



UNIVERSIDAD DE CHILE

FACULTAD DE CIENCIAS VETERINARIAS Y PECUARIAS
ESCUELA DE CIENCIAS VETERINARIAS

PROBIÓTICO Y BACTERIÓFAGOS COMO BIOCONTROLADORES DE LA COLONIZACIÓN DE *Salmonella* Enteritidis EN POLLOS EXPERIMENTALMENTE INFECTADOS.

FRANCISCA IGNACIA SANTIBÁÑEZ PINTO

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

PROFESOR GUÍA: DRA. MARIA LUISA SÁNCHEZ CHONG. MV. M.Sc.

SANTIAGO, CHILE
2008

INDICE

Páginas

RESUMEN.....	1
SUMMARY.....	3
INTRODUCCIÓN.....	5
REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA.....	7
HIPÓTESIS.....	46
OBJETIVOS.....	46
MATERIAL Y METODOS.....	47
RESULTADOS.....	57
DISCUSIÓN.....	64
CONCLUSIONES.....	72
BIBLIOGRAFÍA.....	73

Trabajo realizado con el financiamiento de proyecto Fondecyt n° 1060569.

RESUMEN

Salmonella spp., principalmente el serotipo Enteritidis, causa serios problemas en la salud humana y animal, tanto en el país como en el mundo, además de grandes costos económicos. En aves, se promueven medidas de control, particularmente la disminución de su colonización.

Este trabajo, realizado en pollas Leghorn comerciales experimentalmente infectadas, aplica dos biocontroladores, un probiótico y una mezcla de bacteriófagos nativos específicos contra *Salmonella* Enteritidis (S.E.), para determinar si los resultados de esta asociación aumentan, mantienen o disminuyen la colonización del patógeno. Complementariamente se determinó si esta asociación produce un cambio del peso en las aves.

Se trabajaron cinco grupos de aves comerciales Leghorn de un día de edad cada uno, un grupo que sólo recibió probiótico, un grupo sólo con bacteriófagos y un grupo con probiótico más bacteriófagos. Otros dos grupos correspondieron a controles, sano sin tratamiento, y control de infección que fue inoculado con la misma cepa desafío a los siete días de edad. Las aves de un día de edad recibieron el probiótico vía aerosol en dosis única. La administración de la mezcla de tres bacteriófagos nativos se realizó a los seis días de edad, vía aerosol, con una multiplicidad de infección (MOI) de 10^3 ufp. Los grupos probiótico, bacteriófagos y probiótico más bacteriófagos, fueron inoculados con la cepa desafío S.E. *nal^r rif^r* ($2,95 \times 10^5$ ufc/mL) a los siete días de edad.

A los 14 días de edad se sacrificaron todas las aves, obteniéndose muestras individuales de “pool” de órganos internos (hígado, corazón y bazo) para bacteriología cualitativa y de ambos ciegos para bacteriología cualitativa y cuantitativa.

Los resultados de bacteriología cualitativa demostraron que el uso de probiótico disminuyó a 75,7% la incidencia de *S. Enteritidis* en relación al grupo control de infección (100%); la mezcla de bacteriófagos a 80% y, cuando se utilizaron ambos biocontroladores

la incidencia bajó significativamente a 38,7% ($P < 0,0001$). Además, entre los grupos de aves con probiótico y el grupo de aves con probiótico más bacteriófagos se observó una diferencia significativa en la incidencia de $P = 0,0027$. Entre el grupo de aves con bacteriófagos *versus* el grupo de aves con probiótico más bacteriófagos también hubo diferencia significativa en la incidencia ($P = 0,0010$). Se demostró que si bien las terapias individuales obtuvieron buenos resultados, cuando se administraron ambas, los resultados se potenciaron.

Los resultados de bacteriología cuantitativa demostraron que en relación al grupo control de infección, el recuento cecal de *S. Enteritidis* disminuyó en $1,69 \log_{10}$ con el uso de ambos biocontroladores. Hubo diferencia significativa entre los grupos control de infección y probiótico más bacteriófagos ($P = 0,0003$).

En relación a las diferencias de pesaje observadas en los grupos experimentales, el grupo de aves con probiótico *versus* el grupo de aves con probiótico más bacteriófagos mostraron diferencia de sólo 1,1 g. de aumento de peso por ave, a favor del primero.

Se concluye que tanto la terapia sólo con probiótico como la terapia sólo con bacteriófagos disminuyen efectivamente la colonización de *S. Enteritidis* y, al utilizar la terapia probiótico asociado a bacteriófagos los resultados se potenciaron. Por esto, el uso en conjunto de ambos biocontroladores sería efectivo como método para disminuir o evitar la colonización de *S. Enteritidis* en pollas Leghorn comerciales, presentándose como una posible real herramienta para la mejorar la sanidad en la producción avícola.

SUMMARY

Salmonella spp., mainly the serotype Enteritidis, cause serious health problems in humans and animals around the world and also adding economical losses. Control measures to diminish their colonization are promoted in poultry.

This research evaluated a probiotic and a mixture of specific natives bacteriophages to control *Salmonella* Enteritidis (S.E.) in experimentally inoculated commercial Leghorn chicks to determine if the results of this association will increase, maintain or decrease the colonization of the pathogen. Also, if this applications produce a change in the weight of the Leghorn chicks.

Five one-day old Leghorn chicks groups were used to work in this assay: a group which received only probiotic, a group with only bacteriophages, a group with probiotic plus bacteriophages. The other two were controls groups, healthy without treatment, and infection control group which was inoculated with the same challenge strain when they were seven days old. The one-day-old birds received the probiotic via spray with one dose. The administration of a mixture of three native bacteriophages was made at the six days of age with a multiplicity of infection (MOI) of 10^3 ufp, via spray. The probiotic, bacteriophages, and probiotic plus bacteriophage groups were inoculated with S.E. *nal^r rif^r* (2.95×10^5 ufc/mL) as challenge strain when they were seven days old.

When the birds were fourteen days old they were killed, obtaining from each one samples of internal organs (liver, heart and spleen) for qualitative bacteriology, and from caecae for both qualitative and quantitative bacteriology.

The results of the qualitative bacteriology demonstrated that the use of the probiotic reduced to 75,7% the incidence of *S. Enteritidis* in comparative to the control infection group (100%), the mixture of bacteriophages to 80% and when both biocontrollers were used the incidence was reduced significantly to 38,7% ($P < 0,0001$). Also a significant difference in the incidence was observed ($P = 0,0027$) between the probiotic group and the probiotic plus bacteriophage group. There was a significant difference between the

bacteriophage group *versus* the probiotic plus bacteriophage group (P=0,0010) demonstrating that, even though the individual therapies had good results, when both were administrated, the results were empowered.

The results of the quantitative bacteriology demonstrated that the cecal count of *S. Enteritidis* diminished in 1,69 log₁₀ using both biocontrollers in comparative to the control infection group. There was a significant difference between the control infection group and the probiotic plus bacteriophages group (P=0,0003).

In relationship to the differences of body weight observed in the probiotic group *versus* the probiotic plus bacteriophages group, an average difference of only 1,1 g. more per chick in the probiotic group was observed.

It could be concluded that the therapy of chickens only with probiotic and the therapy only with bacteriophages decreases effectively the colonization of *S. Enteritidis*, and when using both biocontrollers on chickens the results showed reinforcement effects. For this reason, the use of both biocontrollers may be an effective method to avoid the colonization of *S. Enteritidis* in commercial chickens and could be a real alternative for a healthy poultry production.

INTRODUCCION

Salmonella spp. es una bacteria zoonótica actualmente descrita en todo el mundo y ha sido catalogada como uno de los problemas más importantes de salud pública, con un costo económico elevado para muchos países. Su serotipo Enteritidis (S.E.) es el más importante en torno a los brotes de toxiinfección; este serotipo, relacionado tanto a seres humanos como a animales, es capaz de ser transmitido a los primeros a través de los alimentos (ETA) como el huevo y la carne de ave.

El aumento actual de su aislamiento en el mundo y en el país, junto a una alta resistencia ante múltiples antimicrobianos, ha llevado a la necesidad de búsqueda de métodos que controlen la colonización, multiplicación y diseminación de *Salmonella* Enteritidis, que puedan ser utilizados como herramientas tanto en la producción de aves y huevos, como en la prevención de casos clínicos en salud pública.

Se han investigado diferentes formas de control de salmonelosis en aves como Vacunación, Prebióticos, Exclusión competitiva, Probióticos, y Bacteriófagos. En Chile, el uso de estos controladores ha adquirido importancia frente a un aumento de positividad a *Salmonella* spp., tanto en planteles de crianza como de gallinas reproductoras y ponedoras.

Ninguno de estos biocontroladores por sí solos han demostrado ser 100% eficientes frente a la infección de *Salmonella* spp. en las aves.

El uso de probióticos, administración de microorganismos vivos, tiene múltiples beneficios en relación al control de bacterias patógenas a nivel gastrointestinal, ya que su utilización puede alterar la composición de la microflora digestiva por la producción de diversos intermediarios, como ácido láctico y péptidos antimicrobianos, que actúan contra bacterias patógenas. Además, limitan la proliferación de patógenos al disminuirles la cantidad de nutrientes disponibles, competir por espacio físico e inhibir su adherencia. El empleo de probiótico, además de disminuir la mortalidad, otorgaría una posible ganancia de peso; a lo señalado se agregan otros beneficios como su fácil aplicación y bajo costo

individual, por lo que su utilización es actualmente de rutina en los planteles avícolas nacionales.

Los bacteriófagos otra medida de control bacteriano, que es altamente específica, han resurgido para contrarrestar el problema de resistencia antimicrobiana encontrado en la avicultura frente a *Salmonella* spp. En Chile el empleo experimental de bacteriófagos nativos, contra la colonización de *S. Enteritidis* en pollos experimentalmente infectados, ha obtenido promisorios resultados.

La aplicación combinada de métodos de biocontrol, como es el uso de probióticos junto a bacteriófagos contra *S. Enteritidis*, es de incipiente investigación y su éxito, entre otros, dependerá de diversos factores relacionados tanto del tipo de probiótico, como de la selección de los bacteriófagos a utilizar. Los resultados positivos obtenidos en Chile por la aplicación de bacteriófagos nativos podrían potenciar los ya reconocidos beneficios que otorga el empleo de probióticos, proyectándose así una superación de los parámetros sanitarios y productivos de la industria avícola.

REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA

GENERALIDADES

El Género *Salmonella*, de la Familia Enterobacteriaceae, corresponde a bacilos Gram negativos, intracelulares facultativos. Su taxonomía reconoce dos especies, *Salmonella bongori* y *Salmonella enterica*; esta última con seis subespecies: *enterica*, *arizonae*, *diarizonae*, *salamae*, *houtenae* e *indica*. Por sus características antigénicas, se describen sobre 2.400 serotipos diferentes de *Salmonella* (Tindall *et al.*, 2005). Según el esquema de Kauffman- White, los antígenos que se reconocen son los somáticos (O) que están basados en el reconocimiento de diferentes determinantes antigénicos relacionados con el lipopolisacárido (LPS), los antígenos flagelares (H) reconocidos por antisueros específicos contra proteínas flagelares, y el antígeno capsular (Vi) que se asocia a sólo algunos serotipos (Le Minor, 1984).

Salmonella spp. puede causar toxiinfección en las personas a través de alimentos y, se ha observado que la enfermedad clínica en niños, ancianos y personas inmunosuprimidas puede ser fatal (Breytenbach, 2004).

Los serotipos *S. Typhi* y *S. Paratyphi* A, B y C son específicos sólo para el hombre, donde *S. Typhi* proviene de reservorios humanos debido a la existencia de portadores crónicos biliares que contaminan el agua o alimentos (Sánchez y Cardona, 2003). Otros serotipos como *S. dublín*, *S. choleraesuis* y *S. abortus equi* están adaptados a los animales y, cuando infectan a los seres humanos, pueden causarle una grave enfermedad.

Por otra parte, *S. Enteritidis* y *S. Typhimurium* son consideradas *Salmonella* no Typhi y pueden infectar a una amplia variedad de huéspedes, incluidos los seres humanos (Breytenbach, 2004). *S. Enteritidis* está ligada a un reservorio zoonótico avícola y produce enfermedad en las personas luego de la ingestión de alimentos derivados de la crianza avícola, tales como carne y huevos (Breytenbach, 2004). Otra posible transmisión a los seres humanos proviene de animales domésticos como perros y gatos, quienes pueden adquirir la infección, al igual que en las personas, por un alimento contaminado o productos

derivados de aves (WHO, 2006). El cuadro clínico, que dura unos ocho días, se caracteriza por diarrea acuosa o disentería, dolor abdominal, cólico y fiebre (OMS, 2002).

Las aves, por lo general, son portadoras asintomáticas de estos tipos de salmonelas; por esto, el control de las infecciones por *Salmonella* spp. en aves se ha convertido en un problema de salud pública (Breytenbach, 2004).

El resultado de la infección en aves es dependiente de la dosis infectante inicial y de la edad, siendo los pollitos mucho más susceptibles que las aves adultas; una baja dosis en estas últimas probablemente permitiría observar sólo el paso de la bacteria a través del intestino sin consecuencias. Con dosis mayores se observaría una colonización intestinal con diseminación hacia órganos internos que puede verse acompañada de una leve diarrea. Durante las dos primeras semanas post infección, *Salmonella* spp. generalmente es aislada desde el tracto intestinal y deposiciones, la que declina posteriormente. Sin embargo, algunas cepas de *S. Enteritidis* han mostrado ser persistentes, por varios meses en el tracto intestinal de gallinas (Breytenbach, 2004).

En el huevo, *Salmonella* spp. puede ser transmitida desde la madre al pollito, por lo que una estrategia de control es asegurar que los grupos de aves reproductoras se mantengan libres de la bacteria. En el “stock” genético, que incluye líneas puras y abuelas, hay tolerancia cero a *Salmonella* spp. (Breytenbach, 2004).

Patogenia

Para asegurar el proceso infeccioso, una bacteria debe adherirse a la célula huésped, resistir los mecanismos de defensa, replicarse e invadir, para finalmente producir daño al huésped (Figuroa y Verdugo, 2005). Los mecanismos de adhesión generalmente involucran varios tipos de fimbrias, presentes en la bacteria, para conseguir un contacto estrecho con los receptores de las células huésped (Sánchez y Cardona, 2003). Al ser ingerida, *Salmonella* spp. debe pasar una serie de barreras, como el pH ácido del estómago, aumento de temperatura, baja tensión de oxígeno (Figuroa y Verdugo, 2005) y pasar al

intestino delgado donde coloniza. La bacteria establece un estrecho contacto con el borde en cepillo del epitelio intestinal; cuando la bacteria se acerca, las microvellosidades circundantes comienzan a degenerarse con elongación, edema y crecimiento en un proceso llamado "ruffling" u ondulamiento, que es un cambio morfológico degenerativo con la finalidad de reordenar el citoesqueleto de actina de la célula huésped, con lo que se inducen cambios morfológicos para poder internalizar a la bacteria, proceso llamado invasión.

Salmonella spp. preferentemente se une a las células en las placas de Peyer del intestino delgado y tonsilas cecales (Figuroa y Verdugo, 2005). Sin embargo la bacteria también puede visualizarse en enterocitos no fagocíticos (Sánchez y Cardona, 2003).

Una vez internalizada la bacteria a la célula huésped, ésta reside dentro de la vacuola contenedora de *Salmonella* que migra a la membrana basal de la célula huésped donde interactúa con los macrófagos asociados a las placas de Peyer de la submucosa y entra en ellos. Esto juega un rol fundamental en la supervivencia de *Salmonella* dentro de los macrófagos, lo que le permite un comportamiento de patógeno intracelular facultativo.

La salmonelosis en las personas es una de las enfermedades más comunes transmitida por los alimentos. Ella constituye un problema de salud pública con un costo significativo en muchos países; así en Estados Unidos se estima en 1,4 millones el número anual de infecciones con *Salmonella* no Typhi, donde el costo total anual por *Salmonella* puede llegar a los 3 billones de dólares anuales (WHO, 2006).

El Reino Unido a su vez, sigue considerando a la salmonelosis como el mayor problema de salud pública, así en el año 2004 se confirmaron 14.476 casos por métodos de laboratorio y, sobre la mitad de estos fueron por *S. Enteritidis*; en la actualidad, el número de casos es probablemente tres veces más alto (DEFRA, 2005). Algunos antecedentes sobre carcasas de pollos broiler entre los años 2000 a 2005 señalan que en Estados Unidos, de un total de 51.327 muestras se aisló *S. Enteritidis* en 280 (0,5% del total); por otra parte,

durante el mismo período aumentó el número de planteles positivos de 9% a 25% y se encontró una amplia distribución que abarcó a 24 Estados (Altekruse *et al.*, 2006).

Otro estudio, realizado en Korea por Kim *et al.*, (2007), buscó la presencia de *Salmonella* en dos establecimientos que explotaban granjas de reproductores, granjas de broiler, criaderos y mataderos. En cada establecimiento se tomaron muestras de torulado cloacal, corrales, suelo, paredes, meconio, áreas de desperdicios, deposiciones, carcasas y aguas del proceso de enfriamiento. Los resultados señalaron gran porcentaje de *S. Enteritidis* y *S. Heidelberg* en reproductoras y criaderos; en las granjas de broiler se repitieron los mismos serotipos y, en mataderos, *S. Enteritidis* fue de gran importancia junto a los serotipos Heidelberg, Blockley y Virchow. Esto demostró la dificultad de controlar este enteropatógeno, que se disemina desde las granjas de reproductores, llegando a los criaderos y contaminando los pollos comerciales.

En Chile, en relación a la información sobre la prevalencia de *S. Enteritidis* en personas, se ha informado que en 1994 en el norte del país se presentó un aumento desde 0,35 casos a sobre 3 por 100.000 habitantes y alcanzó a 5 en 1998. Esta epidemia se extendió en forma progresiva al resto del país, abarcando desde el 19% de los Servicios de Salud en 1994 a más del 80% en 1998 (Fica *et al.*, 2001).

En la Región Metropolitana, el Servicio de Salud Metropolitano del Ambiente (SESMA) inició una vigilancia epidemiológica de los brotes de enfermedades transmisibles por alimentos (ETA) como salmonelosis, aumentando las notificaciones de ETA paulatinamente desde 86 casos en 1994 hasta 260 en el 2000 (Prado *et al.*, 2002). Ya en 2005, el Instituto de Salud Pública informó que hubieron 1.560 cepas de *Salmonella* spp. confirmadas en todo el país, de las cuales 900 correspondieron a la Región Metropolitana y sólo 660 al resto del país.

Antecedentes sobre *Salmonella* spp. recopilados por Figueroa, (2007) mostraron que entre enero y diciembre del año 2005 la prevalencia nacional de *Salmonella* spp. fue de 3,05% al tomar un total de 5.665 muestras de carnes blancas y rojas desde plantas

faenadoras. Además, se observó que entre los años 2000 a 2006, los casos de salmonelosis confirmados en el Instituto de Salud Pública fueron incrementándose a través de los años hasta llegar a 2.219 casos de *Salmonella* spp., de los cuales 1.177 (53%) fueron por el serotipo Enteritidis. En relación al Servicio Agrícola Ganadero (SAG) muestras de carnes de aves tomadas entre los años 2004 a 2006 evidenciaron un 3,33% promedio de positividad a *Salmonella* spp.

En 2000, en la Región Metropolitana, Alexandre *et al.*, estudiaron la presencia de *Salmonella* spp. en muestras de huevos, carnes y menudencias de ave de venta libre. Se detectó positividad en una yema de 1.081 huevos (0,09%) y, el serotipo Enteritidis se detectó en 108 (7,08%) de 1.524 muestras entre carnes de ave y menudencias.

Frente a los brotes por *Salmonella*, los avicultores productores de huevos, médicos veterinarios del sector avícola (AMEVEA) y el Servicio Agrícola Ganadero (SAG), elaboraron en 1998 un plan nacional de control de *Salmonella*. Junto a la vacunación, exclusión competitiva, cuarentena, PABCO y otras consideraciones como prohibición de venta de pollitas de un día a planteles positivos, se monitoreó aves reproductoras y ponedoras, por pruebas serológicas y cultivos bacterianos. Esto se sumó a dos monitoreos en aves de postura, que abarcaron a más del 50% de esa población en 1995 y al 100% de los planteles avícolas en 1997 (González y Correa, 1998).

MEDIDAS DE BIOCONTROL

El control de *Salmonella* spp. en aves ha utilizado variadas medidas, entre otras, uso de prebióticos, vacunas, probióticos, exclusión competitiva y bacteriófagos (Sulakdevidze *et al.*, 2001; Joerger, 2003).

- **Prebióticos**

Los prebióticos son ingredientes alimenticios que estimulan selectivamente el crecimiento y/o actividad de especies de bacterias en el intestino, usualmente

bifidobacterias y *Lactobacillus* con beneficios para la salud. Ellos son carbohidratos de cadena corta que no sufren la acción de las enzimas digestivas del animal. No todos los carbohidratos en la dieta son considerados prebióticos y hay criterios para su clasificación, tales como resistencia a acidez gástrica, hidrólisis de enzimas, absorción gastrointestinal, fermentación de la microflora intestinal y estimulación selectiva del crecimiento y/o actividad de bacterias intestinales que contribuyen con la salud (Roberfroid, 2007). Dentro de ellos, se encuentran los mananooligosacáridos, glucoligosacáridos, fructoligosacáridos, inulina y lactulosa.

