



UNIVERSIDAD DE CHILE
Facultad de Ciencias Veterinarias y Pecuarias
Escuela de Ciencias Veterinarias



**EFFECTO DEL BACTERIÓFAGO β 3 α SE SOBRE LA
COLONIZACIÓN DE *Salmonella enteritidis* EN UN MODELO
AVIAR**

PAULINA ZURITA URREA

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

PROFESOR GUIA: CONSUELO BORIE POLANCO

**SANTIAGO, CHILE
2004**



UNIVERSIDAD DE CHILE
 Facultad de Ciencias Veterinarias y Pecuarias
 Escuela de Ciencias Veterinarias



**EFFECTO DEL BACTERIÓFAGO β 3 α SE SOBRE LA
 COLONIZACIÓN DE *Salmonella enteritidis* EN UN MODELO
 AVIAR**

PAULINA ZURITA URREA

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

NOTA FINAL:.....

		NOTA	FIRMA
PROFESOR GUIA	: CONSUELO BORIE POLANCO
PROFESOR CONSEJERO:	PEDRO ABALOS PINEDA
PROFESOR CONSEJERO:	HÉCTOR HIDALGO OLATE

SANTIAGO, CHILE

2004

Esta memoria de título se desarrolló con el apoyo del proyecto FIV3718-2 “Efecto del bacteriófago f3&SE sobre la colonización de *Salmonella enteritidis* en un modelo aviar”

ÍNDICE

Página

1. INTRODUCCIÓN.....	1
2. REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA	
1) Aspectos generales de <i>Salmonella</i>	2
2) Patogénesis de <i>Salmonella</i>	3
3) Hospederos de <i>Salmonella</i>	5
4) <i>Salmonella</i> en el hombre.....	7
5) <i>Salmonella enteritidis</i> en Chile.....	7
6) Medidas de control frente a <i>Salmonella enteritidis</i> en aves.....	10
7) Bacteriófagos.....	15
8) Bacteriófagos contra <i>Salmonella</i>	19
3. OBJETIVOS.....	22
4. MATERIAL Y MÉTODO.....	23
5. RESULTADOS.....	28
6. DISCUSIÓN.....	33
7. CONCLUSIONES.....	37
8. BIBLIOGRAFÍA.....	38

RESUMEN

Las infecciones por *Salmonella enteritidis*, han aumentado considerablemente en Chile y en el mundo entero. Esta zoonosis se transmite principalmente por el consumo de productos contaminados, siendo el reservorio más frecuente las aves. Este hecho ha canalizado los esfuerzos hacia métodos de control eficientes, que excluyan el uso de antibióticos, debido a los altos niveles de multiresistencia observados en este enteropatógeno.

El objetivo de este estudio fue evaluar el efecto del bacteriófago $f3\alpha SE$, de origen aviar, sobre la colonización de *Salmonella enteritidis* en un modelo de aves, para esto se trabajó con pollos broiler. A los 10 días de edad se formaron 5 grupos de 15 pollos cada uno. El grupo 1 se inoculó con una relación bacteria/fago 1:1, el grupo 2 fue inoculado con una relación bacteria/fago 1:10, el grupo 3 constituyó el control de infectividad de la cepa de *Salmonella enteritidis nal^r rif^r* recibiendo una dosis de 4×10^9 UFC/ml, el grupo 4 fue inoculado sólo con el fago en una dosis de 10^{10} UFP/ml, constituyendo el grupo control de inocuidad del fago, se contó además con un quinto grupo, que no recibió fago ni bacteria, para controlar la contaminación cruzada del fago entre las unidades experimentales. Después de 10 días de la inoculación fago/bacteria, se efectuó la eutanasia de las aves y se procedió al reaislamiento de la cepa desafío a partir de intestino y corazón e hígado (“pool” de órganos) de cada una de las aves. La inoculación del fago en una dosis de 10^9 UFP/ml, disminuyó en forma significativa el número de aislamientos de *Salmonella* desde hígado y corazón vs el grupo control, no así desde intestino. El fago administrado en una dosis de 10^{10} UFP/ml disminuyó significativamente los aislamientos de *Salmonella* a nivel intestinal vs el grupo control, no ocurriendo lo mismo en órganos internos. En el grupo control de inocuidad del fago, inoculado con 10^{10} UFP/ml, no se observó daño en órganos internos a nivel macroscópico. Se concluye que el uso del bacteriófago $f3\alpha SE$ sería eficaz en disminuir la colonización intestinal y sistémica de pollos desafiados con una cepa de *Salmonella enteritidis*.

SUMMARY

Salmonella enteritidis infections has been considerable increased in Chile and the whole world. The ingestion of contaminated chicken products is the main cause of this zoonosis. This fact comand the efforts to effective control methods that excluded the use of antibiotics because the bacterian multiresistance showed.

The aim of this study was evaluate the effect of the bacteriophage $f3\alpha SE$ over the *Salmonella enteritidis* colonization in an avian model. At 10 days of age, 5 groups with 15 broiler chickens each one, were formed. The group 1 was inoculated with a relation bacterium/ phage 1:1, the group 2 was inoculated with a relation bacterium/phage 1:10, the group 3 was the infectivity control of the *Salmonella enteritidis nal^r rif^r* strain and was challenged with 4×10^9 CFU/ml, the group 4 received only the phage in a dosis of 10^{10} PFU/ml, a fifth group that not receive phage neither bacteria, was created to observe a possible phage cross contamination between experimental units.

After 10 days of the phage/bacteria inoculation, the chickens were euthanasiaed and the intestinal and pool of organs sampled of each chicken, were prossesed to the reisolation of the challenged strain. The administration of the phage in a dosis of 10^9 UFP/ml, reduce significantly the reisolation of *Salmonella* since liver and heart vs the control group, but not from the intestine. The administration of the phage in a dosis of 10^{10} UFP/ml reduce significantly the reisolation of *Salmonella* from the intestine vs the control group, but not from the internal organs. There was not macroscopic damage in the internal organs of the phage control group. In conclusion, the use of the bacteriophage $f3\alpha SE$ will be effective in reduce the intestinal and systemic infection in chickens challenged with a *Salmonella enteritidis* strain.

1) INTRODUCCIÓN

El desarrollo tecnológico-económico experimentado por nuestro país ha producido distintos cambios en la industria pecuaria. Los sistemas de producción se han intensificado y generan nuevas condiciones que propician el desarrollo de nuevos patógenos y su perpetuamiento en el medio. *Salmonella enterica* serotipo *enteritidis* (S.E) está dentro de la lista de patógenos emergentes y exhibe una compleja epidemiología que tiene al sector avícola como principal escenario; es a través de sus productos, carne, huevo y derivados de estos, por los que el hombre adquiere la infección.

Las medidas de control de S.E que aparecen como las más usadas en el sector avícola chileno son: vacunación con cepas muertas, exclusión competitiva y el uso de antibióticos, sin embargo, ninguna de ellas muestra una total eficacia, no logrando evitar por completo la colonización del tracto digestivo por S.E. A esto, se suma la emergencia de la resistencia a antibióticos que hace más imperativo aún el desarrollo de nuevas estrategias de control y prevención. Es así, como los bacteriófagos líticos reaparecen como una alternativa alentadora para emplear como medida de biocontrol. Recientemente, variadas experiencias avalan el uso de ellos y los muestran con exitosos resultados en el control de distintas infecciones bacterianas en el sector agropecuario y humano.

En nuestro país, se han aislado tres fagos de origen aviar con actividad lítica “*in vitro*” frente a S.E; por lo tanto, parece interesante evaluar si se repite esta eficacia en el modelo animal aviar; de ser así, se abriría una nueva puerta en el control de este enteropatógeno que es responsable de producir una zoonosis que se extiende ampliamente a nivel mundial.

2) REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA

A) ASPECTOS GENERALES DE SALMONELLA

En 1885, Daniel E. Salmon, bacteriólogo veterinario, junto a Theobald Smith, aislaron desde cerdos, el primer miembro de este grupo de microorganismos, *Salmonella choleraesuis* (Zinsser, 1967). Hoy en día, más de 2000 serotipos de *Salmonella*, involucrados en la producción de enfermedades, han sido aislados de un gran número de hospederos alrededor del mundo. La adaptación a distintos nichos de evolución ha conducido a las cepas de *Salmonella* a una gran diversidad fenotípica y genotípica (Fierer y Guiney, 2001). Por definición general, *Salmonella* pertenece a la familia Enterobacteriaceae y corresponden a bacilos Gram- negativos, anaerobios facultativos (Krieg y Holt, 1984). *Salmonella* tiene la propiedad de ser intracelular facultativa, así, aunque son fagocitadas por los macrófagos, tienen la propiedad de sobrevivir y multiplicarse en ellos. Además, *Salmonella* ha demostrado tener efectos citotóxicos sobre macrófagos de ratas; este efecto se atribuye a una respuesta de tipo apoptótica del macrófago, mediada por la bacteria (Schwan *et al.*, 2000).

La diferenciación de *Salmonella* con respecto a otros miembros de la familia Enterobacteriaceae puede realizarse en función de las propiedades bioquímicas que la caracterizan, dentro de éstas se puede mencionar que no fermentan la lactosa, pero sí la glucosa con producción de gas, generan SH₂, y no producen desaminasas ni ureasas, entre otras (Krieg y Holt, 1984).

La clasificación de *Salmonella* según el esquema de Kauffmann – White, utiliza tres tipos de antígeno para su serotipificación: antígeno O (Somático), que corresponde a la porción polisacárida, localizada en la pared celular, antígeno H (flagelar) que es una proteína termolábil contenida en los flagelos y antígeno Vi (capsular), que es un polisacárido termolábil (Hagan y Bruner, 1992). De acuerdo a este esquema, actualmente se describen más de 2000 serotipos de *Salmonella* (Fierer y Guiney, 2001).

B) PATOGÉNESIS DE SALMONELLA

Normalmente la flora del intestino, bloquea el acceso a los sitios de unión para *Salmonella*, en la pared intestinal. Factores que alteren esta flora, tales como terapia antimicrobiana, dieta inadecuada o privación de agua, entre otras, incrementan notablemente la susceptibilidad del individuo a sufrir una septicemia (Hagan y Bruner, 1992). Los movimientos de peristalsis, son estimulados normalmente por la microflora normal intestinal. Si estos movimientos son disminuidos por una disbacteriosis, el animal infectado está aún más expuesto a la colonización, ya que el ambiente favorece el sobrecrecimiento de *Salmonella* (Hagan y Bruner, 1992). Los fenómenos de estrés debidos al transporte, mala alimentación o enfermedades concomitantes, también facilitan la colonización intestinal de este enteropatógeno (Biberstein y Chung Zee, 1990).

