación y la detección serológica de los lotes positivos. Infecciones experimentales en pollos han logrado producir altas tasas de anticuerpos dentro de una semana post inoculación, y la positividad serológica puede persistir por todo un año (Skov *et al.*, 2002). Aunque ha sido menos estudiada, la inmunidad celular también puede ser observada en las aves infectadas con *Salmonella*. Los heterófilos de los pollos y pavos son fuertemente fagocíticos y bactericidas contra *Salmonella*, y pueden restringir la invasión sistémica durante los primeros estados de la infección (Kogut *et al.*, 1994). Así mismo, se ha correlacionado la disminución en el aislamiento de *S. Enteritidis* desde los tejidos reproductivos de gallinas ponedoras, con la proliferación de linfocitos T y B. También se han registrado diferencias entre distintas líneas genéticas de pollos infectados con *S. Enteritidis*, en la frecuencia de eliminación fecal, invasión sistémica y contaminación de los huevos, donde los mecanismos inmunes innatos y adaptativos han sido propuestos para explicar estas diferencias de susceptibilidad a *Salmonella* (Withanage *et al.*, 2003).

Las distintas vacunas aplicadas contra *Salmonella* han demostrado una significativa protección, sin embargo, ninguna ha sido consistentemente hábil para prevenir la infección en forma completa, especialmente contra altas dosis bacterianas (Gast, 2007). La vacunación con cepas inactivadas y atenuadas tiene una larga historia de aplicación, para la reducción de la susceptibilidad de los lotes de aves a las infecciones por *Salmonella* y, por lo tanto, proteger a los consumidores humanos contra la transmisión alimentaria de la enfermedad. La vacunación de lotes de aves ponedoras se ha asociado a una menor frecuencia de contaminación de los huevos, aún cuando el ambiente de las aves permanece contaminado con *Salmonella* (Davies y Breslin, 2004).

Una limitación de las vacunas muertas es su incapacidad para reproducir efectivamente una respuesta inmune celular protectora, quizá debido a los efectos deletéreos sobre los antígenos protectivos durante los tratamientos de inactivación. Una protección de alta eficacia y duración ha sido a menudo atribuida a vacunas vivas contra *Salmonella*, posiblemente como resultado de la mayor persistencia en la presentación de antígenos relevantes al sistema inmune del hospedero (Gast, 2007).

La emergencia de *S. Enteritidis* como un problema mayor en salud pública en las últimas dos décadas, ha estimulado un renovado interés en el uso de vacunas muertas en los lotes de

aves. Bacterinas con adyuvantes, administradas por vía subcutánea o intramuscular, han sido asociadas con una significativa reducción en el aislamiento de *S. Enteritidis* desde heces, tejidos internos y huevos de gallinas oralmente expuestas a la bacteria, y a menor mortalidad, lesiones y signos clínicos después de una exposición intravenosa (Gast *et al.*, 1992a).

Un obstáculo en el desarrollo de vacunas contra *Salmonella* es la variedad de serotipos y cepas existentes. Ya que la vacunación depende fuertemente de antígenos específicos, es imperativo que los futuros estudios sean diseñados a fin de encontrar algún grado de protección cruzada entre las diferentes salmonelas de importancia epidemiológica (Boyle *et al.*, 2007).

## **V.2. Control de la colonización gastrointestinal**

La habilidad de la microflora bacteriana del tracto gastrointestinal para inhibir la colonización de patógenos entéricos, tales como *Salmonella*, ha sido aplicada para el desarrollo de un diverso grupo de tratamientos, descritos colectivamente como “control de la colonización gastrointestinal”. Estos tratamientos involucran la administración de cultivos bacterianos, definidos o indefinidos, para disminuir la colonización gastrointestinal de organismos patógenos, y son denominados genéricamente como probióticos. El mecanismo por el cual estos cultivos ejercen su efecto protector es a menudo caracterizado como exclusión competitiva (EC). Además, también se han aprovechado manipulaciones no microbianas de la bioquímica gastrointestinal para lograr el control de la colonización bacteriana (Gast, 2007).

El contenido intestinal de aves maduras y cultivos anaerobios indefinidos derivados de este material, han sido utilizados para proveer protección contra la colonización gastrointestinal y la subsiguiente invasión hacia tejidos internos por *Salmonella* en pollos y pavos, así también llevando a eventuales reducciones en la frecuencia de contaminación de las carcasas. Aunque la mayoría de los productos o tratamientos efectivos de EC han sido derivados de materiales indefinidos, presentes en la flora intestinal madura de aves adultas, las mezclas definidas de microorganismos también han sido extensamente investigadas. Dentro de las ventajas atribuidas al tratamiento con cultivos definidos de EC, se incluyen una mayor consistencia en los resultados obtenidos y una mayor garantía de seguridad, respecto a las mezclas que contienen surtidos inespecíficos de microorganismos (Gast, 2007).

Los esfuerzos para determinar cual constituyente específico de las mezclas bacterianas es responsable de la protección observada contra la colonización gastrointestinal de agentes patógenos, ha identificado una variedad de candidatos, incluyendo *Lactobacillus* spp., *Bifidobacterium* spp., *Escherichia coli* (*E. coli*), *Bacillus subtilis* y *Streptococcus cristatus* (Gast, 2007). Miyamoto *et al.* (2000) evaluaron la presencia de *Lactobacillus* en la cloaca y vagina de gallinas ponedoras y su efecto inhibitorio sobre el crecimiento de *S. Enteritidis* *in vitro*. La evaluación de 40 gallinas ponedoras arrojó un recuento promedio total de *Lactobacillus* en la cloaca y vagina de 5,5 y 2,5 log<sub>10</sub> UFC/g, respectivamente. En el ensayo de inhibición *in vitro*, todas las cepas de *Lactobacillus* aisladas desde el contenido cloacal y mucus vaginal de las aves en estudio inhibieron el crecimiento de *S. Enteritidis*. Estos resultados sugieren que los lactobacilos presentes en la cloaca y vagina de las gallinas, al igual que en el tracto digestivo, pueden tener un efecto protector en estos sectores contra la colonización de *S. Enteritidis*.

La capacidad de los cultivos de EC para controlar la colonización de patógenos, puede ser debida a la interferencia directa en la unión de las bacterias patógenas al epitelio intestinal y, en forma indirecta, a la inhibición de su crecimiento, debido a la disminución del pH intestinal asociada al incremento en los niveles de ácidos grasos volátiles no disociados, competencia por los nutrientes disponibles y producción de bacteriocinas con propiedades antimicrobianas (Rosales, 2005).

Varios aditivos alimenticios, conocidos genéricamente como prebióticos, han sido evaluados por su capacidad de modificar la bioquímica intestinal, debido a la inhibición de la colonización patógena y al apoyar el crecimiento de la microflora protectora. La adición de carbohidratos complejos (tales como lactosa, manosa y fructooligosacáridos) al alimento o al agua de bebida, ha mostrado reducir la colonización de *Salmonella* a nivel del buche e intestino de pollos. La suplementación alimenticia con ácido fórmico, propiónico o caproico, clorato, ácido láctico o sucrosa, también ha brindado protección contra la colonización de *Salmonella* a nivel del buche (Hinton *et al.*, 2002; Byrd *et al.*, 2003; Gast, 2007).

### **V.3. Medidas de bioseguridad**

La mayoría de los factores de riesgo identificados en la infección de los lotes de aves con *Salmonella*, así como sus respectivas prácticas de reducción, son relativamente serotipo-

independientes. Además, algunas de estas prácticas también son aplicables para reducir el riesgo de infección de otros potenciales patógenos; así, varias recomendaciones específicas para el control de *S. Enteritidis*, son comunes en casi todos los programas de control de *Salmonella* spp. actualmente aplicados (Gast, 2007):

1. Las aves y los huevos incubables deben ser obtenidos sólo desde planteles reproductores libres de *Salmonella*.
2. Los huevos incubables deben ser apropiadamente desinfectados e incubados bajo estrictas condiciones de higiene.
3. Los planteles deben ser profundamente limpiados y desinfectados entre los distintos lotes de aves, utilizando productos y procedimientos certificados.
4. Deben incorporarse medidas de control de vectores biológicos y mecánicos, tales como roedores y artrópodos, al diseño y manejo de los planteles, las cuales deben ser monitoreadas y registradas periódicamente.
5. Debe restringirse en forma rigurosa el movimiento de personas y equipos, entre los diversos locales de un plantel y entre planteles avícolas.
6. El alimento debe ser peletizado o no contener proteínas de origen animal.
7. El agua debe provenir desde fuentes tratadas, para garantizar su pureza microbiológica.

La principal ventaja de las prácticas de reducción de riesgo es que se dirigen a las reales causas de la infección de los lotes de aves por *Salmonella*, en vez de limitarse a identificar lotes infectados o hacerlos menos susceptibles a la infección. En este contexto, la reducción de riesgos es más proactiva y menos reactiva respecto a las otras opciones de control disponibles.

La mayor deficiencia de este enfoque es que ofrece efectos a largo plazo para el control de *Salmonella* y, por lo tanto, no ofrece respuestas rápidas frente a problemas serios con consecuencias a corto plazo en salud pública. Además, la implementación de mejoras importantes en las medidas de bioseguridad probablemente sean de alto costo y difíciles de mantener en el tiempo. Todo esto, hace necesaria la búsqueda de soluciones costo–efectivas para prevenir la infección de *Salmonella* en los planteles avícolas (Atterbury, 2006).



#### V.4. Antimicrobianos

El sector avícola por mucho tiempo ha recurrido al uso de antimicrobianos para prevenir las infecciones bacterianas y promover el crecimiento de las aves, práctica que ha sido severamente criticada, ya que puede aumentar los problemas en salud pública por el incremento de cepas bacterianas resistentes a los antibióticos (Ruiz *et al.*, 2006).

Una de las drogas antimicrobianas más efectivas para el control de *Salmonella* es el Enrofloxacin, antibiótico relativamente nuevo perteneciente a la familia de las fluoroquinolonas. No obstante su eficacia, en muchos países se ha encontrado una alta proporción de cepas de *Salmonella* spp. con resistencia múltiple a los antibióticos, incluyendo el Enrofloxacin y otros antimicrobianos similares (Ruiz *et al.*, 2006).

Al respecto, San Martín *et al.* (2005) aislaron 94 cepas de *Salmonella* a partir de 30 planteles avícolas de la zona central de Chile (pollos broiler y aves de postura), obteniendo 39 cepas resistentes a antimicrobianos de las familias de las quinolonas y fluoroquinolonas (Flumequina, Ácido Nalidíxico y Ácido Oxolínico), siendo *S. Heilderberg* y *S. Enteritidis* los serotipos mayormente aislados.

Briceño *et al.* (2007) estudiaron patrones de resistencia y multiresistencia en un total de 146 cepas de *Salmonella* spp. aisladas desde una planta procesadora de aves de consumo en el estado de Zulia, Venezuela, a partir de muestras animales y ambientales. Los resultados revelaron alta resistencia para Ácido Nalidíxico (73,3%), Nitrofurantoína (60,2%), Tetraciclinas (56,2%), Oxitetraciclinas (54,8%), Trimetoprim (54,1%) y menor resistencia a Enrofloxacin (6,2%), Ciprofloxacino (2,7%), Neomicina (2,0%) y Cloranfenicol (2,5%). Además, se encontró un elevado porcentaje de multiresistencia (65,0%), siendo los más notorios para Ácido Nalidíxico–Nitrofurantoína–Tetraciclinas–Trimetoprim (42,1%), Ácido Nalidíxico–Nitrofurantoína–Trimetoprim (26,3%) y Ácido Nalidíxico–Nitrofurantoína–Tetraciclinas (10,5%).

La utilización de las estrategias mencionadas, en forma individual o en asociación, no han logrado el éxito esperado y, por lo tanto, el control y prevención de *Salmonella* actualmente enfrenta grandes desafíos. Sumado a lo anterior, la emergencia de cepas resistentes a los agentes antimicrobianos disponibles ha llegado a ser un alarmante problema de la medicina

moderna, lo que ha llevado al desarrollo de métodos alternativos para enfrentar las infecciones bacterianas. Al respecto, los investigadores han vuelto a interesarse en el uso de bacteriófagos, descubiertos y utilizados previo al desarrollo de los antimicrobianos (Sulakvelidze *et al.*, 2001).

## **VI. BACTERIÓFAGOS**

### **VI.1. Generalidades**

Los bacteriófagos son virus que invaden células procariotas y producen su lisis, siendo ésta la base de su aplicación para el biocontrol de patógenos bacterianos. Su descubrimiento ha sido objeto de variadas controversias, aunque actualmente se acepta que sus características fueron independientemente descritas por Frederick Twort en 1915 y Félix d'Herelle en 1917 (Summers, 2001).

Los bacteriófagos son altamente ubicuos, ocupando todos los ecosistemas donde las bacterias logran desarrollarse con éxito, siendo aislados desde ambientes acuáticos superficiales y profundos, suelos, cavidad oral, sangre e intestino de animales y seres humanos sanos (Sulakvelidze *et al.*, 2001); estimaciones de frecuencia indican que por cada célula bacteriana existen aproximadamente diez partículas fágicas. Algunos bacteriófagos son altamente específicos, atacando sólo determinadas cepas bacterianas, mientras que otros son bastante amplios en su rango de hospederos (Skurnik y Strauch, 2006).

La taxonomía de estos virus se basa en características morfológicas, como forma y tamaño, y moleculares, como las características de sus ácidos nucleicos. Al menos 4.950 fagos (96%) poseen cola, constituyendo el orden Caudovirales, y las tres familias Siphoviridae, Myoviridae y Podoviridae; los fagos poliédricos, filamentosos y pleomórficos constituyen menos del 4% de estos virus (Dabrowska *et al.*, 2005). Sus ácidos nucleicos pueden ser DNA o RNA, de hebra simple o doble, siendo en la mayoría DNA de hebra doble (Skurnik y Strauch, 2006).

En ambientes fluidos, como caldos de cultivo o sangre, la mezcla y difusión de los fagos es relativamente expedita. En contraste, la viscosidad del contenido intestinal ha mostrado reducir la probabilidad de colisiones entre bacterias y bacteriófagos, por lo cual sería necesario utilizar concentraciones más altas de fagos respecto a las bacterias para lograr una fagoterapia

oral eficaz. Adicionalmente, el gran número de bacterias presentes en ciertos segmentos del tracto intestinal podría no sólo ser una barrera mecánica para la difusión de los bacteriófagos, ya que algunas de ellas podrían exhibir uniones inespecíficas con los fagos (Joerger, 2003).

Los bacteriófagos son generalmente muy estables y sobreviven relativamente bien diversas condiciones de almacenamiento, incluso cuando son adsorbidos a partículas sólidas. Por ejemplo, un título inicial de bacteriófagos contra *Salmonella* de  $10^9$  unidades formadoras de placas líticas (UFP)/g, mezclados con alimento peletizado para aves, disminuyó en sólo  $2 \log_{10}$  UFP/g cuando el alimento fue almacenado por más de 14 días a 37 °C (Sklar y Joerger, 2001).

Se ha demostrado que los bacteriófagos no logran sobrevivir a pH 2,0 y su número disminuye entre pH 3,0 y 7,0. No obstante, la sensibilidad de cada fago a rangos bajos de pH depende de cada especie. Aunque algunos bacteriófagos han demostrado ser relativamente resistentes *in vivo* e *in vitro* al pH ácido, para otros la neutralización del pH gástrico ácido sería esencial para su sobrevivencia luego de ser administrados por vía oral (Dabrowska *et al.*, 2005).

Por otra parte, el sistema inmune del hospedero también responde a la presencia de bacteriófagos y bacterias en el organismo, logrando reducir sus títulos. Levin y Bull (2004) sugirieron que la fagoterapia sólo necesita disminuir el número de bacterias a un nivel donde las defensas del propio hospedero puedan ocuparse de las bacterias restantes. Ellos también indicaron que es difícil comprender el por qué algunos fagos que replican bien en una bacteria blanco, fallan cuando son usados en forma terapéutica. La comprensión de estos fenómenos requiere una apreciación cuantitativa de las dinámicas del ciclo fágico, especialmente *in vivo*.

Sobre los mecanismos moleculares de infección, los bacteriófagos pueden seguir destinos diferentes. Los “bacteriófagos líticos” siguen el ciclo infectivo lítico, donde se multiplican en la célula bacteriana y alteran su metabolismo, produciendo la lisis al final del ciclo, para liberar las partículas fágicas formadas. Por otra parte, los “bacteriófagos lisogénicos o templados” utilizan la vía lisogénica, donde el genoma fágico se integra y replica como parte del genoma hospedero, permaneciendo en estado de latencia por extensos períodos de tiempo; si la bacteria hospedera encuentra condiciones ambientales adversas, el profago puede activarse y retomar el ciclo lítico, al final del cual las partículas fágicas recién formadas son liberadas tras la lisis bacteriana (Skurnik y Strauch, 2006).

Las siguientes fases pueden ser distinguidas en el desarrollo de un ciclo fágico lítico (Skurnik y Strauch, 2006):

1. Adsorción del bacteriófago sobre la célula bacteriana a través de receptores específicos. Para este propósito, los fagos pueden valerse de cápsulas bacterianas, diferentes partes del LPS, flagelos, fimbrias y algunas otras proteínas de superficie.
2. Inyección del genoma fágico al interior de la bacteria hospedera.
3. Expresión de genes fágicos tempranos y síntesis de proteínas tempranas, involucradas en la intervención de los sistemas enzimáticos bacterianos y la replicación del genoma fágico.
4. Replicación del genoma fágico.
5. Expresión de proteínas fágicas tardías, involucradas en la formación de nuevas partículas virales y en la lisis de la bacteria hospedera.
6. Ensamblaje de las cabezas y colas fágicas, y compactación del genoma viral.
7. Lisis de la bacteria hospedera y liberación de la nueva progenie fágica.

La habilidad de los bacteriófagos para destruir las bacterias al final del ciclo lítico, es la base teórica para su utilización como agentes terapéuticos en modelos animales y como biocontroladores en la industria alimenticia. Su empleo en estos ámbitos se apoya también en un conjunto de ventajas ofrecidas, entre las cuales se incluyen (Sulakvelidze *et al.*, 2001):

1. Elevada especificidad de hospedero, disminuyendo las probabilidades de generar disbiosis, es decir, desbalances de la microflora bacteriana normal.
2. Replicación en el sitio de infección, lo que permite su presencia en los momentos más necesarios de la infección.
3. Inocuidad clínica en organismos mayores. Los bacteriófagos han sido administrados por vía oral, rectal, dérmica, aerosol y parenteral (intramuscular, intravenosa e intraperitoneal), tanto en animales como seres humanos, sin registrarse efectos nocivos en ellos. Cabe destacar que los efectos secundarios descritos durante los primeros años de investigación, fueron debidos a la presencia de contaminantes y endotoxinas bacterianas, producto de las insuficientes técnicas de purificación de las suspensiones fágicas.
4. Escasas posibilidades de generar resistencia bacteriana, situación que puede ser reducida aún más con la aplicación de varios fagos (“cocktail”) en forma simultánea.
5. Su selección y multiplicación son procesos relativamente sencillos, rápidos y de bajo costo.