Thitaram *et al.*, (2005) compararon la eficiencia de dietas con Isomaltooligosacárido (IMO) al 1%, 2% y 4%, sobre la disminución de la colonización de *S. Typhimurium* en pollitos broiler de 1 día y desafiados a los 7 días con 1×10^8 unidad formadora de colonias (ufc) de la bacteria. Los pollitos con 1% de IMO redujeron en $2 \log_{10}$ el recuento cecal de *S. Typhimurium*; las dietas con 2% y 4% de IMO disminuyeron la cantidad de la bacteria en el ciego en forma no significativa. Se observó, además, que todas las dietas incrementaron significativamente los niveles de bifidobacterias, sin diferenciación entre dietas.

Spring *et al.*, (2000) a su vez, observaron los efectos de una dieta de mananooligosacáridos (MOS) en pollitos recién nacidos inoculados con $1,25 \times 10^6$ ufc/ave de microflora básica y desafiados con *S. Typhimurium* 10^4 ufc a los tres días. Además se les administró una dieta suplementada con paredes celulares de *Saccharomyces cerevisiae*. Como resultado, disminuyeron los recuentos cecales de *S. Typhimurium* en $1,40 \log_{10}$ en las aves suplementadas con MO; además, disminuyó el número de pollitos positivos a *Salmonella* en 34,1% ($P < 0,05$).

- **Vacunas**

Se utilizan tanto vacunas vivas como muertas o bacterinas. Al respecto, Cerquetti y Gherardi (2000) emplearon en pollitos, una vacuna mutante de *S. Enteritidis* 10^9 ufc, viva, atenuada, vía oral los días 1, 2, 3 y 7 de edad; el grupo, separado en dos, fueron desafiados a los días 7 y 14 de edad con *S. Enteritidis* respectivamente. Se observó que las múltiples

dosis de vacunas protegieron contra el desafío de *S. Enteritidis* y se redujo el recuento del patógeno en ciego y órganos internos. El desafío a los 14 días de edad logró mejor resultado que a los 7 días. Además las vacunaciones protegieron contra *S. Gallinarum* reduciendo su colonización cecal; esto no se observó ante el desafío con *S. Typhimurium*.

En cuanto a bacterinas, Gast *et al.*, (1993) utilizaron una dos veces con cuatro semanas de intervalo en gallinas ponedoras de 28 semanas de edad que se desafiaron con *S. Enteritidis* 10^8 ufc dos semanas después de la última vacunación. El recuento bacteriano en órganos y huevos disminuyó en un 20%; la eliminación de *S. Enteritidis* por deposiciones, disminuyó 2,5 log desde la primera semana posvacunación, pero a la tercera semana, aún se evidenciaron niveles de *S. Enteritidis*, sugiriendo sólo una protección parcial de la bacterina. Babu *et al.*, (2004) compararon una bacterina con una vacuna viva en pollitos de una semana desafiados con *S. Enteritidis* y concluyeron que una vacuna viva atenuada de *Salmonella* spp. es un efectivo método para controlar *S. Enteritidis* en pollitos, más que el uso de una bacterina.

Otros mecanismos de biocontrol en la avicultura corresponden a la administración, a través de diferentes vías, de microorganismos vivos que compiten con enteropatógenos previniendo la colonización de estos últimos. Estos métodos de biocontrol se definen como exclusión competitiva y/o probiótico. Para algunos autores no existe diferencia entre ambos términos; para otros, si los microorganismos son indefinidos correspondería a probiótico, en tanto que la exclusión competitiva sería un probiótico con denominaciones de Géneros y especies definidas.

Ecología intestinal

El tracto gastrointestinal es un ecosistema muy complejo. El intestino anterior esta escasamente poblado y desde el ileon las concentraciones bacterianas gradualmente se incrementan, alcanzando 10^{11} - 10^{12} ufc /g en el colon (Isolauri *et al.*, 2004). La superficie mucosa es una gran área para la adherencia y colonización microbiana intestinal. Esto sugiere un inmenso potencial metabólico, especialmente en el colon, que contiene bacterias

que representan a más de 400 especies. Estos microorganismos incluyen diversos Géneros bacterianos con predominio de Gram positivos, anaerobios de los Géneros *Bacteroides*, *Eubacterium* y *Bifidobacterium*; otros grupos como *Clostridium*, *Streptococcus* y *Lactobacillus* también juegan un importante rol en la estabilidad de la mucosa intestinal y en la generación de ácidos grasos de cadenas cortas (Holzapfel y Schillinger, 2002). El balance ecológico de la microflora intestinal se puede alterar favorablemente por la ingestión de probióticos (Sullivan, 2001). Se ha visto actualmente que la exclusión competitiva es muy bien aceptada, e incluso integrada en programas nacionales de control como una manera efectiva de reducir la incidencia y severidad de las infecciones por *Salmonella* y otros patógenos intestinales en aves (Nakamura *et al.*, 2002).

- **Exclusión competitiva**

La exclusión competitiva (EC) o el concepto “Nurmi” (Mead, 2000), ha sido propuesta para evitar la colonización intestinal por bacterias patógenas en aves de corral (Pascual *et al.*, 1999). Es la administración oral de microflora normal en pollitos, proveniente del tracto gastrointestinal de aves adultas con una microflora desarrollada plenamente, para que esta, incorporada a nivel intestinal, prevenga la colonización de patógenos. Esta microflora normal es una mezcla de bacterias anaeróbicas obligadas y facultativas, originadas de aves adultas sanas, libres de microorganismos patógenos. El propósito de la preparación es compensar cualquier deficiencia en la composición de una microflora intestinal normal (Mead, 2000). Esto se sustenta en que los pollitos tienen un lento desarrollo de la microflora nativa que los pudiera proteger contra *Salmonella* spp. y otros enteropatógenos, ya que son muy sensibles a la invasión de patógenos entéricos como *Salmonella* spp., durante la primera semana de vida (Schneitz y Renney, 2003).

El efecto inmediato de la exclusión competitiva ante un desafío de *Salmonella* spp., es prevenir su multiplicación en el ciego y ser gradualmente eliminada por el ave. La administración ideal es antes que los pollitos se expongan a cualquier cepa de *Salmonella* spp., de otra manera el efecto sería mínimo (Mead, 2000).

El mecanismo preciso de acción no ha sido totalmente determinado. Probablemente lo más importante es la competencia por receptores inespecíficos de la mucosa intestinal. La microflora coloniza esta mucosa, observándose como un grupo de células con fibras interconectadas por glicocáliz, que crean una barrera física para la colonización de enteropatógenos como *Salmonella* spp. (Mead, 2000).

Se ha sugerido que la producción de ácidos grasos volátiles, por la microflora normal, puede ser inhibitoria para otros microorganismos presentes, especialmente a pH bajo 6. Aquellos inhibidores de *Salmonella* spp. serían los ácidos acético, propiónico y butírico que pueden actuar con otros factores para suprimir *Salmonella* spp., especialmente a bajo potencial redox que se desarrolla en el ciego. Otro posible factor en los mecanismos de exclusión sería la competencia por nutrientes entre las microflora patógena y nativa (Mead, 2000).

La eficacia de la exclusión competitiva puede afectarse por varios grados de estrés; los pollitos son más susceptibles que aves de mayor edad, las cuales desarrollarían la infección en forma más tardía. El estrés fisiológico por variaciones en la temperatura, deprivación de alimento o agua de bebida pueden interferir con el establecimiento de la microflora protectora o reducir la protección obtenida, pero este efecto no es aparente luego de las dos semanas de vida (Weinack *et al.*, 1985). La exposición a agentes infecciosos puede también afectar el estado portador de *Salmonella* e incrementar su eliminación, por lo tanto es importante evitar cualquier estrés, especialmente en las primeras etapas de establecimiento de la microflora de aves adultas en los pollitos (Mead, 2000).

- **Probióticos**

Los probióticos son microorganismos viables que promueven y apoyan un balance benéfico de la población microbiana en el sistema gastrointestinal. Estos microorganismos no son habitantes constantes del sistema, pero se observan sus efectos benéficos en el estatus general de la salud tanto humana como animal (Holzapfel *et al.*, 2001). Así un número indefinido de especies microbianas y géneros son considerados probióticos

(Holzapfel *et al.*, 2001). En la actualidad hay una gran variedad de bacterias e incluso hongos y levaduras como *Aspergillus oryzae* y *Candida pintolopesli* utilizados como biocontroladores en diferentes sistemas productivos. Amores *et al.*, (2004) señalan el interés de adicionar, además, cepas no patógenas de *E. coli* para que compitan con su homólogo patógeno.

Los organismos probióticos pueden alterar la composición de la flora, produciendo ácido láctico, bacteriocinas y péptidos antimicrobianos que son activos contra patógenos bacterianos como *E. coli*, *Streptococcus*, *Clostridium*, *Bacteroides* y *Salmonella*. Beneficios adicionales incluyen la producción de micronutrientes en la mucosa, eliminación de toxinas y reducción de amoníaco fecal que es tóxico para las mucosas (Sullivan, 2001). Se destaca además, la limitación de la proliferación de patógenos por la deprivación de nutrientes específicos por parte de bacterias benéficas. Los microorganismos probióticos compiten también con los patógenos por el espacio físico. Algunas bacterias inhiben la adherencia de los patógenos a los receptores, por un mecanismo de obstrucción o de bloqueo específico del receptor, con lo que se previene la colonización de estos microorganismos por inhibición competitiva en las zonas de adhesión (Amores *et al.*, 2004). Si bien la microflora colónica es una barrera frente a los organismos invasores, los patógenos a menudo se establecen cuando la integridad de la microflora se deteriora por el estrés, enfermedad, tratamiento con antibióticos, cambios en la dieta o alteraciones fisiológicas en el intestino (Mcfarlane y Cummings, 1999).

Las Bacterias Ácido Lácticas (LAB) son las mejores representantes de probióticos, tanto en alimentos como en el mercado farmacéutico. Estas bacterias están asociadas con varios hábitats, ricos en nutrientes como sustratos alimenticios, suelos, aguas, abono, aguas residuales y ensilados. Algunas cepas de LAB pueden habitar la cavidad oral, vaginal, el tracto intestinal e influenciar beneficiosamente esos ecosistemas. Esto explicaría el por qué se consideran los candidatos ideales para su aplicación como probióticos (Holzapfel y Schillinger, 2002). Se ha reportado que *Lactobacillus* es eficaz en el tratamiento de diarreas infecciosas debido a Rotavirus o *Clostridium difficile*, asociados a transportes (Sullivan, 2001).

Diversos preparados de probióticos se han utilizado a la fecha en aves domésticas para el control en la salmonelosis, ya sea antes o después de la inoculación con *Salmonella*. Así, Avila *et al.*, (2006) utilizaron el probiótico comercial “Colostrum” (BioCamp Laboratorios Ltda.) en pollitos a las 3 hrs de vida, estos posteriormente fueron desafiados por contacto con *S. Enteritidis* a través de tres grupos de pollos sembradores, los cuales fueron infectados experimentalmente por inoculación de diferentes dosis bacterianas. El primer grupo se contactó con los sembradores (*S. Enteritidis* 10^8 ufc) una hora post probiótico; el segundo grupo se contactó con los sembradores (*S. Enteritidis* 10^6 ufc) 12 horas post probiótico y el tercero con los sembradores (*S. Enteritidis* 10^4 ufc) 24 horas post probiótico. Los pollitos de todos los grupos fueron positivos a los siete días post contacto con sembradores. El tercer grupo a los tres días posdesafío disminuyó la recuperación de *Salmonella* cecal en un 61% (100 *versus* 38,9%) en relación al control sin probiótico, continuándose su aislamiento en 94,4% a los días cinco y siete posdesafío; indicando que el potencial protector de la flora competitiva no fue capaz de inhibir la colonización cecal de *Salmonella* posdesafío, así la flora puede limitar, pero no prevenir, la infección por *Salmonella*. Los pollitos tratados con el probiótico en el segundo y tercer grupo disminuyeron el recuento cecal en 0,56 y 1,45 \log_{10} ufc/mL respectivamente. A nivel sistémico los pollos del primer grupo se infectaron rápidamente (88% a 100%) posdesafío con los sembradores; en el segundo y tercer grupo la infección sistémica fue más gradual (5,5% a 100%). Estos resultados sugieren que la infección sistémica depende de la dosis infectante utilizada en los pollos sembradores, junto al intervalo de tiempo entre el alojamiento y el inicio del desafío.

Pascual *et al.* (1999) utilizando como probiótico *Lactobacillus salivarius* CTC2197 10^8 ufc vía oral forzada, observaron su capacidad benéfica en prevenir la colonización de *S. Enteritidis* en pollos. Pollitos con el probiótico y desafiados con *S. Enteritidis* 10^6 ufc, a los 21 días posdesafío, fueron protegidos en un 100% frente a la colonización de *Salmonella*, contra el 30% del grupo control sin probiótico. En una segunda experiencia, con administración de probiótico a través del agua de bebida (10^7 ufc), en el alimento (10^8 ufc) y con igual desafío, al final de 21 días también se observó 100% de protección.

A su vez, hay experiencias donde el probiótico se utiliza en forma posterior al desafío con *Salmonella*. Higgins *et al.*, (2007a) evaluaron la habilidad del producto “FMB11” para reducir la recuperación de *Salmonella* desde el ciego de pollos broiler. Los pollitos fueron separados en distintos grupos, desafiados con *S. Enteritidis* o *S. Typhimurium* a 10^4 ufc/ave y una hora después, se les administró el probiótico vía oral forzada a $4,0 \times 10^6$ ufc/mL. Los resultados encontrados sugieren que el probiótico reduce significativamente la incidencia de *S. Enteritidis* en un 60 a 70% y de *S. Typhimurium* en un 89 a 95% en tonsilas cecales 24 horas post tratamiento, comparado con el grupo control ($P < 0,05$). Además, la administración del probiótico redujo $> 2,9 \log_{10}$ el recuento de *S. Enteritidis* en todas las muestras 24 horas después del tratamiento, en comparación con el control ($P < 0,05$).

Bailey *et al.*, (1998) a su vez, estudiaron el efecto de un producto de exclusión competitiva preparado con paredes epiteliales cecales, en pollos de un día con y sin *Salmonella*. En una primera experiencia, los pollos en contacto con pollos sembradores infectados con *S. Typhimurium*, se trataron con el producto mediante diferentes vías de administración; al primer grupo vía aspersión en la nacedora, al segundo en la primera agua de bebida, en el tercero se combinaron los dos tratamientos anteriores, a un último grupo se le administró vía oral forzada. Para cada tratamiento, más un grupo sin el producto, los pollos fueron divididos en dos y se les desafió con *S. Typhimurium* (10^4 o 10^6 ufc) dos días post nacimiento. Siete días después, el 99% de los pollos previamente expuestos a *Salmonella* por los sembradores, continuaron positivos, independiente de si hubo o no administración del producto. Dos grupos sin contacto previo con sembradores, fueron tratados con el producto vía agua de bebida el día de edad y se les desafió al día siguiente con *S. Typhimurium*, 10^4 o 10^6 ufc respectivamente, observándose que ambos grupos tuvieron una protección sustancial con positividad para el patógeno de 0,0 % (0/18) y 10,5% (2/19). En una segunda experiencia, se trató simultáneamente pollos de un día en contacto con sembradores, y aspersados con el producto durante el nacimiento. Luego a algunos se les administró nuevamente el producto vía primera agua de bebida y, a otros se les desafió con una dosis adicional de *S. Typhimurium* (10^5 ufc) vía oral en el segundo día. Siete días después el 96% de los pollos contactados con los sembradores estaban colonizados con *Salmonella*, independiente si el tratamiento fue en aerosol o en agua de

bebida. El 100% de los pollos que tuvieron contacto con sembradores y desafiados con *S. Typhimurium* (10^5 ufc) fueron colonizados con la bacteria a pesar de cualquier tratamiento de exclusión competitiva. Este porcentaje de colonización baja al 0,0% (0/10) en pollitos que no tuvieron contacto con los sembradores pero, que se les administró el producto vía agua de bebida al día de edad y se desafiaron con *S. Typhimurium* a los dos días de vida. Esto demostró que la pre-exposición de *Salmonella* antes del tratamiento de exclusión competitiva reduce en forma sustancial la protección que puede ser obtenida con este tratamiento.

En relación al aumento de peso por el uso de probióticos, en una experiencia realizada por Timmerman *et al.*, (2006) en que se pesaron a las aves al empezar la experiencia y al finalizar, observaron que al usar un probiótico de 4×10^7 ufc, vía aerosol en forma inmediata a la llegada de las aves al plantel, los pesos de las aves subían en 8,70%, además de observar una disminución de la mortalidad. Otro estudio realizado por O' Dea *et al.*, (2006) observaron ganancias de peso al final de la producción en pollos broilers cuando se utilizó el probiótico en relación al control sin el probiótico.

Hay variados productos de exclusión competitiva registrados en el mercado tales como Aviguard, Preempt y Broilact.

Dentro de estos, Aviguard contiene una mezcla de bacterias comensales vivas parcialmente caracterizadas, que representan a las poblaciones bacterianas maduras en el ciego de pollos adultos. Este producto, ha demostrado eficacia frente a serotipos invasivos de *Salmonella* como *S. Enteritidis* y *S. Typhimurium* (Nakamura *et al.*, 2002). A pollitas White Leghorn de un día de edad, se les administró Aviguard vía oral; seis horas después un grupo fue desafiado con *S. Typhimurium* y otro con *S. Enteritidis*. Se tomaron torulados cloacales de cada ave en los días 1, 4, 7 y 14 post desafío. Al día uno, se encontró un alto recuento de la bacteria en la mayoría de los pollos independiente del serotipo ($3,5 \log_{10}$ ufc/g). Diferencias entre ellos, fueron encontradas a los 4, 7 y 14 días post desafío; donde en el cuarto día, el recuento del serotipo *Enteritidis* fue de $3,8 \log_{10}$ ufc/g y el de *Typhimurium* $3,2 \log_{10}$ ufc/g; al séptimo día, los recuentos fueron $2,89 \log_{10}$ ufc/g y $3,5$

\log_{10} ufc/g respectivamente y al día catorce continuaron bajando, $1,89 \log_{10}$ ufc/g para Enteritidis y $2,88 \log_{10}$ ufc/g para Typhimurium (Nakamura *et al.*, 2002).

Otro estudio realizado por Seo *et al.*, (2000) utilizando Aviguard en pollos Leghorn de un día de edad y desafiados con *S. Enteritidis* $1,5 \times 10^6$ ufc a los dos días de edad, encontraron que cuatro semanas post infección los recuentos en hígado, bazo y ciego fueron bastante menores ($0,4 \pm 0,8 \log_{10}$, $1,0 \pm 0,8 \log_{10}$ y $4,1 \pm 2,2 \log_{10}$ para estos órganos respectivamente) encontrándose valores estadísticamente significativos ($P < 0,05$) en las muestras de ciego en relación al grupo control sin Aviguard. Al observar los resultados a las ocho semanas post infección estos valores disminuyeron hasta a cero en el caso de hígado y bazo, en tanto que en ciego el valor fue de $0,2 \pm 0,6 \log_{10}$. Se observaron cambios en el porcentaje de aves infectadas al utilizar el producto a las ocho semanas post infección. Se concluye que no sólo se reduce la colonización intestinal por *S. Enteritidis*, también se reduce la infección persistente en el tiempo.

En aves, el primer producto comercial de exclusión competitiva disponible fue el finlandés Broilact®, desarrollado como una suspensión y utilizado en Europa del norte desde 1987 (Nakamura *et al.*, 2002). Este producto, de acuerdo a su ficha técnica, corresponde a una mezcla definida de 32 bacterias intestinales (aeróbicas, anaeróbicas facultativas y obligadas) provenientes del contenido cecal de aves adultas y, capaces de adherirse a la pared intestinal del ave; 22 especies corresponden a anaerobios estrictos de cinco Géneros y a 10 anaerobios facultativos de tres Géneros, además, el producto es libre de esporas. Se ha encontrado que reduce la colonización intestinal de *Escherichia coli*, *Clostridium perfringens* y *Campylobacter jejuni*. Muchos estudios, además, han demostrado efecto contra varios serotipos de *Salmonella*, como *S. Enteritidis* y *S. Infantis* (Schneitz y Renney, 2003).

Broilact® ha sido administrado por diferentes vías. La aplicación por aerosol ha dado buenos resultados en la disminución del recuento cecal de *S. Enteritidis*; al respecto, Scheintz (1992) mediante esta aplicación al día de edad, redujo los recuentos cecales de la bacteria en $4,6 \log_{10}$ y los “pooles” de órganos internos fueron negativos, a diferencia del

grupo control. A su vez, Blankenship *et al.*, (1993) aplicaron Broilact® en aerosol y en el agua de bebida, reduciendo en gran medida la prevalencia de *Salmonella* tanto a nivel ambiental como en carcasas de aves. Para que el aerosol sea efectivo, requiere de gotas relativamente grandes (1 mm de diámetro) y ser rociado suavemente; las aves al limpiarse naturalmente las plumas ingieren los microorganismos. Este proceso puede mejorarse utilizando una luz brillante que ilumine las gotas del producto en las plumas del ave, atrayendo la atención de ésta hacia una mayor limpieza y por ende ingestión del producto vía oral (Mead, 2000).