Una gran variedad de bacterias gram-negativas, entre ellas *Salmonella*, utilizan el sistema de secreción tipo III (SSTT) como mecanismo de virulencia. Los genes de virulencia de *Salmonella* se encuentran esparcidos, y/o bien agrupados en segmentos del cromosoma conocidos como islas de patogenicidad de *Salmonella* (SPI) (Hueck, 1998). Una vez que la bacteria se pone en contacto con la superficie de la célula epitelial intestinal, se liberan muchas de las proteínas secretadas por este sistema de secreción, que interactúan directamente con los componentes de la célula huésped, alterando sus señales de traducción. *Salmonella* contiene dos sistemas de secreción tipo III, codificados en las islas SPI-1 y SPI-2. Ambos sistemas juegan roles distintos durante la patogénesis bacteriana. SPI-1 es requerido para la penetración inicial de *Salmonella* a la mucosa intestinal y SPI-2 es necesario en la fase sistémica de la infección (Hueck, 1998).

SopB, también conocida como SigD, es una proteína liberada por el SSTT. Participa, a nivel intestinal, en la formación de la vacuola que contiene a *Salmonella* y en la fusión de ésta a la célula epitelial intestinal; además, estaría relacionada a la respuesta inflamatoria y la acumulación de fluidos en el lumen intestinal, asociados con la presentación de diarrea clínica (Terebiznik *et al.*, 2002).

En ratas afectadas sistémicamente por *Salmonella*, se ha visto que la bacteria penetra a la mucosa intestinal, adhiriéndose a las células M de las placas de Peyer.

El tropismo de *Salmonella* hacia las células M parece ser mediado por fimbrias especie-específicas (Ipf) que actuarían en la invasión de la barrera intestinal (Hueck, 1998).

Las proteínas SipA y SipC, liberadas por el SSTT, se unen a la actina alterando el citoesqueleto de la célula huésped (Zhou y Galán, 2001), así, *Salmonella* puede ingresar a las células M, destruirlas y tener acceso al sistema linfoide subyacente (Hueck, 1998).

En el tejido linfoide, bajo las células M, *Salmonella* es fagocitada por los macrófagos de la zona, replicándose dentro de la vacuola fagocítica. La bacteria utiliza a los macrófagos para diseminarse dentro del tejido linfoide y se acumula y replica masivamente en el hígado, bazo y órganos que son ricos en células fagocíticas (Hueck, 1998).

Estudios *in vitro*, utilizando tejidos de terneros como cultivo, han demostrado que el sistema de secreción tipo 1 (SSTT-1) está directamente relacionado con el inicio de la respuesta inflamatoria. Este sistema libera la proteína conocida como SipB, que gatilla la liberación de los mediadores de inflamación, interleuquina-1 β e interleuquina-8 (IL-8), desde macrófagos y células epiteliales intestinales respectivamente (Hersh *et al.*, 1999 citado por Zhang *et al.*, 2003). Usando al ternero como modelo de estudio de la enterocolitis causada por *S. typhimurium*, se ha observado que la liberación de citokinas como la IL-8, conduciría a una infiltración de neutrófilos hacia el lumen intestinal, con la consecuente necrosis de la mucosa ileal; además, la respuesta inflamatoria produce un aumento de la permeabilidad vascular que resulta en un edema de la mucosa. Estos datos sugieren que la severa pérdida de fluidos observada en la enterocolitis causada por *S. typhimurium*, estaría dada, al menos en parte, por los mecanismos de inflamación que alteran la barrera epitelial (Zhang *et al.*, 2003).

Los antígenos presentes en *Salmonella* también juegan un rol importante dentro de la patogénesis bacteriana, así la invasividad de *Salmonella* está determinada en parte, por el tipo y número de polisacáridos presentes en el antígeno somático o cadena O (Hagan y Bruner, 1992). La actividad endotóxica del lípido A de la pared celular, participa en el proceso de septicemia. Entre los efectos que produce se pueden mencionar la inducción de fiebre, hemorragias asociadas al consumo de los factores de coagulación, leucopenia seguida de leucocitosis, hipotensión, shock y depleción del glicógeno hepático con la consecuente hipoglicemia (Hagan y Bruner, 1992).

Además *Salmonella* presenta una enterotoxina LT, similar a la observada en *Escherichia coli*, que estaría involucrada en la pérdida de fluidos hacia el lumen intestinal (Hagan y Bruner, 1992).

C) HOSPEDEROS DE SALMONELLA

Los miembros del género *Salmonella* producen enfermedades en reptiles, aves, mamíferos y en el hombre. Pueden dividirse en tres categorías según su relación con hospederos humanos o animales. Dentro del primer grupo se encuentran *S. typhi* y *S. paratyphi* A y C, quienes afectan exclusivamente al humano. En el segundo grupo se encuentran serotipos adaptados a hospedadores animales específicos, entre ellas *S. dublin* en bóvidos, *S. abortusequi* en los caballos y *S. choleraesuis* en cerdos. El tercer grupo está constituido por serotipos no adaptados, capaces de producir alteraciones patológicas tanto en el hombre, como en diversos animales, se encuentran entre éstos *S. typhimurium*, *S. enteritidis* y *S. anatum* entre otras (Blood *et al.*, 1999). Así mismo, esta bacteria puede clasificarse según su movilidad. Dentro de las móviles, responsables de los cuadros de paratifosis se encuentran los serotipos anteriormente nombrados. Pertenecen al grupo de las Salmonelas no móviles los serotipos *gallinarum* y *pullorum*, generalmente específicos de las aves y que originan en ellas la tifosis aviar y la diarrea blanca de los pollitos, respectivamente (Biberstein y Chung, 1990).

En aves, los signos clínicos producidos por *Salmonella enteritidis*, se ven generalmente sólo en pollos de poca edad y pueden presentarse altas tasas de mortalidad y retraso en el crecimiento. Dentro del serotipo *enteritidis*, hay bacterias que tienen receptores que reconocen fagos específicos y por lo tanto, se pueden agrupar según el fago que sean capaces de unir, constituyendo los fagotipos. El fagotipo 4 de *Salmonella enteritidis* se ha asociado con altos niveles de invasividad y mortalidad en pollos recién nacidos (Barrow, 1991). Las aves reproductoras y de postura infectadas, generalmente no manifiestan signos clínicos de la enfermedad, pudiendo pasar como un problema desapercibido, sin embargo, en algunos casos pueden producirse anorexia, diarrea y disminución en la producción de huevos (Shivaprasad *et al.*, 1990).

La salmonelosis en los bovinos, ataca tanto a individuos jóvenes como adultos. La enfermedad puede limitarse al tracto entérico o ser de carácter septicémico, siendo el aborto una consecuencia de esta última forma de presentación (Blood *et al.*, 1999). En el cerdo, la salmonelosis se puede presentar como una septicemia aguda y fulminante, o como una enfermedad intestinal debilitante de curso crónico (Hagan y Bruner, 1992). En cerdos de engorda, se presenta el síndrome de estenosis rectal como secuela de la enterocolitis causada por *Salmonella typhimurium*, (Blood *et al.*, 1999). En equinos, casi todos los casos de Salmonelosis suelen presentarse posterior a una situación de estrés y muchas de las infecciones son adquiridas dentro de hospitales veterinarios (Biberstein y Chung Zee, 1990). En aquellos casos donde se encuentra involucrada *Salmonella abortusequi*, se produce un aborto (Hagan y Bruner, 1992).

En animales cuya resistencia está disminuía, la infección por *Salmonella* se disemina más allá de los ganglios linfáticos mesentéricos, estableciéndose en las células reticuloendoteliales del hígado, desde donde invade el torrente sanguíneo. Muchos animales sobreviven a la etapa aguda de la enfermedad, transformándose en portadores crónicos, eliminando la bacteria en forma intermitente a partir de la vesícula biliar, focos de infección en la pared intestinal y, ocasionalmente, a través de la leche (Blood *et al.*, 1999).

Hoy en día, los animales de compañía cumplen un importante rol dentro de la transmisión de *Salmonella*. Los perros y gatos, no desarrollan generalmente signos clínicos de la enfermedad, sin embargo es común la existencia de portadores que, eventualmente, pueden transmitir la bacteria al hombre (Sanchez *et al.*, 2002). Muchos reptiles en cautiverio, portan la bacteria como parte de su flora normal intestinal (Warwick *et al.*, 2001). Es así, como durante la década del 90, el CDC (Center for Disease Control and Prevention) en los Estados Unidos, reportó numerosos casos de salmonelosis en niños que tuvieron contacto con iguanas y serpientes en cautiverio (Sanchez *et al.*, 2002).

D) SALMONELLA EN EL HOMBRE

En el hombre, las infecciones por *Salmonella* pueden manifestarse en cuatro formas: enteritis, fiebre entérica, colonización asintomática y septicemia (Murray, 1999).

Dentro de éstas, la enteritis es la forma más común de presentación y es causada por numerosos serotipos de *Salmonella*, entre ellos, *S. enteritidis*.

S. typhi produce la enfermedad febril conocida como fiebre tifoidea. *S. paratyphi* A, *S. schottmuelleri* y *S. hirschfeldii*, producen una forma leve de la enfermedad denominada fiebre paratífica. El cuadro se caracteriza porque el paciente desarrolla una fiebre remitente progresiva, para luego dar paso a síntomas gastrointestinales. Las Salmonelas causantes de la fiebre tifoidea y paratífica pueden ser mantenidas por portadores humanos y la vesícula biliar representa el reservorio en la mayoría de los casos.

Todas las Salmonelas pueden causar septicemia, aunque las infecciones por *S. paratyphi*, *S. typhi* y *S. dublin* conducen con más frecuencia a esta fase, siendo más susceptibles los niños, ancianos y pacientes con Síndrome de Inmunodeficiencia Adquirida.

E) SALMONELLA ENTERITIDIS EN CHILE

Las infecciones por *Salmonella enteritidis* aparecen en el mundo en la década de los 80, extendiéndose en forma progresiva y pandémica (Fica *et al.*, 2001). En nuestro país, el aumento de casos clínicos en humanos, se ha acompañado de un cambio en el clásico patrón de presentación, que durante décadas tuvo a *Salmonella typhi* y en menor grado a *Salmonella paratyphi*, como principales etiologías. La extensa epidemia que afectó a Chile a partir del año 1977, alcanzando cifras superiores a 120 casos por 100.000 habitantes, se estabilizó a partir del año 1997 con menos de 10 casos cada 100.000 habitantes. Este cambio epidemiológico, caracterizado por la declinación de casos de fiebre tifoidea, se debería principalmente al mayor desarrollo económico y tecnológico presentado por nuestro país, reflejado en una serie de medidas tendientes a romper la cadena de transmisión, al contarse con un adecuado abastecimiento de agua potable, manejo de excretas y medidas básicas de higiene (Fica *et al.*, 2001). Sin embargo, a partir del año 1994 las infecciones por *Salmonella enteritidis* aparecieron en forma epidémica en el norte del país.

De 0,35 casos cada 100.000 habitantes observados entre los años 1990 y 1993, la situación cambió a una presentación de 3 casos cada 100.000 habitantes en el año 1994, y sobre 5 casos cada 100.000 habitantes en el año 1998. Actualmente, las infecciones por *Salmonella enteritidis* se consideran endémicas en nuestro país e involucran a alimentos dentro de su cadena de transmisión, específicamente relacionados a reservorios avícolas. Es por ello que la carne, huevo, y sus derivados constituyen los principales participantes, que por un mal manejo dentro de la cadena de producción y elaboración, favorecen la acción de toxinas termolábiles y la replicación bacteriana (Fica *et al.*, 2001).