## VI.2. Uso de bacteriófagos en la industria de alimentos

Los bacteriófagos han sido aislados desde una gran variedad de alimentos y procesos asociados, incluyendo la fermentación de pepinos, fermentación de salame, hojas de lechuga, cangrejos refrigerados y congelados, carne de vacuno y de cerdo, ostras, mejillones, setas, tartas, masa de galletas y pan, pollo y pavo crudos y asados, leche, queso, yogurt y mantequilla (Hudson *et al.*, 2005; Hagens y Loessner, 2007).

La presencia de bacteriófagos en los alimentos ha sido ampliamente estudiada como indicadora de patógenos bacterianos, ya que revelan que la bacteria hospedera está también presente o lo estuvo pero ha sido inactivada durante el procesamiento. Así, por ejemplo, la presencia de “colifagos” (cuyo hospedero es *E. coli*) podría ser indeseable en algunos alimentos, pero no inesperada en otros como la carne cruda. Por esta razón, se ha propuesto el uso de los fagos como indicadores de calidad higiénica en los alimentos (Hudson *et al.*, 2005).

Los bacteriófagos también han sido estudiados por su rol biocontrolador contra diversos patógenos causantes de enfermedades transmitidas por los alimentos (ETAs), tales como *Listeria monocytogenes* (*L. monocytogenes*) (Leverentz *et al.*, 2003), *Campylobacter* spp. (Atterbury *et al.*, 2003; Bigwood *et al.*, 2008), *E. coli* (O’Flynn *et al.*, 2004) y *Salmonella* spp. (Leverentz *et al.*, 2001; Modi *et al.*, 2001; Whichard *et al.*, 2003; Fiorentin *et al.*, 2005a; Higgins *et al.*, 2005), en alimentos de origen vegetal y animal.

Tal vez el camino más lógico para el empleo de bacteriófagos como agentes biocontroladores es su aplicación directa sobre los alimentos. Ya que algunos alimentos son distribuidos bajo condiciones de refrigeración y la mayoría de los patógenos alimentarios no se desarrollan bajo estas condiciones, es importante determinar si los fagos pueden destruir a sus hospederos en alimentos refrigerados (aproximadamente a 4 °C). Otras consideraciones relacionadas a la relación fago–hospedero incluyen el efecto de la presencia de organismos no hospederos, la influencia del pH y otras propiedades fisicoquímicas de los alimentos, actividad sobre un substrato sólido o “*biofilm*”, la emergencia de bacterias mutantes resistentes y el número relativo de fagos y hospederos requeridos para permitir la replicación (Hudson *et al.*, 2005).

Atterbury *et al.* (2003) evaluaron el efecto del bacteriófago  $\Phi 2$  contra *Campylobacter jejuni* (*C. jejuni*) en piel de pollo, a temperatura de refrigeración y congelación. Para esto, secciones de piel de 2 cm<sup>2</sup> fueron inoculadas con 10<sup>6</sup> UFC/dosis de *C. jejuni* y 10<sup>7</sup> UFP/dosis del fago, siendo posteriormente incubadas a 4 y -20 °C. Una hora post inoculación, el recuento promedio inicial de *C. jejuni* fue de 5,4 log<sub>10</sub> UFC/sección en ambos ensayos. Diez días post inoculación, las muestras incubadas a 4 °C mostraron una significativa reducción en el recuento bacteriano promedio, alcanzando 5,1 log<sub>10</sub> UFC/sección. Además, a -20 °C las reducciones fueron aún mayores, alcanzando un recuento promedio de 4,2 log<sub>10</sub> UFC/sección.

Recientemente, Bigwood *et al.* (2008) aplicaron bacteriófagos contra *C. jejuni* a una multiplicidad de infección (MOI: relación numérica entre bacteriófagos y bacterias inoculados) baja (10<sup>1</sup> UFP) o alta (10<sup>4</sup> UFP), en carne de vacuno experimentalmente contaminada a concentraciones bacterianas bajas (menores a 10<sup>2</sup> UFC/cm<sup>2</sup>) o altas (10<sup>4</sup> UFC/cm<sup>2</sup>), incubándola posteriormente a 5 y 24 °C. La disminución de los recuentos bacterianos fue variable, dependiendo de las condiciones de incubación y preparación de la carne, lográndose reducciones de 2–3 log<sub>10</sub> UFC/cm<sup>2</sup> a 5 °C y mayores a 5,9 log<sub>10</sub> UFC/cm<sup>2</sup> a 24 °C.

Leverentz *et al.* (2003) demostraron el efecto biocontrolador de bacteriófagos específicos contra *L. monocytogenes* sobre cortes frescos de melón y manzana. Luego de 7 días post infección, la población de *L. monocytogenes* disminuyó en 2,0–4,6 log<sub>10</sub> UFC/muestra en los cortes de melón, mientras que en las rebanadas de manzana la reducción fue menor a 0,4 log<sub>10</sub> UFC/muestra. Además, al combinar la fagoterapia con nisina (bacteriocina antimicrobiana utilizada como aditivo alimenticio), se logró reducir la población de *L. monocytogenes* sobre 5,7 log<sub>10</sub> UFC/muestra en los cortes de melón y sobre 2,3 log<sub>10</sub> UFC/muestra en los rebanadas de manzana. Además, los títulos de los fagos se mantuvieron estables sobre los cortes de melón, mientras que disminuyeron rápidamente a niveles indetectables en las rebanadas de manzana.

Recientemente, Guenther *et al.* (2009) evaluaron 2 bacteriófagos de amplio espectro de hospedero para el biocontrol de *L. monocytogenes*, sobre una amplia gama de alimentos de consumo directo frecuentemente asociados a esta bacteria. Los alimentos fueron infectados con *L. monocytogenes* (dosis de 10<sup>3</sup> UFC/g) y luego tratados con bacteriófagos (dosis de 3 x 10<sup>6</sup> a 3 x 10<sup>8</sup> UFP/g), siendo posteriormente almacenados a 6 °C por 6 días. En alimentos líquidos (tales como leche chocolateada y salmuera de queso Mozzarella) los recuentos bacterianos

disminuyeron rápidamente a niveles indetectables. Así mismo, en alimentos sólidos (tales como “*hot dogs*”, rebanadas de pavo, salmón ahumado, mariscos, hojas de repollo y hojas de lechuga) los recuentos bacterianos disminuyeron sobre  $5 \log_{10}$  UFC/g. Además, en los alimentos de origen animal los bacteriófagos mantuvieron sus títulos estables durante la mayor parte del período de almacenamiento, mientras que en los alimentos de origen vegetal sus títulos disminuyeron en más de  $1 \log_{10}$  UFC/g.

Modi *et al.* (2001) evaluaron el efecto de los bacteriófagos sobre la sobrevivencia de *S. Enteritidis* en la producción y almacenaje de queso Cheddar. Para ello, muestras de leche cruda y pasteurizada fueron inoculadas con *S. Enteritidis* (para contener  $10^4$  UFC/mL) y con bacteriófagos (para contener  $10^8$  UFP/mL), determinando el recuento de ambos durante todo el proceso. En los quesos resultantes de ambas leches, la población bacteriana aumentó en alrededor de  $1 \log_{10}$  UFC/g cuando la leche no recibió bacteriófagos, mientras que disminuyó en  $1-2 \log_{10}$  UFC/g cuando la leche recibió fagos. Además, tras 89 días de maduración, el recuento bacteriano disminuyó cerca de  $2 \log_{10}$  UFC/g en ausencia de bacteriófagos, mientras que en presencia de ellos la bacteria disminuyó a niveles indetectables en el queso de leche pasteurizada, aunque permaneció cercana a  $10^2$  UFC/g en el queso de leche cruda. *Salmonella* sobrevivió en los quesos de leche cruda y pasteurizada sin bacteriófagos, alcanzando una concentración aproximada de  $10^3$  UFC/g a los 99 días de maduración a  $8^\circ\text{C}$ .

Leverentz *et al.* (2001) estudiaron el efecto biocontrolador de los bacteriófagos contra *S. Enteritidis*, sobre cortes de melón y manzana a  $5$ ,  $10$  y  $20^\circ\text{C}$ . Tras 168 horas de incubación, los bacteriófagos retardaron el crecimiento bacteriano en las muestras de melón a  $10$  y  $20^\circ\text{C}$ , con recuentos finales  $1-2 \log_{10}$  UFC/muestra menos, respecto a las muestras no tratadas. A  $5^\circ\text{C}$ , por debajo de la temperatura de crecimiento mínima para *Salmonella*, el recuento bacteriano disminuyó gradualmente en presencia y ausencia de bacteriófagos. No hubo diferencias significativas entre las muestras de manzana tratadas y no tratadas, y el título de bacteriófagos disminuyó rápidamente a niveles indetectables dentro de 24 a 48 horas. Resultados similares fueron obtenidos por estos autores al evaluar el efecto de los bacteriófagos contra *L. monocytogenes* sobre rebanadas de manzana, sugiriendo el menor pH de este sustrato como el factor más lógico para explicar la poca eficacia de los bacteriófagos en ambos estudios (Leverentz *et al.*, 2003).

Whichard *et al.* (2003) evaluaron el efecto del bacteriófago Felix O1 y una variante de éste, sobre el crecimiento de *S. Typhimurium* DT104 en salchichas de pollo. Los fagos fueron aplicados a una dosis de  $1,9 \times 10^4$  UFP en 10 g de salchichas, previamente contaminadas con *Salmonella* a una dosis de  $3 \times 10^2$  UFC/g. Tras 24 horas de incubación a 22 °C, las muestras no tratadas mostraron un recuento bacteriano promedio de  $6,81 \log_{10}$  UFC/g, mientras que las muestras tratadas con el bacteriófago y su variante, mostraron recuentos de 5,01 y 4,78  $\log_{10}$  UFC/g, respectivamente.

Fiorentin *et al.* (2005a) evaluaron la actividad de 3 bacteriófagos líticos nativos contra *S. Enteritidis* sobre piel de pollo. Para esto, los autores contaminaron las muestras de piel mediante la inmersión de piernas de pollo completas en una suspensión con  $10^6$  UFC/mL de *S. Enteritidis* PT4. Un día después, las muestras de un grupo fueron inmersas en una suspensión con  $10^9$  UFP/mL de cada fago, almacenando luego las muestras a 5 °C. Los recuentos bacterianos a los 3, 6 y 9 días post tratamiento fueron significativamente menores en las muestras tratadas con fagos, respecto al grupo no tratado, mostrando una disminución de 4,49 veces al día 9 post tratamiento.

Higgins *et al.* (2005) inocularon carcasas de pollo con 20–31 UFC/dosis de *S. Enteritidis* sobre la pechuga, las que posteriormente fueron tratadas por aspersion con distintas dosis del bacteriófago PHL4 y enjuagadas para el enriquecimiento bacteriano. Se observó que en las carcasas inoculadas con 31 UFC/dosis de *S. Enteritidis* y tratadas con  $5,5 \times 10^{10}$  UFP/dosis del bacteriófago, la frecuencia de aislamiento bacteriano fue un 85% menor, respecto al grupo no tratado. De igual forma, en las carcasas inoculadas con 20 UFC/dosis de *S. Enteritidis*, la misma dosis de bacteriófagos logró reducir la frecuencia de aislamiento bacteriano en un 93%. Durante el mismo estudio, los autores enjuagaron carcasas comerciales de pavo positivas a *Salmonella*, con una mezcla de 72 bacteriófagos líticos contra *S. Enteritidis*, disminuyendo entre un 50–60% la frecuencia de aislamiento bacteriano, respecto a las carcasas no tratadas.

Gracias a los buenos resultados obtenidos mediante el uso de bacteriófagos líticos como biocontroladores en la industria alimenticia, la “*Food and Drug Administration*” (FDA) y el “*United States Department of Agriculture*” (USDA) aprobaron en agosto del 2006 el uso de una mezcla comercial de 6 fagos líticos, efectivos contra 170 cepas de *L. monocytogenes*, como aditivo alimenticio para productos cárnicos de consumo directo y subproductos avícolas (FDA, 2006).



### VI.3. Fagoterapia en modelos animales

El renovado interés en la fagoterapia reapareció con la emergencia de cepas bacterianas altamente resistentes a prácticamente todos los agentes antimicrobianos disponibles. Aún cuando, tras su hallazgo, los fagos fueron exitosamente aplicados en el tratamiento de infecciones bacterianas, el descubrimiento, aplicación y éxito de los antibióticos mermó las investigaciones sobre las potencialidades de la fagoterapia, permaneciendo sólo unos pocos centros de investigación dedicados a esta área durante las últimas décadas. No obstante, a pesar de los prometedores resultados obtenidos en estos estudios, la terapia con bacteriófagos aún es considerada controversial (Dabrowska *et al.*, 2005).

Según Skurnik y Strauch (2006), antes de intentar la aplicación de la fagoterapia, deben considerarse ciertos prerequisites:

1. No debe intentarse la aplicación de la fagoterapia, mientras la biología del bacteriófago involucrado no sea lo suficientemente comprendida.
2. Las preparaciones de bacteriófagos deben cumplir todos los requisitos de bioseguridad, debiendo ser libres de bacterias y sus componentes.
3. Las preparaciones de fagos deben contener partículas fágicas infectivas, por lo cual el almacenamiento de las preparaciones debe ser validado.
4. Idealmente, el receptor del bacteriófago debe ser conocido. En una población bacteriana de  $10^6$ – $10^8$  bacterias, hay una alta probabilidad de existencia de mutantes espontáneas fago-resistentes, deficientes del receptor o con una alteración de éste.
5. La eficacia de la fagoterapia debe ser comprobada en un modelo animal, ya que cada bacteriófago puede comportarse en forma diferente *in vivo*.

#### VI.3.1. Fagoterapia contra bacterias entéricas: *E. coli* y *Campylobacter*

Diversos estudios han demostrado la eficacia de la fagoterapia en el biocontrol de enteropatógenos. Al respecto, Barrow *et al.* (1998) infectaron pollos de 3 semanas de edad con *E. coli* H247 ( $10^6$  UFC/dosis/ave) por vía intramuscular, tratándolos luego con bacteriófagos ( $10^4$ – $10^6$  UFP/dosis/ave) por vía intramuscular; este tratamiento logró reducir en un 100% la morbilidad y mortalidad de los pollos. En un segundo ensayo, los autores desafiaron por vía oral

a 4 terneros privados de calostro con la misma cepa bacteriana ( $10^{10}$  UFC/dosis/animal), tratándolos 8 horas post infección con el mismo bacteriófago ( $10^{10}$  UFP/dosis/animal) por vía intramuscular. Tres días post infección, los terneros fueron sacrificados para la obtención de muestras intestinales, donde se comprobó que sólo uno de ellos había manifestado la enfermedad, en el cual se encontraron cepas fago-resistentes.

Huff *et al.* (2003) infectaron pollos broiler de 7 días de vida con *E. coli* serotipo O2, mediante inyección intratorácica, a una dosis total de  $10^4$  UFC/dosis/ave. Luego, las aves fueron tratadas con distintas dosis de bacteriófagos, vía intramuscular y aspersion, a las 2, 24 y 48 horas post desafío bacteriano. La fagoterapia vía aspersion logró reducir significativamente la mortalidad de las aves en un 40% al ser aplicada 2 horas post desafío, pero tuvo escaso efecto al ser administrada a las 24 y 48 horas post desafío. Por otra parte, la fagoterapia intramuscular logró reducir significativamente la mortalidad en un 67,9%, 78,3% y 54,5%, cuando fue aplicada a las 2, 24 y 48 horas post desafío, respectivamente.

Los mismos autores infectaron pollos de 7 días, mediante la inyección intratorácica de *E. coli* serotipo O2 ( $6 \times 10^4$  UFC/dosis/ave), junto a una mezcla de 2 bacteriófagos líticos. La fagoterapia logró reducir significativamente la mortalidad de las aves en un 41,2% cuando fue aplicada a una dosis total de  $10^4$  UFP/dosis/ave, lográndose una reducción total de la mortalidad cuando fue aplicada a una dosis total de  $10^8$  UFP/dosis/ave (Huff *et al.*, 2005).

Por otra parte, Wagenaar *et al.* (2005) evaluaron el efecto preventivo y terapéutico de 2 bacteriófagos líticos sobre la colonización intestinal de *C. jejuni* en pollos broiler. En un primer ensayo, pollos de 10 días de edad recibieron en forma preventiva la mezcla de fagos por vía oral durante 10 días, con dosis variantes de  $4 \times 10^9$  a  $2 \times 10^{10}$  UFP/dosis/ave. Al día 5 del experimento, los pollos fueron desafiadas por vía oral con *C. jejuni*, a una dosis total de  $10^5$  UFC/dosis/ave; en este ensayo, la fagoterapia no logró prevenir la colonización intestinal de la bacteria, pero sí logró reducirla en  $2 \log_{10}$  UFC/g de contenido cecal, respecto al grupo control de infección. En un segundo experimento, pollos de 32 días de edad recibieron la fagoterapia en forma terapéutica por vía oral desde el día 5 al 11 post inoculación bacteriana, con dosis similares al primer ensayo; los resultados mostraron una reducción inmediata de  $3 \log_{10}$  UFC/g en los recuentos bacterianos cecales en las aves tratadas, aunque después de 5 días los recuentos se estabilizaron en  $1 \log_{10}$  UFC/g por debajo del grupo control de infección.

Carrillo *et al.* (2005) evaluaron el efecto terapéutico de 2 bacteriófagos sobre la colonización intestinal de *C. jejuni* en pollos broiler de 20–22 días de vida. Para esto, los pollos fueron desafiados por vía oral con *C. jejuni* (2,7–7,8 log<sub>10</sub> UFC/dosis/ave) y a los 25 días de edad recibieron individualmente los bacteriófagos por vía oral, a una dosis total de 5–9 log<sub>10</sub> UFP/dosis/ave. Los resultados mostraron que la fagoterapia logró reducir los recuentos cecales de la bacteria entre 0,5–5,0 log<sub>10</sub> UFC/g de contenido cecal, respecto al grupo no tratado.

### **VI.3.2. Fagoterapia contra *Salmonella***

En el caso de *Salmonella* spp., la administración profiláctica y terapéutica de bacteriófagos líticos también ha demostrado buenos resultados, disminuyendo la incidencia de infección y los recuentos bacterianos a nivel intestinal, así como también reduciendo la colonización sistémica de la bacteria. No obstante, estos estudios sólo han sido realizados en pollos broiler y aves de reposición de corta edad, usualmente menores de 30 días de edad.