Por último, se señala la administración del producto *in ovo*, método que implica la inyección de los huevos durante la incubación, donde los organismos son depositados en el saco aéreo o en el amnios del huevo. Desafortunadamente el nacimiento se ve reducido por la producción de gas microbiano y la presencia de organismos proteolíticos (Mead, 2000).

Debido a que el rol de la flora intestinal normal es prevenir la colonización de bacterias dañinas, el uso de probióticos tiene un efecto positivo en las aves. La mayoría de las experiencias en las que se utiliza el producto, este se administra antes del desafío experimental con *Salmonella*. Así, En 1998, Schneitz *et al.*, administraron Broilact® vía oral forzada a pollos broiler con dosis única en el día del nacimiento, o cinco dosis con un intervalo de dos a cinco días durante dos semanas, con inicio al segundo día de edad. En una primera experiencia los pollos tratados con el producto de estas dos formas, se desafiaron a los días siguientes de finalizado el tratamiento, con *S. Infantis* ($5,0 \times 10^4$ ufc/mL por ave). En una segunda experiencia pollitos de 14 días, tratados de igual manera, fueron desafiados al día siguiente de finalizado el tratamiento, con *S. Infantis* ($6,0 \times 10^7$ ufc/mL por ave). Los pollos tratados con Broilact® dosis única o con cinco dosis estuvieron protegidos contra una alta dosis de *Salmonella* spp., pero no se encontraron diferencias significativas al uso de una o cinco dosis. El resultado además demostró incluso que los pollos de 14 días de edad fueron más difíciles de desafiar por presentar ya un desarrollo de la microflora intestinal.

Schneitz y Renney (2003) en faisanes de un día de edad, administraron Broilact® en dosis única vía oral, los que fueron desafiados 24 hrs después con *S. Infantis* en dos concentraciones ($4,4 \times 10^3$ ufc/mL y $4,3 \times 10^3$ ufc/mL) y luego sacrificados cuatro y cinco días después. Los recuentos cecales de *S. Infantis* correspondieron a $2,9 \log_{10}$ ufc/g para los tratados y $8,4 \log_{10}$ ufc/g para los controles. El número promedio de *Salmonella* fue > 1000 ufc/ g contenido cecal de los grupos tratados y > 100 millones en los no tratados. Indicándose así, que los faisanes recién nacidos son extremadamente susceptibles a la infección que posteriormente declina con una mayor edad de las aves.

A su vez Fukata *et al.*, (1999), suministraron a un grupo de pollos de un día, Broilact® en forma oral, a otro grupo fructo-oligosacáridos (FOS) al 0,1% en el alimento durante toda la experiencia, y al último grupo la combinación de ambos tratamientos. Todos los pollos fueron desafiados con *S. Enteritidis* 10^8 ufc/mL a los 7 o 21 días de edad. Los pollos tratados con Broilact®, desafiados a los siete días y sacrificados un día después, tuvieron recuentos cecales significativamente menores ($2,35 \pm 0,7 \log_{10}$) en relación al grupo control ($4,57 \pm 0,37 \log_{10}$), en tanto que los tratados y sacrificados catorce días después tuvieron cero recuento cecal en relación al control ($0,15 \log_{10}$). En una segunda experiencia en que los pollitos fueron desafiados a los 21 días de edad y sacrificados un día después, los recuentos fueron bajos en el grupo FOS ($2,45 \pm 0,20 \log_{10}$) y FOS más Broilact® ($1,76 \pm 0,37 \log_{10}$) en comparación con el grupo control ($4,31 \pm 0,50 \log_{10}$), en tanto que los tratados y sacrificados a los catorce días tuvieron en los tres tratamientos recuentos muy bajos (Broilact® $0,40 \pm 0,40 \log_{10}$, FOS $0,30 \pm 0,20 \log_{10}$ y en la combinación de ambos tratamientos recuento cero en relación al control ($1,54 \pm 0,69 \log_{10}$). Además la infección en órganos por *S. Enteritidis* fue significativamente menor cuando se administró Broilact® en pollos desafiados a los 7 o 21 días al utilizar la combinación de ambos tratamientos.

En relación a una experiencia donde el producto se utiliza después del desafío bacteriano. Palmu y Camelin (1997) en un criadero contaminado previamente con *Salmonella* utilizaron vía aerosol Broilact® en pollitos de un día y observaron que la positividad a *Salmonella* en los grupos tratados bajó a 6% en relación al 42% de positividad en los grupos controles (P=0,0005). Considerando un gran número de crianzas estudiadas a

su llegada al plantel, se encontró que el 16% de ellas fueron positivas a *Salmonella*; de estas crianzas un 13% correspondió al grupo tratado y 25% al grupo control, pero esta disminución no fue significativa ($P=0,337$). En una segunda experiencia, se muestrearon piel de cuello en grupos de aves tratadas con y sin Broilact® después de haber sido evisceradas. El porcentaje de muestras positivas a *Salmonella* fue significativamente menor ($P=0,021$) en el grupo tratado con Broilact® (44%) que en el grupo control sin Broilact® (62%).

Estos buenos resultados, frente a la disminución de los recuentos de *Salmonella* spp. para varios de sus serotipos, sugieren que el uso de microorganismos vivos limitan su colonización en aves. Una nueva etapa sería confirmar si la administración de estos microorganismos logra una acción sinérgica, al complementarse con otro método biológico como es el empleo de bacteriófagos contra *Salmonella* spp.

Las terapias o tratamientos contra *Salmonella* spp. al igual que en otras enfermedades bacterianas pueden considerarse de tipo preventivo o curativo.

- **Bacteriófagos**

El inglés Ernest Hankin reportó, en 1896, la presencia de una marcada actividad antibacteriana de una desconocida sustancia en ríos de India, que pasaba a través de finos filtros de porcelana y, la atribuyó como responsable de limitar la diseminación de una epidemia de cólera (Sulakvelidze *et al.*, 2001). Veinte años después, el bacteriólogo inglés Frederick Twort reintrodujo el tema, reportando un fenómeno similar y avanzando en la hipótesis de que pudo ser debido a un virus. Los bacteriófagos fueron oficialmente descubiertos por Félix D` Herelle, microbiólogo del Instituto Pasteur (Sulakvelidze *et al.*, 2001). Twort en 1915 y D` Herelle en 1917 visualizaron en placas con cultivos bacterianos la presencia de halos de lisis cuando se añadían extractos de aguas residuales (López, 2004).

La utilización de los bacteriófagos por D'Herelle surgió ante la necesidad de encontrar tratamiento para severos brotes de disentería hemorrágica en seres humanos en 1915; entonces varios soldados fueron hospitalizados y D' Herelle fue el encargado de la investigación de los brotes. Durante estos estudios un filtrado de muestras fecales de pacientes, libres de bacterias, lo mezcló e incubó con cepas de *Shigella* aisladas desde los mismos enfermos (Sulakvelidze *et al.*, 2001). Es entonces cuando D' Herelle observó, en los cultivos, la aparición de pequeñas áreas limpias que él llamó placas. Aparentemente aisló el bacteriófago por primera vez en 1916, señalando que ellos eran virus vivos y no enzimas (Sulakvelidze *et al.*, 2001).

El primer uso de bacteriófagos en forma terapéutica (fagoterapia) fue la administración en un niño de 12 años con disentería severa; previamente para confirmar su seguridad, D'Herelle y médicos internos ingirieron una preparación del bacteriófago. Se observó que con una sola administración del bacteriófago antidisentería cesaban los síntomas de la enfermedad (Sulakvelidze *et al.*, 2001).

Después de este inicio como agente terapéutico, en los años 40' se crearon múltiples producciones comerciales de bacteriófagos, las que dejaron de utilizarse por la ventaja que presentó, en ese entonces, el advenimiento de los antibióticos (Sulakvelidze *et al.*, 2001). Sin embargo, en Europa del Este y en la Unión Soviética continuaron usándose en forma terapéutica, solos o asociados a antibióticos (López, 2004); estos países continuaron en forma activa la investigación y desarrollo de los bacteriófagos (Sulakvelidze *et al.*, 2001).

En una recopilación de López (2004) se observó que en la década de los 80,' en países occidentales, se inició tímidamente la utilización de bacteriófagos en animales de experimentación, observándose que eran capaces de sanar infecciones sistémicas en ratas. Luego se amplió su campo de acción a terneros, ovejas y cerdos con resultados esperanzadores.

Actualmente el uso de bacteriófagos es considerado una terapia novedosa y alternativa a los antimicrobianos, proporcionando un método muy eficaz para combatir el preocupante

problema de la resistencia bacteriana frente a todo el arsenal antibiótico del que se dispone (López, 2004).

Definición

Los bacteriófagos que son virus que infectan bacterias, presentan una naturaleza general similar a los otros virus, con una pieza de información genética, ácido nucleico, que puede ser ADN o ARN de hebra simple o doble (Dabrowska *et al.*, 2005; Huff *et al.*, 2005) y una envoltura proteica con o sin lípidos (Skurnik y Strauch, 2006); además, requieren de un hospedero sensible con un receptor específico para replicarse en sus células (Dabrowska *et al.*, 2005).

Desde 1959 se han examinado, bajo microscopía electrónica, sobre 5.100 bacteriófagos presentado diferentes morfologías y tamaños. Al menos el 96% de estos esta constituido por el orden Caudovirales y por tres familias: Siphoviridae, Myoviridae y Podoviridae. El 4% restante de estos son poliédricos, filamentosos y pleomórficos (Ackermann, 2003).

Se describen dos tipos principales de bacteriófagos, los líticos y los temperados o lisogénicos. Los bacteriófagos líticos matan a la bacteria a través de un proceso de múltiples pasos. Primero, los bacteriófagos se fijan a la superficie de las bacterias blanco a través del reconocimiento de sitios de ataque específicos (receptores), estos pueden ser cápsulas, diferentes partes de lipopolisacárido (LPS), flagelos, fimbrias y muchas otras superficies proteicas (Skurnik y Strauch, 2006). Luego del reconocimiento del receptor, el ácido nucleico es inyectado dentro de la bacteria, con lo que se expresan los primeros genes del bacteriófago y se produce la síntesis de las primeras proteínas, necesarias para la síntesis del material genético del bacteriófago y, disminución de la biosíntesis y degradación del ADN o ARN y proteínas bacterianas; posteriormente se expresan las proteínas tardías involucradas en formar la estructura del bacteriófago, además de causar la lisis bacteriana (Skurnik y Strauch, 2006).

Cuando las partes del bacteriófago están formadas (cabeza, cola y genoma) estas se ensamblan y una vez completo, ocurrirá la lisis de la bacteria huésped y liberación de la progenie fágica (Skurnik y Strauch, 2006). Esto da como resultado una producción promedio de 50 a 200 partículas fágicas por bacteria (Huff *et al.*, 2005). Si cada partícula fágica infecta, se multiplica y mata a una bacteria huésped habrían hasta 40.000 progenies al final del segundo ciclo, 8.000.000 al final del tercer ciclo y así sucesivamente (Carlton, 1999). El tipo de bacteriófago lítico que inicia la replicación y producción de progenie en forma inmediata es el preferido para la fagoterapia, ya que conduce a una rápida destrucción de la bacteria blanco, y así tiene menor oportunidad de interactuar con el genoma bacteriano (Joerger, 2003).

La habilidad de los bacteriófagos de lisar bacterias al final del ciclo, es la piedra angular que sustenta la idea de usarlos como agentes terapéuticos (Skurnik y Strauch, 2006).

Los bacteriófagos temperados o lisogénicos no se replican inmediatamente en la bacteria que infectan, sino que coexisten con ella como pro-bacteriófagos, es decir su ácido nucleico viral insertado en el genoma bacteriano. Cuando la bacteria lisogénica se estresa, el pro-bacteriófago se activa resultando la replicación del virus y la muerte de la bacteria por lisis (Huff *et al.*, 2005; Skurnik y Strauch, 2006).

Características Generales

Los bacteriófagos en relación a las bacterias son más numerosos en la tierra. Se estima que la población global de bacteriófagos es de 10^{30} partículas virales (Hendrix, 2002) y, que por cada bacteria hay 10 partículas fágicas (Skurnik y Strauch, 2006). Pueden encontrarse en todo lugar donde este presente su bacteria blanco, desde la profundidad de océanos hasta manantiales calientes, y pueden ser aislados de agua, aceite y organismos animales. Los bacteriófagos son muy comunes en el tracto gastrointestinal, y junto a sus bacterias blanco son un importante componente de la flora intestinal (Drabowska *et al.*, 2005).

Desde un punto de vista clínico, los bacteriófagos parecen ser inocuos. Durante la larga historia de su administración, estos han sido dados por muchas vías tales como la oral, rectal, tópico a nivel dérmico, aerosol y en inyecciones tanto intramuscular, intraperitoneal e intravenosa donde no se han reportado serias complicaciones sobre su uso (Sulakvelidze *et al.*, 2001). Es por esto que, recientemente se ha aprobado el uso de bacteriófagos específicos en Estados Unidos para *Listeria monocytogenes* en alimentos listos para su consumo (Bren, 2006).

Los bacteriófagos son, generalmente, bastante estables y sobreviven al almacenamiento relativamente bien, incluso si son incluidos en partículas sólidas (Joerger, 2003).

Otra característica que hace atractivos a los bacteriófagos, es su naturaleza discriminatoria. La mayoría de estos virus conocidos interactúan con un set particular de bacterias que expresan sitios específicos de unión; las bacterias sin este receptor no son afectadas (Joerger, 2003), además es una gran ventaja ya que el bacteriófago no matará otras especies de bacterias (Payne y Jansen, 2003). Con algunas excepciones, los bacteriófagos no tienden a cruzar los límites de las especies bacterianas y si se produce resistencia al bacteriófago, es poco probable que lo hagan otras especies bacterianas sobre el mismo (Carlton, 1999).

El crecimiento y la sobrevivencia de los bacteriófagos son controlados por una variedad de factores como pH, agua, temperatura, presencia de la bacteria blanco y estatus metabólico del huésped. La sobrevivencia del bacteriófago en el medio ambiente parece ser un fenómeno complejo; los niveles pueden variar enormemente desde ser indetectables hasta disminuciones de hasta 80 % por hora. Se ha observado que tanto partículas como coloides orgánicos e inorgánicos pueden mejorar su sobrevivencia (Gorski y Weber- Drabowska, 2005).

Se ha demostrado que los bacteriófagos no sobreviven a la exposición de pH 2,0 y decrecen en número si se exponen a pH 3,0 a 7,0; la sensibilidad a un bajo pH depende de la especie de bacteriófago. Algunos son sensibles al medio ambiente ácido, por lo tanto la neutralización del ácido gástrico antes de su administración vía oral podría ser un factor

importante de su viabilidad (Drabowska *et al.*, 2005). Esto se ha comprobado en estudios realizados tanto por Atterbury *et al.*, (2007) y Higgins *et al.*, (2007b) en que los bacteriófagos empleados fueron administrados junto a carbonato de calcio e hidróxido de magnesio respectivamente, cuando la vía de administración fue oral.

De los factores que pueden influir en el número de bacteriófagos está la luz solar; sin embargo, la susceptibilidad a la radiación de alta energía difiere entre especies (Gorski y Weber-Drabowska, 2005). Las variaciones de temperatura también pueden dañar la capacidad infectiva de los bacteriófagos. Otros factores potencialmente adversos se encuentran en el tracto intestinal, como las variaciones de pH, la presencia de enzimas y otros componentes digestivos como la bilis (Joerger, 2003).

Una bacteria puede volverse resistente al bacteriófago al mutar o al perder el receptor fágico (Skurnik y Strauch, 2006). Según los autores, Levin y Bull, (2004) esta situación no siempre es negativa, ya que la resistencia puede reducir la virulencia de la bacteria si el receptor utilizado por el bacteriófago resulta ser un determinante de virulencia. Una bacteria puede ser resistente a un bacteriófago por la adquisición horizontal de sistemas de restricción y modificación que degraden el ácido nucleico del bacteriófago inyectado y por una mutación de un gen que sea esencial para la replicación del bacteriófago (Skurnik y Strauch, 2006).

En relación a su cinética, lo que más diferencia a los bacteriófagos es su habilidad de autorreplicación. Esto significa que sólo un pequeño inóculo inicial podría ser necesario para que controlen a su bacteria blanco. Se pueden distinguir dos tipos de infecciones realizadas por los bacteriófagos, infección primaria (infección de la bacteria por el bacteriófago desde el inóculo inicial) e infección secundaria, que es la infección de la bacteria por la progenie de los bacteriófagos (Payne y Jansen, 2003). Si en un inicio se inocula una gran cantidad de bacteriófagos, podrían destruir un número significativo de bacterias, lo que es descrito como fagoterapia pasiva. Cuando la terapia, por el contrario, se basa en una infección secundaria, con incremento del número de bacteriófagos autorreplicados, se denomina fagoterapia activa (Payne y Jansen, 2003). La cinética de la

fagoterapia tiene un estrecho paralelismo con la dinámica de población de modelos ecológicos predador-presa y de modelos epidemiológicos huésped - parásito (Payne y Jansen, 2003; Dabrowska *et al.*, 2005).

El punto clave de la fagoterapia es que el crecimiento de la población de bacteriófagos es críticamente dependiente de la densidad o concentración de la bacteria blanco, donde el número de bacteriófagos aumenta sólo cuando hay una alta densidad bacteriana y, donde la probabilidad del bacteriófago de infectar bacterias excede la posibilidad de que el bacteriófago muera por carencia de su blanco (Payne y Jansen, 2003, Carillo *et al.*, 2005). Al principio de esta dinámica, la densidad bacteriana es muy baja para sostener la población de bacteriófagos y el número de bacteriófagos baja; después, si la densidad bacteriana es lo suficientemente alta para que la infección secundaria ocurra, el número de bacteriófagos aumenta (Payne y Jansen, 2003).

En un ambiente relativamente fluido como un medio de cultivo líquido o la sangre, la mezcla y difusión de los bacteriófagos es producida relativamente sin obstáculos. Pero ante la viscosidad del contenido intestinal se puede reducir la probabilidad del contacto entre la bacteria-bacteriófago por lo que se requieren mayores niveles de bacteriófagos en relación a la bacteria para un encuentro efectivo (Joerger, 2003).

En la actualidad, se ha visto que los bacteriófagos interactúan con el sistema inmune. Por su naturaleza vírica, se ha observado la generación de anticuerpos antibacteriófagos, los cuales pueden causar neutralización o inactivación de los bacteriófagos; estas interacciones junto al sistema inmune inespecífico juegan un rol importante en la remoción de bacteriófagos desde organismos superiores (Dabrowska *et al.*, 2005).

No se debe dejar de considerar que los bacteriófagos que se encuentran en la circulación sanguínea son potencialmente sujetos a ser atacados por anticuerpos, o pueden ser removidos de circulación por el sistema reticuloendotelial y que en general, la mayoría de los bacteriófagos son removidos desde el cuerpo relativamente rápido lo que disminuiría la efectividad de la fagoterapia, pero esto puede ser compensado con la administración de

una alta dosis de bacteriófagos (Carlton, 1999). Además sería factible la selección de variantes de bacteriófagos que no sean capaces de ser removidos de la circulación en el cuerpo. Respecto a esto, Merrill *et al.*, (1996) realizaron un estudio donde seleccionaron bacteriófagos mutados después de pasar por varios ciclos de replicación y observaron que resistían en circulación periodos mayores en relación a otros bacteriófagos.

Se observa que los anticuerpos neutralizantes se producen en individuos que utilizaron una terapia con bacteriófagos o estuvieron expuestos naturalmente a estos y, que diferentes tipos de bacteriófagos pueden estimular diferentes tipos de anticuerpos por la diferenciación de sus antígenos. Los bacteriófagos relacionados entre sí, usualmente comparten antígenos similares que estimulan a la producción de anticuerpos capaces de reaccionar cruzadamente con especies de bacteriófagos relacionados (Dabrowska *et al.*, 2005).

La administración de bacteriófagos puede ser por varias vías. La vía oral les permite alcanzar la circulación sanguínea (fagemia) y migrar a los sitios de infección bacteriana, además de penetrar otros tejidos y órganos incluido hígado, bazo y riñón (Gorski y Weber-Drabowska, 2005). La rápida penetración a la sangre es seguida de la diseminación a los órganos internos y parece ser que la persistencia de bacteriófagos en el bazo es significativa (Dabrowska *et al.*, 2005). Además, se observa que la permanencia de la concentración de los bacteriófagos en el hospedero animal, a través del tiempo, depende de la ausencia o presencia de la bacteria susceptible (Dabrowska *et al.*, 2005) y, su permanencia en los tejidos dependerá de la ruta de administración (Gorski y Weber-Drabowska, 2005).