Las enfermedades causadas por el consumo de alimentos contaminados, han surgido como una importante causa de morbimortalidad a nivel mundial. A partir del año 1994 el Servicio de Salud Metropolitano del Ambiente (SESMA), comienza una vigilancia epidemiológica; de los brotes de enfermedades transmitidas por alimentos (ETA). Tanto en las muestras de alimentos como de deposiciones, se investigó la presencia de bacterias, virus, hongos, parásitos, toxinas y metales. Como conclusión de este estudio, *Salmonella* del grupo no typhi (*S. enteritidis* y *S. typhimurium*) junto a *Staphylococcus aureus*, destacaron como los principales microorganismos asociados a brotes en la Región Metropolitana durante el año 2000 (Prado *et al.*, 2002).

Estudios microbiológicos realizados en la Región Metropolitana, durante los años 1998-1999, mostraron que la carne de ave aparece contaminada con una mayor frecuencia que los huevos, sin embargo, su cocción previa al consumo, la hace ser de un menor riesgo epidemiológico. Con respecto a los huevos, éstos aparecen con una menor frecuencia de contaminación, pero su alto consumo y muchas veces cocción inadecuada indican un gran riesgo para la población. Los resultados encontrados en las muestras de carne y menudencias de pollos fueron los siguientes: De 1524 muestras totales, el 9.44% resultó positiva a *Salmonella spp* y un 7.08 % positiva a S.E. Con respecto a los huevos, de un total de 1081 muestras, un 0.09% resultó positiva a S.E (Alexandre *et al.*, 2000).

En el año 1975 el Instituto de Salud Pública (ISP) inicia un registro y cepario de *Salmonellas*, a partir de aislamientos clínicos provenientes de todo el país. A través de técnicas de fagotipificación se pudo identificar que los fagotipos 8 y 28 correspondían a los presentes en el período preepidémico, sin embargo, este escenario cambió durante el período de epidemia, donde los fagotipos 1 y 4, reemplazaron a los anteriores.

El fagotipo 1 es característico del continente europeo y el 4 se distribuye mundialmente, lo que indicaría una introducción hacia planteles avícolas por parte de fuentes externas al país (Fica *et al.*, 2001). En el año 1998, frente a la aparición de sucesivos brotes de *Salmonella*, los avicultores productores de huevos, la Asociación de Médicos Veterinarios Especialistas en Avicultura (AMEVEA) y el Servicio Agrícola Ganadero (SAG) elaboraron el plan nacional de control de *Salmonella*, que involucraba una vigilancia tanto para planteles de ponedoras como de reproductoras y un conjunto de medidas básicas de control para planteles positivos y negativos a este patógeno. (González y Correa, 1998).

En la actualidad, la salmonelosis es considerada por el Servicio Agrícola y Ganadero (SAG) como una enfermedad básica a controlar por el programa de Planteles Avícolas Bajo Control Oficial (PABCO). Dentro del PABCO, que es de incorporación voluntaria, los productores adscritos se comprometen a implementar y mantener acciones sanitarias y de calidad agroalimentaria, basadas en las definiciones estipuladas por el SAG en sus respectivos manuales PABCO. Estas acciones están destinadas a obtener una excelente condición sanitaria de los animales y productos de buena calidad, aptos para el consumo humano, permitiendo la certificación oficial por parte del SAG para su posterior comercialización a nivel nacional e internacional. Cualquier plantel de postura o unidad de producción que solicite su ingreso a este sistema, deberá realizar un chequeo inicial, el que determinará la condición sanitaria en relación a *Salmonella enteritidis* en sus distintas unidades de producción. El plantel deberá ser negativo a *Salmonella* en este muestreo inicial, para así certificarse dentro del programa; de resultar positivo, se incorporarán al programa PABCO como planteles en saneamiento (SAG, 2000).

La emergencia de S.E podría explicarse por el gran desarrollo que ha tenido la industria avícola en nuestro país con una alta intensificación en la cadena de producción que lleva a que un gran número de aves compartan alimentos, hábitat y microorganismos comunes (Fica *et al.*, 2001). Es así, como una gran población susceptible a S.E se encuentra disponible en el sector avícola, pudiendo contagiarse a través del contacto directo, agua o alimentos contaminados y, también, por transmisión transovárica, pero en muy baja frecuencia (Barrow, 1993).

Las estrategias de prevención y control aparecen como únicas herramientas para el control de esta zoonosis debido a su compleja epidemiología que incluye la excreción fecal con la consecuente contaminación ambiental y la existencia de numerosos reservorios animales, tanto domésticos como silvestres. Distintas investigaciones, se han llevado a cabo en nuestro país, con el objetivo de develar la real magnitud de los reservorios, dentro de éstas se puede mencionar a Toro *et al.*, (1999) quienes realizaron estudios para determinar el estado sanitario de 100 palomas de vida libre, capturadas en la ciudad de Santiago, encontrando un 3% de aislamiento de *Salmonella spp* a partir de contenido intestinal. En el mismo ámbito, Borie *et al.*, (2002) analizaron roedores sinantrópicos de la Región Metropolitana como reservorios de *Salmonella spp*, encontrando un 5.44% de animales con cultivo positivo.

F) MEDIDAS DE CONTROL FRENTE A *SALMONELLA ENTERITIDIS* EN AVES

Dentro de las distintas medidas que se han realizado a nivel mundial, para lograr un control sobre S.E en aves, se pueden mencionar:

F.1) Exclusión competitiva

Es el proceso, mediante el cual, la flora bacteriana normal de un animal adulto se establece con rapidez en el neonato, logrando así, reducir el número de salmonelas y otros patógenos susceptibles de colonizar el intestino. Su uso data desde 1908, en donde cultivos de *Lactobacillus spp.* fueron usados como prevención en la diarrea “de los viajeros” (Sanchez *et al.*, 2002).

La microflora, se encuentra ausente en el intestino de los pollos recién nacidos. Sin embargo, dentro de las primeras horas de vida, esta microflora se establece comenzando a cumplir sus funciones, entre las que se cuentan la producción de ciertas vitaminas, participación en los procesos de digestión alimenticia y también el proveer de una barrera natural contra el posible daño que produzcan bacterias que ingresen al organismo (Jeffrey, 1999).

Entre los mecanismos que se han propuesto para explicar su modo de acción, se encuentran (Jeffrey, 1999):

- 1- Obstrucción física de los sitios de unión para *Salmonella*, por parte de la microflora normal.
- 2- Competencia por los nutrientes esenciales entre la microflora normal y *Salmonella*, limitando la capacidad de crecimiento de esta última.
- 3- Producción de ácidos grasos volátiles por parte de la microflora (especialmente en ciego), que limitan el crecimiento de *Salmonella*.

Aunque el mecanismo de acción no se ha dilucidado completamente, es sabido que los ácidos grasos volátiles, particularmente el ácido propiónico, pueden ser de importancia en disminuir los conteos de *Salmonella* a nivel intestinal (Nisbet *et al.*, 1996). La adición de lactosa en el agua o comida de los pollos recién nacidos, ofrece una ventaja ya que éstos observan sólo una actividad traza de la lactasa en su intestino, dando así paso para que la lactosa llegue hasta ciego y actúe sobre ella la microflora. Por ello es importante seleccionar bacterias fermentadoras de lactosa, para así obtener los ácidos grasos volátiles mencionados anteriormente (Hume *et al.*, 1992).

Con el propósito de utilizar un cultivo que contuviese un pequeño número de bacterias capaces de aumentar los ácidos grasos volátiles, y así excluir a *Salmonella* entérica serovar *enteritidis*, Van der Wielen *et al.* (2002) utilizaron un reactor que imitaba la ecofisiología cecal de los pollos broiler. El crecimiento de *Salmonella* fue inhibido completamente en un medio con pH 5.8 al adicionar una mezcla de *Lactobacillus crispatus* y *Clostridium lactatifermentans*, quienes fermentan la lactosa a lactato y el lactato hasta acetato y propionato respectivamente. Concentraciones de 20 –mM de propionato, fueron capaces de inhibir el crecimiento. El uso de *Lactobacillus crispatus*, como monocultivo, bajo las mismas condiciones de pH, no produjo una inhibición en el crecimiento de *Salmonella*. El mismo experimento realizado en un medio con pH 7.0 no logró limitar el crecimiento del serotipo *enteritidis*, debido a que el lactato no fue completamente degradado, y por ello se inhibió el crecimiento de *Clostridium lactatifermentans*, existiendo por ende, menores niveles de propionato y acetato.

Esto demuestra la importancia de la producción de acetato y propionato por parte de cultivos bacterianos, administrados con el fin de controlar esta zoonosis.

F.2) Vacunación:

Se han ensayado el uso tanto de vacunas vivas, como de bacterinas. La aplicación de vacunas vivas, otorga una protección más prolongada en el tiempo, esto asociado posiblemente, a la presencia de antígenos relevantes que estimularían el sistema inmune humoral y celular y de los cuales carecerían las bacterinas (Barrow *et al.*, 1990). Con respecto a esto, Barrow (1993) describe la importancia de la vía de administración de la vacuna, así la administración oral de una bacterina de *S. typhimurium* en pollos, se habría mostrado poco eficaz por no estimular adecuadamente la inmunidad de la mucosa intestinal.

Gast *et al.* (1993), prepararon una bacterina en base a *Salmonella enteritidis*. Las gallinas en estudio, fueron vacunadas dos veces subcutáneamente. Transcurridas 3 semanas desde la segunda inmunización, las aves fueron desafiadas con *Salmonella enteritidis*. El aislamiento de *Salmonella* desde órganos internos y contenido de huevos fue menor en el grupo que recibió vacuna vs. el grupo no vacunado, sin embargo el número de aves que siguió eliminando *Salmonella* a través de sus heces fue igual para ambos grupos. Esto indica sólo una protección parcial de la vacuna.

Existen planteles en los que suelen utilizarse sistemas mixtos en lo que respecta a medidas de control, es así como Methner *et al.* (2001) analizaron la ventaja, de utilizar en forma conjunta, los métodos de exclusión competitiva e inmunización en pollos. Se contabilizó el número de microorganismos a nivel de ciegos para evaluar los resultados. El uso en forma independiente de los métodos de exclusión competitiva y vacunación, mostró reducciones en la colonización cecal por *S. typhimurium*. Sin embargo, los mejores resultados se obtuvieron al combinar ambos métodos, previniéndose casi completamente la colonización intestinal de los pollos desafiados con una dosis de 10^9 UFC de *Salmonella typhimurium*.

La pelecha forzada es una importante herramienta económica para los productores de huevos, sin embargo, estudios han demostrado que en ponedoras bajo restricciones de alimento, las infecciones ocasionadas por *Salmonella enteritidis* son de un carácter más severo que en aquellas ponedoras alimentadas normalmente (Holt *et al.*, 1994).