Fiorentin *et al.* (2005b) infectaron oralmente 5 pollos broiler de 1 día (“pollos sembradores”) con *S. Enteritidis* PT4, a una dosis de 10<sup>8</sup> UFC/dosis/ave, los cuales sirvieron para infectar el resto de las aves sanas mediante contacto. A los 7 días de edad, los pollos fueron tratados por vía oral con una mezcla de 3 bacteriófagos líticos, a una dosis de 10<sup>11</sup> UFP/cada fago/ave. Los pollos fueron sacrificados a intervalos de 5 días, hasta el día 25 post tratamiento, recolectándose muestras de ciegos, hígado y bazo, para estudios bacteriológicos. Los pollos sometidos a fagoterapia mostraron menores recuentos bacterianos a nivel cecal, respecto al grupo control de infección, mostrando mayores diferencias al día 20 post tratamiento (7,97 v/s 9,81 log<sub>10</sub> UFC/g de contenido cecal, respectivamente). Así mismo, la incidencia de infección a nivel de hígado y bazo fue menor en el grupo tratado con fagos a partir del décimo día post tratamiento.

Toro *et al.* (2005) evaluaron la eficacia de una mezcla de 3 bacteriófagos líticos en pollos White–Leghorn libres de patógenos específicos (SPF, “*specific-pathogen-free*”). Para esto, los pollos recibieron la fagoterapia a los 4, 5, 6, 8, 9 y 10 días de edad, a una dosis de 5,4 x 10<sup>6</sup> UFP/dosis/ave, siendo luego desafiados a los 7 días de edad con *S. Typhimurium* (3,95 x 10<sup>5</sup> UFC/dosis/ave). Los pollos fueron sacrificados a los 11 días de edad, obteniéndose muestras de ileon y ciegos. Los resultados mostraron una significativa disminución en los recuentos de

*S. Typhimurium* en el grupo tratado con bacteriófagos (1,1 UFC/mL), respecto a los pollos no tratados (81,8 UFC/mL), en las muestras de ileon. Además, el recuento de *S. Typhimurium* en los ciegos fue 6 veces menor en el grupo sometido a fagoterapia, respecto al grupo no tratado.

En un segundo experimento, los autores evaluaron el efecto biocontrolador de bacteriófagos y probióticos, solos y en asociación, sobre el mismo modelo animal. Para esto, un grupo de pollos recibió el probiótico (Broilact®) por vía oral durante los 3 primeros días de vida; un segundo grupo de aves recibió los bacteriófagos a los 4, 5, 6, 18, 19 y 20 días de edad, a una dosis de  $5,4 \times 10^6$  UFP/dosis/ave, mientras que un tercer grupo de aves recibió ambos tratamientos bajo el mismo protocolo. A los 7 días de edad, los pollos fueron desafiados con *S. Typhimurium* ( $3,95 \times 10^5$  UFC/dosis/ave). Los resultados bacteriológicos mostraron que, a los 11 días de edad, los 3 tratamientos lograron reducir significativamente los recuentos cecales de *Salmonella*, aproximadamente 10 veces respecto al grupo control de infección; no obstante, no se lograron reducciones significativas en las muestras de ileon, bazo e hígado. Por otra parte, a los 21 días de edad, el tratamiento con probióticos y con ambos biocontroladores en conjunto, disminuyó en forma significativa los recuentos bacterianos en las muestras de ileon (alcanzando niveles marginales) y ciegos; sin embargo, la fagoterapia individual no tuvo efectos benéficos en estas muestras. Así mismo, ninguno de los tratamientos logró reducir en forma significativa los recuentos bacterianos en las muestras de hígado y bazo (Toro *et al.*, 2005).

Filho *et al.* (2007) desafiaron por vía oral a pollos de 1 día con *S. Enteritidis* ( $9 \times 10^3$  UFC/dosis/ave). Una hora post infección, un grupo de pollos fue tratado con el bacteriófago CB4Ø ( $1 \times 10^8$  UFP/dosis/ave), un segundo grupo fue tratado con el fago WT45Ø ( $1,2 \times 10^8$  UFP/dosis/ave) y un tercer grupo recibió una mezcla de ambos bacteriófagos a una dosis de  $10^8$  UFP/cada fago/ave. Los tratamientos aplicados lograron disminuir significativamente el recuento de *S. Enteritidis* desde tonsilas cecales en un 35, 30 y 55%, respectivamente, en relación al grupo control de infección a las 24 horas post tratamiento, aunque no se observaron diferencias significativas a las 48 horas post tratamiento.

En una segunda experiencia, los autores desafiaron oralmente pollos de 1 día de edad con *S. Enteritidis* ( $3 \times 10^3$  UFC/dosis/ave). Un grupo de pollos fue tratado por vía cloacal con un probiótico comercial (Floromax–B11®) 2 horas post infección bacteriana; un segundo grupo de pollos fue tratado por vía cloacal con el fago WT45Ø ( $10^9$  UFP/dosis/ave) 1 hora post infección

bacteriana, y un tercer grupo recibió ambos tratamientos bajo el mismo protocolo descrito. Un día post tratamiento, los grupos de pollos mostraron significativas reducciones en los recuentos bacterianos a partir de tonsilas cecales, en un 32, 44 y 44%, respectivamente, en relación al grupo control de infección (Filho *et al.*, 2007).

Por su parte, Atterbury *et al.* (2007) infectaron pollos broiler de 36 días con *S. Enteritidis* o *S. Typhimurium* ( $8 \log_{10}$  UFC/dosis/ave). Dos días post infección, las aves fueron tratadas con bacteriófagos específicos a una dosis variable de 9–11  $\log_{10}$  UFP/dosis/ave, asociados a una solución antiácida. Las aves tratadas con bacteriófagos mostraron una significativa reducción en el recuento cecal promedio de *S. Enteritidis* ( $1,53 \log_{10}$  UFC/g) y *S. Typhimurium* ( $3,48 \log_{10}$  UFC/g) respecto a los grupos controles de infección ( $5,77$  y  $5,67 \log_{10}$  UFC/g, respectivamente), 24 horas post tratamiento.

Higgins *et al.* (2007) evaluaron la eficacia de una mezcla de bacteriófagos seleccionados por su capacidad de sobrevivir el paso a través del tracto gastrointestinal. Pavos de 2 días de edad fueron infectados oralmente con *S. Enteritidis* ( $10^4$  UFC/dosis/ave) y tratados con bacteriófagos ( $2,5 \times 10^9$  UFP/dosis/ave) e hidróxido de magnesio, 48 horas post infección; en este ensayo, la fagoterapia logró reducir los recuentos cecales de *Salmonella* en menos de  $1 \log_{10}$  UFC/g a las 6, 12 y 24 horas post tratamiento, respecto a sus respectivos grupos controles. En una segunda experiencia, pavos de 2 días fueron desafiados con *S. Enteritidis* ( $1,6 \times 10^4$  UFC/dosis/ave) y tratados 48 horas post desafío con bacteriófagos ( $7,5 \times 10^9$  UFP/dosis/ave) e hidróxido de magnesio; este tratamiento disminuyó los recuentos cecales de la bacteria en  $0,85 \log_{10}$  UFC/g, a las 24 horas post tratamiento, respecto al grupo control. Sin embargo, en ambas experiencias, las reducciones en los recuentos bacterianos cecales no tuvieron significancia estadística. No obstante, este estudio sugiere la posibilidad de utilizar modelos animales para seleccionar *in vivo* los bacteriófagos a utilizar en la fagoterapia, con el objetivo de incrementar su capacidad de sobrevivencia en el tracto gastrointestinal.

### **VI.3.3. Fagoterapia a nivel nacional**

En Chile, también se ha estudiado el rol de los bacteriófagos como método de biocontrol de *S. Enteritidis*. Santander y Robeson (2004) demostraron que los bacteriófagos *f3 $\alpha$ SE* y *f3 $\alpha$ SP* protegieron al nematodo *Caenorhabditis elegans* contra *S. Enteritidis* y *S. Pullorum*,

respectivamente, disminuyendo significativamente las mortalidades de los nematodos, respecto a los grupos controles. Los autores, en esta primera experiencia a nivel nacional, sugirieron la utilidad de los bacteriófagos, tales como *f3αSE*, como una medida de control adicional para disminuir la contaminación de *S. Enteritidis* en pollos.

Es así como, también durante 2004, Borie *et al.* (2008b) evaluaron la efectividad del bacteriófago *f3αSE* en pollos broiler de 10 días. Para esto, los pollos fueron tratados en forma profiláctica con el bacteriófago ( $10^6$  ó  $10^7$  UFP/dosis/ave) e infectados con *S. Enteritidis* ( $4 \times 10^6$  UFC/dosis/ave), 2 horas post tratamiento. Diez días post infección las aves fueron sacrificadas, obteniéndose muestras de intestino completo y órganos internos (“pool” de corazón, hígado y bazo). Independiente del tipo de muestra, el tratamiento con bacteriófagos logró reducir el número de pollos infectados en un 33% al utilizar la dosis de  $10^6$  UFP/ave y en un 40% al utilizar la dosis de  $10^7$  UFP/ave, respecto al grupo control de infección.

Dos años más tarde, los mismos autores administraron oralmente una mezcla de 3 bacteriófagos líticos, a una dosis de  $10^8$  UFP/cada fago/ave, a pollos SPF de 10 días de vida; luego, un día post administración de los fagos, los pollos fueron desafiados con *S. Enteritidis* ( $8,3 \times 10^5$  UFC/dosis/ave). Diez días post infección los pollos fueron sacrificados, obteniéndose muestras de ciegos y órganos internos (“pool” de corazón, hígado y bazo). Los resultados bacteriológicos mostraron que la fagoterapia disminuyó en un 21,6% la incidencia de infección a nivel intestinal y en un 22,5% en órganos internos, respecto al grupo control de infección (Albala, 2007).

Durante el 2007, estos investigadores administraron una mezcla de 3 bacteriófagos líticos ( $10^8$  UFP/cada fago/ave) a pollos White–Leghorn de 9 días, mediante agua de bebida o aspersión, los que luego fueron desafiados con *S. Enteritidis* ( $9,6 \times 10^5$  UFC/dosis/ave). Diez días post infección, las aves fueron sacrificadas y se obtuvieron muestras de intestinos y órganos internos (“pool” de corazón, hígado y bazo). Se observó que la administración de bacteriófagos vía aspersión fue la más efectiva a nivel intestinal, reduciendo la incidencia de infección en un 27,3%. Por el contrario, la administración de bacteriófagos a través del agua de bebida fue más efectiva en órganos internos, reduciendo la incidencia de infección en un 36,3%. Además, la administración de bacteriófagos, vía aerosol y agua de bebida, disminuyó significativamente los recuentos cecales de *S. Enteritidis* en 1,63 y 1,42  $\log_{10}$  UFC/g,

respectivamente. Esta situación no fue observada en órganos internos, donde las reducciones no fueron estadísticamente significativas (Borie *et al.*, 2008a).

Siguiendo su línea de investigación, los autores evaluaron el efecto de bacteriófagos y un probiótico comercial (Broilact®) sobre la colonización intestinal y sistémica de *S. Enteritidis* en pollas comerciales White–Leghorn, para lo cual se formaron 4 grupos de aves. Uno de los grupos recibió el probiótico vía aspersion al día de vida, mientras que otro grupo recibió la mezcla de bacteriófagos vía aspersion a los 6 días de edad, a una MOI de  $10^3$  UFP. Un tercer grupo de aves recibió ambos tratamientos de forma similar, considerándose además un cuarto grupo, como control de infección, que no recibió tratamientos. Todos los grupos fueron desafiados oralmente al séptimo día de edad con *S. Enteritidis* ( $2,95 \times 10^5$  UFC/dosis/ave). La eutanasia de los pollos se realizó a los 7 días post infección, obteniéndose muestras de ciegos y órganos internos (“pool” de hígado y bazo). De los estudios bacteriológicos cualitativos y cuantitativos se demostró que, tanto probióticos como bacteriófagos por sí solos, fueron efectivos en reducir la incidencia de infección en un 24,3 y 20%, respectivamente, y los recuentos cecales en 0,79 y 0,91  $\log_{10}$  UFC/g, respectivamente, en relación al grupo control de infección. La observación más interesante fue el efecto sinérgico mostrado por ambos biocontroladores al ser administrados en forma conjunta, disminuyendo la incidencia de infección en un 61,3% y el recuento cecal promedio en 1,69  $\log_{10}$  UFC/g, respecto al grupo control de infección. No obstante, no se encontraron diferencias significativas en la incidencia de infección en órganos internos (Borie *et al.*, 2009).

A pesar de los prometedores resultados obtenidos en los estudios previamente citados, tanto a nivel internacional como nacional, hasta la fecha no han sido publicados estudios que avalen la efectividad de la fagoterapia en aves de postura adultas, las cuales juegan un rol esencial en la epidemiología de la salmonelosis humana, al ser ellas las responsables de la oferta de huevos contaminados a los consumidores.

# OBJETIVOS

## I. OBJETIVO GENERAL

Determinar la eficacia de una terapia preventiva con bacteriófagos en el control de *S. Enteritidis* en gallinas de postura.

## II. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

1. Establecer la dosis mínima infectante de *S. Enteritidis* para gallinas de postura comerciales.
2. Determinar la reducción de la colonización de *S. Enteritidis* en los ciegos de gallinas de postura comerciales experimentalmente infectadas, previamente tratadas con una mezcla de bacteriófagos.
3. Establecer la incidencia de infección de *S. Enteritidis* en huevos provenientes de gallinas de postura comerciales experimentalmente infectadas, tratadas previamente con una mezcla de bacteriófagos.



## MATERIAL Y MÉTODOS

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 el Laboratorio de Microbiología de la Facultad de Ciencias Veterinarias y Pecuarias de la Universidad de Chile.

### 1. Animales

Se trabajó con gallinas de postura comerciales de la línea Hy-Line Brown, de 22 semanas de vida, adquiridas en un plantel avícola de la Séptima región (Talca), el cual informó negatividad a *Salmonella* spp. y cuyos animales provienen de madres vacunadas contra este enteropatógeno. Se comprobó la negatividad de las aves mediante coprocultivo, reacción de polimerasa en cadena (PCR) a partir de muestras fecales (Laboratorio de Microbiología; Sánchez, 2007) y serología (Servicio Agrícola y Ganadero, SAG).

Las aves fueron mantenidas en la Unidad de Animales de Experimentación del Departamento de Medicina Preventiva Animal (Facultad de Ciencias Veterinarias y Pecuarias, Universidad de Chile), con adecuado manejo de temperatura e iluminación. Además, las gallinas fueron alojadas en jaulas de 40 x 35 cm., en grupos de 3 aves, con alimento comercial libre de antimicrobianos y agua potable *ad libitum*.

La crianza y manejo de las aves estuvo bajo la supervisión del Médico Veterinario Especialista en aves de postura, Dr. Sergio Ramírez Urrutia.

### 2. Cepa desafío

Se utilizó una cepa nativa de *Salmonella* Enteritidis (*S. Enteritidis*) de origen aviar, mutante espontánea resistente a Ácido Nalidíxico (*nal*) y Rifampicina (*rif*). La cepa fue previamente sometida a 9 pasajes en aves adultas para exacerbar su virulencia (Laboratorio de Microbiología, Facultad de Ciencias Veterinarias y Pecuarias, Universidad de Chile).

### 3. Bacteriófagos

Se utilizó una mezcla de 3 bacteriófagos líticos nativos (*f*18, IF1 y EST2) suspendidos en agua destilada estéril. Éstos fueron aislados desde material fecal de aves de engorda, productos avícolas y aguas residuales de origen animal y humano de la Quinta región (Robeson *et al.*, 2008). El aislamiento, titulación y suspensión de los bacteriófagos fue realizada por el Dr. James Robeson Camus (Laboratorio de Microbiología, Instituto de Biología, Pontificia Universidad Católica de Valparaíso) y fueron utilizados a una multiplicidad de infección (MOI) de  $10^3$  unidades formadoras de placas líticas (UFP), correspondiendo ésta a la relación numérica existente entre los bacteriófagos y las bacterias inoculadas.

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

Gallinas comerciales de raza White–Leghorn, negativas a *Salmonella* por coprocultivo y serología (Servicio Agrícola y Ganadero, SAG), fueron inoculadas con la cepa desafío por vía oral forzada en dosis de  $10^7$ ,  $10^8$  y  $10^9$  unidades formadoras de colonias (UFC)/dosis/ave.

Para la obtención de los inóculos bacterianos, la cepa desafío se cultivó a 37 °C por 24 horas en caldo común y luego se ajustó su turbidez al tubo N° 1 del Nefelómetro de McFarland ( $3 \times 10^8$  bacterias/mL). De esta concentración se realizaron diluciones al décimo con solución salina estéril, para obtener la dosis menor. Por otra parte, para alcanzar la concentración de  $10^9$  UFC/dosis/ave, cada gallina recibió 8 mL de la suspensión inicial. Para corroborar las unidades formadoras de colonias de las suspensiones inoculadas, se realizó el recuento bacteriano de éstas en placas de agar XLD (Difco®) con Ácido Nalidíxico y Rifampicina (20 µg/mL, Arlab®).

Diez días post infección, las aves fueron sacrificadas mediante la administración de solución para eutanasia T61® (2 mL, vía intrapulmonar; AVMA, 2001) y se obtuvieron muestras individuales de ciegos, las que fueron analizadas mediante bacteriología cualitativa, detallada en el punto 6.

La DMI fue considerada la mínima concentración bacteriana con la cual se logró el reaislamiento de *S. Enteritidis* a nivel cecal en al menos el 90% de las aves.

## 5. Grupos de aves

Se formaron 4 grupos de aves, cuyos detalles se especifican en el cuadro N°1:

**Cuadro N° 1.** Diseño experimental de los 4 grupos de gallinas Hy-Line Brown inoculados con *S. Enteritidis* y una mezcla de bacteriófagos.