La presencia de bacteriófagos en el tracto gastrointestinal bajo ciertas circunstancias, sugiere que estos pueden cruzar la barrera epitelial y entrar en sitios extraintestinales como linfonodos mesentéricos, bazo e hígado (órganos primariamente responsables de su eliminación), y alcanzar la circulación sanguínea (Gorski y Weber-Drabowska, 2005). Se señala que los bacteriófagos administrados por la ruta intravenosa pueden ser rápidamente eliminados desde el sistema circulatorio y ser retenidos en forma primaria por el bazo e hígado, donde persisten por algunos días (Gorski y Weber-

Drabowska, 2005). Otros autores sugieren que por la misma vía de ingreso se permite una rápida y directa introducción de estos a la circulación sanguínea y su diseminación a través de este sistema (Merril *et al.*, 1996).

Otras vías de administración han entregado resultados bastantes similares de efectividad en la penetración de los bacteriófagos en la sangre, como es la inyección intraperitoneal; en este caso los títulos reflejan la dosis inicial y sólo hay una relativa disminución de ellos en el cuerpo animal. La penetración sanguínea desde el peritoneo además de ser fácil y rápida, tiene la habilidad para curar cuadros de septicemia en animales. En forma similar, la inyección intramuscular puede también proteger de infecciones bacterianas letales (Merril *et al.*, 1996).

Atterbury *et al.*, (2007) usaron bacteriófagos vía oral para reducir la colonización de *Salmonella* en pollos broiler donde se obtuvo una reducción significativa en el recuento cecal para *S. Enteritidis* $1,53 \pm 2,38 \log_{10}$ ufc/g contenido cecal y *S. Typhimurium* $3,48 \pm 1,88 \log_{10}$ ufc/g contenido cecal en relación a los grupos controles ($5,77$ y $5,67 \log_{10}$ ufc/g contenido cecal). En el primer y segundo día después del tratamiento con bacteriófago, el número de *S. Enteritidis* se redujo significativamente, lo que también fue observado para la cepa *S. Typhimurium*.

Huff *et al.*, (2002) por otro lado, los utilizaron vía aerosol en aves que fueron desafiadas posteriormente con *E.coli*. Los resultados demostraron cambios significativos en la mortalidad entre los grupos tratados con bacteriófagos y los no tratados. En una primera experiencia a los siete días de edad, se utilizó la mezcla de dos bacteriófagos (DAF6 a $3,6 \times 10^7$ unidad formadora de placas (ufp)/mL y SPR02 a $4,6 \times 10^7$ ufp/mL) y la inoculación con *E. coli* $5,6 \times 10^5$ ufc/mL. Hubo diferencias en la mortalidad cuando se utilizó bacteriófagos (30%) en relación al grupo no tratado (60%). Cuando se utilizaron mayores concentraciones de bacteriófagos ($2,6 \times 10^8$ ufp/mL de SPR02 y $2,35 \times 10^9$ ufp/mL DAF6) se encontraron diferencias aún mayores en la mortalidad entre el grupo tratado (7%) y no tratado (63%). En una segunda experiencia, pero a los diez días de edad, también hubo diferencia significativa entre el grupo tratado (3%) del no tratado (40%).

Los mismos autores en el año 2003, compararon la administración de bacteriófagos vías aerosol vs. intramuscular en la protección de aves contra *E. coli*. Como resultado, se encontró que el tratamiento vía aerosol inmediatamente después de la inoculación bacteriana protegió significativamente, disminuyendo la mortalidad en 30%. Sin embargo, la administración de los bacteriófagos 24 o 48 horas después de la inoculación bacteriana no protegió en forma contundente. La vía intramuscular de una sola dosis de bacteriófago inmediatamente después de la inoculación de *E. coli*, redujo la mortalidad en forma significativa en 36%. La inoculación intramuscular produjo un título relativamente alto y rápido a nivel sistémico, comparado con los obtenidos por vía aerosol; pero, lo negativo de la vía intramuscular es que la mayoría de los bacteriófagos son removidos relativamente rápido lo que podría afectar la efectividad de la fagoterapia.

Fagoterapia

Hay un interés creciente en el uso de bacteriófagos para controlar las infecciones bacterianas (Huff *et al.*, 2005); en especial porque pueden actuar frente a cepas bacterianas altamente resistentes a los agentes antimicrobianos disponibles (Dabrowska *et al.*, 2005) y proveen una alternativa efectiva a estos (Huff *et al.*, 2005). Es posible incluso, utilizarlos en conjunto como terapia si es que la bacteria blanco adquiere resistencia a los antimicrobianos o a los bacteriófagos, porque es muy poco probable que sea resistente a ambos; con la fagoterapia se prolongará una posible utilidad clínica (Carlton, 1999).

Con la fagoterapia hay una baja probabilidad de destrucción de la flora nativa intestinal, respiratoria o de tracto urogenital y, por lo tanto, es poco probable que provoque enfermedad y muerte cuando hay sobrecrecimiento bacteriano (Carlton, 1999). Los bacteriófagos pueden trabajar a dosis muy bajas y son fácilmente utilizables en variadas experiencias (Payne y Jansen, 2003). Los bacteriófagos además pueden ser utilizados en el control de patógenos en alimentos (Sklar y Joerger, 2001).

Quizás, lo que más puede limitar la eficacia de la fagoterapia es la rápida eliminación de los bacteriófagos; así, se ha observado que sobre el 90% de los

bacteriófagos administrados al sistema circulatorio se eliminan rápidamente, de tal modo que disminuye la efectividad de la dosis disponible para bacterias infectantes *in vivo* (Merril *et al.*, 1996).

Levin y Bull (2004), sugirieron que la fagoterapia sólo es necesaria para disminuir el número de bacterias infectantes a un nivel donde las defensas del huésped pueden hacerse cargo de las bacterias remanentes. Existen determinados prerequisites para la fagoterapia:

- Debe ser utilizada con sentido común, donde la biología de la terapia debe ser bien entendida.
- Las preparaciones de bacteriófagos deben reunir todos los requerimientos de seguridad, la preparación debe estar libre de bacterias y sus componentes.
- Las preparaciones de bacteriófagos deben contener los bacteriófagos infectivos; además, el almacenamiento debe estar validado.
- El receptor del bacteriófago debe ser conocido.
- La eficacia de la fagoterapia debe ser probado en un modelo animal, cada bacteriófago puede comportarse en forma diferente *in vivo*.

Otros usos de los bacteriófagos

En alimentos como las frutas, los bacteriófagos han demostrado el biocontrol que ejercen sobre bacterias tales como *Listeria monocytogenes*, pudiendo con su utilización, disminuir los recuentos bacterianos (Leverentz *et al.*, 2003); en carcasas de ave contaminadas con *S. Enteritidis* o *Campylobacter* también se han utilizado con resultados muy favorables en la disminución bacteriana al aplicar bacteriófagos (Higgins *et al.*, 2005).

A nivel ambiental, se ha estudiado el posible uso de bacteriófagos en el proceso de tratamiento para aguas residuales donde los bacteriófagos controlen patógenos específicos, pero para eso, faltarían más estudios sobre el comportamiento ecológico microbiano de los componentes del agua y de sus interacciones para que los bacteriófagos sean una solución efectiva al problema ambiental (Withey *et al.*, 2005).

- Bacteriófagos *versus E.coli*

Huff *et al.*, 2005 realizaron, en aves, un estudio para determinar si el uso de un bacteriófago previo al desafío con *E. coli*, puede prevenir la colibacilosis. El grupo inoculado sólo con *E. coli* 10^3 ufc/mL tuvo 80% mortalidad, la que descendió a 30% cuando se administró el bacteriófago en 10^3 ufp/mL. Otro grupo desafiado con *E. coli* 10^4 ufc/mL tuvo una mortalidad de 85%, la que descendió a 40% cuando se administró el bacteriófago en 10^4 ufp/mL. Mejores resultados se obtuvieron con bacteriófago a una concentración de 10^6 ufp/mL que tuvo una mortalidad de 5% y, de hasta un 0% cuando el bacteriófago llegó a la concentración de 10^8 ufp/mL, donde la protección fue completa. Esto demostró que la utilización de altos títulos de bacteriófagos presentes en el sitio de la infección previene, en este caso, la colibacilosis. Otra experiencia utilizó dos bacteriófagos SPR02 (10^8 ufp/mL) y DAF6 (10^9 ufp/mL) vía aerosol en distintos grupos, desafiados inmediatamente y a los 7, 8 y 10 días de edad. Se encontró que el grupo tratado con bacteriófagos inmediatamente antes de *E. coli*, tuvo un 7% mortalidad; el tratado con bacteriófagos a los siete días y desafiado a los ocho, un 27% mortalidad. Por último, el grupo tratado con bacteriófagos a los siete días y desafiado a los diez días tuvo una 3% mortalidad. Se concluyó que el uso de bacteriófagos fue efectivo al prevenir el comienzo de una severa colibacilosis cuando son administrados inmediatamente previos al desafío de las aves con *E. coli* y además previno el cuadro cuando los bacteriófagos fueron administrados tres días antes que la bacteria, lo que sugirió que una administración de bacteriófagos en la nacedora antes de llegar al lugar de crianza proveería protección en el momento de mayor susceptibilidad a las infecciones respiratorias.

Los mismos autores el año 2006, evaluaron diferentes títulos de bacteriófagos en pollos broiler para el tratamiento de colibacilosis. Para esto, se utilizaron dos bacteriófagos en forma separada a diferentes concentraciones para tratar la infección por *E. coli*. Una primera experiencia consistió en la administración del bacteriófago SPR02 o DAF6 10^8 ufp por sí solos; y en el desafío de *E. coli* 6×10^4 ufc/mL a los siete días de edad, donde posteriormente se administró el bacteriófago SPR02 o DAF6 en concentraciones decrecientes 4×10^8 , 10^6 , 10^4 , 10^2 ufp vía intramuscular. Las aves fueron eutanasiadas a las

tres semanas de edad. Los resultados observaron que la mayor concentración de bacteriófago (10^8 ufp) en SPR02 y (10^6 ufp) en DAF6 tuvo el menor porcentaje de mortalidad (7%) en relación al grupo control (48%). Además, se observaron diferencias entre los dos bacteriófagos, las aves tratadas con SPR02 tuvieron una mortalidad muy baja (10%) a la concentración de 10^4 ufp, lo que no se observó con DAF6 donde la mortalidad de las aves tratadas fue de 23%. En una segunda experiencia se varió la concentración de *E. coli* 9×10^4 ufc/mL y donde las concentraciones de bacteriófagos fueron 3×10^8 , 10^6 , 10^4 y 10^2 ufp. A estas concentraciones el bacteriófago SPR02 se comportó muy diferente de la primera experiencia, la menor mortalidad continuó con 10^8 ufp, pero a una concentración de 10^4 ufp la mortalidad se elevó en cinco veces (50%). En relación al bacteriófago DAF6, este aumentó la mortalidad con su utilización en todas las concentraciones, manteniéndose entre 37- 47%.

Por otro lado, Barrow *et al* (1998), utilizaron bacteriófagos líticos en cuadros septicémicos contra *E. coli* en pollos y terneros infectados. Se observó que la bacteria en ausencia del bacteriófago produjo 100% de mortalidad en los pollos, pero cuando tanto la bacteria como el bacteriófago se administraron vía intramuscular, a la misma concentración (10^6), no hubo mortalidad. La administración del bacteriófago 10^4 ufp también produjo una protección significativa en las aves, indicando que el bacteriófago se multiplicó *in vivo*. La administración de 10^2 ufp del bacteriófago produjo alguna protección pero hubo mortalidad de las aves en relación a las demás concentraciones. Esta misma terapia fue utilizada en terneros privados de calostro e inoculados vía oral con *E. coli* H247 10^{10} ufc y 8 horas después inyectados con bacteriófago 10^{10} ufp vía intramuscular. Al sacrificio de los terneros tres días post infección para tomar muestras intestinales de la cepa desafío, se observó que de cuatro animales, sólo uno enfermó, encontrándose bacterias mutantes resistentes a la acción del bacteriófago.

- Bacteriófagos *versus Campylobacter*

Atterbury *et al.* (2005) seleccionaron 205 broiler en el Reino Unido, desde diferentes grupos de aves que fueron posteriormente sacrificadas y necropsiadas, removiéndose ambos ciegos, donde se aislaron *Campylobacter jejuni* y un bacteriófago lítico específico para *Campylobacter*. Ciento veintinueve pollos broiler de 205 (63%) tuvieron sólo aislamiento cecal de *Campylobacter* y 41 de 205 (20%) aislamiento del bacteriófago lítico. Se evidenció que las aves con ambos aislamientos tuvieron una significativa reducción en el recuento cecal de la bacteria ($5.1 \log_{10}$ ufc/g) ($P < 0,001$) en comparación a las muestras que sólo evidenciaban *Campylobacter* ($6.9 \log_{10}$ ufc/g). Esta reducción en el título fue de $2 \log_{10}$. Fue interesante observar que la bacteria no fue aislada de 29 de 41 (71%) ciegos positivos al bacteriófago, lo que se comparó con 47 de 164 (29%) de los ciegos negativos al bacteriófago. Esta diferencia entre las incidencias pudo haber sido debida a que la población de bacteriófagos actuó para reducir la colonización cecal de la bacteria bajo los niveles de detección ($2 \log_{10}$). Se concluyó que el bacteriófago afectó el número de *Campylobacter*, lo que demostró la correlación entre la presencia del bacteriófago en un ambiente natural y la reducción en el recuento de *Campylobacter* colonizada en el ciego de las aves.

Carrillo *et al.*, (2005) a su vez, estudiaron los bacteriófagos CP8 y CP34 como terapia para reducir la colonización por *Campylobacter jejuni* en pollos broiler; éstos se inocularon a los 20 días de edad vía oral con *C. jejuni* $5 \log_{10}$ ufc; 5 días post inoculación fueron tratados con bacteriófagos, en dosis desde $5 \log_{10}$ hasta $9 \log_{10}$ ufp. Se sacrificaron y se les realizó la necropsia con intervalos de 24 horas. Los resultados evidenciaron que al utilizar tanto el bacteriófago CP8 como CP34 a una concentración de $7 \log_{10}$ ufp hubo una reducción en el recuento de *C. jejuni* de $5,6 \log_{10}$ y $3,9 \log_{10}$ ufc/g de contenido cecal respectivamente; además con el bacteriófago CP34 los recuentos en órganos fueron menores. Ambos bacteriófagos a la concentración de $9 \log_{10}$ ufp de acuerdo a los autores no tuvieron resultados efectivos en la disminución del recuento cecal de *C. Jejuni* en los primeros días de la experiencia, pero posteriormente al cuarto día hubo una disminución de $1,4 \log_{10}$ ufc/g de contenido cecal.

Si observamos lo que pasa a nivel industrial, Atterbury *et al.*, (2003) estudiaron la aplicación del bacteriófago $\Phi 2$ en la superficie de la piel de pollos contaminados con *Campylobacter* y, como a diferentes temperaturas se reducía su recuento. Trozos de piel (2 cm²) fueron inoculados con *Campylobacter jejuni* 10⁶ ufc seguida 30 minutos después con el bacteriófago $\Phi 2$ 10⁷ ufp. Posteriormente las muestras fueron almacenadas a 4°C o a -20°C. A los días 1, 3 y 5 se sacaron muestras que estaban a 4°C y el día 5 a -20°C. En los grupos controles inoculados con *C. jejuni* 10⁶ o 10⁴ ufc, el recuento fue de 5,3 log₁₀ ufc y 3,3 log₁₀ ufc promedio; con el uso del bacteriófago a 10⁷ ufp hubo una reducción significativa de 1,1 log₁₀ del recuento de la bacteria en todos los tiempos muestreados de muestras almacenadas a 4°C en relación con el control positivo. Los recuentos fueron significativamente menores (2,3 log₁₀) al estar las muestras congeladas. Se concluyó que el bacteriófago sobrevivió la baja temperatura de almacenamiento y redujo los recuentos de la bacteria, además el hecho de congelar las muestras también bajó el recuento bacteriano. Lo importante es que en estas condiciones los bacteriófagos utilizados deben encontrarse con su bacteria blanco para poder actuar.

Goode *et al.*, (2003) por otro lado, evaluaron la reducción de la contaminación experimental de piel de pollo con *Salmonella* y *Campylobacter* mediante la aplicación de bacteriófagos líticos. Realizaron una experiencia donde piezas de piel de pollo fueron inoculadas con *Campylobacter jejuni* 10⁴ ufc/ cm² y con un bacteriófago para *C. jejuni* 10⁶ ufp/cm²; el tratamiento con el bacteriófago a 10⁶ ufp/ cm² redujo significativamente el recuento de *Campylobacter* en 95% (4,05 a 1,74 log₁₀ ufc/ cm²).

- Bacteriófagos *versus* *Listeria*

En frutas, Leverentz *et al.*, (2003) estudiaron biocontrol de *Listeria monocytogenes* en cortes frescos, utilizando bacteriófagos líticos y bacteriocinas (péptidos con actividad bactericida contra especies bacterianas). Trozos de manzanas y melones se trataron con bacteriófagos sobre 2 log en relación a la concentración bacteriana, posteriormente se inocularon con *L. monocytogenes* 5 x 10⁵ ufc/mL. En los resultados se encontró que el tratamiento sólo con bacteriófagos redujo el recuento bacteriano en melón; el que se

potenció al adicionarle bacteriocina (nisina). Usando la combinación de bacteriófagos más bacteriocina la población de *L. monocytogenes* bajó de 5,8 log a 1,4 log en cortes de melón y de 3,5 log a 0,6 log en cortes de manzana. Este resultado estuvo influido por el pH de los sustratos debido a que la concentración bacteriana (crecimiento) de *L. monocytogenes* depende del pH al que se enfrenta, donde su pH óptimo de crecimiento es de pH 6 a 8. En los cortes de melón, el pH varió de 5,5 a 6,5 y en la manzana de 3,8 a 4,2.

Debido a los buenos resultados encontrados con el uso de bacteriófagos en *Listeria monocytogenes*, en el año 2006 la Food and Drug Administration (FDA) aprobó su uso para ser agregados a la carne y productos avícolas listos para su consumo. Este es un preparado de 6 bacteriófagos purificados, específicos contra *L. monocytogenes*. Esto marca el inicio de la regulación de la FDA en el uso de preparaciones de bacteriófagos como aditivo de alimentos. La preparación aprobada se reporta efectiva contra 170 cepas de *L. monocytogenes* y cada bacteriófago es específico contra varias cepas, incluidas las cepas asociadas a enfermedad por los alimentos, de acuerdo al registro federal (Bren, 2006).

- Bacteriófagos versus *Salmonella* spp.

Atterbury *et al.*, (2007) usaron bacteriófagos específicos para reducir la colonización en cepas de *Salmonella* (Enteritidis, Hadar y Typhimurium) utilizando tres grupos de pollos broiler, uno para cada serotipo. Cada grupo de pollos broiler posteriormente estuvo dividido a su vez en cuatro subgrupos A, B, C y D. El grupo A fue inoculado con *Salmonella* vía oral, el grupo B sólo inoculado con bacteriófago vía oral y los grupos C y D recibieron *Salmonella* y bacteriófago. A los 36 días de edad, las aves de los grupos A, C y D fueron desafiadas con una suspensión de *Salmonella nal* con el serotipo correspondiente a la concentración de 8,0 log₁₀ ufc/mL, El grupo B en cambio, fue inoculado con PBS (buffer fosfato). A los 38 días de edad, los grupos B, C y D fueron inoculados además con el bacteriófago a la concentración de 9,0 log₁₀ ufp (bacteriófago Φ151 para *S. Enteritidis*, bacteriófago Φ 25 para *S. Hadar* y bacteriófago Φ 10 para *S. Typhimurium*). Cuando los bacteriófagos fueron administrados a 9,0 log₁₀ ufp/mL no redujeron el recuento de *Salmonella* en los ciegos de ninguno de los serotipos probados.

Los bacteriófagos fueron removidos rápidamente desde el intestino de los pollos en la ausencia de *Salmonella* (grupo B).

En la segunda experiencia en las que se utilizó $11,0 \log_{10}$ ufp de cada bacteriófago, se obtuvo una reducción significativa en la colonización de los ciegos para *S. Enteritidis* $1,53 \pm 2,38 \log_{10}$ ufc/g contenido cecal y *S. Typhimurium* $3,48 \pm 1,88 \log_{10}$ ufc/g contenido cecal después de 24 horas en relación a los grupos controles ($5,77$ y $5,67 \log_{10}$ ufc/g contenido cecal respectivamente); No hubieron diferencias entre los grupos tratados con bacteriófagos y el grupo control para aves colonizadas con *S. Hadar* ($5,77$ y $5,34 \log_{10}$ ufc/g contenido cecal respectivamente). En el primer y segundo día después del tratamiento con bacteriófago, el número de *S. Enteritidis* se redujo significativamente, lo que también fue observado para la cepa *S. Typhimurium*. Sin embargo no hubo reducciones significativas en el recuento de *S. Hadar* en ninguna de las dos experiencias (Atterbury *et al.*, 2007).