En relación a este tema, Holt *et al.* (2003) realizaron estudios en ponedoras libres de patógenos específicos (SPF), con el fin de determinar si la vacunación por aerosol con MeganVac1tm, vacuna comercial atenuada contra *Salmonella typhimurium*, reduciría la transmisión de S.E desde ponedoras infectadas a las no infectadas durante el período de muda forzada. Los grupos de aves vacunadas, tuvieron menores niveles de eliminación intestinal de S.E, con respecto a los grupos no vacunados. Igualmente las aves que no fueron vacunadas tuvieron niveles significativamente más altos de aislamiento de la cepa desafío desde hígado, bazo, ovario y ciego. Este estudio indica que la inmunización de las ponedoras con una vacuna atenuada de *Salmonella typhimurium* podría reducir los problemas de *S. enteritidis* durante la muda forzada, al disminuir la transmisión de tipo horizontal y el aislamiento bacteriano a partir de órganos internos.

F.3) Probióticos y Prebióticos

Los probióticos consisten en preparaciones, que contienen microorganismos viables capaces de alterar la microflora intestinal, provocando efectos beneficiosos sobre la salud del huésped (Labmed, sf).

Dentro de este grupo se encuentra *Saccharomyces boulardii*. La administración de esta levadura, junto al alimento en pollos broiler, logró reducir significativamente la colonización de *Salmonella*, desde un 70% en los controles positivos, hasta un 20% y 5% en las aves tratadas con 1 y 100 gr. de *Saccharomyces boulardii* por kg de alimento respectivamente (Line *et al.*, 1998). Esta levadura presenta manosa en su pared celular. Muchos patógenos entéricos, entre ellos *Salmonella*, presentan fimbrias tipo 1 que se unen a la manosa; así, en vez de unirse a los receptores intestinales, se unen a este azúcar, disminuyendo la adherencia bacteriana. Sin embargo, no todas las cepas de *Salmonella spp.* presentan un sitio de unión específico para este azúcar, esperándose resultados variables frente a su utilización (Allen *et al.*, 1997).

Fernández *et al.*, (2002) realizaron un ensayo en pollos, considerando una dieta suplementada con oligosacárido manosa, o bien, con harina de semilla de palma como prebiótico. Los prebióticos se definen como ingredientes de los alimentos, que afectan beneficiosamente al huésped por una estimulación selectiva del crecimiento y/o actividad

de un limitado grupo de bacterias a nivel intestinal (Labmed, sf). Los resultados mostraron un 60% de disminución en la colonización cecal por S.E a partir de la cuarta semana de la administración de la dieta suplementada con el oligosacárido manosa. Con respecto al grupo que recibió el prebiótico, observaron a partir de la cuarta semana, una significativa reducción en los niveles de S.E. y un incremento en el crecimiento de anaerobios obligados, particularmente *Bifidobacterium spp.* y *Lactobacillus spp.* Estos microorganismos son considerados benéficos, ya que a través de su metabolismo producen ácido acético y láctico, que en altas concentraciones, disminuyen el pH. La mayoría de los agentes patógenos, como *Salmonella*, prefieren un ambiente neutro o ligeramente alcalino, para su multiplicación, explicándose el efecto antibacteriano que se les atribuye (Fernández *et al.*, 2002).

Dentro de los prebióticos, encontramos a las saponinas. Éstas corresponden a detergentes naturales encontrados en muchas plantas, incluyendo el árbol chileno *Quillaja saponaria*. Con el objetivo de evaluar su posible efecto inmunomodulador, Toro *et al.* (2001) realizaron un ensayo en pollos, con inmunidad materna frente a S.E, desafiándolos con *Salmonella typhimurium*. La adición de saponinas, extraídas de *Quillaja saponaria* (Q-Sap), en dosis de 100 y 300 ppm en sus dietas logró que el reaislamiento de *Salmonella typhimurium*, desde ciego y órganos, fuese de un 63.6% y de un 54.3% respectivamente, valores que difirieron estadísticamente del grupo control (90%).

F.4) Antibióticos

El uso de antibióticos como medida de control, despierta preocupación en el mundo entero, debido a la rápida aparición de cepas bacterianas multiresistentes. Los patógenos resistentes limitan las opciones terapéuticas, conduciendo a fracasos en los protocolos de tratamiento, aumentando la morbilidad y mortalidad de los pacientes (Akkina *et al.*, 1999).

Salmonella typhimurium DT104, es un ejemplo de esta situación. Este serotipo presenta resistencia para cinco antimicrobianos y es causa de serios problemas en humanos, animales de abasto, compañía y de vida silvestre (Sanchez *et al.*, 2002). Existen numerosos reportes de la transmisión de la cepa DT104 desde animales infectados al hombre (Sanchez *et al.*, 2002).

Debido a esta situación, se contemplan nuevas alternativas en el control de *Salmonella*, que disminuyan el uso de antimicrobianos. Es claro el rol que tienen las medidas de control frente a esta zoonosis. Así, la implementación de nuevas medidas que se sumen a las ya existentes, aparece como un interesante desafío. Dentro de la búsqueda de nuevos horizontes, el uso de bacteriófagos aparece actualmente como una alternativa alentadora para evitar la colonización del tracto digestivo por S.E.

G) BACTERIÓFAGOS

HISTORIA

El descubrimiento de los bacteriófagos, fue realizado en primera instancia en 1915, por Edward Twort. Más tarde, en el año 1917, se consideraría a Felix D' Herelle, microbiólogo canadiense del Instituto Pasteur de París, como el principal autor de este descubrimiento (Summers, 2001). D' Herelle, al analizar las muestras de los pacientes de las tropas francesas, que sufrían de disentería hemorrágica, reporta la existencia de un “microbio invisible”. La motivación de su estudio apuntaba hacia la sospecha de que estos microbios correspondían a virus filtrables, que actuaban como cofactores en la patogenicidad de la disentería. Sin embargo, durante su investigación, encontró que el título de estos fagos estaban bajos o ausentes al comienzo de la enfermedad, se incrementaban notablemente en la medida que ésta progresaba y eran aún más altos durante la recuperación del paciente, por lo que infirió que la causa de recuperación era atribuible al fago (Summers, 2001).

Los bacteriófagos pueden definirse como virus “parásitos” de la célula bacteriana que utilizan la maquinaria de ésta para su propia síntesis. El ciclo vital del bacteriófago lítico comienza con la adsorción de la partícula fágica a receptores específicos en la superficie de la bacteria, seguida por la inyección del ácido nucleico del bacteriófago en la célula. El ácido nucleico (ADN o ARN) del bacteriófago se apodera de la maquinaria bacteriana sintetizando sus componentes víricos que luego son ensamblados. Finalmente, la bacteria experimenta lisis y libera bacteriófagos maduros al medio adyacente (Dulbecco y Ginsberg, 1980).

A partir de los resultados obtenidos en las primeras experiencias, se comienzan a gestar numerosos ensayos, en miras de obtener mayor información sobre la ocurrencia de estos procesos.

En el ámbito de la medicina humana, los fagos se utilizaron en un comienzo como medida terapéutica. Pacientes afectados de disentería e infecciones a la piel producidas por estafilococos, entre otros, lograron notables mejorías frente a la aplicación de fagoterapias (Sulakvelidze *et al.*, 2001). Sin embargo, con el advenimiento de los antibióticos en 1940, el uso de los fagos como medida terapéutica y profiláctica, desapareció rápidamente. Es en la ex Unión Soviética donde el estudio de los fagos se mantuvo a pesar de lo anteriormente expuesto, contándose en la actualidad con numerosos trabajos en relación al tema (Bull *et al.*, 2002).

Entre las mejores propiedades de los fagos se destacan que son altamente específicos para una cepa bacteriana, no son tóxicos para los animales e incrementan su título una vez que infectan, multiplican y matan a la bacteria blanco (Summers, 2001).

Actualmente, los problemas generados por la resistencia bacteriana (Sanchez *et al.*, 2002) los hace resurgir como una alternativa terapéutica. Debe sumarse a esto, el mayor conocimiento adquirido en el funcionamiento y obtención de fagos. El desarrollo de fagos mutantes, capaces de permanecer en el sistema circulatorio por períodos prolongados, ha sido estudiado por Merrill *et al.* (1996) utilizando la técnica de pasajes seriados de fago en ratones. Esto, sumado al desarrollo de nuevas técnicas de purificación que controlan los niveles de toxinas presentes en los preparados de fagos, contribuye a mejorar la efectividad de éstos como agentes terapéuticos (Merrill *et al.*, 1996).

Si se compara el uso de los bacteriófagos respecto al de los antibióticos, se tendrán tanto ventajas como desventajas. Los bacteriófagos son muy específicos en cuanto a su blanco, evitándose problemas de disbiosis, ésto se diferencia del amplio campo de acción que ejercen los antibióticos, quienes afectan tanto la flora patógena como la normal, predisponiendo a futuras infecciones. Sin embargo, la alta especificidad de los fagos puede considerarse una desventaja, ya que la bacteria debe identificarse previo al inicio de la fagoterapia, mientras que los antibióticos tienen una mayor probabilidad de ser efectivos aún cuando no se haya determinado la etiología (Sulakvelidze *et al.*, 2001).

Con respecto a las ventajas del uso de fagos, se tiene que la selección de nuevos fagos, es un proceso relativamente rápido con respecto al desarrollo de nuevos antibióticos, que es un proceso que demanda varios años (Sulakvelidze *et al.*, 2001).

El renacimiento de los fagos, se acompañó de la realización de nuevos trabajos en el ámbito del tratamiento y prevención de infecciones bacterianas. La administración de fagos en terneros, corderos y cerdos infectados con una cepa enteropatógena de *Escherichia coli* protegió a los animales de una infección potencialmente letal y disminuyó el número de bacterias en el tracto alimentario (Smith y Hugginns, 1983).

Barrow *et al.* (1998) aislaron desde alcantarillados, bacteriófagos líticos contra *Escherichia coli* que fueron utilizados en terneros y pollos afectados septicémicamente por la cepa de *E. coli* H247. Este fago, denominado R, presenta especificidad para unirse al antígeno capsular K1 de la bacteria. Los resultados indicaron que en ausencia del bacteriófago, *E. coli* H247 produjo casi un 100% de mortalidad en los pollos, sin embargo, la administración simultánea vía intramuscular de una concentración de 10^6 unidades formadoras de colonia (UFC) de la cepa de *E. coli* y de 10^6 unidades formadoras de placas (UFP) del bacteriófago, no mostró niveles de mortalidad en el 100% de los animales. La administración de 10^6 UFC de *E. coli* y 10^4 UFP del fago, otorgó una protección significativa a las aves, indicando una multiplicación *in vivo* del fago. La administración de 10^6 UFC de la bacteria y 10^2 UFP del fago, produjo algún grado de protección, pero estadísticamente no significativo. Igualmente, en este ensayo, se estudió la aplicación del fago previo al desafío con *E. coli* (5, 2 y 1 día pre-desafío), viéndose que el grado de protección se mantenía hasta el día 2 pre- desafío.