Grupos	N°de aves	Fagos (MOI)	<i>S. Enteritidis nal rif</i>
1 (Control negativo)	9*	–	–
2 (Control de infección)	30	–	1 DMI
3 (Control inocuidad de BF)	10	10 <sup>3</sup> UFP	–
4 (Terapia con BF)	30	10 <sup>3</sup> UFP	1 DMI

MOI: Multiplicidad de infección. DMI: Dosis mínima infectante. BF: Bacteriófagos. UFP: Unidades formadoras de placas líticas. \* Una gallina debió ser eliminada por motivos ajenos a la experiencia

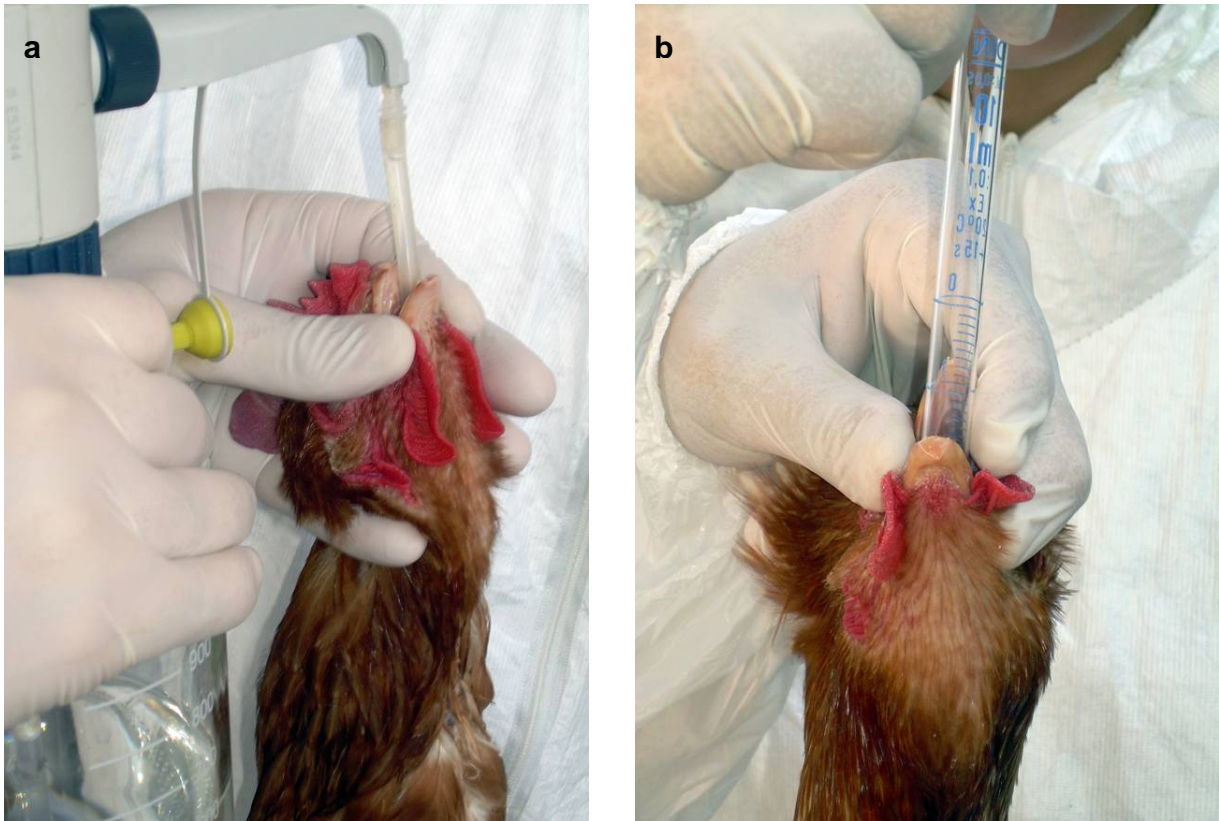
El número de aves por grupo se calculó considerando que el aislamiento de *Salmonella* spp. es  $p = 0,8$ ; con error  $\pm 0,15$  y un nivel de confianza de 95%.

La administración de la mezcla de bacteriófagos se realizó mediante vía oral forzada utilizando una cánula flexible, durante los 3 días consecutivos previos al desafío bacteriano, calculando una MOI de 10<sup>3</sup> UFP para cada fago. Posteriormente, las aves de los grupos 2 y 4 fueron desafiadas con 1 DMI de la cepa desafío, por vía oral forzada (Figura N° 1).

Diez días post desafío, todas las aves fueron sacrificadas mediante la administración de solución para eutanasia T61® (2 mL, vía intrapulmonar; AVMA, 2001) (Sala de Necropsias, Departamento de Patología Animal) y se obtuvieron individualmente los ciegos para el análisis bacteriológico cualitativo y cuantitativo. Adicionalmente, todos los huevos ovipuestos después del desafío bacteriano y los huevos en formación encontrados durante la necropsia de las aves de los grupos 2 y 4, fueron recolectados y procesados para aislar *S. Enteritidis*.

Cada grupo de aves fue mantenido en una sala experimental individual debidamente acondicionada, para evitar toda posibilidad de contaminación cruzada, tanto con *S. Enteritidis*

como con bacteriófagos. Además, se llevaron a cabo las distintas medidas de bioseguridad detalladas en el punto 7.



**Figura 1. (a)** Administración de la mezcla de bacteriófagos líticos a gallinas Hy-Line Brown por vía oral forzada, mediante cánula flexible. **(b)** Administración de la cepa desafío a gallinas Hy-Line Brown por vía oral forzada, mediante pipeta de vidrio de 10 mL.

## 6. Bacteriología

Se siguieron las pautas bacteriológicas recomendadas por Murray y Barton (1993):

### 6.1. Bacteriología cualitativa

Cada muestra de ciegos fue pesada en una balanza electrónica (Belltronic Scales®) y colocada en una bolsa plástica estéril para equipo Masticador (Nasco Whirl-Pack®) con caldo Rappaport-Vassiliadis (RV, Difco®) en razón 1:10. Luego, cada bolsa se homogenizó en el

equipo Masticador (IUL Instruments®) por 180 segundos y fue incubada a 37 °C por 72 horas. La siembra a partir de las bolsas se realizó a las 48 y 72 horas de incubación, en placas de agar XLD (Difco®) con Ácido Nalidíxico y Rifampicina (20 µg/mL, Arlab®) y fueron incubadas a 37°C durante 24 horas.

Las colonias sospechosas, de borde transparente y centro negro, fueron identificadas mediante batería bioquímica corta (fermentación de azúcares y producción de H<sub>2</sub>S, desarrollo en agar Citrato de Simmons y desaminación de fenilalanina) y aglutinación con suero anti-*Salmonella* grupo D1 (Difco®), de acuerdo a las instrucciones del fabricante.

Los huevos frescos ovipuestos durante la experiencia fueron recolectados en las salas de experimentación, donde fueron mantenidos hasta su procesamiento en el Laboratorio de Microbiología. Se formaron 3 conjuntos de huevos de similar número, según la cantidad ovipuesta por el durante el día. Éstos fueron desinfectados externamente mediante inmersión en etanol al 70% durante 5 segundos y luego secados con papel absorbente. En forma aséptica, se separaron las albúminas de las yemas y fueron depositadas en bolsas plásticas estériles, adicionando además a la bolsa de albúminas una muestra de las membranas de la cáscara de cada huevo (Gast *et al.*, 2002). Cada bolsa recibió caldo RV en razón 1:10 (Gast *et al.*, 2003b) y fue homogenizada en el equipo Masticador durante 30 segundos, para luego ser incubada a 37 °C durante 72 horas. La siembra de cada bolsa se realizó a las 48 y 72 horas de incubación, en placas de agar XLD con Ácido Nalidíxico y Rifampicina (20 µg/mL).

## **6.2. Bacteriología cuantitativa**

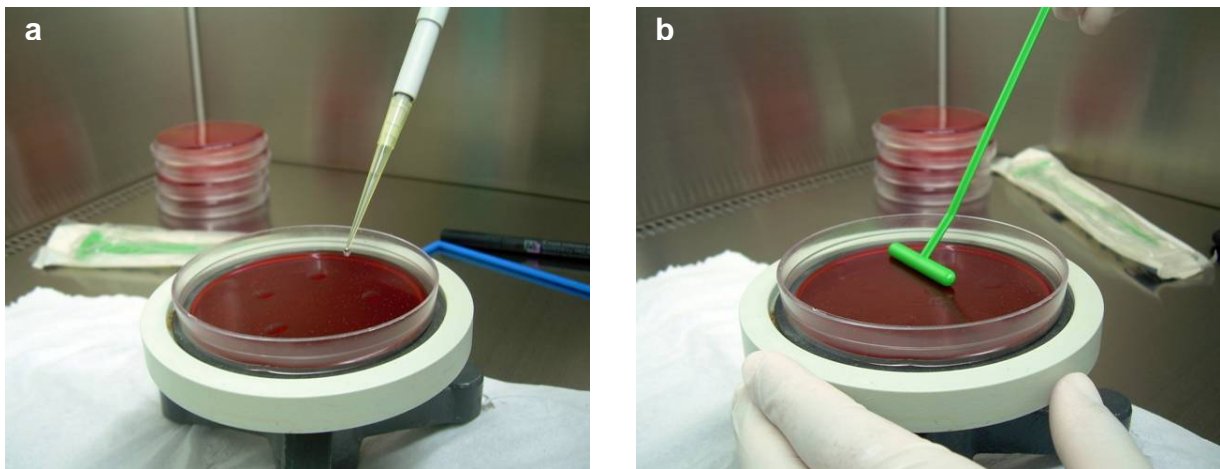
Para el recuento de la cepa desafío en ciegos, se utilizó 1 mL del homogenizado en caldo RV (razón 1:10) sin incubar (suspensión inicial, dilución 10<sup>0</sup>), al cual se agregaron 9 mL de agua peptonada fosfatada (APF, Oxoid®). A partir de esta suspensión (10<sup>-1</sup>) se realizaron tres diluciones al décimo (diluciones 10<sup>-2</sup>, 10<sup>-3</sup> y 10<sup>-4</sup>) en APF y de cada dilución se obtuvieron 100 µL, los cuales fueron sembrados por diseminación (Figura N° 3) en la superficie de placas de agar XLD con Ácido Nalidíxico y Rifampicina (20 µg/mL). Posteriormente, las placas sembradas fueron incubadas a 37 °C durante 24 horas, tras lo cual se realizó el recuento de colonias. La identificación de colonias fue corroborada mediante batería bioquímica corta y aglutinación, en forma similar a la señalada en la bacteriología cualitativa.

## 7. Normas de bioseguridad

Se utilizaron las normas de bioseguridad recomendadas por el Centro de Control y Prevención de Enfermedades (CDC) de Estados Unidos para un nivel de bioseguridad 2, correspondiente a *Salmonella* no Typhi (Richmond y McKinney, 1999).

Las aves se mantuvieron en salas debidamente acondicionadas y separadas para evitar toda contaminación cruzada. El recinto mantuvo su entrada restringida a personal exclusivo del estudio; así mismo, el manejo de los distintos grupos experimentales fue realizado por personal diferente. Además, se utilizó vestimenta desechable (overoles con gorro, mascarilla, guantes, manguillas plásticas y cubrebotas) y la manipulación de las aves se realizó con guantes gruesos.

La desinfección se realizó con derivados de amonio cuaternario, cloro y alcohol yodado; la esterilización se realizó con glutaraldehído al 2% en aspersion. Todo residuo sólido fue incinerado, mientras que los residuos líquidos fueron clorados a razón de 1.000 ppm antes de su evacuación.



**Figura 2.** (a) Aplicación de 100  $\mu$ L de las diluciones del homogenizado en caldo RV, sobre la superficie de placas de XLD con antimicrobianos. (b) Diseminación de las diluciones del homogenizado en caldo RV, sobre la superficie de placas de XLD con antimicrobianos, mediante rastrillos plásticos estériles.

## 8. Análisis estadístico

Los resultados de la bacteriología cualitativa de los grupos 2 y 4, fueron expresados como proporciones de positividad y sus diferencias fueron analizadas mediante la prueba de independencia de Chi cuadrado ( $\chi^2$ ).

El análisis bacteriológico cuantitativo entre los grupos experimentales se realizó mediante análisis de varianza (ANDEVA) de un criterio. Para ello, los recuentos bacterianos (UFC/g) de los grupos 2 y 4 fueron transformados en unidades logarítmicas ( $\log_{10}$  UFC/g), de distribución normal. Además, toda muestra cuya bacteriología cualitativa fue positiva y, a su vez, fue negativa a la bacteriología cuantitativa, tomó valor 1; mientras que, todas aquellas muestras negativas a la bacteriología cualitativa y cuantitativa, tomaron valor 0. Los valores de  $p$  menores a 0,05 fueron considerados estadísticamente diferentes (InfoStat, 2004).

## RESULTADOS

### I. CÁLCULO DE LA DOSIS MÍNIMA INFECTANTE (DMI)

El análisis de la DMI, es decir, aquella concentración bacteriana con la cual se obtuvo al menos el 90% de las aves positivas a nivel cecal, se detalla en el cuadro N° 2. Si bien, con la concentración de  $10^7$  UFC/dosis/ave se obtuvo un 90% de infección cecal, ésta no logró la infección de tejidos reproductivos, por lo cual fue descartada. Con las concentraciones de  $10^8$  y  $10^9$  UFC/dosis/ave se obtuvo un 100% de infección cecal, por lo cual fue seleccionada la menor concentración bacteriana ( $10^8$  UFC/dosis/ave).

Cabe señalar que sólo con la concentración de  $10^9$  UFC/dosis/ave fue posible obtener algunas gallinas (2) con el oviducto y el ovario simultáneamente infectados con *Salmonella*, mientras que con la concentración de  $10^8$  UFC/dosis/ave ninguna gallina presentó ambos órganos reproductivos infectados en forma simultánea.

A título complementario, es importante señalar que sólo con la concentración de  $10^8$  UFC/dosis/ave fue posible pesquisar un huevo interno (presente en el oviducto al momento de la eutanasia) positivo a *S. Enteritidis*, aún cuando con las concentraciones de  $10^8$  y  $10^9$  UFC/dosis/ave se detectó infección en órganos reproductivos. Por esta razón, se consideró adecuado utilizar la concentración de  $10^8$  UFC/dosis/ave.

**Cuadro N° 2.** Aislamiento de *S. Enteritidis* desde ciegos y tejidos reproductivos de gallinas experimentalmente infectadas con diferentes dosis bacterianas.

Órganos	Número de aves infectadas (%) según dosis de <i>S. Enteritidis</i> (UFC/dosis/ave)		
	$10^7$	$10^8$	$10^9$
Ciegos	9/10 (90%)	4/4 (100%)	4/4 (100%)
Folículos	0/10 (0%)	1/4 (25%)	2/4 (50%)
Oviducto	0/10 (0%)	2/4 (50%)	2/4 (50%)

UFC: Unidades formadoras de colonias



## II. EFICIENCIA DE FAGOTERAPIA ORAL EN GALLINAS DE POSTURA COMERCIALES

Con respecto al estudio de eficiencia de la fagoterapia en gallinas experimentalmente infectadas, los resultados de la bacteriología cualitativa y cuantitativa son presentados en el cuadro N°3. La dosis bacteriana final inoculada a las gallinas en estudio fue  $2,4 \times 10^8$  UFC/ave.

Los resultados de la bacteriología cualitativa muestran que la incidencia de infección cecal fue igual entre los grupos 2 (control de infección) y 4 (terapia con bacteriófagos), correspondiendo a un 96,67% en ambos grupos. Por otra parte, no se logró el aislamiento de *S. Enteritidis* desde los grupos 1 (control negativo) y 3 (control inocuidad de bacteriófagos), descartándose la posibilidad de contaminación cruzada entre los grupos experimentales.

Los resultados de la bacteriología cuantitativa (recuento cecal promedio y recuentos mínimos y máximos) son presentados en el cuadro N° 3 y en el gráfico N° 1. El grupo 2 (control de infección) mostró un recuento cecal promedio de  $2,978 \log_{10}$  UFC/g, mientras que el grupo 4 (terapia con bacteriófagos) mostró un recuento de  $2,402 \log_{10}$  UFC/g; no obstante, los resultados del ANDEVA no arrojaron diferencias significativas ( $p = 0,0961$ ) entre ambos grupos.

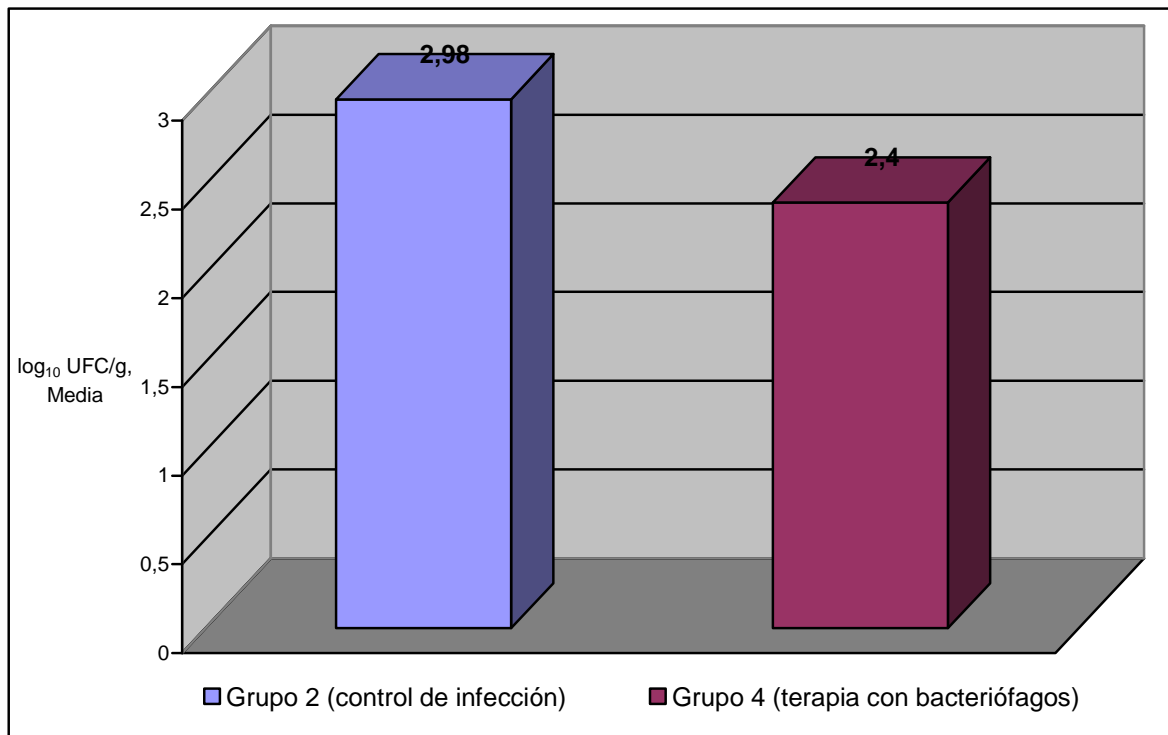
**Cuadro N° 3.** Aislamiento y recuentos ( $\log_{10}$  UFC/g) de *S. Enteritidis* desde ciegos de gallinas experimentalmente infectadas y sometidas a terapia con una mezcla de bacteriófagos.

Grupos de aves	Número de aves	Nº aves infectadas (%)	Recuento cecal promedio ( $\log_{10}$ UFC/g)	Recuentos mínimos y máximos, ( $\log_{10}$ UFC/g)
<b>Grupo 1</b> (Control negativo)	9 <sup>a</sup>	0 (0)	–	–
<b>Grupo 2</b> (Control de infección)	30	29 (96,67)	2,978	1,0 <sup>b</sup> – 6,0
<b>Grupo 3</b> (Control inocuidad de BF)	10	0 (0)	–	–
<b>Grupo 4</b> (Terapia con BF)	30	29 (96,67)	2,402	1,0 – 4,81

UFC: Unidades formadoras de colonias. BF: Bacteriófagos. <sup>a</sup>: Eliminación de un ave por motivos ajenos al estudio.