A diferencia de lo observado en fagoterapias de dosis única, Toro *et al.*, (2005) evaluaron la eficacia de un cóctel de tres bacteriófagos (S2a, S9 y S11) a la concentración de $5,4 \times 10^6$ ufp/ave, dosificados en los días 4, 5, 6, 8, 9 y 10 de edad en pollitos Leghorn inoculados el día 7 de edad con *S. Typhimurium* ($2,4 \times 10^5$ ufc/mL) y sacrificados al día 11. Muestras de íleon de pollitos tratados con bacteriófagos mostraron en forma significativa un menor recuento de *S. Typhimurium* ($1,1$ ufc/mL), que en pollitos no tratados ($81,8$ ufc/ml). Además, se observó una diferencia significativa en la colonización de ciego por *S. Typhimurium*, que disminuyó aproximadamente en 2500 ufc/mL. Esto demostró que los pollitos tratados con bacteriófagos evidenciaron en el ciego, 6 veces menor cantidad de bacterias que los no tratados con bacteriófagos. Por otra parte se observó un aumento de peso en los pollos tratados con bacteriófagos ($74,61$ gr. vs $68,01$ gr.). Esta diferencia de peso confiere un efecto protector del tratamiento utilizado, a pesar de que no se encontraron diferencias significativas ($P > 0,05$).

Filho *et al.*, (2007) a su vez, emplearon diferentes “pools” de bacteriófagos para reducir *S. Enteritidis* en aves. Recolectaron un “pool” de 4 bacteriófagos (CB40) de corrales de broiler y un “pool” de 45 bacteriófagos (WT450) de aguas residuales. Pollitos

de un día de edad, divididos en cuatro grupos, recibieron vía oral *S. Enteritidis* 9×10^3 ufc/ave. El primer grupo no recibió tratamientos, el segundo fue tratado con “pool” de bacteriófagos WT45Ø 10^8 ufp/ave vía oral, una hora post-inoculación. El tercer grupo con “pool” bacteriófagos CB4Ø 10^8 ufp/ave vía oral, una hora post-inoculación y el cuarto grupo, la mezcla de ambos bacteriófagos (10^8 : 10^8 ufp/ave) vía oral. La mitad de cada grupo de pollitos se sacrificó a las 24 horas y la otra a las 48 horas. Se observó que el uso de los grupos de bacteriófagos solos o combinados redujeron significativamente el recuento de *S. Enteritidis* ($P < 0,05$) desde tonsilas cecales a las 24 horas en relación al grupo control; sin embargo no hubo diferencias significativas a las 48 horas postratamiento.

En relación al uso de pollos sembradores como diseminadores de *Salmonella* spp., Fiorentin *et al.*, (2005) trataron vía oral, con bacteriófagos a broiler desafiados con *S. Enteritidis* PT4. Los pollos fueron infectados durante los tres primeros días de edad mediante el contacto con pollos sembradores “seeder” infectados con *S. Enteritidis* 10^8 ufc/mL; posteriormente a los siete días de edad fueron tratados con una mezcla de tres bacteriófagos líticos 10^{11} ufp/mL. Post tratamiento, los pollos fueron necropsiados en intervalos de 5 días donde se tomaron muestras de bazo, hígado, ciego incluidas las tonsilas cecales. Los resultados encontrados demostraron a los 15 días post tratamiento que el uso de bacteriófagos disminuyó el recuento cecal de *S. Enteritidis* a $9,58 \log_{10}$ ufc/g en relación al control de infección ($9,98 \log_{10}$ ufc/g) pero sin resultados estadísticamente significativos ($P = 0,2200$). A los 20 días post tratamiento los recuentos cecales fueron aún menores en relación al grupo con bacteriófagos $7,97 \log_{10}$ ufc/g en relación al control infección $9,81 \log_{10}$ ufc/g ($P = 0,0620$). En cuanto a hígado y bazo positivos a *S. Enteritidis*, estos disminuyeron su recuento a los 10 días post tratamiento con bacteriófagos, pero sin diferencias estadísticamente significativas.

Sklar y Joerger, (2001) también utilizaron bacteriófagos para tratar la infección de *S. Enteritidis* en pollos broiler. En una primera experiencia se infectó con *S. Enteritidis* 10^4 ufc/mL y tres horas después se administró una sola dosis 10^8 ufp/mL de cada uno de cuatro bacteriófagos (MOT2, CON, P1:1 e IP); los resultados no fueron estadísticamente significativos ($P = 0,53$) entre los grupos tratados con distintos bacteriófagos y el grupo

control sin bacteriófagos, tampoco hubo diferencias entre bacteriófagos. En una segunda experiencia, compararon la administración del bacteriófago P1:1, con dosis de 10^7 ufp por el alimento y agua de bebida, encontrándose un menor recuento cecal de *Salmonella* con el bacteriófago administrado en el alimento ($0,9 \log_{10}$ ufc/g contenido cecal).

En Chile también se ha estudiado el uso de bacteriófagos vía oral. Borie *et al.*, (2004) describieron la utilización de un bacteriófago nativo (F3 α), como biocontrolador de la colonización de *S. Enteritidis* en pollitos broiler experimentalmente infectados. Bajo ese contexto, se inocularon oralmente cuatro grupos de 15 pollos de 10 días de edad. El primero con 1:1 bacteria/ bacteriófago (4×10^6 ufc/mL: 10^6 ufp/mL) y el segundo con 1:10 bacteria / bacteriófago (4×10^6 ufc/mL: 10^7 ufp/mL), el tercer grupo conformó el control de infectividad de la cepa desafío *S.E nal^r rif^r* recibiendo una dosis de 4×10^6 ufc/mL, y el cuarto grupo fue inoculado sólo con el bacteriófago en una dosis 10^7 ufp/mL, constituyendo el grupo control de inocuidad del bacteriófago. Todos se sacrificaron 10 días después. En el grupo control de inocuidad del bacteriófago, inoculado con 10^7 ufp/mL, no se observó daño en órganos internos a nivel macroscópico. Se encontró que la dosis de bacteriófago 10^6 bajó significativamente el aislamiento de *S. Enteritidis* en hígado y corazón y, si se sube la dosis a 10^7 ufp disminuye el aislamiento en intestino. Se concluyó que el uso del bacteriófago f3 α SE reduce tanto sistémica como intestinalmente la infección en pollos desafiados con *S. Enteritidis*.

En otro estudio realizado en el país por Santander y Robeson (2004), se utilizó el mismo bacteriófago f3 α SE para comprobar protección contra *S. Enteritidis* y *S. Pullorum* en el nematodo *Caenorhabditis elegans*. Se encontró que el bacteriófago f3 α SE lo protege de la infección y subsiguiente muerte por *S. Enteritidis*.

Borie *et al.*, (2006), continuando con su investigación, utilizaron pollas Leghorn SPF que a los diez días de edad recibieron una mezcla de tres bacteriófagos líticos vía oral (10^8 ufp/mL), aislados de muestras fecales y aguas servidas desde el sector avícola nacional. Seis horas post inoculación con los bacteriófagos, las aves fueron desafiadas con *S. Enteritidis* $8,3 \times 10^5$ ufc. El sacrificio se realizó diez días después obteniéndose muestras

de intestino completo y “pool” de órganos (hígado, bazo, corazón) para reaislar la cepa desafío. Se concluyó que la utilización de la mezcla de bacteriófagos bajó la incidencia y el recuento de *S. Enteritidis* en el intestino de las aves, ya que la cepa desafío se reaisló en un 60% en pollos tratados, mientras que en el control fue de 80%; además, el recuento disminuyó en $2,7 \log_{10}$ ufc/g.

En cuanto a la utilización de bacteriófagos en productos avícolas, Higgins *et al.*, (2005) estudiaron el uso de bacteriófagos para reducir *Salmonella* en carcasas de broiler y pavos comerciales; para esto se obtuvo una suspensión de lavado de la cavidad abdominotorácica desde las carcasas comerciales previamente inoculadas con *S. Enteritidis* y bacteriófago PHL 4 en diferentes concentraciones. En la primera experiencia se agregó *S. Enteritidis* en concentraciones de $0,92 \times 10^0$, 10^1 , 10^2 y 10^3 ufc/mL, además del bacteriófago PHL 4 10^6 o 10^{10} ufp/mL. Encontrándose que la mayor concentración del bacteriófago PHL 4 aplicado (10^{10} ufp/mL) redujo significativamente ($P < 0,05$) el recuento de *S. Enteritidis* entre 50 y 100 %, a todos los niveles de contaminación aplicados en relación a los controles. En la segunda experiencia, las suspensiones de lavado desde la cavidad abdominotorácica fueron contaminadas con *S. Enteritidis* 10^2 o 10^3 ufc/mL y bacteriófago 0 , 10^2 , 10^4 , 10^6 , 10^8 o 10^{10} ufp/mL. El bacteriófago a la concentración de 10^8 o 10^{10} ufp/mL redujo en 70% ($P < 0,05$) el recuento de *S. Enteritidis* en relación a los controles.

En otra experiencia, utilizaron carcasas de pollos broiler, las que se inocularon en el área pectoral con *S. Enteritidis* 31 ufc y bacteriófago 10^{10} ufp/mL, o *S. Enteritidis* 20 ufc y bacteriófago $0,53 \times 10^4$, 10^6 , 10^8 o 10^{10} ufp/mL. Se demostró que las carcasas con 31 ufc y bacteriófago PHL4 $5,5 \times 10^{10}$ ufp/mL, redujeron en 85% el recuento de *S. Enteritidis* en comparación al control. Estos recuentos se redujeron en 93% al utilizar 21 ufc y bacteriófago $5,5 \times 10^8$ ufp/mL en relación al control. Por último, a carcasas de pavos comerciales naturalmente positivos a *Salmonella*, se les adicionó bacteriófagos $1,6 \times 10^8$ ufp/mL, $1,8 \times 10^7$ ufp/mL, o una combinación de bacteriófagos $8,9 \times 10^7$ ufp/mL. Este tratamiento redujo significativamente el recuento de *Salmonella* en 55-58 % (Higgins *et al.*, 2005).

Goode *et al.*, (2003) por otro lado, evaluaron la reducción de la contaminación experimental de piel de pollo con *Salmonella* y *Campylobacter* mediante la aplicación de bacteriófagos líticos. Realizaron varias experiencias con distinta multiplicidad de infección o (MOI), que es la relación entre el número de bacteriófagos por una bacteria. En la primera experiencia, grandes piezas de pollo (área 60 cm²) se inocularon con *S. Enteritidis* a 10³ ufc/cm²; posteriormente a la mitad de las porciones se les administró bacteriófagos 10³ ufp/cm². Se tomaron muestras de tres áreas separadas (10 cm²) de cada porción de pollo antes del tratamiento con el bacteriófago y después de 24 y 48 horas. Cuando los bacteriófagos fueron aplicados a un MOI de 10¹ el recuento de *Salmonella* cayó de 3,91 log₁₀ ufc/cm² a 2,96 log₁₀ ufc/cm² después de 48 horas de incubación en relación al grupo control, donde el recuento bajó de 3,92 log₁₀ ufc/cm² a 3,71 log₁₀ ufc/cm².

En otra experiencia, 15 piezas de piel de pollo fueron infectadas con *S. Enteritidis* a 3,7 log₁₀ ufc/cm². Cinco piezas fueron tratadas con bacteriófago P22 7,1 log₁₀ ufp/mL, cinco piezas con bacteriófago 29c 8,1 log₁₀ ufp/mL para producir un MOI entre 100 y 1000; cinco piezas de pollo no fueron tratadas, donde en estas últimas el recuento bacteriano fue 4,66 log₁₀ y en las piezas tratadas con los bacteriófago P22 o 29c los recuentos fueron de 2,83 y 1,92 log₁₀ respectivamente; esto correspondió a una reducción de 98,7 y 99,2%, respectivamente, donde ambos resultados fueron altamente significativos (P < 0,01) (Goode *et al.*, 2003).

En una tercera experiencia, piezas de piel fueron inoculadas con *S. Enteritidis* 10¹ o 10² ufc/cm². Algunas correspondieron a control, y a otras se les adicionó bacteriófago 29c 10² ufp/cm². El recuento bacteriano en el control fue de 2,03 log₁₀, y las tratadas con el bacteriófago cero (Goode *et al.*, 2003).

Por último, se inocularon piezas de piel de pollo con 10² ufc de *S. Heidelberg* y *S. Enteritidis* PT6. Posteriormente algunas fueron tratadas con bacteriófago 29c a igual concentración. El recuento para *S. Heidelberg* en el grupo control fue 2,07 log₁₀, que bajó a cero en las piezas tratadas con bacteriófagos. Para *S. Enteritidis* el grupo control tuvo un

recuento de $2,23 \log_{10}$ que bajó a $0,3 \log_{10}$ en las piezas tratadas. Los bacteriófagos persistieron sin disminuir su número en la piel, por al menos 48 horas. Se sugirió que su aplicación puede proteger a las carcasas contra la contaminación cruzada de patógenos desde otras carcasas o superficies (Goode *et al.*, 2003).

- Fagoterapia contra *Salmonella* spp. asociada a probiótico

Toro *et al.*, (2005) estudiaron el posible sinergismo entre la utilización de bacteriófagos y probióticos en pollos Leghorn SPF infectados con *S. Typhimurium*. Utilizaron el probiótico vía oral, durante tres días desde el día de edad; durante los días 4, 5, 6, 9 y 10 de edad les administraron un cóctel de bacteriófagos ($5,4 \times 10^6$ ufp) y se les desafió el día 7 con *S. Typhimurium nal^r* ($7,9 \times 10^5$ ufc/mL). Se observaron disminuciones en los recuentos de ileon y ciego de las aves al utilizar los dos biocontroladores, evidenciándose niveles marginales de *S. Typhimurium* en el íleon al utilizar los tratamientos de probiótico y probiótico más bacteriófagos, con una disminución de 17.000 ufc/mL aproximadamente con ambas terapias. En el ciego, los tratamientos de probiótico y probiótico más bacteriófagos disminuyeron también los recuentos en relación a los controles, de 70.000 ufc/mL a 40.000 ufc/mL y 10.000 ufc/mL respectivamente.

Además, a los 10 días pos desafío observaron un aumento de peso de 24 gr. en las aves tratadas con bacteriófagos ($P < 0,05$); en los tratados con probiótico y probiótico más bacteriófagos los pesos aumentaron de 10 a 12 gr.

Filho *et al.*, (2007) al respecto, también utilizaron bacteriófagos y probiótico para reducir *S. Enteritidis*. Pollitos de un día de edad se inocularon con *S. Enteritidis*; un grupo recibió bacteriófago, vía cloacal, una hora post inoculación de *S. Enteritidis*. Un segundo grupo fue tratado vía cloacal con el probiótico dos horas post inoculación de *Salmonella* y un tercer grupo recibió el tratamiento con los dos biocontroladores. Los resultados demostraron que al usar en forma conjunta los dos biocontroladores administrados vía cloacal, estos redujeron significativamente (36%) el aislamiento de *S. Enteritidis* ($P < 0,05$) en las tonsilas cecales, en relación al grupo control (80%).

La escasa información sobre el uso en conjunto de dos biocontroladores, como de probiótico y bacteriófagos, más los alentadores resultados obtenidos en estudios con uso individual tanto de probióticos como bacteriófagos, reflejan la necesidad de seguir investigando si existe o no una potenciación de estos resultados al utilizarlos en pollos comerciales jóvenes para combatir la colonización de *Salmonella* spp.

HIPÓTESIS

Dado que en Chile se ha demostrado eficiencia del uso de bacteriófagos nativos frente a la colonización de *Salmonella spp.* en pollos, es interesante confirmar que la asociación de bacteriófagos y probióticos disminuye, al menos a nivel intestinal, la colonización de *Salmonella* Enteritidis en pollos comerciales experimentalmente infectados.

1. OBJETIVO GENERAL

Contribuir al control de *Salmonella spp.* en aves comerciales mediante el empleo de una asociación de dos biocontroladores.

2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

Determinar en pollos comerciales la efectividad de un probiótico frente al desafío con *S. Enteritidis*.

Analizar, en pollos comerciales experimentalmente infectados con *S. Enteritidis*, la eficiencia del biocontrol por administración de un probiótico más una mezcla de bacteriófagos.

Determinar, en pollos comerciales experimentalmente infectados con *S. Enteritidis*, si existe diferencia en la ganancia de peso entre los grupos probiótico *versus* probiótico más bacteriófagos.

MATERIAL Y MÉTODOS

El presente estudio se efectuó como parte del proyecto Fondecyt n° 1060569 “Biocontrol de *Salmonella* spp. en Medicina Veterinaria mediante el uso de Bacteriófagos.” Durante el primer año de este proyecto (2006) se determinó que el uso de una mezcla de tres bacteriófagos fue más eficiente que su dosificación en forma individual y que la vía de administración en aerosol produjo los mejores resultados en el biocontrol de *Salmonella* spp. Con estos antecedentes, este trabajo continuó con las metodologías que lograron los mejores resultados y fue realizado, en su totalidad, en los Laboratorios de Microbiología y otras dependencias del Departamento de Medicina Preventiva Animal, Facultad de Ciencias Veterinarias y Pecuarias de la Universidad de Chile.

1. ANIMALES DE EXPERIMENTACIÓN

Se utilizaron aproximadamente 150 pollas hembras de reposición White Leghorn de un día de edad, provenientes de un criadero comercial sin evidencias de salmonelosis y con vacunación de las madres contra *Salmonella* Enteritidis. Para corroborar la ausencia de *Salmonella* spp. en las pollas hembras experimentales, se les realizó un coprocultivo a los dos días de edad y, además en muestras fecales se realizó el método de PCR (Reacción en cadena de polimerasa) específico para *Salmonella* spp. Se utilizaron aves negativas a *Salmonella* spp. por ambos métodos.

Las aves fueron criadas en jaulas desde el primer día de edad, en la Unidad de Animales Experimentales del Departamento de Medicina Preventiva Animal, con temperatura controlada (36°C – 30°C) y luminosidad apropiada (100 Lux); además, se les proporcionó alimento formulado sin antibióticos y, agua potable *ad libitum*.

2. CEPA DESAFÍO

Se utilizó una cepa nativa de *Salmonella* Enteritidis de origen aviar, donada en 2002 por la Dra. Irma Acevedo del Laboratorio de Bacteriología del Servicio Agrícola y Ganadero (SAG), Ministerio de Agricultura. Luego de nueve pasajes (P-9) en gallinas para exacerbar su virulencia, se seleccionó una mutante espontánea con marcadores genéticos de resistencia a Ácido Nalidixico (*nal^r*) y Rifampicina (*rif^r*) en el Laboratorio de Bacteriología del Instituto de Biología de la Pontificia Universidad Católica de Valparaíso, originándose la cepa S.E. *nal^r rif^r*.

3. CÁLCULO DE DOSIS MÍNIMA INFECTANTE (DMI)

La dosis mínima infectante (DMI) correspondió a la mínima cantidad de bacterias S.E. *nal^r rif^r* inoculadas, que permitieron el reaislamiento de esta cepa desafío al menos en el 85% de las aves a los 10 días post-infección (p.i), independiente del tipo de muestra.

La DMI de la cepa desafío *S. Enteritidis* P-9, se obtuvo por cultivo en caldo común, incubación a 37°C por 24 horas y luego ajuste a la turbidez del tubo N° 0.5 del Nefelómetro Mc Farland ($1,5 \times 10^8$ bacterias). De esta concentración se realizaron diluciones al décimo, hasta una concentración teórica de $1,5 \times 10^1$ bacterias. Cuatro grupos de 10 aves cada uno, de siete días de edad, se inocularon vía oral, con un mL de distintas suspensiones bacterianas que contenían diferentes diluciones: 10^3 , 10^4 , 10^5 y 10^6 ufc/mL. Estas dosis se corroboraron por recuento en placa, utilizando agar XLD (Difco®) con Ácido Nalidixico y Rifampicina (20 µg/mL cada uno). Diez días post inoculación, se realizó el sacrificio de las aves mediante dislocación cervical (Beaver, 2001) y se obtuvieron de cada ave, muestras de intestino completo y “pool” de órganos internos (hígado, corazón y bazo) para bacteriología cualitativa (ver descripción en punto 6.1).

4. PROBIÓTICO

Se utilizó el producto comercial de exclusión competitiva Broilact® (Orion Corporation), cuya ficha técnica señala contenido de bacterias anaeróbicas $4,4 \times 10^{10}$ ufc/g, *Enterococcus* spp. $1,0 \times 10^9$ ufc/g, *Lactobacillus* spp. $2,3 \times 10^7$ ufc/g y bacterias coliformes no patógenas $4,4 \times 10^9$ ufc/g.



Foto N° 1. “Agente regenerador” para el producto Broilact®



Foto N° 2. Probiótico listo para su utilización.

La preparación, de acuerdo a las recomendaciones del fabricante, consistió en mezclar 20 g del agente regenerador (Foto N°1) en un litro de agua destilada tibia; se homogeneizó suavemente y se adicionó a razón de 600 mL a 2g de Broilact® (Orion Corporation) que es la dosis para 2000 aves (Foto N°2), de esta suspensión se calculó la cantidad necesaria para administrarse en las 60 aves de los dos grupos experimentales que utilizaron el producto. Esta mezcla se dejó reposar media hora antes de su utilización en las aves. El probiótico se administró vía aerosol en gotas de un tamaño visible, aproximadamente de un mm, hasta mojar completamente cada ave (Foto N°3).



Foto N° 3. Pollas de reposición Leghorn recién tratadas con el probiótico.