El bacteriófago R, aislado por Barrow *et al.* (1998), también fue aplicado a terneros deprivados de calostro. El grupo control fue inoculado vía oral con 10^{10} UFC de *E. coli* H247, apareciendo rápidamente signos de letargia y coma. Tras la inoculación vía intramuscular, de 10^{10} UFP del bacteriófago R, administrados 8 horas posterior al desafío con *E. coli*, uno de los terneros manifestó la enfermedad, pero los otros tres se encontraban sanos en el momento de la eutanasia, realizada 3 días post infección. En el intestino del animal que manifestó la septicemia, se encontraron bacterias K1 mutantes, resistentes a la acción del fago.

También en el mundo de la piscicultura se ha considerado el uso de fagos. En Japón, los peces ayu (*Plecoglossus altivelis*) son considerados los más populares, tanto para cultivo, como para la pesca deportiva. *Pseudomona plecoglossicida* es el agente causal de la ascitis hemorrágica en estos peces, causando altos índices de mortalidad. Park *et al.* (2000), aislaron desde el agua de cultivo y riñones de peces enfermos, un bacteriófago específico contra *P. plecoglossicida*. Procedieron a infectar peces con “pellets” comerciales, impregnados de un cultivo vivo de la bacteria, para luego administrarles el bacteriófago en el alimento. Los peces que no recibieron fago alcanzaron una mortalidad de un 65%, en contraste al 22.5% del grupo al que se le administró el fago. En el grupo que recibió fago, no se logró detectar la bacteria en riñón después de 12 horas de transcurrido el desafío, esto puede explicar los menores índices de mortalidad observados. La propiedad de este fago de inhibir el crecimiento bacteriano en el agua (Park *et al.*, 2000), sugiere además la posibilidad de utilizarlo como medida profiláctica contra la transmisión de tipo horizontal.

El uso de fagos ya se ha puesto en marcha como medida de control para enfermedades que afectan a la industria avícola. Huff *et al.* (2003) llevaron a cabo dos estudios, para determinar la eficacia de administrar una mezcla de dos bacteriófagos, vía aerosol o inyección intramuscular, como tratamiento en pollos broiler afectados por una severa infección respiratoria causada por *E.coli*. El tratamiento con aerosol spray inmediatamente posterior al desafío con *E.coli*, otorgó una protección significativa a las aves, y disminuyó los niveles de mortalidad desde un 50% hasta un 20%. Sin embargo, no se observó una respuesta eficaz, cuando el aerosol fue administrado 24 o 48 hrs. posterior al desafío. Por el contrario, la aplicación de una única dosis de la mezcla de fagos vía intramuscular, resultó mucho más efectiva, reduciendo significativamente la mortalidad, tanto cuando se aplicó inmediatamente posterior al desafío con *E. coli*, como cuando se aplicó a las 24 y 48 hrs. posterior a éste. Estos resultados, coincidieron con un nivel de obtención de bacteriófagos desde sangre más alto, que en el grupo tratado por vía aerosol.

Dentro de la acción de fagos contra bacterias que presentan resistencia a antimicrobianos, se puede citar el caso de *Enterococcus* vancomicina resistente (VRE). Hoy en día, esta cepa se encuentra presente en muchos hospitales de los Estados Unidos, predisponiendo a

cuadros de septicemia y/o endocarditis. Biswas *et al.* (2002) exploraron el uso de la fagoterapia en ratones infectados con VRE. La inoculación vía intraperitoneal de 10^9 UFC de ésta, produjo una septicemia, con muerte del 100% de los ratones, dentro de las 48 Hrs. Una simple inoculación de 3×10^8 unidades formadoras de placas (UFP) del fago, administrada 45 minutos después del desafío con VRE, fue suficiente para evitar la septicemia letal en el total de los ratones tratados. Así mismo, mediante una única aplicación de fago a animales ya moribundos, se logró rescatar al 50% de los ratones con septicemia.

H) BACTERIÓFAGOS CONTRA SALMONELLA

La emergencia a nivel mundial de *Salmonella* multiresistente, ha desarrollado interés en el ámbito de la investigación, por el desarrollo de fagos tendientes al control de esta zoonosis. Se ha estudiado el uso de bacteriófagos como control de S.E, durante la producción y almacenamiento del queso Cheddar, fabricado tanto con leche cruda como pasteurizada (Modi *et al.*, 2001). Una dosis de 10^4 UFC/ml de una cepa de S.E luminiscente y el fago SJ2 en dosis de 10^8 UFP/ml fueron agregados simultáneamente a la leche. La utilización de leche con fago, tanto cruda como pasteurizada, redujo los conteos de S.E en 1 a 2 log durante la fabricación, en contraste con aquellos quesos en los que no se utilizó fago, donde S.E tuvo un incremento de 1 log. Con respecto al almacenamiento, transcurridos 99 días a 8°C , se observó la sobrevivencia de S.E en los quesos que carecían de fago, alcanzando una concentración de 10^3 UFC/g. En el queso elaborado con leche pasteurizada en presencia del fago, la bacteria no sobrevivió después de 89 días, sin embargo, en el queso elaborado con leche cruda adicionada del fago, los conteos de *Salmonella* alcanzaron 50 UFC/g. Este estudio demuestra que la aplicación de fagos durante la elaboración de queso Cheddar, ya sea con leche cruda o pasteurizada, reduce la habilidad de este enteropatógeno para sobrevivir en el queso (Modi *et al.*, 2001).

En estudios realizados en cortes de fruta fresca se observó que S.E permanecía en cortes de melones y manzanas almacenados a 5°C y que incrementaba su número en temperaturas de 10 y 20°C .

Se examinó el uso de un bacteriófago lítico como medida de control, observando que la población bacteriana disminuía en 3.5 logaritmos en melones almacenados a 5 y 10° C. No se observaron efectos líticos del fago sobre *Salmonella* en los cortes de manzana, fenómeno atribuido al bajo pH de éstas (Leverentz *et al.*, 2001).

Alavidze *et al.* (2000) realizaron un estudio con el objetivo de aislar y caracterizar fagos que pudiesen ser útiles en el manejo de las infecciones producidas por *Salmonella*. Siete clones de bacteriófagos líticos contra *Salmonella* fueron aislados desde el medio ambiente. Para evaluar su potencial lítico *in vitro*, dispusieron de 245 cepas de *Salmonella*, incluyendo *S. hadar* (84 cepas), *S. typhimurium* (42 cepas), *S. enteritidis* (24 cepas), *S. heidelberg* (21 cepas), *S. newport* (18 cepas), 44 cepas de 17 serotipos distintos y 12 no tipificadas. Los resultados obtenidos mostraron que el fago más activo produjo la lisis de 220 cepas (90%), incluyendo todas las cepas de *Salmonella* DT-104 analizadas. Al utilizar una mezcla de tres fagos, el porcentaje de lisis se incrementó hasta un 95%. El uso de esta mezcla también se evaluó sobre superficies experimentalmente contaminadas con este patógeno. Su aplicación en una concentración de 1×10^5 UFP en forma de aerosol sobre la superficie contaminada, redujo los niveles de *Salmonella* desde 1×10^7 UFC hasta niveles indetectables en menos de 48 hrs.

En la Universidad de Arkansas, USA, se está trabajando en el desarrollo de sistemas alternativos a los antibióticos para el control de patógenos en producción aviar. Dentro de sus proyectos se contempla la evaluación de la eficacia del uso de bacteriófagos contra *Salmonella*. Para esto, cuentan con 120 bacteriófagos con potencial lítico para más de 20 *Salmonellas* distintas, representantes de 12 serovares comunes en USA. Evaluaciones parciales “*in vitro*” indicaron que una mezcla de estos fagos, fue capaz de inducir lisis “*in vitro*” en más del 90% de las cepas de *Salmonella* aisladas. La evaluación también se extendió a la aplicación de bacteriófagos en forma de aerosol, sobre carcasas contaminadas experimentalmente con este enteropatógeno; en esta experiencia se redujo la contaminación en alrededor de un 90%. Estos resultados fueron comparados con carcasas contaminadas naturalmente, provenientes de plantas faenadoras, donde la aplicación de la mezcla de fagos disminuyó la contaminación en un 60-80% (USDA, 2002).

La utilización de un bacteriófago capaz de lisar una cepa de *Salmonella enteritidis* resistente a ácido nalidíxico (S.E Nal^r) fue evaluada en pollos broiler, por Sklar y Joerger (2001). Se analizaron distintos vehículos para la administración del fago, como alimento, agar, o bien, agua de bebida. Durante el curso de la experiencia, se obtuvieron tórculas cloacales, para analizar de una manera cualitativa la eliminación de S.E Nal^r y la presencia del fago. El análisis de los resultados evidenció, que la fracción de aves que daba tórculas positivas a S.E Nal^r, era menor en los grupos que recibían tratamiento con fago, sobretodo en el grupo que recibió el fago mezclado con alimento. Un análisis de tipo cuantitativo se efectuó en las muestras cecales. Se obtuvieron conteos de S.E Nal^r, aún en los grupos sometidos a la acción del fago. Sin embargo, éste fue entre 0.3 y 1.3 órdenes menores de magnitud, en comparación al grupo no tratado. La diferencia en los conteos se consideró estadísticamente no significativa en tres de los grupos experimentales, pero significativa en dos ensayos, en los que se utilizó el alimento como vehículo para el fago, demostrando que los fagos pueden ser utilizados en el control de la colonización de *Salmonella* en pollos.

En nuestro país, Santander y Robeson., (2002) tomaron muestras de heces procedentes de la industria avícola, logrando aislar tres bacteriófagos líticos contra *Salmonella enteritidis* y *Salmonella pullorum*. Estos, según sus características morfológicas, pertenecerían a la familia *Siphoviridae*, de fagos con cabeza icosaédrica y cola no contráctil, además como material genético presentan ADN bicatenario. Experimentalmente, estos fagos presentan estabilidad a -20°C, pero ésta comienza a decaer por sobre los 45°C. Toleran más de un año bajo condiciones de almacenamiento y un amplio rango de pH y solventes como cloroformo y etanol, lo que indicaría que no presentan lípidos dentro de sus estructuras. Tras análisis de microscopía electrónica, el fago denominado *f3αSE*, presentó el mayor diámetro de halo de lisis viral sobre *Salmonella enteritidis*. Los ensayos “*in vitro*” realizados sobre *Salmonella enteritidis* y *Salmonella pullorum* mostraron a los fagos *f3αSE* y *f3αSP*, como los más virulentos en su hospedador correspondiente, disminuyendo la población bacteriana de 10⁸ UFC/ml a 10³ UFC/ml en 100 minutos.

Debido a la actividad lítica “*in vitro*” del fago *f3αSE* sobre S.E, surge el interés para su utilización, como biocontrolador de la infección por *Salmonella enteritidis* en pollos.

Dado que varios antecedentes experimentales, muestran el uso de fagos líticos contra *Salmonella spp* con resultados exitosos, la hipótesis que se plantea es que la administración por vía oral del bacteriófago F3 α SE, disminuye la colonización intestinal de S.E en un modelo aviar.