<sup>b</sup>:  $1,0 \log_{10}$  UFC/g =  $<10^3$  UFC/g, en muestras con bacteriología cualitativa positiva, pero negativas a la bacteriología cuantitativa.

**Gráfico N° 1.** Recuentos cecales promedio ( $\log_{10}$  UFC/g) de *S. Enteritidis* desde ciegos de gallinas experimentalmente infectadas y sometidas a terapia con una mezcla de bacteriófagos.



Durante este período, no fue posible detectar *S. Enteritidis* en ninguno de los conjuntos de huevos provenientes de ambos grupos de aves. Sin embargo, se logró aislar *S. Enteritidis* a partir de un conjunto de huevos internos (recolectados directamente desde el oviducto durante la necropsia) provenientes del grupo 2 (control de infección).

En forma anexa, se evaluó el porcentaje de postura gallina/día, en los grupos 2 y 4, antes y después del desafío bacteriano, para lo cual los huevos fueron recolectados una vez al día (al mediodía) y enumerados. A partir de estos, se calculó el porcentaje de postura gallina/día, pre infección bacteriana (promediado durante 3 días previos al desafío bacteriano) y post infección bacteriana (promediado durante 10 días posteriores al desafío bacteriano). Para determinar diferencias en los niveles de postura, los resultados fueron sometidos a ANDEVA de un criterio. Los valores de  $p$  menores a 0,05 fueron considerados estadísticamente diferentes (InfoStat, 2004). Los resultados de este análisis son presentados en el cuadro N°4.

**Cuadro N° 4.** Porcentaje de postura gallina/día (promedio) durante la experiencia, en aves experimentalmente infectadas y sometidas a terapia con una mezcla de bacteriófagos.

<b>Variables</b>	<b>Grupo 2</b> (Control de infección)	<b>Grupo 4</b> (Terapia con bacteriófagos)
% postura pre infección bacteriana (promedio 3 días pre infección)	85,56 <sup>a</sup>	83,33 <sup>a</sup>
% postura post infección bacteriana (promedio 10 días post infección)	87,67 <sup>b</sup>	97,33 <sup>c</sup>

<sup>a-b-c</sup>: medias con diferentes superíndices son estadísticamente diferentes ( $p < 0,05$ ) dentro y entre columnas.

Los porcentajes de postura gallina/día pre y post infección bacteriana fueron estadísticamente diferentes ( $p < 0,05$ ) dentro de cada grupo. Al analizar este parámetro entre ambos grupos experimentales, se observa que el porcentaje de postura gallina/día pre infección bacteriana fue de un 85,56% para el grupo 2 y de un 83,33% para el grupo 4, no hallándose diferencias significativas ( $p = 0,7415$ ) entre estos resultados. Por otra parte, el porcentaje de postura gallina/día post infección bacteriana fue de un 87,67% para el grupo 2 y de un 97,33% para el grupo 4, resultados estadísticamente diferentes ( $p = 0,0054$ ).

Durante el transcurso de la experiencia no se observaron cambios conductuales ni manifestaciones clínicas sugerentes de enfermedad en ninguno de los cuatro grupos en estudio. Así mismo, no se observaron lesiones macroscópicas durante la necropsia de las aves, a excepción de una gallina del grupo 2 que cursaba con un cuadro de salpingoperitonitis.

## DISCUSIÓN

La DMI utilizada para la inoculación de las gallinas fue  $2,4 \times 10^8$  UFC/dosis/ave, similar a la utilizada por Keller *et al.* (1995) la cual, en gallinas White–Leghorn de 23–25 semanas de edad, logró un 100% de infección intestinal hasta los 12 días post infección. En este estudio, la dosis mínima infectante logró una alta incidencia de infección cecal (96,67%) en el grupo control de infección. No obstante, como información complementaria, esta dosis sólo logró un 43,33% de infección en tejidos reproductivos (ovario y/o oviducto) en el mismo grupo de aves <sup>1</sup>.

Los resultados de la bacteriología cualitativa mostraron que la administración profiláctica de bacteriófagos no logró reducir la incidencia de infección cecal de *S. Enteritidis*, respecto al grupo control de infección, siendo en ambos grupos un 96,67%. De forma similar, los resultados de la bacteriología cuantitativa mostraron una reducción de  $0,58 \log_{10}$  UFC/g en los recuentos cecales de *S. Enteritidis* en el grupo sometido a fagoterapia, respecto al grupo control de infección, pero esta reducción no fue significativa ( $p = 0,0961$ ).

Aún cuando no existen experiencias similares en aves adultas, con las cuales poder realizar comparaciones objetivas, es posible inferir algunas explicaciones en base a los estudios de fagoterapia realizados en aves jóvenes. Resultados similares fueron obtenidos por Higgins *et al.* (2007) en pavos de 2 días de vida, desafiados con  $10^4$  UFC/dosis de *S. Enteritidis* y tratados con  $2,5 \times 10^9$  UFP/dosis de una mezcla de bacteriófagos, asociando además la fagoterapia a hidróxido de magnesio, como antiácido. La fagoterapia logró reducir los recuentos bacterianos a nivel cecal en menos de  $1 \log_{10}$  UFC/g a las 6, 12 y 24 horas post infección, aunque no de forma significativa. Además, a las 48 horas post infección, las aves que recibieron fagoterapia mostraron un incremento en los recuentos cecales de la bacteria en  $1,64 \log_{10}$  UFC/g, respecto al grupo control. Aún cuando los autores no lograron explicar totalmente este fenómeno, plantearon la posibilidad del surgimiento de fago–resistencia por parte de la bacteria y/o pérdida de especificidad de hospedero por parte de los bacteriófagos utilizados.

También Sklar y Joerger (2001) obtuvieron resultados similares en varios ensayos. En un primer estudio, pollos de 1 día fueron desafiados con *S. Enteritidis* ( $10^4$  UFC/dosis/ave) y

---

<sup>1</sup> Borie, C. 2008. [comunicación personal]. U. Chile, Fac. Cs. Veterinarias y Pecuarias.

tratados por vía oral, tres horas post infección, con 4 bacteriófagos (CON, P1:1, IP y MOT2) en forma individual ( $10^8$  UFP/dosis/ave). A los 14 días post infección, ninguno de los 4 fagos logró reducir los recuentos cecales en forma significativa ( $p = 0,53$ ); además, el grupo tratado con el fago MOT2 presentó recuentos cecales mayores ( $19,2 \times 10^5$  UFC/g) respecto al grupo control de infección ( $6,8 \times 10^5$  UFC/g). En un segundo ensayo, pollos infectados con la misma dosis de *S. Enteritidis* recibieron por vía oral una dosis ( $10^8$  UFP/dosis/ave) del bacteriófago P1:1, tres horas post infección, ó 3 dosis del mismo fago a los 2, 4 y 6 días post infección, logrando ambos protocolos ligeras reducciones en los recuentos bacterianos a nivel cecal a los 14 días post infección, aunque no significativas ( $p = 0,09$ ). En un tercer ensayo, pollos igualmente infectados recibieron el fago P1:1 ( $10^9$  UFP/dosis/ave) a los 1, 2, 3, 11, 12 y 13 días post infección, asociando la fagoterapia a alimento peletizado o a una matriz de agar, para su administración oral; ninguno de estos tratamientos logró reducir los recuentos cecales en forma significativa ( $p = 0,06$ ) a los 14 días post infección y, además, el grupo que recibió la fagoterapia asociada al agar a los 1, 2 y 3 días post infección, mostró un incremento en los recuentos cecales ( $89,3 \times 10^5$  UFC/g) respecto al grupo control de infección ( $52,7 \times 10^5$  UFC/g).

Un factor que puede afectar fuertemente el éxito de la fagoterapia corresponde a la vía de administración seleccionada para su aplicación. La mejor vía de administración es aquella que permita la llegada rápida de los bacteriófagos al tejido infectado por la bacteria blanco, en concentraciones lo suficientemente altas para lograr infectar y lisar la mayor cantidad de células bacterianas posibles (Dabrowska *et al.*, 2005). De esta manera, la administración oral de bacteriófagos ha mostrado ser muy efectiva en el tratamiento de infecciones gastrointestinales en terneros, corderos y lechones privados de calostro, protegiéndolos contra la diarrea y la mortalidad (Smith y Huggins, 1983). Así mismo, la fagoterapia oral en pollos experimentalmente infectados con diversas bacterias patógenas, tales como *S. Typhimurium*, *S. Enteritidis* y *E. coli*, ha disminuido exitosamente la incidencia de infección y recuentos bacterianos a nivel gastrointestinal y sistémico (Huff *et al.*, 2005; Toro *et al.*, 2005; Borie *et al.*, 2008a). La inyección de bacteriófagos por vía endovenosa también ha mostrado exitosos resultados, permitiendo su llegada rápida y directa al torrente sanguíneo, desde donde pueden diseminarse al resto del organismo (Dabrowska *et al.*, 2005). Otras vías de administración también han resultado efectivas para la llegada de los bacteriófagos a nivel sistémico, tales como las vías intraperitoneal (Merril *et al.*, 1996), intramuscular (Barrow *et al.*, 1998), intranasal (Carrera *et al.*, 2004), intraocloacal (Filho *et al.*, 2007), rectal (Sechter *et al.*, 1989) y aspersión (Borie *et al.*,

2008a). Así, la mayoría de los estudios llevados a cabo hasta la fecha, ejemplifican el gran potencial de penetración de los bacteriófagos, los cuales son capaces de ingresar y diseminarse a través de organismos mayores prácticamente por todas las rutas regulares de administración.

En el presente estudio, la vía de administración seleccionada para la aplicación de los bacteriófagos fue la vía oral. Esta elección se sustenta en los resultados obtenidos por Borie *et al.* (2008a), quienes utilizando la misma cepa bacteriana en pollos de 9 días de edad, observaron que la administración de una mezcla de 3 bacteriófagos líticos por vía oral (agua de bebida) fue más efectiva en reducir la incidencia de infección a nivel de órganos internos (“pool” de corazón, hígado y bazo) respecto a la administración por aspersion. Por otra parte, dada la facilidad técnica de administración en aves adultas, así como su futura aplicabilidad en la industria avícola para la administración a lotes de aves, se prefirió utilizar la vía oral.

No obstante, es probable que la administración oral de bacteriófagos en forma efectiva sea difícil, debido a las condiciones adversas encontradas dentro del tracto gastrointestinal. La presencia de enzimas digestivas, condiciones variables de pH y otros compuestos como la bilis, son comúnmente perjudiciales para la estructura de los bacteriófagos. Dabrowska *et al.* (2005) describieron que el número de bacteriófagos disminuye significativamente entre pH 3 y 7, no logrando sobrevivir a pH 2. De forma similar, Hudson *et al.* (2005) observaron que los bacteriófagos serían estables entre pH 5–8, aunque a bajas temperaturas este rango de pH puede extenderse entre 4–10, existiendo una severa disminución en los títulos bajo pH 3. También Leverentz *et al.* (2001) sugirieron los efectos perjudiciales de los rangos extremos de pH sobre la efectividad de la fagoterapia ya que, tras la infección experimental de cortes de frutas con *S. Enteritidis*, la aplicación de bacteriófagos fue capaz de reducir los recuentos bacterianos sobre cortes de melón (pH 5,8), pero no sobre rebanadas de manzana (pH 4,2).

Aunque algunos bacteriófagos han demostrado ser relativamente resistentes *in vivo* e *in vitro* a rangos de pH ácido, para otros la neutralización del pH gástrico ácido sería esencial para su sobrevivencia tras la administración oral. Al respecto, se ha demostrado que la penetración al torrente sanguíneo por parte de los bacteriófagos es mucho menos efectiva desde el estómago que desde otras secciones del tracto gastrointestinal (Dabrowska *et al.*, 2005).

Koo *et al.* (2001) determinaron la viabilidad de 3 cepas de *Vibrio vulnificus* y fagos específicos a ellas, durante la exposición a un completo modelo mecánico gastrointestinal por 9 horas a 37 °C, con o sin la administración de antiácidos (hidróxido de aluminio e hidróxido de magnesio). Sin la administración de antiácidos, los bacteriófagos fueron completamente eliminados dentro de 45 minutos en el compartimiento gástrico (disminución de pH de 5,1 a 2,5) y disminuyeron casi 2 log<sub>10</sub> UFP/mL después de 9 horas en el compartimiento intestinal (pH 7). Por el contrario, con la administración de antiácidos, los títulos iniciales de bacteriófagos sufrieron una ligera disminución (menor a 1 log<sub>10</sub> UFP/mL) después de 2 horas en el compartimiento gástrico (disminución de pH de 7,7 a 6,0) y una disminución menor a 1 log<sub>10</sub> UFP/mL después de 9 horas en el compartimiento intestinal (pH 7,6). Además, en forma comparativa a sus respectivas bacterias hospederas, los bacteriófagos estudiados mostraron una mayor ácido-resistencia en el compartimiento gástrico.

De forma similar, Smith *et al.* (1987) demostraron que la adición de carbonato de calcio a suero de leche inoculado con bacteriófagos líticos contra *E. coli* enteropatógena, mejoró la sobrevivencia de los fagos, de modo que su número en el intestino delgado de terneras, 5 ó 10 horas después de su ingesta fue, aproximadamente, 4 ó 5 veces mayor respecto a los grupos controles sin antiácido en el lactosuero. En este mismo estudio, se demostró que el tiempo de sobrevivencia de los bacteriófagos a 37 °C en suero lácteo a pH 2 fue de 0,5–5 minutos, comparado a los 5–60 minutos de sobrevivencia de la bacteria hospedera, sugiriendo que, al contrario del estudio de Koo *et al.* (2001), los bacteriófagos utilizados fueron menos ácido-resistentes que sus respectivas bacterias hospederas.

Aún cuando la mayoría de los estudios efectuados en pollos no tomaron en cuenta este factor dentro del diseño experimental, otros autores si consideraron importante la administración de soluciones antiácidas junto a los bacteriófagos. Al respecto, Higgins *et al.* (2007), en pavos de 2 días de edad, administraron 0,25 mL de hidróxido de magnesio 5 mM por vía oral, 30 minutos antes de la administración oral de los bacteriófagos (administrados 48 horas post infección con *S. Enteritidis*), los cuales además fueron asociados a 0,25 mL de hidróxido de magnesio 1 mM. Los resultados mostraron que el grupo que recibió sólo bacteriófagos no logró reducir los recuentos bacterianos cecales, a diferencia del grupo que recibió la fagoterapia asociada a antiácidos, donde se obtuvieron reducciones menores a 1 log<sub>10</sub> UFC/g en los recuentos a las 6, 12 y 24 horas post infección, aunque estas diferencias no fueron significativas

respecto al grupo control de infección sin fagoterapia. También Atterbury *et al.* (2007) asociaron la fagoterapia a un antiácido (carbonato de calcio) en pollos broiler de aproximadamente 1 mes de vida, logrando reducir la colonización cecal de *S. Enteritidis* por sobre  $4,2 \log_{10}$  UFC/g y de *S. Typhimurium* por sobre  $2,9 \log_{10}$  UFC/g, dentro de 24 horas, respecto a sus respectivos grupos controles. No obstante, estos autores no consideraron en el diseño experimental la presencia de grupos controles sin antiácidos, con los cuales realizar una comparación objetiva.

Estudios realizados sobre 2 de los bacteriófagos utilizados en esta experiencia (IF1 y *f*18), trabajados en un gradiente de pH, mostraron que los títulos iniciales de ambos (levemente mayores a  $10^9$  UFP/mL) se mantienen relativamente estables entre pH 7 y 11, disminuyendo levemente a partir de pH 5. A pH 2, los títulos del fago IF1 desaparecen totalmente y los del fago *f*18 disminuyen en  $7 \log_{10}$  UFP/mL aproximadamente <sup>2</sup>.

La mayoría de los investigadores están de acuerdo en que todas las secciones del canal alimenticio de la gallina son generalmente ácidas, con los pH superiores registrados en los intestinos (pH 5,6–7,2) y los inferiores en la molleja (pH 2,0–3,5), aunque se ha demostrado que el pH del tracto digestivo no es estático, sino que cambia continuamente. La mayor acidez de la bilis aviar (pH 5,0–6,8), la mayor secreción de jugo gástrico (8,8 mL por kilogramo de peso corporal por hora) y la mayor concentración de ácido clorhídrico en éste, pueden explicar en parte el pH inferior del tubo digestivo, respecto a los mamíferos. También se ha demostrado que la producción de metabolitos ácidos por parte de la flora microbiana disminuye el pH en el buche, los ciegos y el colon (Sturkie, 1981).

Por el contrario, el pollo joven no tiene la capacidad de producir suficiente ácido clorhídrico como para mantener el pH del tracto digestivo dentro de rangos tan ácidos como la ave adulta, siendo también menor la secreción y actividad enzimática. Además, al momento de nacer el pollo posee un tracto digestivo prácticamente estéril, comenzando el establecimiento de la microflora bacteriana durante los primeros días de vida. Por todo esto, el pH del tracto digestivo en las aves jóvenes se mantiene en un rango aproximado de 5,5–6,0 (Rosales, 2005).

Estas diferencias en las condiciones bioquímicas del tracto digestivo aviar, asociadas a la edad, pueden explicar el éxito de la fagoterapia al ser aplicada en pollos de pocos días de

---

<sup>2</sup> Robeson, J. 2008. [comunicación personal]. Pontificia U. Católica Valparaíso, Instituto Biología.



vida (Huff *et al.*, 2003; Huff *et al.*, 2005; Toro *et al.*, 2005; Atterbury *et al.*, 2007; Filho *et al.*, 2007; Borie *et al.*, 2008a; Borie *et al.*, 2008b; Borie *et al.*, 2009). Así mismo, las condiciones extremas presentes en el tracto digestivo de las aves adultas, considerando además el comportamiento de los bacteriófagos utilizados a los rangos de pH ácido, explicarían la poca efectividad de la fagoterapia oral obtenida en este estudio, ya que la sobrevivencia de los bacteriófagos en el tracto digestivo de aves adultas sería insuficiente como para reducir en forma significativa los recuentos de *S. Enteritidis*.

Por otra parte, la temperatura típica de las gallinas se encuentra entre 40,6–42 °C, es decir, tan solo 3–5 °C por debajo del nivel en el cual las proteínas empiezan a desnaturalizarse. Al nacimiento, la temperatura corporal del pollo es de 37,6 °C, bastante menor respecto a las aves adultas, y sólo a partir de los 22–35 días de vida su temperatura corporal aumenta hasta estabilizarse en 41–42 °C (Estrada y Márquez, 2005).