5. BACTERIÓFAGOS

Se utilizó una mezcla de tres bacteriófagos líticos nativos (E2, E16 y F18) aislados desde aguas residuales asociadas a plantas avícolas de la Quinta región. Se empleó una multiplicidad de infección (MOI) de 10^3 ufp, que corresponde a la relación del número de bacteriófagos por una bacteria. Los bacteriófagos fueron purificados y preparados por el Dr. James Robeson de la Pontificia Universidad Católica de Valparaíso. Se suspendieron en agua destilada estéril y fueron dosificados mediante aerosol (Desvac®) con una gota de tamaño inferior a $20\ \mu\text{m}$.

6. GRUPOS EXPERIMENTALES

Cuadro N°1. Diseño experimental de los cinco grupos de pollas Leghorn inoculadas con un probiótico y/o mezcla de bacteriófagos previo a la inoculación con S.E.

Grupos	Nº de aves*	Concentración de Bacteriófagos	Probiótico	Dosis de S. E
1. Control negativo	30	----	----	----
2. Control infección	30	----	----	1DMI
3. Terapia probiótico	30	----	+	1DMI
4. Terapia fagos	30	MOI 10 ³ ufp	----	1DMI
5. Terapia probiótico más fagos	30	MOI 10 ³ ufp	+	1DMI

DMI: dosis mínima infectante. MOI: multiplicidad de infección. Probiótico: dosis única al día de edad. Bacteriófagos: seis días de edad. S.E: inoculación siete días de edad.

Todos los grupos permanecieron bajo iguales condiciones de ambiente y alimentación. La experiencia se inició al día de edad, los grupos 3 y 5 recibieron el probiótico vía aerosol, hasta quedar totalmente mojados. Además, ambos grupos fueron pesados colectivamente tanto al primer día como al final de la experiencia.

A los seis días de edad, los grupos 4 y 5 recibieron como terapia la mezcla de bacteriófagos en una dosis de 10³ ufp (MOI) vía aerosol, mediante dos aplicaciones en el día. Al día siete de edad las aves con terapias de los grupos 3, 4 y 5, más el control de la infección, fueron desafiados vía oral con 1 DMI de *S. Enteritidis nal^r rif* P-9. A los 14 días

de edad (7 días p.i) todas las aves, de todos los grupos, fueron sacrificadas mediante dislocación cervical (Beaver, 2001) y necropsiadas en forma individual para obtener dos muestras, una correspondiente a un “pool” de órganos internos (corazón, bazo e hígado) y la otra de ambos ciegos. A ambas muestras se les realizó bacteriología cualitativa para el reaislamiento de la cepa desafío; sólo a las muestras de ciego se les realizó bacteriología cuantitativa para el recuento de *Salmonella* (ufc/g).

6.1 Bacteriología Cualitativa

El reaislamiento e identificación de la cepa desafío se realizó en todas las aves de los grupos experimentales, incluyendo el grupo control sano que no recibió terapia ni salmonela. Se utilizó la técnica descrita en Murray y Barton (1993).

A cada muestra individual de “pool” de órganos internos y de ciegos, en bolsas estériles, se les adicionó 100 mL de caldo Rappaport-Vassiliadis (Difco®) y se sometieron a un equipo Masticator (IuL instruments) por 180 segundos. Posteriormente las bolsas se incubaron a 37°C por 72 horas. Del caldo, con 48 horas de incubación, se sembraron tres asadas en agar XLD (Difco®) con 20 µg/mL de Ácido Nalidíxico y Rifampicina (Arlab®), para el reaislamiento de la cepa desafío. Si la muestra resultó negativa a este cultivo, se resembró con 72 horas de incubación. Las muestras que resultaron negativas a la bacteriología cualitativa fueron transferidas a tubos estériles de 15 mL y almacenadas en congelación (-20°C), hasta su procesamiento por la técnica de PCR (descrito en el punto 7.)

Toda colonia sospechosa, de borde transparente con centro negro, se suspendió con suero poli A-I y Vi (Difco®) para la confirmación o no de aglutinación.

6.2 Bacteriología Cuantitativa

La bacteriología cuantitativa se realizó sólo en 15 aves seleccionadas al azar de cada grupo experimental. Para el recuento de colonias se utilizaron sólo muestras cecales. Un mL del homogeneizado en caldo Rappaport-Vassiliadis (ciegos más 9 mL R-V) sin

incubar, se suspendió al décimo y, de dicho tubo, se realizaron otras 4 diluciones al décimo en Agua peptonada tamponada (Oxoid®). De cada una de estas 5 diluciones se homogeneizó un mL en agar XLD (Difco®) más Ácido Nalidixico y Rifampicina (20 µg/ml) que se incubó a 37°C por 24 horas para realizar el recuento de colonias. Las muestras negativas, ausencia de colonias en todas las diluciones, fueron procesadas nuevamente a partir del caldo Rappaport-Vassiliadis (Difco®) pero incubado por 24 horas a 37°C, siguiendo el mismo esquema.

7. PCR TRADICIONAL PARA LA DETECCIÓN DE S. ENTERITIDIS

Se utilizó la técnica de descrita por Malorny *et al.*, (2003), utilizando partidores (Fermelo®) que amplifican el gen *InvA* produciendo hebras de ADN de tamaño conocido (284 pares de bases).

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

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

7.1 Fase de extracción

Se realizó con el “Kit” de extracción de ADN (Genomic DNA Purification Kit, Fermentas®). Una alícuota de 200 µL de la muestra se agregó a 400 µL de solución de lisis (Fermentas®) en un tubo Eppendorf para PCR, este se incubó a 65°C en baño termorregulador por 5 minutos, luego se agregaron 600 µL de cloroformo (Merck®) y se centrifugó (Heraeus instruments) la muestra a 7.500 x g (10.000 rpm) por 2 minutos. Al sobrenadante se le agregaron 720 µL de agua libre de nucleasas (Winkler®) y 80 µL solución de precipitación (Fermentas®) y, nuevamente se centrifugó a igual velocidad y tiempo para obtener un pellet. Obtenido el pellet, se agregó 100 µL de NaCl (Fermentas®) y 300 µL de etanol (Merck®) y se congeló la muestra por 10 minutos. Luego se centrifugó a 7.500 x g (10.000 rpm) por 4 minutos. Se eliminó el sobrenadante y el pellet se disolvió en 100 µL de agua libre de nucleasas (Winkler®).

7.2 Mezcla de reacción

Se realizó con 12,5 μL PCR Master mix (Fermentas®), 5 μL de cada partidor y 5 μL de muestra extraída. Esta mezcla se llevó en tubos de 0,2 mL al Termociclador (Apollo, CLP, USA). Las condiciones para desarrollar las amplificaciones de las hebras blanco en el Termociclador fueron: Denaturación inicial de 95°C por un minuto, seguida por 37 ciclos con: Denaturación de 95°C por 30 segundos, hibridación o annealing de 64°C por 30 segundos, extensión a 72°C por 30 segundos. Finalmente se realizó un período de extensión adicional de 72°C por 4 minutos. La mantención del producto del PCR fue a 4°C.

7.3 Visualización del producto amplificado

Se realizó mediante cámara de electroforesis (Apollo instrumentation). En ella se depositó un gel de 0,5 g de agarosa (Winkler®) al 2% en 25 mL de buffer Tris acetato EDTA (Fermentas®) y 2,5 μL de Bromuro de Etidio (Invitrogen®) con una concentración de 10mg/mL. El gel se cargó con una mezcla de 8 μL del producto de PCR más 4 μL de azul de bromofenol (Fermentas®), que es un colorante utilizado para chequear el progreso de las bandas de DNA. El proceso de electroforesis se realizó a una velocidad de 90 V por 90 minutos o hasta la migración del azul de bromofenol hasta 3/4 del campo. Paralelamente en el gel se corrió un marcador de tamaño de 50bp ADN (Fermentas®), con el cual se comparó el tamaño de las bandas obtenidas. Al finalizar la electroforesis, los grupos de bandas de ADN se visualizaron con un transiluminador de luz UV (UVP®) y fueron fotografiados con película Polaroid®. Durante todo el proceso, para evitar la contaminación de las muestras utilizadas y como medida de bioseguridad, se usaron guantes sin algodón. Además se desinfectó el área con alcohol yodado. El gel utilizado en la lectura de la electroforesis fue incinerado.

8. BIOSEGURIDAD

Se utilizaron las normas recomendadas por el Centro de Control y Prevención de Enfermedades (CDC; NHI, 2007) de Estados Unidos para un nivel 2 de bioseguridad, correspondiente a *Salmonella* spp. no Typhi.

Las salas de animales de experimentación fueron esterilizadas al inicio y al final de cada experiencia con Glutaraldehido 2,5% (Asepti-Steryl, Ecolab®). Se utilizó un pediluvio con Metaquat (Ecolab®) un derivado de amonio cuaternario, para desinfectar los zapatos.

Los laboratorios, sus mesones y pisos fueron desinfectados con alcohol yodado y cloro.

Todo el manejo de las aves en las salas de experimentación se realizó con ropa de protección desechable como overoles, mascarillas, guantes, mangas y botas desechables. Todos los residuos orgánicos sólidos fueron incinerados y los residuos líquidos tratados a razón de 1000 ppm de cloro antes de su eliminación. El manejo de las aves se dividió en dos personas, una encargada de las aves inoculadas con bacteriófagos y otra de las aves que no recibieron bacteriófagos. El trabajo realizado en el Laboratorio de Microbiología implicó la utilización de delantal, botas, guantes y mangas. Además se restringió el sector para personas ajenas a la experiencia.

9. ANÁLISIS ESTADÍSTICO

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

El análisis bacteriológico cualitativo se expresó como proporciones de animales infectados, y las diferencias se determinaron por la prueba de independencia de Chi cuadrado (X^2) (Taucher, 1997).

El análisis bacteriológico cuantitativo se realizó mediante análisis de varianza (ANOVA) de un criterio, para comparar los recuentos cecales de *S. Enteritidis* entre los grupos experimentales, y se utilizó la prueba de comparaciones de Tukey's para ver diferencias estadísticas entre las medias de determinados grupos experimentales. Para el análisis estadístico de esta variable, toda muestra cuya bacteriología cualitativa fuera positiva pero su bacteriología cuantitativa fue negativa se le asignó valor 1 y, muestras negativas en ambos análisis se les asignó valor 0 (Infostat, 2004).

RESULTADOS

DOSIS MÍNIMA INFECTANTE

El resultado de la DMI de *S. Enteritidis* fue de $2,95 \times 10^5$ ufc/mL con un total de 100% de aves infectadas. Según el tipo de muestra, se encontró un 100% de aislamiento intestinal y 60% de aislamiento en “pool” de órganos internos.

1. BACTERIOLOGÍA CUALITATIVA Y CUANTITATIVA

Los resultados de la experiencia para determinar posible sinergia entre probiótico y bacteriófagos, se observan en la Cuadro N° 1 y Gráficos N° 1, 2 y 3.

Cuadro N° 1. Aislamiento de S.E. desde “pool” de órganos internos y/o ciegos en pollas Leghorn sometidas a terapias únicas de probiótico y bacteriófagos o, en combinación.

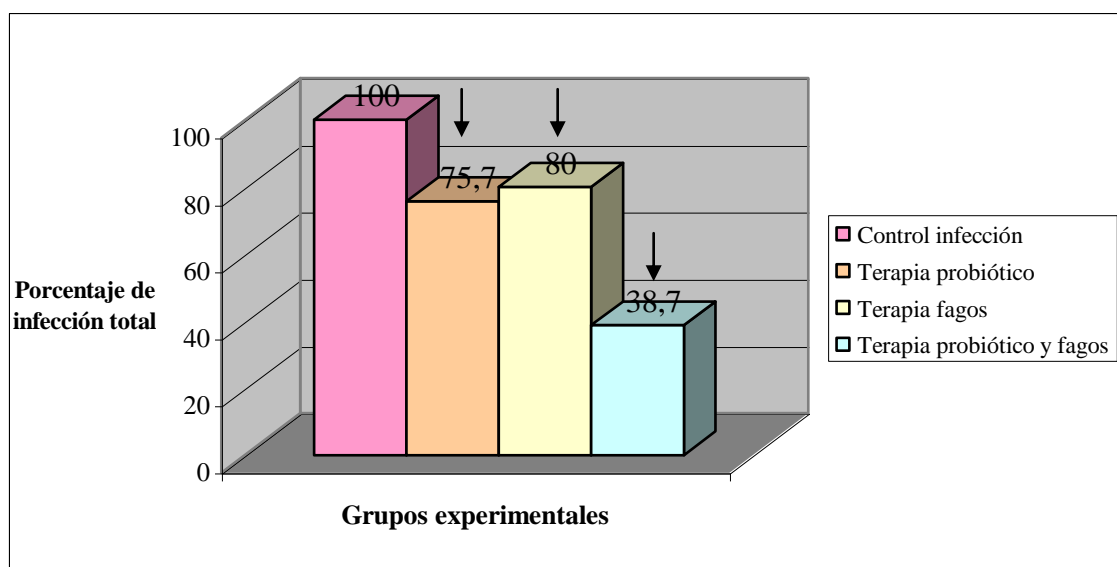
Grupos	N° aves ⁽¹⁾	Total aves infectadas (%) con S. E ⁽²⁾	N° órganos positivos a S.E (%)	N° ciegos positivos a S.E (%)
Control infección	29	29 (100)	18 (62,0)	29 (100)
Terapia probiótico	33	25 (75,7)	13 (39,4)	22 (66,6)
Terapia fagos	30	24 (80,0)	16 (53,3) ⁽³⁾	22 (73,3)
Terapia probiótico más fagos	31	12 (38,7)	10 (32,2)	6 (19,3)

(1) Los grupos Control de infección y Terapia fagos se iniciaron con 30 aves; los grupos Terapia probiótico y Terapia probiótico más fagos con más de 30. (2) Las aves se consideraron infectadas con, al menos, una muestra (“pool” de órganos internos/ciegos) positiva. (3) Del total de muestras negativas al cultivo, sólo un ave fue positiva por PCR. Probiótico: un día de edad. Bacteriófagos: seis días de edad. S.E: siete días de edad.

En el grupo control de infección se alcanzó un 100% de infección independiente del tipo de muestra (“pool” de órganos internos y/o ciegos) ; mientras que en el grupo con probiótico más bacteriófagos la infección fue de 38,7%, con una diferencia significativa ($P < 0,0001$) mediante la prueba X^2 (Chi cuadrado). El grupo sólo con probiótico tuvo una infección de 75,7%, que comparada con la del grupo probiótico más bacteriófagos de 38,7%, presentó una diferencia significativa ($P = 0,0027$). El grupo sólo bacteriófagos tuvo una infección de 80%, que comparada con la del grupo probiótico más bacteriófagos de 38,7%, también presentó una diferencia significativa ($P = 0,0010$). Hubo una diferencia significativa ($P < 0,0111$) entre el grupo bacteriófagos y el grupo control de infección. No se encontró diferencia significativa ($P = 0,6858$) entre grupos de terapia sólo con probiótico *versus* sólo con bacteriófagos.

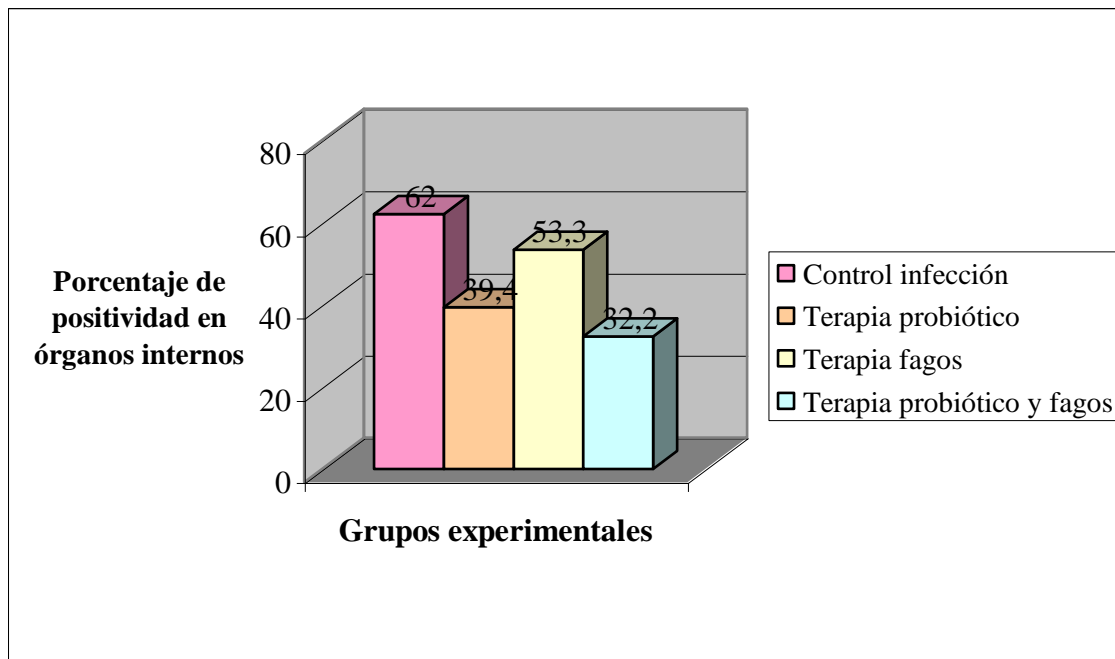
Los resultados de la Tabla N° 1 se presentan en los Gráficos N° 1, 2 y 3 como porcentajes de los números de aves infectadas por grupo experimental, porcentajes del número de órganos positivos y, porcentajes de ciegos positivos a *S. Enteritidis*.

Gráfico N° 1. Porcentajes de aislamientos de S.E. como total de aves infectadas en pollas Leghorn tratadas con probiótico, bacteriófagos o la combinación de ellos.



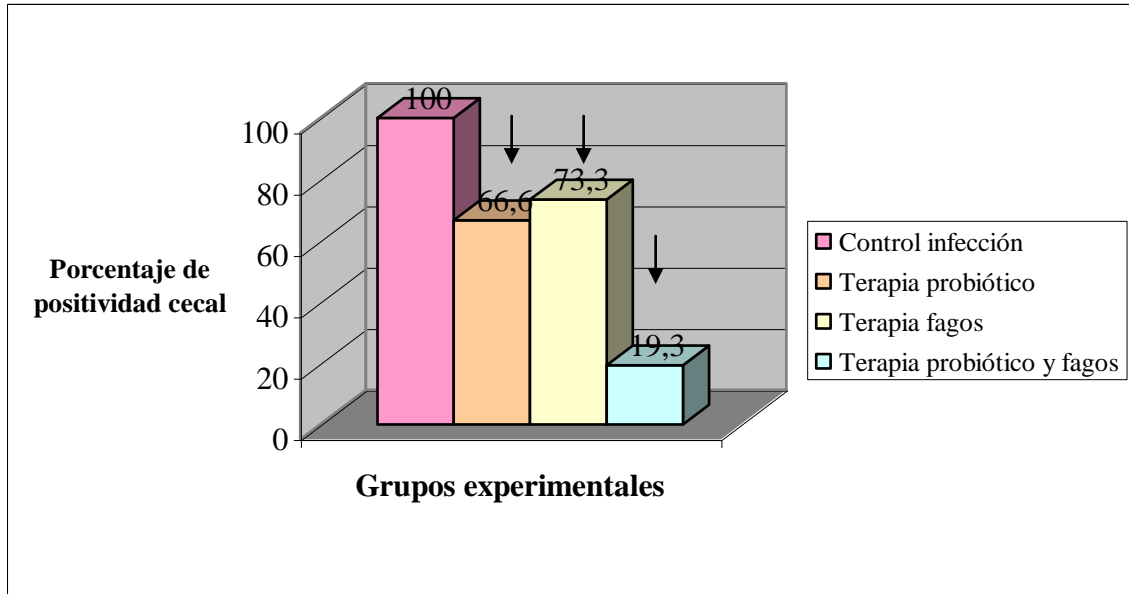
Las flechas en el gráfico denotan diferencias significativas entre el grupo terapia bacteriófagos más probiótico con los grupos sólo probiótico, sólo bacteriófagos y, control de infección.

Gráfico N° 2. Porcentajes de positividad a S.E. en “pooles” de órganos internos en pollas Leghorn tratadas con probiótico, bacteriófagos o la combinación de ellos.



Los porcentajes de aislamientos de la cepa desafío en “pool” de órganos internos, entre los distintos grupos experimentales, no presentaron diferencias significativas ($P= 0,0863$).

Gráfico N° 3. Porcentajes de positividad cecal de S.E. en pollas Leghorn tratadas con probiótico, bacteriófagos o la combinación de ellos.



Las flechas en el gráfico denotan diferencias significativas entre el grupo terapia bacteriófagos más probiótico con los grupos sólo probiótico, sólo bacteriófagos y, control de infección.

El porcentaje de aislamiento de 100% de la cepa desafío en muestras de ciego del grupo control de infección, comparado con el 66,6% del grupo sólo con probiótico dió una diferencia significativa de $P=0,0006$; al compararlo con el 73,3% del grupo sólo con bacteriófagos también presentó diferencia significativa ($P= 0,0028$) y, al compararlo con el 19,3% del grupo con probiótico más bacteriófagos se observó una diferencia significativa de $P<0,0001$.

Al comparar los grupos de probiótico más bacteriófagos (19,3%) con sólo probiótico (66,6%) y sólo bacteriófagos (73,3%), se obtuvieron diferencias significativas para ambos de $P<0,0001$.