3) OBJETIVOS

A) OBJETIVO GENERAL

Contribuir al biocontrol de *Salmonella enteritidis* (S.E) en pollos mediante el uso de un bacteriófago de origen aviar.

B) OBJETIVO ESPECÍFICO

Evaluar el efecto del bacteriófago f3 α SE sobre la colonización de *Salmonella enteritidis* en un modelo de aviar.

4) MATERIAL Y MÉTODO

A) MATERIAL

A.1) ANIMALES DE EXPERIMENTACIÓN

Los pollos broiler utilizados durante este ensayo provinieron de un criadero comercial, sin evidencias de salmonelosis y con vacunación de las madres contra S.E. Para corroborar la ausencia inicial de *Salmonella* en las aves, se realizó un coprocultivo cuya metodología estandarizada se detalla en el punto **B.1**. Todas las aves tuvieron un coprocultivo negativo a *Salmonella*. Las aves fueron criadas en jaulas, desde el primer día de edad, en las sala de animales de experimentación del Departamento de Medicina Preventiva Animal y en la unidad de experimentación de Patología Aviar, bajo condiciones de temperatura y luminosidad apropiadas para la especie. La dieta fue en base a alimento comercial sin antibióticos y agua, ambos administrados *ad libitum*.

A.2) CEPA DE DESAFÍO DE S.E

Se utilizó la cepa de *Salmonella enteritidis*, de origen aviar, marcada genéticamente para resistencia a ácido nalidíxico y rifampicina. Ésta fue obtenida y donada gentilmente por el Doctor James Robeson del Instituto de Biología de la Universidad Católica de Valparaíso.

A.3) BACTERIÓFAGO LÍTICO CONTRA S.E

Fue utilizado el bacteriófago F3 α SE, cuyo aislamiento y características morfológicas, se describen por Santander y Robeson (2002). La preparación y titulación del inóculo del fago, se realizó en el Instituto de Biología de la Universidad Católica de Valparaíso.

B) MÉTODO

Debido al trabajo con un enteropatógeno zoonótico, marcado con genes de resistencia, se consideraron todas las medidas de bioseguridad pertinentes. Las aves mantenidas en la sala de animales de experimentación del Departamento de Medicina Preventiva Animal y en la

Unidad de Experimentación de Patología Aviar, fueron atendidas por personas distintas y con entrada exclusiva a las unidades respectivas, para así evitar una contaminación de tipo cruzada. Todo el manejo de las aves fue realizado con ropa protectora (botas, delantal, mascarilla, gorra y guantes). Los residuos orgánicos (camas de las aves y material de desecho contaminado) fueron incinerados y el agua de bebida fue clorada previa a su eliminación. Se utilizó glutaraldehído al 2% (Spartan) como desinfectante y glutaraldehído adicionado de buffer ASAP-65 (Spartan) como esterilizante para su uso en paredes, mesones, techos, jaulas, etc.

B.1) AISLAMIENTO E IDENTIFICACIÓN DE *SALMONELLA*

El aislamiento e identificación de *Salmonella*, se realizó para el coprocultivo, ya mencionado y para el reaislamiento de la cepa desafío, tanto de los grupos tratados con fagos como de los controles.

Para este procedimiento, se siguieron las pautas australianas de diagnóstico de *Salmonella* para muestras clínicas (Murray y Barton, 1993), descritas a continuación:

- a) etapa de enriquecimiento, en razón de 1 gramo de muestra/100 ml. de caldo Rappaport Vasiliadis (RV) (Difco).
- b) Trituración y homogenización de la muestra durante 1 minuto (“Masticator”, Arquimed).
- c) Cultivo de la muestra en la estufa a 37°C por 24 horas.
- d) Desde el caldo RV cultivado, se toman 3 asas y se efectúa la siembra en placas con agar XLD (Difco).
- e) Las placas son llevadas a la estufa de cultivo a 37°C por 24 horas. Si transcurridas estas 24 horas, no se desarrollan colonias sospechosas de *Salmonella*, las muestras se subcultivan con caldo RV de 48 y 72 horas de incubación.
- f) Una vez obtenidas las colonias sospechosas de *Salmonella*, se realizan las pruebas bioquímicas tradicionales (Kliegler, fenilalanina, citrato, urea, etc). Estos resultados se corroboran con una prueba de aglutinación, utilizando el antisuero polivalente grupo D₁ (Difco).

En el caso particular del aislamiento de la cepa desafío *Salmonella enteritidis nal^r rif^r*, se utilizaron placas con agar XLD (Difco) adicionadas de ácido nalidíxico y rifampicina (20 mg/ml, Laboratorio Chile).

B.2) ANIMALIZACIÓN DE LA CEPA DESAFÍO DE S.E

La animalización de la cepa desafío de S.E, tuvo como objetivo exacerbar la virulencia de ésta. Se realizó por tres pasajes consecutivos, en cinco aves (de 10 días de edad) cada vez. Para ello, el primer grupo fue inoculado vía oral con 1 ml de caldo común ajustado al tubo n° 1 del Nefelómetro de Mc Farland para tener una concentración de 3×10^8 UFC/ ml de *Salmonella enteritidis nal^r rif^r*. Cinco días post desafío, se procedió a la eutanasia de las aves con éter etílico. Se obtuvieron muestras de corazón e hígado, siguiendo la metodología de aislamiento descrita en el punto **B.1**. Con la cepa aislada desde corazón e hígado (“pool” de órganos), se procedió a la inoculación del segundo grupo con 1ml. de caldo común ajustado por nefelometría para tener 10^8 UFC/ ml de la cepa de S.E *nal^r rif^r*. Se siguió el mismo procedimiento descrito anteriormente, tanto para la eutanasia como para el aislamiento de la cepa. El tercer grupo fue inoculado con la cepa de S.E *nal^r rif^r* proveniente del pasaje número 2 y el procedimiento a seguir fue realizado de igual forma que en los casos anteriores, hasta obtener la cepa de S.E del tercer pasaje.

B.3) DETERMINACIÓN DE LA DOSIS MÍNIMA INFECTANTE

Para determinar la dosis mínima infectante de la cepa desafío de S.E, se realizó una suspensión en caldo común de la cepa desafío animalizada (pasaje 3). Ésta se incubó a 37°C por 24 horas y se ajustó según nefelometría para tener una concentración de 3×10^8 UFC/ml (tubo n°1 de Mc Farland). A partir de esta concentración, se efectuaron diluciones seriadas 1:10 hasta llegar a una concentración de 3×10^1 UFC/ml. Se corroboraron las dosis de infección de las aves, mediante recuento de UFC en placas. Así, los tres grupos formados por 5 pollos de 10 días de edad, fueron inoculados vía oral con tres dosis diferentes: $2,4 \times 10^6$, $2,4 \times 10^7$ y $2,4 \times 10^8$ UFC/ml. Diez días post desafío se procedió a la eutanasia de las aves con éter etílico y se obtuvieron muestras correspondientes a corazón e hígado. La metodología utilizada para el procesamiento de las muestras y aislamiento son las descritas en el punto **B.1**.

Se consideró que la dosis mínima infectante, fuera aquella, donde se obtuviera un 100% de aislamiento de la cepa desafío, a partir del “pool” de órganos analizados

B.4) INOCULACIÓN DE LAS AVES CON BACTERIÓFAGO $f3\alpha$ SE Y CEPA DESAFÍO DE S.E

Una vez determinada la dosis mínima infectante, se procedió al biocontrol con el bacteriófago $f3\alpha$ SE. Para esto, se formaron cinco grupos de 15 pollitas de 1 día de edad que se detallan en la Tabla N°1.

Tabla N°1: Dosis de *Salmonella enteritidis* (S.E) $nal^r rif^r$ y bacteriófago $f3\alpha$ SE según grupos

Grupos de aves	Dosis $f3\alpha$SE	Dosis S.E $nal^r rif^r$
Bacteria/fago 1:1	10^9 UFP ^a /ml	4×10^9 UFC ^b /ml
Bacteria/fago 1:10	10^{10} UFP/ml	4×10^9 UFC /ml
Control infección <i>Salmonella</i>	_____ ^c	4×10^9 UFC /ml
Control inocuidad Fago	10^{10} UFP/ml	_____ ^c
Control contaminación cruzada fago	_____ ^c	_____ ^c

^aUFP= Unidad formadora de placa

^bUFC=Unidad formadora de colonia

^c_____ = No recibe dosis

En consideración a estudios internacionales (Biswas *et al.*, 2002), se decidió analizar una dosis de bacteria/fago en razón de 1:1 y 1:10 (1 bacteria cada 1 fago y 1 bacteria cada 10 fagos, respectivamente).

A los 10 días de edad, las aves de los grupos experimentales bacteria/fago 1:1, bacteria/fago1:10 y control inocuidad fago, recibieron 1 ml. vía oral del bacteriófago ϕ 3 α SE, suspendido en solución fisiológica, en concentración de 10^9 UFP/ml, 10^{10} UFP/ml y 10^{10} UFP/ml, respectivamente. Transcurrida 1 hora de la inoculación con el bacteriófago, se procedió a desafiar a las aves de los grupos bacteria/fago 1:1, bacteria/fago 1:10 y control de infección *Salmonella*, con la dosis mínima infectante de la cepa desafío, calculada anteriormente.

El grupo control inocuidad fago, recibió la dosis más alta (10^{10} UFP/ml) del bacteriófago ϕ 3 α SE. Se evaluaron al momento de la necropsia, posibles cambios macroscópicos en los distintos órganos de cada una de las aves que conforman este grupo.

El grupo denominado control contaminación cruzada fago, no recibió fago ni cepa desafío ya que su objetivo fue identificar una posible transmisión o escape del fago entre las distintas unidades experimentales.

Los grupos inoculados con fago/bacteria y control inocuidad fago se mantuvieron en la sala de animales de experimentación del Departamento de Medicina Preventiva Animal separados en cubículos individuales. El grupo control de infección *Salmonella*, fue destinado a la Unidad de aves experimentales del Departamento de Patología Aviar y el grupo control sin bacteriófago ni *Salmonella* (control contaminación cruzada fago), fue mantenido en la sala de animales controles de la misma Unidad.

Diez días después de las inoculaciones fago/bacteria, todas las aves fueron sometidas a eutanasia, mediante el uso de éter etílico, recolectándose muestras individuales de intestinos y “pool” de órganos. Las muestras fueron depositadas en bolsas de polietileno y enriquecidas selectivamente mediante la aplicación de caldo Rappaport Vasiliadis (Merck) en una relación 1:100 aproximadamente. Una pequeña porción de las muestras obtenidas fueron enviadas bajo condiciones de refrigeración hasta el Instituto de Biología de la Universidad Católica de Valparaíso, en donde se procedió al reaislamiento viral, como aporte a una tesis de pregrado.

B.5) ANÁLISIS DE LOS RESULTADOS

Los resultados obtenidos de los distintos grupos, se compararon basados en la distribución del estadígrafo χ^2 (Astudillo *et al.*, 1968).

5) RESULTADOS

A) Dosis mínima infectante de la cepa desafío de S.E: La dosis mínima infectante correspondió a 4×10^9 UFC/ml.