Los estudios realizados a los fagos IF1 y f18 mostraron una reducción en el porcentaje de bacteriófagos activos entre un 10–60% al ser sometidos a una temperatura de 45 °C, respecto a sus niveles basales a 37 °C<sup>3</sup>. Por lo tanto, la temperatura interna de las aves adultas también pudo reducir la sobrevivencia de los bacteriófagos en el organismo y, por lo tanto, limitar el éxito de la fagoterapia. Al contrario, este factor no habría limitado el éxito obtenido en aves jóvenes, ya que la mayoría de los estudios han utilizado pollos menores de 20 días de edad (Huff *et al.*, 2003; Huff *et al.*, 2005; Toro *et al.*, 2005; Atterbury *et al.*, 2007; Filho *et al.*, 2007; Borie *et al.*, 2008a; Borie *et al.*, 2008b; Borie *et al.*, 2009).

En el presente estudio, también es posible que algún porcentaje de *S. Enteritidis* en los ciegos no estuviera en crecimiento, o bien, estuviera en un estado fisiológico en el cual no expresan receptores para bacteriófagos a la misma tasa a la cual lo hacen en su crecimiento exponencial en medios líquidos. Al respecto, Poulsen *et al.* (1995) señalaron que *E. coli* BJ4 existe en dos subpoblaciones en el intestino grueso de ratones. La población asociada al *mucus* intestinal crece a un tiempo de generación estimado de 40 a 80 minutos, mientras que la población en el lumen intestinal se mantiene esencialmente estática. Si una situación similar pudiera aplicarse a *Salmonella*, las bacterias en el lumen no serían hospederos productivos para los fagos debido a su crecimiento limitado, lo que implica una menor síntesis de receptores

---

<sup>3</sup> Robeson, J. 2008. [comunicación personal]. Pontificia U. Católica Valparaíso, Instituto Biología.

de superficie y de batería enzimática replicativa. Por otra parte, las bacterias de crecimiento rápido, asociadas al *mucus* intestinal, estarían rodeadas por un medio viscoso que limitaría la difusión de los fagos. Joerger (2003) también describe que la viscosidad del contenido intestinal parece disminuir la probabilidad de colisiones entre bacterias y bacteriófagos; adicionalmente, el gran número de bacterias presentes en ciertos segmentos del tracto intestinal podría ser una barrera mecánica para la difusión de los fagos, por cierto menos marcada en aves jóvenes. No obstante, es presumible que el efecto físico de estas barreras podría compensarse, en parte, aumentando la cantidad numérica de los fagos administrados. De hecho, la aplicación de fagoterapia necesariamente requiere de multiplicidades de infección (MOI) altas.

En este estudio, la elección de una MOI de  $10^3$  UFP fue sustentada por trabajos previos realizados a nivel nacional, los cuales utilizando la misma cepa bacteriana, obtuvieron exitosos resultados usando estas proporciones bacteriófago–bacteria en aves de corta edad (Albala, 2007; Borie *et al.*, 2008a; Borie *et al.*, 2008b; Borie *et al.*, 2009). Así mismo, elevadas multiplicidades de infección ( $10^3$ – $10^5$  UFP) han sido utilizadas contra diversas bacterias patógenas a nivel internacional, tales como *E. coli*, *S. Enteritidis*, *S. Typhimurium* y *C. jejuni*, en modelos animales y en la industria alimentaria (Modi *et al.*, 2001; Fiorentin *et al.*, 2005a; Fiorentin *et al.*, 2005b; Higgins *et al.*, 2005; Huff *et al.*, 2005; Atterbury *et al.*, 2007; Filho *et al.*, 2007; Bigwood *et al.*, 2008).

No existen estudios similares realizados en aves adultas, con los cuales comparar objetivamente este parámetro, aunque probablemente la utilización de una MOI mayor podría arrojar resultados más exitosos. No obstante, las capacidades técnicas de esta investigación, así como las limitaciones fisiológicas del modelo animal utilizado, hicieron imposible obtener una MOI mayor a  $10^3$  UFP (es decir, lograr una concentración de bacteriófagos mayor a  $10^{11}$  UFP/dosis en un volumen tolerado por las aves), debido a la elevada dosis bacteriana necesaria para la infección de las gallinas (mayor a  $10^8$  UFC/dosis/ave).

Otra posible explicación para la falta de eficacia de la fagoterapia aplicada en este estudio, es la adquisición de resistencia a los fagos por parte de la población bacteriana blanco (Higgins *et al.*, 2007). La exposición de una población bacteriana relativamente grande a la acción de bacteriófagos podría llevar a la selección de bacterias resistentes a éstos, particularmente si la fagoterapia es sustentada sólo sobre una especie fágica. La fago–

resistencia puede surgir por múltiples vías; algunos mecanismos se basan en la mutación de genes existentes en la bacteria, mientras que otros genes son adquiridos desde el material genético de otras bacterias o bacteriófagos, resultando en modificaciones fenotípicas de los receptores utilizados por los fagos para su unión a la célula hospedera (Levin y Bull, 2004). Aún cuando el fenómeno de resistencia bacteriana no fue comprobado en este estudio, es poco probable que haya ocurrido, debido a la utilización de una mezcla de 3 bacteriófagos, lo cual disminuye enormemente la posibilidad de adquisición de resistencia por parte de la población bacteria blanco a todos los fagos en forma simultánea (Borysowski *et al.*, 2006).

La falta o pérdida de especificidad de hospedero por parte de los bacteriófagos, también podría explicar la poca efectividad obtenida en algunos estudios de fagoterapia (Higgins *et al.*, 2007). No obstante, Robeson *et al.* (2008) describieron la capacidad lítica de los 3 fagos usados en este estudio, demostrándose su especificidad y estrecho rango de hospedero, infectando eficientemente sólo cepas de *S. Enteritidis* y algunos otros pocos serotipos del género, siendo incapaces de lisar bacterias entéricas de la microflora normal proveniente de aves sana.

Respecto al estudio bacteriológico de huevos, durante esta experiencia no fue posible detectar *S. Enteritidis* en ninguna de las muestras procesadas. Sin embargo, se logró aislar la bacteria desde un conjunto de huevos internos (recolectados directamente desde el oviducto durante la necropsia de las aves), provenientes del grupo control de infección.

Estos resultados coinciden con varios estudios realizados previamente a nivel internacional. Por ejemplo, Barrow y Lovell (1991) infectaron gallinas ponedoras por vía intravenosa con *S. Enteritidis* PT4 ( $10^5$ – $10^6$  UFC/dosis/ave), no logrando aislar la bacteria de un total de 810 huevos. En un segundo ensayo, los autores administraron la bacteria por vía oral ( $10^8$  UFC/dosis/ave), logrando sólo un 0,3% de infección en el contenido de los huevos; sin embargo, este porcentaje de infección se elevó a un 6% cuando se consideró el huevo completo (incluyendo la cáscara). Ya que obtuvieron un 30% de infección ovárica, pero muy pocos huevos contaminados al no considerar la cáscara, los autores concluyeron que la contaminación de los huevos fue producida principalmente por la deposición de la bacteria sobre la cáscara de los huevos.

Shivaprasad *et al.* (1990) infectaron gallinas de 18 meses de edad con *S. Enteritidis*, por vía oral ( $4 \times 10^8$  UFC/dosis/ave) e intravenosa ( $2 \times 10^8$  UFC/dosis/ave), no lográndose el aislamiento de la bacteria desde el contenido de los huevos muestreados (sólo yemas), aunque fue detectada en 2 cáscaras. En una segunda experiencia, los autores infectaron gallinas de 18 meses de edad por vía oral ( $10^4$  UFC/dosis/ave), intravenosa ( $10^6$  UFC/dosis/ave) e intracloual ( $5 \times 10^7$  UFC/dosis/ave), no logrando aislar la bacteria desde el contenido (albúmina y yema) de los huevos recolectados, aunque fue detectada en la cáscara de 8–10 huevos en cada grupo experimental. Keller *et al.* (1995) tampoco lograron el aislamiento de *S. Enteritidis* desde el contenido de huevos frescos hasta los 20 días post infección, tras inocular gallinas de 23–25 semanas con  $10^8$  UFC/dosis/ave, por vía oral.

Una visión distinta ha sido propuesta por varios estudios donde la infección experimental de aves adultas ha generado la oviposición de un significativo número de huevos contaminados en su interior, aunque sólo por un limitado período de tiempo tras la inoculación. Gast y Beard (1990a) inocularon oralmente aves adultas con *S. Enteritidis* fagotipo 13a (PT13a) ( $10^9$  UFC/dosis/ave); durante las primeras 4 semanas de estudio, la bacteria fue aislada, en forma excepcional, desde el 10% de las cáscaras, el 19% de las albúminas y el 16% de las yemas, detectándose la contaminación interna hasta el día 23 post inoculación. Tendencias similares han sido observadas en varios estudios, aunque la producción de huevos contaminados, en la mayoría de los ensayos, ha sido relativamente baja. Timoney *et al.* (1989) infectaron gallinas por vía oral con *S. Enteritidis* PT4 ( $10^6$  UFC/dosis/ave), aislando la bacteria a una frecuencia levemente mayor al 1% en yemas y albúminas desde los días 2–13 post inoculación.

La ausencia de positividad a *Salmonella* en todos los conjuntos de huevos frescos ovipuestos por las aves, pudo explicarse por la baja invasividad de la cepa bacteriana utilizada. Información complementaria al estudio mostró que la cepa desafío, a la dosis utilizada, sólo logró un 43,33% de infección en tejidos reproductivos (ovario y/o oviducto) en el grupo control de infección, a pesar de lograr un 100% de infección a nivel cecal<sup>4</sup>.

Borie *et al.* (2008a) utilizando la misma cepa de este estudio en pollos SPF de 10 días, a una dosis de  $9,6 \times 10^5$  UFC/dosis/ave, lograron un 77,2% de infección en órganos internos (“pool” de corazón, hígado y bazo) con un 100% de infección intestinal. Además, utilizando la

---

<sup>4</sup> Borie, C. 2008. [comunicación personal]. U. Chile, Fac. Cs. Veterinarias y Pecuarias.

misma cepa bacteriana a una dosis de  $2,95 \times 10^5$  UFC/dosis/ave, los autores obtuvieron un 62% de infección en órganos internos, con un 100% de infección cecal, en pollas White–Leghorn de 7 días (Borie *et al.*, 2009). Los resultados de estos autores corroboran la baja invasividad de la cepa bacteriana utilizada, al ser comparada con otros estudios donde se ha conseguido hasta un 100% de infección en órganos internos (Fiorentin *et al.*, 2005b).

Según Gast *et al.* (2003a), las cepas de *S. Enteritidis* pueden ser adaptadas a los órganos reproductivos de la gallina a través de una serie de pasajes *in vivo* y el posterior reaislamiento desde los tejidos reproductivos, logrando esto una mayor eficiencia de infección en órganos reproductivos y huevos. No obstante, estudios realizados en el Laboratorio de Bacteriología de la Pontificia Universidad Católica de Valparaíso, demostraron que la cepa bacteriana usada en esta experiencia pierde sensibilidad a la acción de los fagos por sobre el pasaje 9, razón por la cual no se aumentó el número de pasajes <sup>5</sup>.

Existe escasa información sobre los mecanismos de colonización de *S. Enteritidis* en los órganos reproductivos de aves adultas. No obstante, es importante señalar que la capacidad de las distintas cepas de *S. Enteritidis* para colonizar los tejidos reproductivos, no sólo se relaciona con su capacidad de invasión sistémica, sino también con otros factores, no del todo comprendidos, tales como la expresión de determinados factores de virulencia o bien la regulación de los mecanismos de virulencia conocidos; al respecto se ha propuesto la expresión de la fimbria tipo 1 o la composición del lipopolisacárido (LPS) (Guard–Petter, 2001; De Buck *et al.*, 2004b; De Buck *et al.*, 2004c). De hecho, la habilidad de las distintas cepas de *S. Enteritidis* para invadir órganos internos (tales como hígado y bazo) no siempre ha sido correlacionada con una alta frecuencia de contaminación interna de los huevos (Gast y Beard, 1992a). Así mismo, la presencia de este patógeno en los tejidos reproductivos, aún en altos niveles, no es suficiente para garantizar la contaminación de los huevos ovipuestos (Barrow y Lovell, 1991).

También es importante destacar que el diseño de las jaulas experimentales redujo al mínimo la probabilidad de contaminación fecal de la superficie de los huevos, lo cual asociado a su temprano procesamiento (menos de 24 horas post oviposición), disminuyó en forma considerable la probabilidad de contaminación externa y posterior penetración de la bacteria a través de la cáscara.

---

<sup>5</sup> Robeson, J. 2008. [comunicación personal]. Pontificia U. Católica Valparaíso, Instituto Biología.

No obstante, aún cuando no fue posible aislar la bacteria desde el contenido de los huevos, esto no asegura su total esterilidad, ya que usualmente la infección interna de éstos es a muy bajas concentraciones bacterianas (Gast, 2007). Al respecto, Gast y Beard (1992b) reportaron que los recuentos de *S. Enteritidis* en el contenido líquido de huevos ovipuestos por gallinas experimentalmente infectadas, fueron aproximadamente de 6 UFC/mL. También Gast *et al.* (2002) registraron recuentos bacterianos menores a 1 UFC/mL de contenido líquido, en huevos provenientes de gallinas infectadas en forma experimental.

Para favorecer el aislamiento de *S. Enteritidis* en huevos, Gast (2007) recomienda agrupar el contenido de 10–20 huevos para el muestreo, seguido por la incubación en medios de enriquecimiento o suplementos de fierro, para soportar el crecimiento de la población bacteriana a un nivel detectable por los métodos de cultivo tradicional. Además, el autor señala que el método requeriría de varios días para dar por negativa una muestra (incluso más de 7 días).

En el presente estudio, aún cuando las muestras fueron hechas a partir del contenido de 10 huevos y fueron incubadas en medios de enriquecimiento por hasta 72 horas, el método empleado pudo haber sido insuficiente para elevar los bajos recuentos bacterianos iniciales a un nivel detectable bajo el protocolo y capacidades técnicas del laboratorio. Por lo tanto, la sensibilidad del cultivo tradicional de *Salmonella* spp. con la cual se realizó esta experiencia ( $\geq 10^3$  UFC/mL) pudo haber sido insuficiente para detectar recuentos bacterianos tan bajos.

Actualmente existen métodos más rápidos para el diagnóstico de *S. Enteritidis* aplicables en huevos, tales como la hibridación con sondas genéticas o ELISA ("*enzyme-linked immunosorbent assay*"), pero aún no han logrado reemplazar los métodos de cultivo tradicional en la mayoría de los estudios efectuados. Las principales desventajas de estos métodos radican en su alto costo, así como su nivel de sensibilidad comparable a los métodos de cultivo tradicional, por lo cual no logran eliminar el paso de enriquecimiento en medios de cultivo. La reacción de polimerasa en cadena (PCR) muestra un elevado nivel de sensibilidad para el diagnóstico de *S. Enteritidis*, al compararla con los métodos de cultivo tradicional, no obstante, también sería necesario el cultivo en medios de enriquecimiento para obtener resultados seguros; además, su alto costo limita su aplicación a gran escala (Gast, 2007).

Keller *et al.* (1995) indicaron la mayor frecuencia de aislamiento de *S. Enteritidis* desde huevos internos (en formación en el tracto reproductivo), respecto a los huevos ya ovipuestos, en gallinas experimentalmente infectadas. Aún cuando en el presente estudio sólo se obtuvo positividad a partir de una muestra de huevos internos proveniente del grupo control de infección, los resultados no son comparables con la experiencia de Keller *et al.* (1995), ya que estos autores muestrearon los huevos junto a los tejidos oviductales que los contenían; por el contrario, el presente estudio sólo consideró las yemas, albúminas y membranas de la cáscara, así como las cáscaras en depósito dentro del útero, separándolos completamente del tejido oviductal asociado. No obstante, es muy probable que la presencia de anticuerpos, enzimas antibacterianas, secuestradores de hierro e inhibidores de proteasas bacterianas, en la yema y albúmina, sean altamente capaces de controlar el desarrollo de *S. Enteritidis* dentro del huevo antes que la cáscara sea completamente depositada y el huevo ovipuesto (Kim *et al.*, 1989; Humphrey *et al.*, 1991; Keller *et al.*, 1995).

La edad de las gallinas continúa siendo un factor poco claro en la incidencia de infección de los huevos, aunque sería un factor importante para la penetración de *S. Enteritidis* a través de la cáscara. Al respecto, la mayoría de los estudios demuestran que la edad del ave afecta considerablemente la calidad de la cáscara (determinada mediante gravedad específica, peso y grosor), la cual se deteriora conforme avanza la edad del lote de gallinas, favoreciendo la penetración bacteriana. Es así como Sauter y Petersen (1974), tras sumergir huevos en una solución con *Salmonella* a una concentración de  $10^4$  UFC/mL, hallaron una contaminación promedio de 47,5%, 21,4% y 10% para varias salmonelas, en huevos con cáscara de calidad baja, intermedia y excelente (gravedad específica de 1.070, 1.080 y 1.090, respectivamente).

Debido a la pérdida de calidad de la cáscara con la edad de las gallinas, se incrementa el número de huevos agrietados. Así mismo, la presencia de grietas en la cáscara es el factor más fuertemente correlacionado con la penetración bacteriana a través de ella; al respecto, Messens *et al.* (2005b) demostraron que el 93% de los huevos agrietados desafiados fueron penetrados por *S. Enteritidis*. Por otra parte, la deposición de cutícula sobre la cáscara también ha mostrado disminuir conforme avanza la edad del lote de aves (Sparks y Board, 1984; Messens *et al.*, 2005b), permitiendo la exposición de un mayor número de poros, los cuales podrían eventualmente ser sitios de penetración bacteriana. Al respecto, Alls *et al.* (1964) demostraron que la remoción química de la cutícula incrementa la contaminación bacteriana en

un 40%. En forma similar, De Reu *et al.* (2006) demostraron que la deposición de cutícula es menor en las cáscaras de huevo penetradas por bacterias, respecto a las cáscaras no penetradas ( $p < 0,001$ ). También la porosidad de la cáscara se incrementa con la edad de la gallina, sin embargo, aún cuando los poros representan portales de entrada para diversos microorganismos, la penetración bacteriana no ha sido correlacionada con el número de poros en la mayoría de los estudios (Nascimento *et al.*, 1992; Messens *et al.*, 2005a).

Hasta la fecha, los estudios realizados para evaluar el efecto de la edad de la gallina sobre la contaminación bacteriana del huevo han sido poco claros, y no siempre han mostrado correlacionarse de forma lógica. Por ejemplo, Humphrey *et al.* (1989) inocularon gallinas de 18 semanas de edad con *S. Enteritidis* PT4 ( $10^6$  UFC/dosis/ave), logrando la producción de huevos contaminados en su interior por 30 días post inoculación, a una frecuencia promedio del 1%; no obstante, el mismo protocolo de infección en aves de 52 semanas de edad, no logró la producción de huevos contaminados. De forma similar, Gast *et al.* (2004) desafiaron gallinas de 28 y 33 semanas de edad con *S. Enteritidis* ( $1,5 \times 10^9$  UFC/dosis/ave), logrando hasta un 7,05% de aislamiento desde el contenido de los huevos, mientras que, un año después, inocularon gallinas de 30 y 42 semanas de edad con la misma dosis, obteniendo hasta un 8,84% de aislamiento desde huevos internos (Gast *et al.*, 2005).