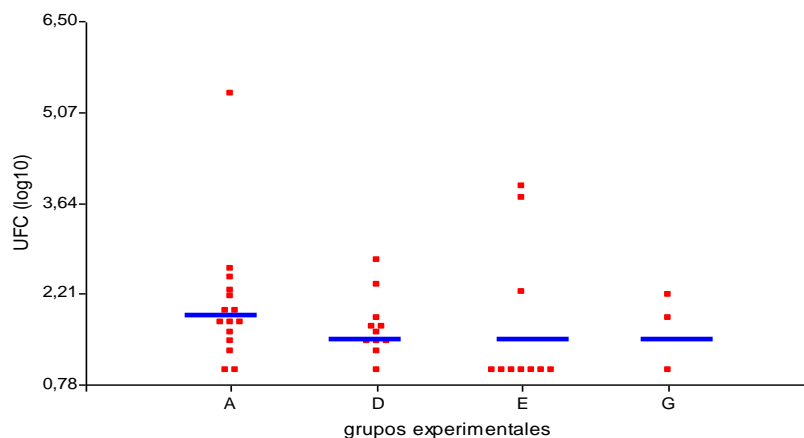
En cuanto al resultado bacteriológico cuantitativo, realizado mediante análisis de varianza (ANOVA) de un criterio, comparó las diferencias de recuentos cecales de *S. Enteritidis* entre cada uno de los grupos experimentales considerando 15 aves por grupo. Toda muestra que resultó positiva a la bacteriología cualitativa pero negativa al recuento cuantitativo, se le consideró valor 1 ($< 10^3$ ufc/mL); las muestras que resultaron negativas tanto al análisis cualitativo como cuantitativo, valor 0 (Cuadro N° 2 y 3, Gráfico N° 4)

Cuadro N° 2. Recuentos cecales de S.E. en 15 pollas Leghorn de cada grupo experimental (control de infección, probiótico, bacteriófagos o la combinación de ellos).

Grupos	Medias Estadísticas ufc(log₁₀)	N° aves
Control infección	2,03	15
Terapia probiótico	1,24	15
Terapia fagos	1,12	15
Terapia probiótico más fagos	0,34	15

Se encontró diferencia significativa entre los grupos control de infección y terapia probiótico más bacteriófagos (P=0,0003).

Gráfico N° 4. Gráfico de dispersión del recuento cecal ufc (\log_{10}) de S.E. en pollas Leghorn tratadas con probiótico, bacteriófagos o ambos y sus promedios.



A = Control infección; D = Terapia probiótico; E = Terapia bacteriófagos y G = Terapia probiótico más bacteriófagos. La línea azul corresponde a la media de los grupos experimentales. Recuentos promedios (ufc \log_{10}/g) calculados sólo con el número de aves positivas a S.E.

Los recuentos promedios y los valores mínimos y máximos, se detallan en el cuadro N° 3. Estos promedios se realizaron considerando sólo las muestras en las cuales fue posible realizar el recuento de S. Enteritidis.

Cuadro N° 3. Recuento cecal promedio de S.E. ufc (\log_{10}) en pollas Leghorn positivas tratadas con probiótico, bacteriófagos o la combinación de ellos.

Grupos	Recuento Promedio de S.E ufc (\log_{10})	Valores recuentos mínimo y máximo ufc (\log_{10})
2. Control infección	2,03	1,0 - 5,3
3.Terapia probióticos	1,69	1,3 - 2,7
4.Terapia fagos	1,68	2,2 - 3,9
5.Terapia fagos y probiótico	1,68	1,0 - 2,2

El grupo control sano (30 aves) fue negativo al cultivo y a PCR de *S. Enteritidis*. Clínicamente no manifestaron alteraciones ni lesiones macroscópicas a la necropsia.

2. COMPARACIÓN DE PESOS PROMEDIOS

Las diferencias de peso entre el primer día de edad y el día catorce, fueron similares entre los diferentes grupos experimentales. El grupo control sano fue el que presentó menor ganancia de peso promedio (Cuadro N° 4).

Cuadro N° 4. Pesos iniciales y finales en pollas Leghorn tratadas con probiótico, bacteriófagos o ambos previo a la inoculación con S.E. antes de la experiencia y una vez terminada, junto a sus diferencias.

Grupos	Peso inicial (g) día 1	Peso final (g) día 14	Peso inicial – final (g)
Control sano	46,6	89,5	42,9
Control infección	46,6	97,0	50,4
Terapia probiótico	46,9	97,6	50,7
Terapia probiótico y bacteriófagos	46,3	95,9	49,6

Probiótico: al día de edad. Bacteriófagos: seis días de edad. S.E: siete días de edad.

DISCUSIÓN

Este estudio fue realizado, por la necesidad de búsqueda de nuevos métodos de control de la salmonelosis en aves comerciales, que disminuyan la posibilidad de colonización intestinal de *S. Enteritidis*, siendo esta la principal vía de ingreso de la bacteria en las aves. Las facilidades técnicas y de infraestructura con las que se contaron para este trabajo, permitieron la obtención de los objetivos.

La evaluación del uso de biocontroladores de *Salmonella* spp. en aves de reposición de postura, como probióticos y bacteriófagos, requiere del desafío con cepas de *Salmonella* spp. para caracterizar sus comportamientos. La utilización de la cepa mutante de S.E. *nal^r rif^r* resistente a Ácido Nalidixico y Rifampicina, es una contribución que permitió su aislamiento y reconocimiento en medios de cultivo selectivos, diferenciándose de otras cepas de la misma especie. Junto a la caracterización de la bacteria utilizada, es importante determinar la cantidad mínima de ésta que fue capaz de infectar a un ave (DMI). Al respecto, las diferentes concentraciones utilizadas en distintos grupos de aves determinó que $2,95 \times 10^5$ ufc/mL logró el 100% de infección, medida como aislamiento desde intestino que es el órgano blanco para esta especie bacteriana, pero en menor proporción en “pool” de órganos internos; esto último podría caracterizar a la cepa como de invasividad sistémica baja si esta es comparada con Fiorentin *et al.*, (2005) que lograron un 100% de aislamiento desde hígado y bazo. Trabajos previos con la misma cepa S.E. *nal^r rif^r*, pero de pasaje 3 realizado en aves, encontró una DMI de 4×10^6 ufc/mL, concentración mayor a la aquí obtenida, debido a que entonces los aislamientos fueron realizados en órganos (Zurita, 2004). Una DMI de $8,3 \times 10^5$ ufc/mL para intestino y “pool” de órganos internos, ligeramente superior, fue informada por Albala, (2007) quien trabajó con pollos SPF. Según López, (2007) la cepa S.E. *nal^r rif^r*, es aislada en un mayor porcentaje tanto en intestino como en “pool” de órganos internos a los días 6 - 7 post infección en aves inoculadas a los siete días de edad.

El empleo de tratamientos con bacteriófagos, requiere de una multiplicidad de infección (MOI) alta. La utilización de MOI de 10^3 ufp se debió al trabajo previo de Albala

(2007), quien para la misma cepa obtuvo buenos resultados con esta proporción. Otros trabajos relacionados han empleado MOI de 10^1 ufp para *S. Typhimurium nal^r* (Toro *et al.*, 2005) y *S. Enteritidis* (Atterbury *et al.*, 2007); MOI de 10^4 ufp para *E. coli* (Huff *et al.*, 2003; 2005; 2006) evidenciando una real disminución de la mortalidad en las aves y, MOI de 10^5 ufp para *E. coli* y *S. Enteritidis* (Higgins *et al.*, 2005; Huff *et al.*, 2005; 2006; Filho *et al.*, 2007) con resultados más favorables, sugiriéndose con estos antecedentes una mayor efectividad en las relaciones mayores entre bacteriófagos y bacteria.

Los bacteriófagos para *Salmonella* spp. se pueden utilizar como únicos (Sklar y Joerger, 2001; Zurita, 2004; Higgins *et al.*, 2005; Atterbury *et al.*, 2007) o como mezcla o cóctel (Sklar y Joerger, 2001; Higgins *et al.*, 2005; Fiorentin *et al.*, 2005; Toro *et al.*, 2005; Albala, 2007; Filho *et al.*, 2007; Higgins *et al.*, 2007). En este trabajo, el empleo de un cóctel de tres bacteriófagos nativos fue para prevenir la posibilidad de desarrollo de resistencia de *Salmonella* spp. a la totalidad de los bacteriófagos del cóctel (Fiorentin *et al.*, 2005; Toro *et al.*, 2005; Filho *et al.*, 2007;).

En cuanto a la utilización de probióticos en aves, empleados durante ya dos décadas especialmente contra infecciones entéricas, existen diferentes preparados comerciales. La selección de Broilact® correspondió a lo disponible en el mercado nacional. El resultado aquí obtenido de utilizar la terapia sólo de probiótico en aves posteriormente infectadas, fue bastante favorable ya que cualitativamente disminuyó la incidencia de infección en un 24,3% (100 *versus* 75,7%). Al respecto, todos los trabajos en que se han utilizado probióticos señalan las bondades de su uso, así Nakamura *et al.*, (2002) observaron una baja en el aislamiento de *S. Enteritidis* a nivel sistémico con la aplicación de un probiótico comercial antes del desafío. Palmu y Camelin, (1997) demostraron que la positividad a *Salmonella* bajó en un 36% en relación al grupo control sin probiótico. Por otra parte Avila *et al.*, (2006), encontraron una disminución del 61% de aislamiento cecal de *S. Enteritidis* *versus* el grupo control tres días postdesafío; sin embargo, a los días cinco y siete postdesafío esta disminución fue acentuadamente menor. Pascual *et al.*, (1999) estudiando también la utilización del probiótico sobre la colonización de *S. Enteritidis*, encontraron un 100% de protección. En la experiencia aquí realizada, el aislamiento bacteriano en ciegos

que disminuyó en 33,4% (100 *versus* 66,6%), superior al de “pool” de órganos internos que disminuyó en 22,6% (62 *versus* 39,4%), puede explicarse porque el probiótico tiene como órgano blanco el intestino, donde podrá actuar contra la colonización e invasión de bacterias patógenas como *Salmonella* spp., disminuyendo su aislamiento. La menor concentración bacteriana en “pool” de órganos internos se puede explicar porque el probiótico, al disminuir la población de salmonela intestinal, redujo también la infección sistémica que, sumado a la capacidad invasiva de la cepa desafío, siempre corresponderá a un número menor de bacterias que en el tracto digestivo.

El empleo de bacteriófagos con posterior infección de *S. Enteritidis* en un grupo de aves, disminuyó cualitativamente la incidencia de infección de éstas en un 20% (100 *versus* 80%), obteniéndose una disminución de 8,7% (62 *versus* 53,3%) en el aislamiento desde muestras de “pool” de órganos internos y una disminución de 26,7% (100 *versus* 73,3%) desde las muestras de ciegos. Si se comparan estos resultados con lo informado por Albala, (2007) quien logró un 24,1% para la muestra de “pool” de órganos internos y un 51,7% para las muestras de intestino completo, los resultados aquí logrados fueron menores en 29,2% para muestras de “pool” de órganos internos y de 21,6% para las muestras cecales. Esta diferencia entre ambos trabajos, donde se utilizó la misma cepa desafío de *S. Enteritidis*, indicó la importancia de los bacteriófagos empleados, donde de un “pool” de tres, hubo uno en común (F18) y los otros dos fueron diferentes. Por otra parte los bacteriófagos en ambos trabajos fueron probados *in vitro* contra diferentes serotipos de *Salmonella* spp., resultando específicos para *S. Enteritidis* y otros serotipos. Sin embargo, de acuerdo a Levin y Bull, (2004) y Atterbury *et al.*, (2007), los resultados *in vitro* no necesariamente se replican en modelos *in vivo*, situación que podría ser aplicada a la diferencia de los resultados entre los bacteriófagos aquí utilizados y los empleados por Albala (2007) anteriormente.

Las diferencias de aislamiento de *S. Enteritidis*, mayor en ciego que en órganos internos, podría deberse a que el bacteriófago viaja con facilidad a través de la sangre para llegar a los órganos, situación diferente a lo que sucede en intestino donde la viscosidad del

mucus reduce la posibilidad de contacto entre el bacteriófago y la célula blanco (Joerger, 2003), permitiendo un mayor número de muestras pesquisadas como positivas.

Si se observan los resultados de bacteriología cualitativa que es el porcentaje de positividad de aves por grupo, independiente del tipo de muestra, en el grupo de aves con probiótico asociado a la mezcla de bacteriófagos se obtuvo un efecto sinérgico de ambos biocontroladores. La incidencia de infección en este grupo se redujo en un 61,3% (100 *versus* 38,7%) en relación al grupo control de infección. Mientras que en la terapia sólo con probiótico la incidencia disminuyó en 24,3% y en el grupo que recibió sólo bacteriófagos la disminución fue de 20%. Al desglosar este resultado por el tipo de muestra, se observa una disminución del porcentaje de aislamiento en “pool” de órganos internos de 29,8% (62 *versus* 32,2%) y en ciegos de 80,7% (100 *versus* 19,3%). La disminución obtenida en las muestras de ciego fue dramáticamente menor por la terapia con ambos biocontroladores, ya que la terapia sólo con probiótico bajó en 33,4% y la terapia con bacteriófagos bajó en 26,7%. Este mejor resultado en muestras de ciegos se explicaría por la acción de ambos biocontroladores a nivel intestinal, por un lado el probiótico tempranamente administrado tendría tiempo de colonizar y multiplicarse en el intestino antes del desafío (Amores *et al.*, 2004), por otra parte la administración de bacteriófagos vía aerosol aplicados dos veces el día antes del desafío, permitiría en forma más prolongada el ingreso de los bacteriófagos vías aerógena, conjuntival y oral, esta última por el hábito de picar y acicalarse. Así, alcanzarían la circulación sanguínea (fagemia) diseminándose, incluso a nivel intestinal donde en este caso encuentra posteriormente a su bacteria blanco. Al ingresar la bacteria vía oral, busca adhesión en receptores específicos del intestino, que por un lado pueden estar copados con el probiótico y por otra parte estas bacterias son destruidas simultáneamente por los bacteriófagos específicos líticos que han alcanzado ese órgano, ingresando a ellas y utilizándolas para su autorreplicación.

En relación a los favorables resultados de “pool” de órganos en que se disminuyó la infección a 32,2% *versus* el grupo control (62,2%), en parte se explicaría como consecuencia de una disminución de la población bacteriana intestinal de *S. Enteritidis* por

efecto tanto de probiótico como de bacteriófagos y por otro lado, por la característica de invasividad demostrada por la cepa.

A pesar de la existencia de escasos trabajos que utilizan probióticos junto a bacteriófagos, se permite señalar que los resultados aquí obtenidos son mejores que lo señalado por Filho *et al.*, (2007) quienes aplicando bacteriófagos y probiótico vía cloacal post infección con *S. Enteritidis*, lograron resultados significativos ($P < 0,05$) en el aislamiento cecal de un 44%, valor inferior al 80,7% aquí encontrado. Toro *et al.*, (2005) empleando como modelo *S. Typhimurium* en una experiencia de hasta 21 días con administración de probiótico y bacteriófagos en multidosis, administrados antes y después de la infección no lograron aislar la cepa desafío mediante cultivo tradicional de *S. Typhimurium*.

El estudio de bacteriología cuantitativa de la cepa *S.E. nal^r rif^r* realizada sólo en muestras cecales, dió como resultado una disminución de 1,69 \log_{10} entre los grupos de aves con probiótico más bacteriófagos (0,34 \log_{10}) y el control de infección (2,03 \log_{10}) si consideramos el total de 15 aves muestreadas por grupo experimental. Si bien no hay una gran diferencia entre estos recuentos cecales, sí hubo una diferencia significativa ($P = 0,0003$) entre ellos. Albala (2007) con una mezcla de tres bacteriófagos, también nativos, obtuvo una reducción intestinal de *S.E. nal^r rif^r* de 3 \log_{10} , superior a la aquí encontrada; esta diferencia de resultados podría explicarse por el uso de diferentes bacteriófagos, diferentes muestras y las metodologías utilizadas en ambas experiencias, así Albala (2007) sometió las muestras intestinales suspendidas en caldo a una incubación de 37°C por 24 horas antes del recuento, proceso que en esta experiencia se realizó sólo a las muestras que resultaron negativas al recuento de las suspensiones cecales recién obtenidas de las aves. Una muestra cecal positiva a *S. Enteritidis* al ser incubada siempre aumentará su recuento bacteriano, en tanto que una muestra positiva no incubada, tendrá un recuento menor. Por otra parte, la incubación de las muestras intestinales sobreestima los recuentos y diferencias (3 \log_{10}) entre los grupos control de infección y grupo mezcla de bacteriófagos de Albala (2007), en relación a los mismos grupos de esta experiencia. Otros autores también han obtenido resultados efectivos en la disminución del recuento cecal de *S.*

Enteritidis en aves a utilizar bacteriófagos, entre ellos Toro *et al.*, (2005) quienes observaron una reducción de seis veces el recuento cecal de *S. Typhimurium nal'* en comparación a su grupo control. Atterbury *et al.*, (2007) empleando un sólo bacteriófago obtuvieron una reducción cecal de *S. Enteritidis* de $1,53 \log_{10}$ ufc/g. La utilización de bacteriófagos en productos industriales avícolas para disminuir concentraciones bacterianas, entre ellas *Salmonella* spp. ha sido llevada a cabo por Higgins *et al.*, (2005) quienes utilizando diferentes concentraciones de bacteriófagos en suspensiones de lavado de la cavidad abdominotorácica de carcasas de broiler y pavos comerciales, redujeron en relación a los controles, entre 50 y 100% el recuento de *S. Enteritidis* con la mayor concentración del bacteriófago utilizada; también obtuvieron buenos resultados al aplicar bacteriófagos en carcasas de broilers comerciales inoculadas en el área pectoral con *S. Enteritidis* y, en pavos comerciales ya positivos a *Salmonella* spp. Resultados menos favorables en el uso de bacteriófagos contra *S. Enteritidis* son comunicados por Fiorentin *et al.*, (2005) quienes redujeron el recuento cecal pero sin diferencias significativas. Higgins *et al.*, (2007) por otra parte, no obtuvieron disminución alguna de *S. Enteritidis* al aplicar bacteriófagos solos o junto a hidróxido de magnesio como neutralizante de la acidez gástrica, de hecho, estos obtuvieron un aumento de la recuperación de la bacteria desde las muestras cecales 48 horas postratamiento ($55,288 \pm 13,557$ para el uso sólo de bacteriófagos, $227,527 \pm 131,210$ para el uso de bacteriófagos junto a hidróxido de magnesio *versus* $5,189 \pm 2,739$ para el grupo control).

El resultado del recuento cecal de *S. Enteritidis* en el grupo con probiótico ($1,24 \log_{10}$), fue similar a lo encontrado en el grupo con bacteriófagos ($1,12 \log_{10}$). Esta similitud de resultados podría explicarse con las mismas bases de discusión para los resultados del grupo con bacteriófagos. Otros investigadores para el recuento cecal de *S. Enteritidis* han utilizado la incubación previa de las muestras, así Avila *et al.*, (2006) con un modelo diferente obtuvieron resultados de disminución de recuento cecal ($1,45 \log_{10}$) cercanos a lo aquí obtenido. A su vez, Fukata *et al.*, (1999) en aves tratadas con el probiótico y desafiadas a los siete días, tuvieron una disminución del recuento cecal en $2,2 \log_{10}$. Otros trabajos que no señalan si este procedimiento de incubación fue realizado, obtienen resultados de $4,6 \log_{10}$ en la disminución de recuento cecal de *S. Enteritidis* (Schneitz *et al.*,

1992) y $5,5 \log_{10}$ (Schneitz y Renney, 2003) en aves desafiadas con *S. Infantis* post aplicación del probiótico.

El resultado del recuento cecal de *S. Enteritidis* en el grupo con probiótico más bacteriófagos fue de $0,34 \log_{10}$, demostrando este resultado que sí hubo un efecto sinérgico al utilizar los dos biocontroladores, similar a los resultados obtenidos en los porcentajes de aislamientos o bacteriología cualitativa. Al haber poca información en la literatura disponible sobre la aplicación de ambas terapias en un mismo grupo de aves, se dificulta la comparación de los resultados aquí obtenidos, que permiten evaluar si estos biocontroladores administrados en conjunto tienen un real efecto sobre el recuento a nivel cecal. Toro *et al.*, (2005) utilizando ambos biocontroladores pero empleados en el modelo *S. Typhimurium* obtuvieron resultados significativos sólo en el recuento bacteriano cecal ($P < 0,05$), pero no se observó un claro sinergismo entre estos dos métodos. Por otra parte, Filho *et al.*, (2007) quienes sólo aislaron cualitativamente *S. Enteritidis*, tampoco observaron un claro sinergismo en la utilización de ambos biocontroladores.

El empleo de probióticos en modelos aviáres informan de ganancias de peso con su uso (O' Dea *et al.*, 2006; Timmerman *et al.*, 2006). Toro *et al.*, (2005) empleando bacteriófagos además de probiótico, encontraron una ganancia de peso de 24 g. en el grupo que recibió sólo bacteriófagos y de 10 a 12 g. en los grupos con sólo probiótico y con probiótico más bacteriófagos. Los autores señalan no haber encontrado un efecto sinérgico entre ambos biocontroladores en la ganancia de peso.