B) Grupo contaminación cruzada fago: Los resultados entregados por la Universidad Católica de Valparaíso, indicaron que este grupo no presentó fagos en las muestras de intestinos e hígados analizadas (Krüeger *et al.*, 2003), corroborando que no existió un escape de partículas virales entre unidades.

C) Grupo control inocuidad fago: Este grupo constituyó el control de inocuidad del fago administrado en su dosis más alta (10^{10} UFP/ml). No se presentaron lesiones ni cambios morfológicos macroscópicos visibles a la necropsia, especialmente a nivel hepático e intestinal. Durante el desarrollo de la experiencia se constató un estado de salud normal, comparable al del grupo contaminación cruzada fago.

D) Grupo control de infección Salmonella: Se logró el reislamiento de la cepa de S.E *nal^r* y *rif^r* desde 13 pollos a nivel intestinal y de 10 pollos a nivel sistémico (muestras de corazón e hígado), obteniendo un total de infección de 86.6% (Tabla N°2 y Figura N°1)

E) Grupo bacteria/fago 1:1: Se logró reislar la cepa de S.E *nal^r* y *rif^r* desde 8 pollos a nivel intestinal y de 3 pollos a nivel sistémico. El total de aislamientos correspondió a un 53.3% (Tabla N°2 y Figura N°1).

F) Grupo bacteria/fago 1:10: La cepa desafío se reaisló desde el intestino de 4 aves y de los órganos internos (corazón e hígado) de 5 aves, con un total de 46.6% de aislamientos

Ave	Grupo Bacteria/fago 1:1	Grupo Bacteria/fago 1:10	Grupo control Infección <i>Salmonella</i> ^a	Grupo control Inocuidad fago ^b
-----	-------------------------	--------------------------	--	---

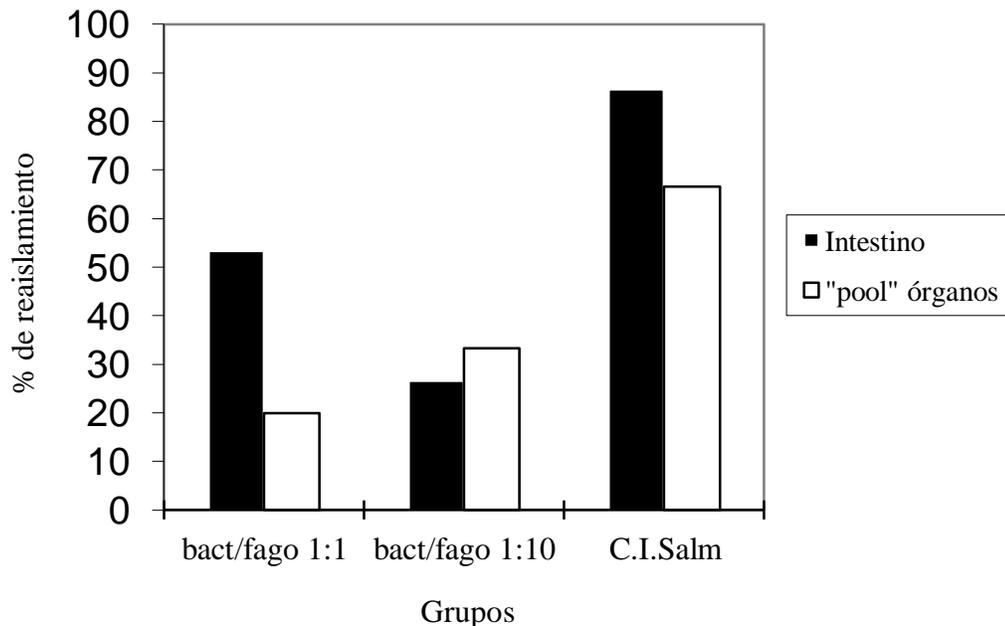
(Tabla N°2 y Figura N°1).

N°	Intestino Sistémico ^c		Intestino Sistémico		Intestino Sistémico		Intestino Sistémico	
1			+	+				
2	+	+	+	+	+			
3					+	+		
4					+	+		
5	+	+			+	+		
6				+	+	+		
7	+				+			
8			+		+	+		
9				+				
10	+				+			
11			+		+	+		
12	+				+	+		
13	+				+	+		
14	+				+	+		
15	+	+		+	+	+		
Sub								
Tot	8/15	3/15	4/15	5/15	13/15	10/15	0/15	0/15
(%)	(53.3%)	(20%)	(26.6%)	(33.3%)	(86.6%)	(66.6%) ⁹	(0%)	(0%)
Tot	8/15		7/15		13/15		0/15	
(%)	(53.3%)		(46.6%)		(86.6%)		(0%)	

TABLA N°2: Reaislamiento de *Salmonella enteritidis nal^r rif^r* a nivel intestinal y sistémico en pollos broilers inoculados con bacteriófago *f3αSE* y cepa desafío de S.E

- Casillero en blanco: indica no detección de la cepa desafío ^a: Sólo recibe cepa de S.E
- +: indica aislamiento de la cepa desafío ^b: Sólo recibe fago *f3αSE*
- ^c: corazón e hígado

Figura n°1: Reaislamiento de *Salmonella enteritidis nal^r rif^r* a partir de intestinos y “pool” de órganos (corazón e hígado) en pollos.



G) Análisis estadístico de los resultados a nivel intestinal:

Al analizar los cuatro grupos a nivel intestinal, mediante la prueba de X^2 , se encontraron diferencias significativas en los niveles de reislamiento de la cepa desafío *S.E. nal^r* y *rif^r* $X^2 = 25.39$ ($p < 0,05$). Para determinar dónde se originaron estas diferencias, se efectuó una comparación entre los distintos grupos. Así, la única comparación que dio una diferencia significativa, fue entre los grupos bacteria/fago 1:10 y control de infección *Salmonella*, $X^2=10.98$ ($p < 0,05$).

H) Análisis estadístico de los resultados a nivel sistémico:

El análisis a nivel sistémico de los cuatro grupos, también entregó diferencias significativas en los niveles de reislamiento de la cepa desafío *S.E. nal^r* y *rif^r* $X^2 = 16.8$ ($p < 0,05$). Dentro de estos, se encontró exclusivamente una diferencia significativa entre los grupos bacteria/fago 1:1 y control de infección *Salmonella* $X^2=6.64$ ($p < 0,05$).

I) Análisis estadístico de los resultados Intestinal/Sistémico intragrupo:

Con el fin de identificar diferencias significativas entre los aislamientos de la cepa desafío a nivel sistémico e intestinal, se efectuaron comparaciones dentro de un mismo grupo, mediante la prueba de Mc Nemar. El grupo bacteria/fago 1:1 tuvo diferencias significativas a favor del número de aislamientos a nivel intestinal $X^2=5$ ($p<0,05$), mientras que el grupo bacteria/fago 1:10 no tuvo diferencias al comparar los reaislamientos de la cepa desafío, obtenidos desde intestino y “pool” de órganos $X^2=0.2$ ($p >0.05$).

6) DISCUSIÓN

Se consideró que la dosis mínima infectante para este estudio, sería aquella donde se obtuviera un 100% de aislamiento de la cepa desafío a partir del “pool” de órganos analizados. Sin embargo, esto no ocurrió al administrar la dosis más alta de desafío analizada ($2,4 \times 10^8$ UFC/ml), donde se logró un 50 % de reaislamiento. Hay que considerar que la virulencia de la cepa había sido exacerbada mediante tres pasajes consecutivos en aves, etapas que habían sido suficientes en estudios previos (Toro *et al.*, 2001).

Así, durante el ensayo se consideró utilizar una dosis mayor correspondiente a 4×10^9 UFC/ml. Después de 10 días de experimentación, se logró un 66.6% de aislamiento de la cepa desafío a partir del “pool” de órganos. Estos resultados pueden compararse a los obtenidos en otros estudios. Así, Toro *et al.* (2001), obtuvieron un 63.3% de aislamiento a partir de órganos internos, después de haber desafiado a pollos con una dosis de $1,5 \times 10^8$ UFC/ml de *Salmonella enteritidis*.

Ya que nuestros pollos provenían desde un criadero comercial donde vacunaban a las reproductoras contra *Salmonella*, puede existir la posibilidad de que estos hayan contado con anticuerpos maternos, obteniéndose un menor número de aislamientos que lo esperado. Es posible que para aumentar la virulencia de la cepa, hayan faltado un mayor número de pasajes durante la animalización, disminuyéndose así la dosis de desafío.

La inocuidad de los fagos ha sido documentada a través de varios ensayos realizados en humanos y animales (Sulakvelidze *et al.*, 2001). La inoculación en ratas y cobayos, de fagos contra *Klebsiella*, a través de las vías endovenosa, intraperitoneal e intranasal, demostró no producir cambios a nivel macroscópicos ni histológicos en los órganos (Bogovazova *et al.*, 1991).

En el grupo control inocuidad fago de este estudio, no se observaron daños, al menos a nivel macroscópico, durante la necropsia realizada 10 días post inoculación del fago. Además, las aves mostraron durante el transcurso de la experiencia, un comportamiento y estado de salud comparable al grupo control que no fue inoculado ni con el fago, ni con *Salmonella*.

Estos resultados apoyan la idea de la utilización de fagos como medida de control, al no producir efectos colaterales visibles. Si a esto se suman las nuevas técnicas de purificación, que controlan los niveles de toxinas presentes en los preparados de fagos, (Merril *et al.*, 1996) se tiene un balance muy positivo en lo que respecta a inocuidad. Sin duda, como un apoyo a estos resultados, habría sido interesante contar en este ensayo con resultados de tipo histológico. Después de 10 días de la inoculación de los fagos, éstos aparecieron en las muestras de los órganos analizadas, sin que estuviera *Salmonella* presente (Krüeger *et al.*, 2003). Resultados similares se han observado en otros estudios, Park *et al.* (2000), tras analizar las muestras de riñones d

24 horas post- inoculación. La permanencia de fagos viables en el organismo del animal, sería una ventaja en la utilización de estos, ya que estarían disponibles ante una eventual infección bacteriana.

La administración de una dosis de 10^9 UFP/ml de $f3\alpha$ SE (grupo bacteria/fago 1:1), no redujo en forma significativa la colonización a nivel intestinal, pero sí evitó el paso bacteriano hacia órganos internos. Poulson *et al.* (1995, citado por Sklar y Joerger, 2001), tras haber realizado un estudio en ratones inoculados con una cepa de *E.coli*, sostienen que las bacterias se comportan de distinta manera, según su ubicación en el intestino. Observaron que el tiempo de generación de *E.coli*, en el estrato mucoso intestinal, era entre 40 y 80 minutos, mientras que en el lumen intestinal, se encontraba prácticamente estática. Si se aplica este comportamiento a la cepa de *Salmonella* utilizada en este estudio, se podría explicar en parte, la poca efectividad del fago en evitar la colonización intestinal. Debido a que la mucosa intestinal se presenta como un medio viscoso que actúa como una barrera para el encuentro entre bacterias y fagos (Sklar y Joerger, 2001); es posible que el bacteriófago $f3\alpha$ SE, hubiese tenido dificultad para acceder al estrato mucoso y actuar sobre su blanco. Como ya se había mencionado, la generación bacteriana a nivel de la mucosa intestinal es más rápida. Existe evidencia de fagos, que restringen su actividad lítica en presencia de un bajo número de bacterias y por el contrario, fomentan su potencial lítico al aumentar la densidad de éstas (Sklar y Joerger, 2001). Esto podría explicar que no se redujeran en forma significativa los aislamientos de *Salmonella* a partir de las muestras intestinales.