Sin embargo, otros estudios han demostrado la mayor contaminación de los huevos conforme aumenta la edad de las aves. Nascimento *et al.* (1992), demostraron un aumento en la penetración de *S. Enteritidis* a través de la cáscara desde un 12,9% (al inicio de la postura) hasta un 25% (al final de la postura), tras sumergir los huevos en una suspensión con  $3 \times 10^3$  UFC/mL. De Reu *et al.* (2006) observaron un leve incremento en la contaminación de huevos enteros desde un 13, 13 y 15% a las semanas 34, 46 y 60, hasta un 26 y 20% en las semanas 69 y 74, respectivamente, tras la inmersión de los huevos durante 1 minuto en una solución con varias especies bacterianas a una concentración de  $10^5$ – $10^6$  UFC/mL. También Jones *et al.* (2002), tras sumergir los huevos en una solución con *S. Enteritidis* ( $10^6$  UFC/mL) durante 10 segundos e incubarlos a 26 °C por 5 semanas, demostraron que la contaminación bacteriana de la cámara de aire, membranas de la cáscara y el contenido del huevo, fue más frecuente en huevos provenientes de aves de 84 semanas, respecto a los huevos ovipuestos por aves menores de 58 semanas.



No obstante, es importante destacar que la mayoría de los estudios dedicados a evaluar la penetración bacteriana a través de la cáscara, consideran en sus protocolos la selección de huevos con buena calidad de cáscara, desechando todos aquellos que presentan anomalías o grietas, tras su evaluación visual simple y a través de ovoscopía. Por lo tanto, estos estudios podrían estar subestimando la penetración bacteriana en huevos provenientes de aves viejas, por lo cual sus resultados deben ser discutidos con discreción.

Durante la experiencia, el porcentaje de postura gallina/día mostró un incremento en el tiempo, siendo mayor hacia el final del estudio respecto al comienzo del mismo. Esta diferencia estadística ( $p < 0,05$ ) pudo deberse a la edad de las gallinas al momento del estudio, cercana al *peak* de postura (aproximadamente a las 24 semanas de edad; Hy-Line International, 2009), por lo cual es esperable un incremento de la postura en la medida que se acercan a esta edad.

Al analizar el porcentaje de postura gallina/día previo al desafío bacteriano (promediado durante los 3 días previos a la infección), no se hallaron diferencias estadísticas entre ambos grupos, siendo de un 85,56% para el grupo control de infección y de un 83,33% para el grupo tratado con bacteriófagos ( $p = 0,7415$ ). No obstante, al comparar este parámetro luego del desafío bacteriano (promediado durante los 10 días posteriores a la infección), se comprobó que el porcentaje de postura fue significativamente menor en el grupo control de infección (87,67%), respecto al grupo tratado con fagos (97,33%) ( $p = 0,0054$ ).

En la mayoría de los estudios, la infección con *S. Enteritidis* no ha sido asociada a consecuencias productivas ni efectos clínicos en aves maduras. Es así como Timoney *et al.* (1989) y Humphrey *et al.* (1989) inocularon gallinas por vía oral con *S. Enteritidis* PT4 ( $10^6$  UFC/dosis/ave) y aunque la bacteria fue aislada en la mayoría de los ovarios y oviductos de las aves, la producción total de huevos no fue afectada, así como tampoco se observaron signos clínicos ni lesiones. Shivaprasad *et al.* (1990) desafiaron a gallinas por vía oral con *S. Enteritidis* fagotipo 8 ( $10^6$  UFC/dosis/ave), tampoco mostrando éstas efectos clínicos o productivos evidentes. En forma similar, Keller *et al.* (1995) infectaron oralmente gallinas ponedoras de 23 a 25 semanas de edad con *S. Enteritidis* ( $10^8$  UFC/dosis/ave), no observando cambios de comportamiento ni efectos clínicos o productivos en las aves inoculadas.

Por el contrario, en otros estudios la infección de gallinas con *S. Enteritidis* ha disminuido significativamente la producción de huevos. Gast y Beard (1990a) desafiaron por vía oral a gallinas de 27 a 62 semanas de edad con *S. Enteritidis* PT13a ( $10^9$  UFC/dosis/ave), con lo cual disminuyó por varias semanas la producción de huevos en un 10–30%. Shivaprasad *et al.* (1990) inocularon gallinas por vía intravenosa con *S. Enteritidis* ( $2 \times 10^8$  UFC/dosis/ave), observándose una fuerte disminución en la producción de huevos por 14 días, la cual sólo se normalizó a los 42 días post infección. También Barrow y Lovell (1991) desafiaron gallinas por vía intravenosa con *S. Enteritidis* PT4 ( $10^5$  UFC/dosis/ave), con lo cual disminuyó la producción de huevos en un 10% y sólo fue normalizada 4 semanas post infección.

Parker *et al.*, han observado que algunas cepas de *S. Enteritidis* que producen lipopolisacárido (LPS) de alto peso molecular (HMM–LPS) podrían alterar la funcionalidad del tracto reproductivo de las gallinas bajo ciertas circunstancias. Aunque los pollos son inusualmente resistentes al efecto deletéreo del LPS, comparado con algunos mamíferos, estos autores demostraron que tras la inoculación subcutánea de *S. Enteritidis* ( $10^8$  UFC/dosis/ave), el HMM–LPS indujo la involución del tracto reproductivo de las gallinas. Además, notaron que las cáscaras de los huevos ovipuestos por las gallinas desafiadas fueron más delgadas de lo normal, obteniéndose a veces huevos descalcificados (Parker *et al.*, 2001; Parker *et al.*, 2002).

Resultados adicionales obtenidos en el presente estudio, mostraron que la incidencia de infección y los recuentos de *S. Enteritidis* en tejidos reproductivos fueron mayores en el grupo control de infección, respecto al grupo tratado con bacteriófagos, siendo estos resultados estadísticamente diferentes a nivel del ovario ( $p = 0,0489$ )<sup>6</sup>. Además, después del desafío bacteriano se obtuvieron 4 huevos descalcificados y 1 huevo macroscópicamente contaminado en el grupo control de infección, no observándose estas alteraciones en el grupo tratado con bacteriófagos. En base a todos estos datos, y considerando la ausencia de manifestaciones clínicas en las aves infectadas, es probable que la menor producción de huevos en el grupo control de infección se haya relacionado con la mayor infección de *S. Enteritidis* a nivel de los tejidos reproductivos. Estas diferencias productivas no fueron observadas en el grupo tratado con bacteriófagos, ya que como fue comprobado, mostró una menor incidencia de infección y menores recuentos bacterianos a nivel reproductivo, probablemente debido al efecto protector de la fagoterapia sobre estos tejidos, disminuyendo la infección de *S. Enteritidis*.

---

<sup>6</sup> Borie, C. 2008. [comunicación personal]. U. Chile, Fac. Cs. Veterinarias y Pecuarias.

Es importante señalar que no se logró aislar *S. Enteritidis* en las aves que no recibieron la cepa desafío ni fagoterapia (control sano), así como tampoco en aquellas que sólo recibieron la fagoterapia (control inocuidad de bacteriófagos), con lo cual se descarta la posibilidad de contaminación cruzada entre los grupos experimentales. Por otra parte, los bacteriófagos resultaron inocuos en las aves que sólo recibieron la fagoterapia, no mostrando cambios conductuales durante la experiencia, ni lesiones macroscópicas al momento de la necropsia. Con esto se comprueba la inocuidad de los fagos en organismos mayores, como ya ha sido documentado en otros ensayos realizados en seres humanos y animales (Sulakvedize *et al.*, 2001; Summers, 2001; Borysowski *et al.*, 2006; Skurnik y Strauch, 2006; Fortuna *et al.*, 2008).

Los resultados del presente estudio demuestran que, bajo el modelo experimental utilizado, los bacteriófagos no fueron capaces de reducir en forma significativa la colonización cecal de *S. Enteritidis* en gallinas de postura. Sin embargo, dados los buenos resultados obtenidos a nivel nacional e internacional en aves jóvenes, sería importante identificar e investigar aquellos posibles factores que limitaron la efectividad de la fagoterapia en gallinas de postura, dada su importancia epidemiológica en los brotes de salmonelosis producidos en la población humana. En un futuro próximo, en la medida que la fagoterapia en aves adultas sea perfeccionada, podría proyectarse como una herramienta adicional para el control de la salmonelosis en la industria avícola y, consecuentemente, en la población humana.

Por último, cabe señalar que aún se requiere investigación adicional para evaluar la aplicabilidad de la fagoterapia contra otras bacterias patógenas y sobre otros modelos animales, incluyendo el ser humano, con el objetivo de ampliar las opciones profilácticas y terapéuticas actualmente existentes, particularmente contra aquellas bacterias patógenas donde las medidas aplicadas han resultado insuficientes para su adecuado control.

## CONCLUSIONES

1. La dosis mínima infectante establecida para la cepa *Salmonella* Enteritidis *nal<sup>r</sup> rif* pasaje 9, administrada por vía oral en gallinas de postura Hy-Line Brown de 22 semanas de edad, fue de  $2,4 \times 10^8$  UFC/dosis/ave.
2. La mezcla de bacteriófagos líticos administrada en forma profiláctica por vía oral, no logró reducir la incidencia de infección cecal en gallinas de postura experimentalmente infectadas con *S. Enteritidis*.
3. La mezcla de bacteriófagos líticos administrada en forma profiláctica por vía oral, no logró reducir los recuentos bacterianos de *S. Enteritidis* a nivel cecal en forma significativa ( $p = 0,0961$ ).
4. No se logró establecer la incidencia de infección de *S. Enteritidis* en huevos frescos provenientes de gallinas de postura experimentalmente infectadas.

## BIBLIOGRAFÍA

**ACHA, P. N., SZYFRES, B.** 2001. Salmonelosis. *In*: Publicación científica y técnica No. 580. Zoonosis y enfermedades transmisibles comunes al hombre y a los animales. Volumen I: bacteriosis y micosis. Organización Panamericana de la Salud. Washington, DC. EUA. 416 p.

**ALBALA, I.** 2007. Biocontrol de *Salmonella* Enteritidis en aves mediante el uso de bacteriófagos. Memoria Título Médico Veterinario. Santiago, Chile. U. Chile, Fac. Cs. Veterinarias y Pecuarias. 53 p.

**ALEXANDRE, M., POZO, C., GONZÁLEZ, V., MARTINEZ, 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. Chile*. 128 (10): 1075–1083.

**ALLS, A. A., COVER, M. S., BENTON, W. J., KRAUSS, W. C.** 1964. Factors affecting permeability and a visual detection of drug absorption. *Avian Dis.* 8 (2): 245–256.

**ATTERBURY, R., J., CONNERTON, P. L., DODD, C. E. R., REES, C. E. D., CONNERTON, I. F.** 2003. Application of host-specific bacteriophages to the surface of chicken skin leads to a reduction in recovery of *Campylobacter jejuni*. *Appl. Environ. Microbiol.* 69 (10): 6302–6306.

**ATTERBURY, R. J.** 2006. The age of phage. *Poult. Int.* 45: 18–22.

**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.

**BARROW, P. A., LOVELL, M. A.** 1991. Experimental infection of egg-laying hens with *Salmonella enteritidis* phage type 4. *Avian Pathol.* 20 (2): 335–348.

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

**BIGWOOD, T., HUDSON, J. A., BILLINGTON, C., CAREY–SMITH, G. V., HEINEMANN, J. A.** 2008. Phage inactivation of foodborne pathogens on cooked and raw meat. *Food Microbiol.* 25 (2): 400–406.

**BOARD, R. G., HALLS, N. A.** 1973. The cuticle: a barrier to liquid and particle penetration of the shell of the hen's egg. *Br. Poult. Sci.* 14: 69–97.

**BORIE, C., ALBALA, I., SÁNCHEZ, P., SÁNCHEZ, M. L., RAMÍREZ, S., NAVARRO, C., MORALES, M. A., RETAMALES, J., ROBESON, J.** 2008a. Bacteriophage treatment reduces *Salmonella* colonization of infected chickens. *Avian Dis.* 52: 64–67.

**BORIE, C., ZURITA, P., SÁNCHEZ, M. L., ROJAS, V., SANTANDER, J., ROBESON, J.** 2008b. 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., SÁNCHEZ, M. L., NAVARRO, C., RAMÍREZ, S., MORALES, M. A., RETAMALES, J., ROBESON, J.** 2009. Aerosol spray treatment with bacteriophages and competitive exclusion reduces *Salmonella* Enteritidis infection in chickens. *Avian Dis.* 53: en prensa.

**BORYSOWSKI, J., WEBER–DĄBROWSKA, B., GÓRSKI, A. J.** 2006. Current status and perspectives of phage therapy. *Adv. Clin. Exp. Med.* 15 (4): 575–580.

**BOYLE, E. C., BISHOP, J. L., GRASS, G. A., FINLAY, B. B.** 2007. *Salmonella*: from pathogenesis to therapeutics. *J. Bacteriol.* 189 (5): 1489–1495.

**BRICEÑO, L., NARVÁEZ, C. A., RODAS, A., WITTUM, T. E., HOET, A. E.** 2007. Resistencia a las fluoroquinolonas y otros antimicrobianos en cepas de *Salmonella spp.* aisladas en el procesamiento de pollo entero. *Rev. Cient. (Maracaibo)* 17 (5): 521–528.

**BYRD, J. A., ANDERSON, R. C., CALLAWAY, T. R., MOORE, R. W., KNAPE, K. D., KUBENA, L. F., ZIPRIN, R. L., NISBET, D. J.** 2003. Effect of experimental chlorate product administration in the drinking water on *Salmonella typhimurium* contamination of broilers. *Poult. Sci.* 82 (9): 1403–1406.

**CARRERA, M. R.A., KAUFMANN, G. F., MEE, J. M., MEIJLER, M. M., KOOB, G. F., JANDA, K. D.** 2004. Treating cocaine addiction with viruses. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 101 (28): 10416–10421.

**CARRILLO, C., ATTERBURY, R. J., EL-SHIBINY, A., CONNERTON, P. L., DILLON, E., SCOTT, A., CONNERTON, I. F.** 2005. Bacteriophage therapy to reduce *Campylobacter jejuni* colonization of broiler chickens. *Appl. Environ. Microbiol.* 71 (11): 6554–6563.

**COVACEVIC, G., ESNAOLA, V. M.** 2008. Evolución del consumo de huevos. In: Producción de huevos (situación actual y perspectivas). Oficina de Estudios y Políticas Agrarias, ODEPA. Ministerio de Agricultura. Gobierno de Chile. Santiago, Chile. 23 p.

**COX, N. A., BERRANG, M. E., CASON, J. A.** 2000. *Salmonella* penetration of egg shells and proliferation in broiler hatching eggs – a review. *Poult. Sci.* 79 (11): 1571–1574.

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

**DARWIN, K. H., MILLER, V. L.** 1999. Molecular basis of the interaction of *Salmonella* with the intestinal mucosa. *Mol. Microbiol. Rev.* 12: 405–428.

**DAVIES, R., BRESLIN, M.** 2004. Observations on *Salmonella* contamination of eggs from infected commercial laying flocks where vaccination for *Salmonella enterica* serovar Enteritidis had been used. *Avian Pathol.* 33: 133–144.

**DE BUCK, J., PASMANS, F., VAN IMMERSEEL, F., HAESBROUCK., DUCATELLE, R.** 2004a. Tubular glands of the isthmus are the predominant colonization site of *Salmonella* Enteritidis in the upper oviduct of laying hens. *Poult. Sci.* 83: 352–358.

**DE BUCK, J., VAN IMMERSEEL, F., HAESEBROUCK., DUCATELLE, R.** 2004b. Effect of type 1 fimbriae of *Salmonella enterica* serotype Enteritidis on bacteraemia and reproductive tract infection in laying hens. *Avian Pathol.* 33 (3): 314–320.

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

**DE LOUVOIS, J.** 1993. *Salmonella* contamination of eggs: a potential source of human salmonellosis: a report of the public Health Laboratory aservice survey of imported and home–produced egg. *PHLS Microbiol. Digest* 10: 158–162.

**DE REU, K., GRIJSPEERDT, K., MESSENS, W., HEYNDRIKX, M., UYTENDAELE, M., BEBEVERE, J., HERMAN., L.** 2006. Eggshell factors influencing eggshell penetration and whole egg contamination by different bacteria, including *Salmonella enteritidis*. *Int. J. Food Microbiol.* 112: 253–260.

**ESTRADA, M. M., MÁRQUEZ, S. M.** 2005. Interacción de los factores ambientales con la respuesta del comportamiento productivo en pollos de engorde. *Rev. Col. Cienc. Pec.* 18 (3): 246–257.

**FDA. FOOD AND DRUG ADMINISTRATION.** 2006. Food additives permitted for direct addition to food for human consumption; bacteriophage preparation. *Fed. Regist.* 71: 47729–47732.

**FICA, C., ALEXANDRE, S., PRAT, M., FERNANDEZ, A., FERNANDEZ, 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. M., VERDUGO, A.** 2005. Mecanismos moleculares de patogenicidad de *Salmonella* sp. *Rev. Latinoam. Microbiol.* 47 (1–2): 25–42.



**FIGUEROA, J. E.** 2007. Descripción y análisis de las acciones realizadas por los servicios públicos (salud animal y salud pública), frente a salmonelosis humana. Memoria Título Médico Veterinario. Santiago, Chile. U. Chile, Fac. Cs. Veterinarias y Pecuarias. 98 p.

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

**FIORENTIN, L., VIEIRA, N., BARIONI, W.** 2005a. Use of lytic bacteriophages to reduce *Salmonella* Enteritidis in experimentally contaminated chicken cuts. *Braz. J. Poult. Sci.* 7 (4): 255–260.

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

**FORTUNA, W., MIĘDZYBRODZKI, R., WEBER-DĄBROWSKA, B., GÓRSKI, A.** 2008. Bacteriophage therapy in children: Facts and prospects. *Med. Sci. Monit.* 14 (8): 126–132.

**FROMM, D.** 1959. A rapid method for the determination of egg shell permeability. *Poult. Sci.* 38: 171–173.

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

**GAST, R. K., BEARD, C. W.** 1990b. Isolation of *Salmonella enteritidis* from internal organs of experimentally infected hens. *Avian Dis.* 34: 991–993.

**GAST, R. K., BEARD, C. W.** 1992a. Evaluation of a chick mortality model for predicting the consequences of *Salmonella enteritidis* infections in laying hens. *Poult. Sci.* 71: 281–287.

**GAST, R. K., BEARD, C. W.** 1992b. Detection and enumeration of *Salmonella enteritidis* in fresh and stored eggs laid by experimentally infected hens. *J. Food Prot.* 55: 152–156.