La comparación de los pesajes obtenidos al inicio y al final de la experiencia, entre los grupos con probiótico y con probiótico más bacteriófagos, tuvieron una diferencia de sólo 1,1 g a favor del grupo con probiótico. Antes de este trabajo se estudiaron las posibles interacciones entre bacteriófagos diferentes a los aquí empleados, sobre 290 cepas bacterianas residentes del tracto gastrointestinal de aves sanas, no encontrándose interacción alguna (Borie *et al.*, 2006); de esto se podría deducir la inexistencia de antagonismo entre bacteriófagos y probiótico, ya que este último se origina de la flora normal gastrointestinal de aves. Por otra parte, los pesajes fueron obtenidos por grupos y

no en forma individual por ave, así pocos cambios individuales podrían influir en los promedios.

Complementariamente, para conocer la posible dinámica entre bacteriófagos y *S.E. nal^r rif^r*, en los grupos de aves tratados con ambos, en la Pontificia Universidad Católica de Valparaíso se logró aislamiento de bacteriófagos en todas las aves que recibieron la terapia con bacteriófagos. El grupo control sólo inoculado con *S. Enteritidis* fue negativo al aislamiento de bacteriófagos, demostrándose que no hubo contaminación cruzada entre los grupos con bacteriófagos y el control. En el grupo de aves que sólo recibieron bacteriófagos se observó un porcentaje de aislamiento de bacteriófagos de 76,6%, muy similar al aislamiento de 80% de *S. Enteritidis*. Finalmente, el grupo con probiótico más bacteriófagos obtuvo un porcentaje de aislamiento de bacteriófagos de 29%, cercano al 38,7% de aislamiento de *S. Enteritidis*, demostrándose que una disminución en el aislamiento bacteriano disminuyó también el número de bacteriófagos encontrados, debido al menor número de su bacteria blanco.

Los positivos resultados obtenidos de este modelo experimental, al emplear dos bien caracterizados biocontroladores, probiótico y bacteriófagos, incentivan a probar esta metodología en procesos industriales avícolas variados; entre otros, en poblaciones de aves adultas, administración simultánea de ambos biocontroladores en un solo manejo para evitar un mayor grado de estrés en las aves y, la utilización de éstos bacteriófagos puede proyectarse para una mejor calidad sanitaria de las carcasas de aves.

Se espera que estos resultados se proyecten como una herramienta más de contribución al control de la salmonelosis en la producción avícola.

CONCLUSIONES

1. El empleo de una asociación de dos biocontroladores, probiótico más bacteriófagos, disminuyó significativamente ($P < 0,0001$) la incidencia de *S. Enteritidis* en pollas Leghorn tanto a nivel intestinal como en “pool” de órganos internos.
2. El grupo de pollas Leghorn que utilizó el probiótico más la mezcla de bacteriófagos logró disminuir significativamente ($P = 0,0003$) el recuento cecal de *S. Enteritidis*.
3. Las pollas Leghorn que recibieron sólo uno de los dos biocontroladores también demostraron una disminución en los parámetros de incidencia y recuento bacteriano, pero con valores no tan alentadores como el uso de ambos.
4. La aplicación de sólo probiótico o de ambos biocontroladores no lograron aumentar el peso de las pollas Leghorn en forma significativa.

BIBLIOGRAFÍA

ACKERMANN, H.W. 2003. Bacteriophages observations and evolution. *Research in Microbiology*. 154: 245-251.

ALBALA, I.M. 2007. Biocontrol de *Salmonella* Enteritidis en aves mediante el uso de bacteriófagos. Memoria para optar al Título de Médico Veterinario. Facultad de Ciencias Veterinarias y Pecuarias. Universidad de Chile. 53p.

ALEXANDRE, M.; POZO, C.; GONZÁLEZ, V.; MARTÍNEZ, M. C.; 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. *Revista Médica de Chile*. 128 (10): 1075-1083.

ALTEKRUSE, S.F.; BAUER, N.; CHANLONGBUTRA, A.; DESAGUN, R.; NAUGLE, A.; SCHLOSSER, W.; UMHOLTZ, R.; WHITE, P. 2006. *Salmonella enteritidis* in broiler chickens, United States, 2000-2005. *Emerging Infectious Diseases*. 12(12): 1848-1852.

AMORES, R.; CALVO, A.; MAESTRE, J. R.; MARTINEZ-HERNANDEZ, D. 2004. Probióticos. *Revista Española de Quimioterapia*. 17(2):131-139.

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 chickens skin leads to a reduction in recovery of *Campylobacter jejuni*. *Applied and Environmental Microbiology*. 69(10): 6302-6306.

ATTERBURY, R.J.; DILLON, E.; SWIFT, C.; CONNERTON, P.L.; FROST, J.A.; DODD, C.E.R. 2005. Correlation of *Campylobacter* bacteriophage with reduced presence of host in broiler chicken ceca. *Applied and Environmental Microbiology*. 71(8): 4885-4887.

ATTERBURY, R.J.; VAN BERGEN, M.A.P.; ORTIZ, F.; LOVELL, M.A. ; HARRIS, J.A.; DE BOER, A.; WAGENAAR, J.A.; ALLEN, V.M.; BARROW, P.A. 2007. Bacteriophage therapy to reduce *Salmonella* colonization of broiler chickens. *Applied and Environmental Microbiology*. 73(14): 4543- 4549.

AVILA, L.A.F.; NASCIMENTO, V.P.; SALLE, C.T.P.; MORAES, H.L.S. 2006. Effects of probiotics and maternal vaccination on *Salmonella enteritidis* infection in broiler chicks. *Avian Diseases*. 50: 608-612.

BABU, U; DALLOUL, R.A.; OKAMURA, M.; LILLEHOJ, H.S.; XIE, H.; RAYBOURNE, R.B.; GAINES, D.; HECKERT, R.A. 2004. *Salmonella enteritidis* clearance and immune responses in chickens following *Salmonella* vaccination and challenge. *Veterinary Immunology and Immunopathology*. 101(2004): 251-257.

BAILEY, J.S.; CASON, J.A.; COX, N.A. 1998. Effect of Salmonella in young chicks on competitive exclusion treatment. Poultry Science. 77: 394 -399.

BARROW, P.; LOVELL, M.; BERCHIERI, A. 1998. Use of lytic bacteriophage for control of experimental *Escherichia coli* septicemia and meningitis in chickens and calves. Clinical and Diagnostic Laboratory Immunology. 5(3): 294-298.

BEAVER, B. 2001. Report of the AVMA panel on euthanasia. Journal of the American Veterinary Medical Association. 218(5): 669-695.

BLANKENSHIP, L.C.; BAILEY, J.S.; COX, N.A.; STERN, N.J.; BREWER, R.; WILLIAMS, O. 1993. Two-step mucosal competitive exclusion flora treatment to diminish Salmonellae in commercial broiler chickens. Poultry Science 72: 1667-1672.

BORIE, C.; ZURITA, P.; SANTANDER, J.; KRUEGER, E.; SÁNCHEZ, M.L.; RAMÍREZ, S.; ROBESON, J. 2004. Efecto del bacteriófago *f3ase* sobre la colonización de *Salmonella enteritidis* en un modelo en aves. XIX Congreso Panamericano de Ciencias Veterinarias. 24-28 de Octubre, Buenos Aires, Argentina.

BORIE, C.; ALBALA, I.; SANCHEZ, M.L.; MORALES, A.; NAVARRO, C.; RETAMALES, J.; ROBESON, J. 2006. Bacteriófagos: biocontrol de Salmonella spp. en aves. XVIII Congreso Latinoamericano de Microbiología, 23-26 octubre, Pucón, Chile. P32.

BREN, L. 2006. FDA approves use of bacteriophages to be added to meat and poultry products. Gastroenterology and Hepatology News. 131: 1370-1372.

BREYTENBACH, J.H. 2004. *Salmonella* Control in Poultry. Intervet International. [En línea]. <http://www.safe-poultry.com/documents/ControlofSalmonellainPoultry-August2004.pdf> [consulta 26-08-07].

CARLTON, R.M. 1999. Phage therapy: past history and future prospects. Archivum Immunologiae et Therapiae Experimentalis. 47: 267-274.

CARRILLO, L.; ATTERBURY, R.J.; EL-SHIBINY, A.; CONNERTON, P.L.; DILLON, E.; SCOTT, A.; CONNERTON, I.F. 2005. Bacteriophage therapy to reduce *Campylobacter jejuni* colonization of broiler chickens. Applied and Environmental Microbiology. 71(11): 6554-6563.

CDC; NIH. CENTRES FOR DISEASE CONTROL AND PREVENTION, NATIONAL INSTITUTES OF HEALTH. 2007. Biosafety in microbiological and biomedical laboratories. [En línea]. http://www.cdc.gov/od/ohs/biosfty/bmb15/BMBL_5th_Edition.pdf [consulta 26-08-07].

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

CUMMINGS, J.H.; MACFARLANE, G.T.; ENGLYST, H.N. 2001. Prebiotic digestion and fermentation. *The American Journal of Clinical Nutrition*. 73 (suppl): 415S-420S.

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

DEFRA; DEPARMENT OF ENVIRONMENT FOOD AND RURAL AFFAIRS. 2005. Zoonoses report united kingdom 2004. 84 p.[En línea] www.defra.gov.uk. [consulta 20-10-07].

FICA, C.; ALEXANDRE, S.; PRAT, M. Et al. 2001. Cambios epidemiológicos de las Salmonelosis en Chile: desde *Salmonella typhi* a *Salmonella enteritidis*. *Revista Chilena de Infectología*. 18(2): 85-93.

FIGUEROA, I.M.; VERDUGO, A. 2005. Mecanismos moleculares de patogenicidad de *Salmonella* sp. *Revista Latinoamericana de Microbiología*. 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 para optar al Título de Médico Veterinario. Facultad de Ciencias Veterinarias y Pecuarias. Universidad de Chile. 102 p.

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

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

FUKATA, T.; SASAI, K.; MIYAMOTO, T.; BABA, E. 1999. Inhibitory effects of competitive exclusion and fructooligosaccharide, singly and in combination, on *Salmonella* colonization of chicks. *Journal of Food Protection*. 62 (3): 229-233.

GAST R.K.; STONE, H.D.; HOLT, P.S. 1993. Evaluation of the efficacy of oil-emulsion bacterins for reducing fecal shedding of *Salmonella enteritidis* by laying hens. *Avian Diseases*. 37: 1085-1091.

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

GOODE, D.; ALLEN, V.M.; BARROW, P.A. 2003. Reduction of experimental *Salmonella* and *Campylobacter* contamination of chicken skin by application of lytic bacteriophages. *Applied and Environmental Microbiology*. 69(8): 5032-5036.

GORSKI, A.; WEBER-DABROWSKA, B. 2005. The potencial role of endogenous bacteriophages in controlling invading pathogens. Cellular and Molecular Life Sciences. 62: 511-519.

HENDRIX, R.W. 2002. Bacteriophages: evolution of the majority. Theoretical Population Biology. 61: 471-480.

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

HIGGINS, S. E.; HIGGINS, J. P.; BIELKE, L. R.; HARGIS, B. M. 2007a. Selection and application of bacteriophages for treating *Salmonella enteritidis* infections in poultry. International Journal of Poultry Science 6 (3): 163-168.

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

HOLZAPFEL, W.H.; HABERER, P.; GEISEN, R.; BJORKROTH, J.; SCHILLINGER, U. 2001. Taxonomy and important features of probiotic microorganisms in food and nutrition. The American Journal of Clinical Nutrition. 73(suppl): 365S-373S.

HOLZAPFEL, W.; SCHILLINGER, U. 2002. Introduction to pre-and probiotics. Food Research International. 35:109-116.

HUFF, W.E.; HUFF, G.R.; RATH, N.C.; BALOG, J.M.; DONOGHUE, A.M. 2002. Prevention of *Escherichia coli* infection in broiler chickens with a bacteriophage aerosol spray. Poultry Science. 81: 1486-1491.

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. Poultry Science. 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. Poultry Science. 84: 655-659.

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

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

ISOLAURI, E.; SALMINEN, S.; OUWEHAND, A. 2004. Probiotics. Best Practice Research Clinical Gastroenterology. 18(2): 299-313.

ISP. INSTITUTO DE SALUD PÚBLICA. 2005. Enfermedades infecciosas, vigilancia de laboratorio y referencia. *Salmonella* spp. [En línea] http://200.68.11.21/ivlweb/hmenu_salmonella.aspx [Consulta 22-10-07].

JOERGER, R.D. 2003. Alternatives to antibiotics: bacteriocins, antimicrobial peptides and bacteriophages. *Poultry Science*. 82: 640-647.

KIM, A.; LEE, Y.J.; KANG, M.S.; KWAG, S.I.; CHO, J.K. 2007. Dissemination and tracking of *Salmonella* spp. in integrated broiler operation. *Journal of Veterinary Science*. 8(2): 155-161.

LE MINOR, L. 1984. Genus III. *Salmonella* *Lignières* 1900, 389. **In:** Krieg, N.R. *Bergey's manual of systematic bacteriology*. 1° Ed. Estados Unidos. Editorial Williams & Wilkins. p 427- 458.

LEVERENTZ, B.; CONWAY, W.S.; CAMP, M.J.; JANISIEWICZ, W.J.; ABULADZE, T. ; YANG, M. ; SAFTENR, R. ; SULAKVELIDZE, A. 2003. Biocontrol of *Listeria monocytogenes* with lytic bacteriophages and a bacteriocin. *Applied and Environmental Microbiology*. 69(8): 4519- 4526.

LEVIN, B.R.; BULL, J.J. 2004. Population and evolutionary dynamics of phage therapy. *Nature Reviews Microbiology*. 2:166-173.

LOPEZ, A. 2007. Descripción de la infección experimental en pollos con una cepa nativa de *Salmonella* Enteritidis *nal^r rif^r* P-9. Memoria para optar al Título de Médico Veterinario, Facultad de Ciencias Veterinarias y Pecuarias. Universidad de Chile. 55p.

LOPEZ, R. 2004. Bacteriófagos: de la biología molecular a su uso terapéutico. Conferencia. [En línea] <http://www.racve.es/actividades/medicina-veterinaria/2004-11-03RubenLopez.htm>. [consulta 20-08-07].

MALORNY, B.; HOORFAR, J.; BUNGE, C.; HELMUTH, R. 2003. Multicenter validation of the analytical accuracy of *Salmonella* PCR: towards an international standard. *Applied and Environmental Microbiology*. 69(1): 290 – 29.

McFARLANE, T.G.; CUMMINGS, J.H. 1999. Probiotics and prebiotics: can regulating the activities of intestinal bacteria benefit health?. *Clinical Research* ed. 318: 999-1003.

MEAD, G. 2000. Prospects for “competitive exclusion” treatment to control *Salmonellas* and other foodborne pathogens in poultry. *The Veterinary Journal*. 159: 111-123.

MERRIL C, R.; BISWAS, B.; CARLTON, R.; JENSEN, N.C.; CREED, G.J.; ZULLO, S.; ADHYA, S. 1996. Long-circulating bacteriophage as antibacterial agents. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 93: 3188-3192.

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

NAKAMURA, A.; OTA, Y.; MIZUKAMI, A.; ITO, T.; NGWAI, B.; ADACHI, Y. 2002. Evaluation of aviguard, a commercial competitive exclusion product for efficacy and after-effect on the antibody response of chicks to *Salmonella*. Poultry Science. 81: 1653-1660.

O'DEA, E.E.; FASENKO, G.M.; ALLISON, G.E.; KORVER, D.R.; TANNOCK, G. W.; GUAN, L.L. 2006. Investigating the effects of commercial probiotics on broiler chick quality and production efficiency. Poultry Science. 85: 1855-1863.

OMS. ORGANIZACIÓN MUNDIAL DE LA SALUD. 2002. Serie evaluación de riesgos microbiológicos. Evaluaciones de riesgos de *Salmonella* en huevos y pollos, resumen interpretativo. [En línea] http://www.who.int/foodsafety/publications/micro/en/mra1_sp.pdf [Consulta 15-10-07]

PALMU, L.; CAMELIN, I. 1997. The use of competitive exclusion in broilers to reduce the level of *Salmonella* contamination on the farm and at the processing plant. Poultry Science. 76: 1501-1505.

PASCUAL, M.; HUGAS, M.; BADIOLA, J.I.; MONFORT, J.M.; GARRIGA, M. 1999. *Lactobacillus salivarius* CTC2197 prevents *Salmonella enteritidis* colonization in chickens. Applied and Environmental Microbiology. 65(11): 4981-4986

PAYNE, R.J.; JANSEN, V.A. 2003. Pharmacokinetics principles of bacteriophage therapy. Clinical Pharmacokinetics. 42(4): 315-325.

PRADO, V.; SOLARI, V.; ALVAREZ, I.M.; ARELLANO, C.; VIDAL, R.; CARREÑO, M.; MAMANI, N.; FUENTES, D.; O' RYAN, M.; MUÑOZ, V. 2002. Situación epidemiológica de las enfermedades transmitidas por alimentos en Santiago de Chile. Período 1999-2000. Revista Médica de Chile. 130(5): 495-501.

ROBERFROID, M. 2007. Prebiotics: the concept revisited. The Journal of Nutrition. 137: 830S- 837S.

SANCHEZ, M.M.; CARDONA, N.M. 2003. Mecanismos de interacción de *Salmonella* con la mucosa intestinal. Asociación Colombiana de Infectología. 7(1): 22-29.

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

SCHNEITZ, C. 1992. Research note: automated droplet application of a competitive exclusion preparation. Poultry Science. 71: 2125-2128.

SCHNEITZ, C.; RENNEY, D.J. 2003. Effect of a comercial competitive exclusion product on the colonization of *Salmonella infantis* in day-old pheasant chicks. *Avian Diseases*. 47: 1448-1451.

SCHNEITZ, C.; KIISKINEN, T.; TOIVONEN, V.; NASI, M. 1998. Effect of BROILACT® on the physicochemical conditions and nutrient digestibility in the gastrointestinal tract of broilers. *Poultry Science*. 77: 426-432.

SCHNEITZ, C. Orion Corporation, Animal Health. Broilact. The competitive exclusion product Broilact® [En línea].
http://www.orion.fi/english/business_areas/alasivu.shtml/a03?25056 [Consulta 20-9-07].

SEO, K.H.; HOLT, P.S.; GAST, R.K.; HOFACRE, C.L. 2000. Elimination of early *Salmonella enteritidis* infection after treatment with competitive - exclusion culture and enrofloxacin in experimentally infected chicks. *Poultry Science* 79: 1408-1413.

SKLAR, I.B.; JOERGER, R.D. 2001. Attempts to utilize bacteriophage to combat *Salmonella enterica* serovar *Enteritidis* infection in chickens. *Journal of Food Safety* 21(2001): 15-29.

SKURNIK, M.; STRAUCH, E. 2006. Phage therapy: facts and fiction. *International Journal of Medical Microbiology* 296: 5-14.

SPRING, P.; WENK, C.; DAWSON, K.A.; NEWMAN, K.E. 2000. The effects of dietary mannanoligosaccharides on cecal parameters and the concentrations of enteric bacteria in the ceca of *Salmonella* - challenged broiler chicks. *Poultry Science*.79: 205-211.

SULAKVELIDZE, A.; ALAVIDZE, Z.; MORRIS, J.G. 2001. Bacteriophage therapy. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*. 45(3): 649-659.

SULLIVAN, G. C.; 2001. Probiotics. *British Journal of Surgery*. 88:161-162.

TAUCHER, E. 1997. Bioestadística. Determinación del tamaño de la muestra. Ed Universitaria. Santiago de Chile pp. 125-126.

THITARAM, S.N.; CHUNG, C.H.; DAY, D.F.; HINTON, A.; BAILEY, J.S.; SIRAGUSA, GR. 2005. Isomaltooligosaccharide increases cecal *Bifidobacterium* population in young broiler chickens. *Poultry Science*. 84: 998-1003.

TIMMERMAN, H.M.; VELDMAN, A.; VAN DEN ELSSEN, E.; ROMBOUTS, F.M.; BEYNEN, A.C. 2006. Mortality and growth performance of broilers given drinking water supplemented with chicken-specific probiotics. *Poultry Science*. 85: 1383-1388.

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

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

WEINACK, O.M.; SNOEYENBOS, G.H.; SOERJADI-LIEM, A.S.; SMYSER, C.F. 1985. Influence of temperature social, and dietary stress on development and stability of protective microflora in chickens against *S. Typhimurium*. *Avian Diseases*. 29(4): 1177-1183.

WHO. WORLD HEALTH ORGANIZATION. 2006. Drug- resistant *Salmonella* [en línea]. <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs139/en/> [Consulta 06/09/07]

WITHEY, S.; CARTMELL, E.; AVERY, L.M.; STEPHENSON, T. 2005. Bacteriophages-potential for application in wastewater treatment processes. *Science of the Total Environment* 339: 1-18.

ZURITA, P. 2004. Efecto del bacteriófago f3αSE sobre la colonización de *Salmonella enteritidis* en un modelo aviar. Memoria para optar al Título de Médico Veterinario. Facultad de Ciencias Veterinarias y Pecuarias. Universidad de Chile. 45p.