**GAST, R. K., BEARD, C. W.** 1993. Recovery of *Salmonella enteritidis* from inoculated pools of eggs contents. *J. Food Prot.* 56: 21–24.

**GAST, R. K., HOLT, P. S.** 2000. 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: 569–563.

**GAST, R. K., HOLT, P. S.** 2001. Assessing the frequency and consequences of *Salmonella enteritidis* deposition on the egg yolk membrane. *Poult. Sci.* 80: 997–1002.

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

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

**GAST, R. K., HOLT, P. S., NASIR, M. S., JOLLEY, M. E., STONE, H. D.** 2003b. Detection of *Salmonella enteritidis* in incubated pools of egg contents by fluorescence polarization and lateral flow immunodiffusion. *Poult. Sci.* 82: 687–690.

**GAST, R. K., GUARD–BOULDIN, J., HOLT, P. S.** 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: 863–869.

**GAST, R. K., GUARD–BOULDIN, J., HOLT, P. S.** 2005. The relationship between the duration of fecal shedding and the production of contaminated eggs by laying hens infected with strains of *Salmonella Enteritidis* and *Salmonella Heidelberg*. *Avian Dis.* 49: 382–386.

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

**GRAVES, R. C., MACLAURY, D. W.** 1962. The effects of temperature, vapor pressure, and absolute humidity on bacterial contamination of shell eggs. *Poultry Sci.* 41: 1219–1225.

**GREGORY, D. W.** 1948. *Salmonella* infections of turkey eggs. *Poultry Sci.* 27: 359–366.

**GUARD–PETTER, J.** 2001. The chicken, the egg and *Salmonella enteritidis*. *Environ. Microbiol.* 3 (7): 421–430.

**GUENTHER, S., HUWYLER, D., RICHARD, S., LOESSNER, M. J.** 2009. Virulent bacteriophage for efficient biocontrol of *Listeria monocytogenes* in ready-to-eat foods. *Appl. Environ. Microbiol.* 75 (1): 93–100.

**HAGENS, S., LOESSNER, M. J.** 2007. Application of bacteriophages for detection and control of foodborne pathogens. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 76: 513–519.

**HASSAN, J. O., CURTISS, R.** 1997. Efficacy of a live avirulent *Salmonella typhimurium* vaccine in preventing colonization and invasion of laying hens by *Salmonella typhimurium* and *Salmonella enteritidis*. *Avian Dis.* 41 (4): 783–791.

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

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

**HIMATHONGKHAM, S., RIEMANN, H., ERNST, R.** 1999. Efficacy of disinfection of shell eggs externally contaminated with *Salmonella enteritidis*: implications for egg testing. *Int. J. Food Microbiol.* 49 (3): 161–167.

**HINTON, A. J., BUHR, R. J., INGRAM, K. D.** 2002. Carbohydrate-based cocktails that decrease the population of *Salmonella* and *Campylobacter* in the crop of broiler chickens subjected to feed withdrawal. *Poult. Sci.* 81 (6): 780–784.

**HOLT, P. S.** 1993. Effect of induced molting on the susceptibility of White Leghorn hens to a *Salmonella enteritidis* infection. *Avian. Dis.* 37: 412–417.

**HOLT, P. S., GAST, R. K.** 2002. Comparison of the effects of infection with *Salmonella enteritidis*, in combination with an induced molt, on serum levels of the acute phase protein,  $\alpha 1$  acid glycoprotein, in hens. *Poult. Sci.* 81: 1295–1300.

**HOLT, P. S.** 2003. Molting and *Salmonella enterica* serovar Enteritidis infection: the problem and some solutions. *Poult. Sci.* 82: 1008–1010.

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

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

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

**HUMPHREY, T. J., BASKERVILLE, A., CHART, H., ROWE, B.** 1989. Infection of egg-laying hens with *Salmonella enteritidis* PT4 by oral inoculation. *Vet. Rec.* 125 (21): 531–532.

**HUMPHREY, T. J., WHITEHEAD, A., GAWLER, A. H. L., HENLEY, A., ROWE, B.** 1991. Numbers of *Salmonella enteritidis* in the contents of naturally contaminated hens's eggs. *Epidemiol. Infect.* 106: 489–496.

**HY-LINE® INTERNATIONAL.** 2009. Hy-Line® variety brown hen day performance graph. ***ln:*** Hy-Line® variety brown. Commercial management guide, 2009 – 2011. Hy-Line® International. West Des Moines, Iowa, U.S.A. 41 pp.

**INFOSTAT.** 2004. InfoStat, versión 2004. Manual del usuario. Grupo InfoStat. FCA. Universidad Nacional de Córdoba. 1 ed. Editorial Brujas. Argentina. 314 pp.

**JOERGER, R. D.** 2003. Alternatives to antibiotics: bacteriocins, antimicrobial peptides and bacteriophages. *Poult. Sci.* 82: 640–647.

**JONES, D. R., ANDERSON, K. E., CURTIS, P. A., JONES, F. T.** 2002. Microbial contamination in inoculated shell eggs: I. Effects of layer strain and hen age. *Poult. Sci.* 81: 715–720.

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

**KOGUT, M. H., TELLEZ, G. I., MCGRUDER, E. D., HARGIS, B. M., WILLIAMS, J. D., CORRIER, D. E., DELOACH, J. R.** 1994. Heterophils are decisive components in the early responses of chickens to *Salmonella* Enteritidis infections. *Microb. Pathog.* 16: 141–151.

**KOO, J., MARSHALL, D. L., DEPAOLA, A.** 2001. Antacid increases survival of *Vibrio vulnificus* and *Vibrio vulnificus* phage in a gastrointestinal model. *Appl. Environ. Microbiol.* 67: 2895–2902.

**LEVERENTZ, B., CONWAY, W. S., ALAVIDZE, Z., JANISIEWICZ, W. J., FUCHS, Y., CAMP, M. J., CHIGHLADZE, E., SULAKVELIDZE, A.** 2001. Examination of bacteriophage as a biocontrol method for *Salmonella* on fresh-cut fruit: a model study. *J. Food Prot.* 64 (8):1116–1121.

**LEVERENTZ, B., CONWAY, W. S., CAMP, M. J., JANISIEWICZ, W. J., ABULADZE, T., YANG, M., SAFTNER, R., SULAKVELIDZE, A.** 2003. Biocontrol of *Listeria monocytogenes* on fresh-cut produce by treatment with lytic bacteriophages and a bacteriocin. *Appl. Environ. Microbiol.* 69 (8): 4519–4526.

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

**LU, S., KILLORAN, P. B., RILEY, L. W.** 2003. Association of *Salmonella enterica* serovar Enteritidis YafD with resistance to chicken egg albumen. *Infect. Immun.* 71 (12): 6734–6741.

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

**MESESSENS, W., GRIJSPEERDT, K, HERMAN, L.** 2005a. Eggshell penetration by *Salmonella*: a review. *World's Poult. Sci. J.* 61 (6): 71–86.

**MESESSENS, W., GRIJSPEERDT, K, HERMAN, L.** 2005b. Eggshell characteristics and penetration by *Salmonella enterica* serovar Enteritidis through the production period of a layer flock. *Br. Poult. Sci.* 46 (6): 694–700.

**MIYAMOTO, T., BABA, E., TANAKA, T., SASAI, K., FUKATA, T., ARAKAWA, A.** 1997. *Salmonella* Enteritidis contamination of eggs from hens inoculated by vaginal, cloacal and intravenous routes. *Avian Dis.* 41: 296–303.

**MIYAMOTO, T., HORIE, T., BABA, E., SASAI, K., FUKATA, T., ARAKAWA, A.** 1998. *Salmonella* penetration through eggshell associated with freshness of laid eggs and refrigeration. *J. Food Prot.* 61: 350–353.

**MIYAMOTO, T., HORIE, T., FUJIWARA, T., FUKATA, T., SASAI, K., BABA, E.** 2000. *Lactobacillus* flora in the cloaca and vagina of hens and its inhibitory activity against *Salmonella enteritidis* *in vitro*. *Poult. Sci.* 79: 7–11.

**MODI, R., HIRVI, Y., HILL, A., GRIFFITHS, M. W.** 2001. Effect of phage on survival of *Salmonella enteritidis* during manufacture and storage of cheddar cheese made from raw and pasteurized milk. *J. Food Prot.* 64 (7): 927–933.

**MOORE, R. W., HOLT, P. S.** 2006. The effect of feed deprivation on tissue invasion by *Salmonella enteritidis*. *Poult. Sci.* 85: 1333–1337.

**MURRAY, C., BARTON, M.** 1993. Salmonellosis bacteriology. *In*: Corner, L., Baugust, T. (eds). Australian standard diagnostic techniques for animal diseases. Australia. pp. 3–8.

**NASCIMENTO, V. P., CRANSTOUN, S., SOLOMON, S. E.** 1992. Relationship between shell structure and movement of *Salmonella enteritidis* across the eggshell wall. *Br. Poult. Sci.* 33: 37–48.

**O'FLYNN, G., ROSS, R. P., FITZGERALD, G. F., COFFEY, A.** 2004. Evaluation of a cocktail of three bacteriophages for biocontrol of *Escherichia coli* O157:H7. *Appl. Environ. Microbiol.* 70 (6): 3417–3424.

**OKAMURA, M., MIYAMOTO, T., KAMIJIMA, Y., TANI, H., SASAI, K., BABA, E.** 2001. Differences in abilities to colonize reproductive organs and to contaminate eggs in intravaginally inoculated hens and *in vitro* adherences to vaginal explants between *Salmonella* Enteritidis and others *Salmonella* serovars. *Avian Dis.* 45: 962–971.

**PADRON, M.** 1990. *Salmonella typhimurium* penetration through the eggshell of hatching eggs. *Avian Dis.* 34: 463–465.

**PARKER, C. T., LIEBANA, E., HENZLER, D. J., GUARD-PETTER, J.** 2001. Lipopolysaccharide O-chain microheterogeneity of *Salmonella* serotypes Enteritidis and Typhimurium. *Environ. Microbiol.* 3: 332–342.

**PARKER, C. T., HARMON, B., GUARD-PETTER, J.** 2002. Mitigation of avian reproductive tract function by *Salmonella enteritidis* producing high-molecular-mass lipopolysaccharide. *Environ. Microbiol.* 4: 538–545.

**POPOFF M. Y., BOCKEMUHL J., GHEESLING L. L.** 2003. Supplement 2001 (no. 45) to the Kauffmann–White scheme. *Res. Microbiol.* 154 (3): 173–174.

**POULSEN, L. K., LICHT, T. R., RANG, C., KROGFELT, K. A., MOLIN, S.** 1995. Physiological state of *Escherichia coli* BJ4 growing in the large intestines of streptomycin–treated mice. *J. Bacteriol.* 177: 5840–5845.

**PRADO, V., SOLARI, V., ALVAREZ, I.** 2002. Situación epidemiológica de las enfermedades transmitidas por alimentos en Santiago de Chile: Período 1999–2000. *Rev. Méd. Chile.* 130 (5): 495–501.

**RICHMOND, J. Y., MCKINNEY, R. W.** 1999. Section II: principles of biosafety. *In*: Centers for disease control and prevention, CDC. Biosafety in microbiological and biomedical laboratories. 4ª ed. U.S. Government printing office. Washington, United States. pp. 8–16.

**RICKE., S. C.** 2003. The gastrointestinal tract ecology of *Salmonella* Enteritidis colonization in molting hens. *Poult. Sci.* 82: 1003–1007.

**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.

**ROSALES, R.** 2005. Broilact® hace de diferencia. Una alternativa inteligente: exclusión competitiva [en línea]. Guadalajara, México. Boehringer Ingelheim Vetmedica, S. A. de C. V. <<http://www.lineavolvac.com/images/boletines/broilact%20exclusion%20competitiva-esp.pdf>> [consulta: 05-10-08]

**RUIZ, J. D., SUÁREZ, M. C., URIBE, C.** 2006. Susceptibilidad antimicrobiana in vitro de cepas de *Salmonella spp.* en granjas de ponedoras comerciales del departamento de Antioquia. *Rev. Col. Cienc. Pec.* 19 (3): 297–305.



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

**SÁNCHEZ, M. M., CARDONA, N. M.** 2003. Mecanismos de interacción de *Salmonella* con la mucosa intestinal. *Infectio.* 7 (1): 22–29.

**SÁNCHEZ, P.** 2007. Uso de reacción de polimerasa en cadena en el diagnóstico de *Salmonella* Enteritidis en tejidos y contenido intestinal de pollos experimentalmente infectados. Memoria Título Médico Veterinario. Santiago, Chile. U. Chile, Fac. Cs. Veterinarias y Pecuarias. 68 p.

**SANTANDER, J., ROBESON, J.** 2004. Bacteriophage prophylaxis against *Salmonella enteritidis* and *Salmonella pullorum* using *Caenorhabditis elegans* as an assay system. *Electronic J. Biotechnol.* 7 (2): 206–209.

**SAUTER, E. A., PETERSEN, C. F.** 1974. The effect of egg shell quality on penetration by various *Salmonellae*. *Poultry Sci.* 53: 2159–2162.

**SAUTER, E. A., PETERSEN, C. F., PARKINSON, J. F., STEELE, E. E.** 1977. Effects of pH on egg shell penetration by *Salmonellae*. *Poultry Sci.* 56: 1754–1755.

**SEARS, C. L., KAPER, J. B.** 1996. Enteric bacterial toxins: mechanisms of action and linkage to intestinal secretion. *Microbiol. Rev.* 60 (1): 167–215.

**SECHTER, I., TOUITOU, E., DONBROW, M.** 1989. The influence of a non-ionic surfactant on rectal absorption of virus particles. *Arch. Virol.* 106: 141–143.

**SHIVAPRASAD, H. L., TIMONEY, J. F., MORALES, S., LUCIO, B., BAKER, R. C.** 1990. Pathogenesis of *Salmonella enteritidis* infection in laying chickens. I. Studies on egg transmission, clinical signs, fecal shedding and serologic responses. *Avian Dis.* 34: 548–557.

**SKLAR, I. B., JOERGER, R. D.** 2001. Attempts to utilize bacteriophage to combat *Salmonella enterica* serovar Enteritidis infections in chickens. *J. Food Saf.* 21: 15–29.

**SKOV, M. N., FELD, N. C., CARSTENSEN, B., MADSEN, M.** 2002. The serologic response to *Salmonella* Enteritidis and *Salmonella* Typhimurium in experimentally infected chickens, followed by an indirect lipopolysaccharide enzyme–linked immunosorbent assay and bacteriologic examinations through a one–year period. *Avian Dis.* 46: 265–273.

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

**SMITH, H. W., HUGGINS, M. B.** 1983. Effectiveness of phages in treating experimental *Escherichia coli* diarrhoea in calves, piglets and lambs. *J. Gen. Microbiol.* 129: 2659–2675.

**SMITH, H. W., HUGGINS, M. B., SHAW, K. M.** 1987. Factors influencing the survival and multiplication of bacteriophage in calves and in their environmental. *J. Gen. Microbiol.* 133: 1127–1135.

**SPARKS, N. H. C., BOARD, R. G.** 1984. Cuticle, shell porosity and water uptake through hens' eggshells. *Br. Poult. Sci.* 25 (2): 267–276.

**STURKIE, D. P.** 1981. Digestión aviar. *In*: Dukes, H. H., Swenson, M. J. (Eds.). Fisiología de los animales domésticos. Volumen II. 4°ed. México, Aguilar. pp. 663–677.

**SULAKVELIDZE, A., ALAVIDZE, Z., MORRIS, J.** 2001. Bacteriophage therapy. *Antimicrob. Agents Chemother.* 45 (3): 649–659.

**SUMMERS, W. C.** 2001. Bacteriophage therapy. *Annu. Rev. Microbiol.* 55: 437–451.

**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: 1170–1173.

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

**TIMONEY, J. F., SHIVAPRASAD, H. L., BAKER, R. C., ROWE, B.** 1989. Egg transmission after infection of hens with *Salmonella enteritidis* phage type 4. *Vet. Rec.* 125 (24): 600–601.

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

**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: 118–124.

**UZZAU, S., BROWN, D. J., WALLIS, T., RUBINO, S., LEORI, G., BERNARD, S., CASADESÚS, J., PLATT, D. J., OLSEN, J. E.** 2000. Host adapted serotypes of *Salmonella enterica*. *Epidemiol. Infect.* 125 (2): 229–255.

**VAN DER VELDEN, A. W. M., LINDGREN, S. W., WORLEY, M. J., HEFFRON, F.** 2000. *Salmonella* pathogenicity island 1–independent induction of apoptosis in infected macrophages by *Salmonella enterica* serotype Typhimurium. *Infect. Immun.* 68 (10): 5702–5709.

**VELGE, P., CLOECKAERT, A., BARROW, P.** 2005. Emergence of *Salmonella* epidemics: the problems related to *Salmonella enterica* serotype Enteritidis and multiple antibiotic resistance in other major serotypes. *Vet. Res.* 36: 267–288.

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

**WALDEN, C. C., ALLEN, I. V. F., TRUSSELL, P. C.** 1956. The role of the egg shell and shell membranes in restraining the entry of microorganisms. *Poultry Sci.* 35: 1190–1196.

**WARD, L. R., DE SA, J. D., ROWE, B.** 1987. A phagotyping scheme for *Salmonella* Enteritidis. *Epidemiol. Infect.* 99: 291–294.

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

**WHO. WORLD HEALTH ORGANIZATION.** 2000. Typhoid vaccines [en línea]. Weekly epidemiological record. Vol. 75, No. 32. <<http://www.who.int/docstore/wer/pdf/2000/wer7532.pdf>> [consulta: 09-07-08]

**WIGLEY, P., BERCHIERI, A. J., PAGE, K. L., SMITH, A. L., BARROW, P. A.** 2001. *Salmonella enterica* serovar Pullorum persists in splenic macrophages and in the reproductive tract during persistent, disease-free carriage in chickens. *Infect. Immun.* 69 (12): 7873–7879.

**WILLIAMS, J. E., DILLARD, L. H., HALL, G. O.** 1968. The penetration patterns of *Salmonella typhimurium* through the outer structures of chicken eggs. *Avian Dis.* 12: 445–466.

**WITHANAGE, G. S., SASAI, K., FUKATA, T., MIYAMOTO, T., LILLEHOJ, H. S., BABA, E.** 2003. Increased lymphocyte subpopulations and macrophages in the ovaries and oviducts of laying hens infected with *Salmonella enterica* serovar Enteritidis. *Avian Pathol.* 32: 583–590.

**ZHANG, S., KINGSLEY, R. A., SANTOS, R. L., ANDREWS-POLYMENIS, H., RAFFATELLU, M., FIGUEIREDO, J., NUNES, J., TSOLIS, R. M., ADAMS, L. G., BÄUMLER, A. J.** 2003. Molecular pathogenesis of *Salmonella enterica* serotype Typhimurium-induced diarrhea. *Infect. Immun.* 71 (1): 1–12.