Por el contrario, la administración de 10^{10} UFP/ml del bacteriófago $f3\alpha SE$ (grupo bacteria/fago 1:10), se mostró efectiva en disminuir los aislamientos a nivel intestinal. Si se considera que el desafío bacteriano fue realizado con 10^9 UFC/ml, se tiene que la inoculación de un mayor número de fagos, en relación a las bacterias, conduce a una mayor circulación de ellos a nivel intestinal, pudiéndose compensar en parte las barreras físicas. Esto se refleja en un menor número de aislamientos atribuidos a una adecuada actividad lítica de los bacteriófagos sobre las bacterias. Si se disminuye la colonización intestinal de *Salmonella*, también se está reduciendo el número de bacterias eliminadas al ambiente, a través de las heces de los pollos, contribuyendo a controlar la transmisión horizontal de la infección (Barrow, 1993).

Con respecto al paso de la bacteria hacia órganos internos, la inoculación de los pollos con una dosis de 10^9 UFP/ml del bacteriófago $f3\alpha SE$ (grupo bacteria/fago 1:1), 1 hora previo a la inoculación con la cepa desafío, logró disminuir significativamente el número de aislamientos de la bacteria desde hígado y corazón. En este grupo se observó que en los pollos la bacteria se quedó en intestino y no pasó hacia órganos internos (Tabla N°2). El paso de *Salmonella* hacia órganos internos, puede significar que la bacteria llegue hasta los órganos reproductivos de la gallina, con una eventual contaminación de los huevos (Gast *et al.*, 2003), de aquí la importancia de los resultados obtenidos.

Sin embargo, la inoculación de los pollos con una dosis de 10^{10} UFP/ml del fago, no logró disminuir los niveles de aislamiento de *Salmonella* desde el “pool” de órganos. Al contrario de lo que podría pensarse, para detener el paso de la bacteria hacia órganos internos, la inoculación de los animales en razón de 1:1 (1 bacteria cada 1 fago) funcionaría mejor que la razón 1:10 (1 bacteria cada 10 fagos). Según estudios internacionales, que han utilizado la fagoterapia como tratamiento para enfermedades sistémicas, la mortalidad y signos clínicos de los animales disminuyen a medida que se administran dosis crecientes de los bacteriófagos (Park *et al.*, 2000, Barrow *et al.*, 1998, Merrill *et al.*, 1996). Así mismo, la administración de una dosis 1:1, se muestra eficaz en el rescate de animales afectados por la fase sistémica de la enfermedad (Park *et al.*, 2000, Barrow *et al.*, 1998).

A pesar de lo anterior, en el caso de *Salmonella*, faltarían otros ensayos para dilucidar cual es la dosis de fago que actuaría mejor en disminuir la colonización intestinal y sistémica. Sería importante considerar el comportamiento intracelular facultativo de este patógeno, que puede alterar en cierta medida, las interacciones bacteria-fago.

Después de realizar estudios bacteriológicos y moleculares de las muestras de intestinos e hígados en los laboratorios de la Universidad Católica de Valparaíso, se determinó que el bacteriófago *f3 α SE* es capaz de persistir en los órganos de los pollos, inoculados con éste, al cabo de los 10 días de tratamiento. El fago obtenido a partir de los pollos infectados (fago ciclado), conservó la morfología de placa del fago original (“wild type”). Sin embargo, se encontró un nuevo fago asociado a los pollos que se denominó introfago. Los análisis de ADN indican que el introfago posee un genoma diferente al del fago *f3 α SE* “wild type”. Tanto el fago original como el ciclado y el introfago presentaron actividad lítica “*in vitro*” eficiente frente a *Salmonella enteritidis nal^r* y *rif^r* (Krüger *et al.*, 2003).

Los resultados obtenidos en este ensayo, muestran a los bacteriófagos con un futuro promisorio en el ámbito del control de *Salmonella*. A pesar que la eliminación de este patógeno sea difícil por la compleja epidemiología que exhibe, las medidas de control son una excelente alternativa a considerar. Dentro del sector avícola, se han mencionado a la exclusión competitiva, vacunación, probióticos y prebióticos; como medidas exitosas en enfrentar este patógeno. Si a éstas se suma el uso de fagos, se podría obtener un control cada vez más eficaz.

Ante la masiva aparición de resistencia bacteriana a los antibióticos, los fagos se muestran como una excelente alternativa. Son de amplia distribución en el medio ambiente y fáciles de reproducir teniendo a su bacteria blanco, así mismo, esta amplificación es de un bajo costo. Realizando los estudios pertinentes de inocuidad, eficacia y estabilidad ambiental podría masificarse su uso y facilitar su administración a través de vehículos como agua, comida o aerosol.

En nuestro país queda abierto un amplio campo para la investigación de los bacteriófagos y no sólo en el ámbito de *Salmonella*, ya que existen muchas enfermedades bacterianas que complican a distintos rubros de la producción animal y es en la prevención y tratamiento de éstas donde el médico veterinario juega un rol preponderante.

7) CONCLUSIONES

A) La administración del bacteriófago $f3\alpha SE$ en una dosis de 10^{10} UFP/ml, disminuye el número de aislamientos de *Salmonella enteritidis nal^r rif^r* a nivel intestinal, pero no a nivel sistémico (corazón e hígado) en pollos desafiados con una dosis de 10^9 UFC/ml de la bacteria.

B) La administración del bacteriófago $f3\alpha SE$ en una dosis de 10^9 UFP/ml, disminuye el número de aislamientos de *Salmonella enteritidis nal^r rif^r* a nivel sistémico (corazón e hígado), pero no a nivel intestinal, en pollos desafiados con una dosis de 10^9 UFC/ml de la bacteria.

C) La inoculación oral de pollos de 10 días de edad con una dosis de 10^{10} UFP/ml del bacteriófago $f3\alpha SE$, no produce cambios al menos a nivel macroscópico, en los órganos internos de las aves mantenidas por 10 días bajo la acción del fago.

D) El uso del bacteriófago $f3\alpha SE$, se muestra como una medida que puede contribuir al biocontrol de la colonización intestinal y sistémica de *Salmonella enteritidis* en pollos.

8) BIBLIOGRAFÍA

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

- **ALAVIDZE, Z.; CHIGHLADZE, E.; TURABELIDZE, D.; TORPEY, D.; BROWN, T.; MORRIS, J.G.; SULAKVELIDZE, A.** 2000. Isolation and Characterization of lytic phages against *Salmonella* serotypes. [en línea] <<http://www.asmsa.org/memonly/abstracts/AbstractView.asp?AbstractID=30184>> [consulta : 15-03-2004]

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

- **ALLEN, V.; FERNÁNDEZ, F.; HINTON.** 1997. Evaluation of the influence of supplementing the diet with mannose or palm kernel meal on *Salmonella* colonisation in poultry. *Br. Poult. Sci.* 38: 485-488.

- **ASTUDILLO, V.; LOYOLA, R.; MORALES, M.; ORREGO, C.; TORO, M.** 1968. Elementos de bioestadística. Universidad de Chile, Facultad de Ciencias Veterinarias y Pecuarias. Santiago, Chile. 236 p.

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

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

- **BARROW, P.** 1993. *Salmonella* control past, present and future. *Avian Pathol.* 22:651-669.

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

- **BIBERSTEIN, E.; CHUNG ZEE, Y.** 1990. Tratado de microbiología Veterinaria. 1ª ed. Editorial Acribia. Zaragoza, España. 663p.

- **BISWAS, B.; ADHYA, S.; WASHART, P.; PAUL, B.; TROSTEL, A.; POWELL, B.; CARLTON, R.; MERRIL, C.** 2002. Bacteriophage therapy rescues mice bacteremic from a clinical isolate of vancomycin- resistant *Enterococcus faecium*. Infect. Immun. 70: 204-210.

- **BLOOD, D., HENDERSON, J., RADOSTITS, O.** 1999. Medicina Veterinaria. 6ª ed. Mc-Graw Hill-Interamericana. Madrid, España. v1.

- **BOGOVAZOVA, G.; VOROSHILOVA, N.; BONDARENKO, V.** 1991. The efficacy of *Klebsiella pneumoniae* bacteriophage in the therapy experimental *Klebsiella* infection.[en línea]<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=pubmed&dopt=Abstract&list_uids=1882608> [consulta : 17-03-2004]

- **BORIE, C.; SÁNCHEZ, M.** 1998. *Salmonella enteritidis*: un nuevo desafío. Tecnovet. 4(1): 5-8.

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

- **BULL, J., LEVIN, B., DEROUIN, T., WALKER, N., BLOCH, C.** 2002. Dynamics of success and failure in phage and antibiotic therapy in experimental infections. [en línea]. <<http://www.biomedcentral.com/1471-2180/2/35>> [consulta : 25-02-2004].

- **DULBECCO, R.; GINSBERG, H.** 1980. Virology. 3th ed. Harper & Row, Publishers. Maryland. USA. 1231 p.

- **FERNÁNDEZ, F.; HINTON, M.; VAN GILS, B.** 2002. Dietary mannan-oligosaccharides and their effect on chicken caecal microflora in relation to *Salmonella enteritidis* colonization. Avian Pathol. 31: 49-58.

- **FICA, A.; ALEXANDRE, M.; PRAT, S.; FERNÁNDEZ, A.; FERNÁNDEZ, J.; HEITMANN, I.** 2001. Cambios epidemiológicos de las salmonelosis en Chile. Desde *Salmonella typhi* a *Salmonella enteritidis*. Rev. Chil. Infect. 18 (2): 85-93.

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

- **GAST, R.; STONE, H.; HOLT, P.** 1993. Evaluation of the efficacy of oil emulsion bacterins for reducing fecalshedding of *Salmonella enteritidis* by laying hens. Avian Dis. 37:1085-1091.

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

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

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

- **HERSH, D.; MONACK, D.; SMITH, M.; GHORI, N.; FALKOW, S.; ZICHLINKY, A.** 1999. The *Salmonella* invasin SipB induces macrophage apoptosis by binding to caspase-1. Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 96:2396- 2401 (citado por ZHANG, S.; KINGSLEY, R.; SANTOS, R.; ANDREWS-POLYMENIS, H.; RAFFATELLU, M.; FIGUEIREDO, J.; NUNES, J.; TSOLIS, R.; ADAMS, L.; BÄUMLER, A. 2003. Molecular pathogenesis of *Salmonella* enterica serotype typhimurium-induced diarrhea. Infect. Immun. 71:1-12.

- **HOBBIE, S.; CHEN, L.; DAVIS, R.; GALÁN, J.** 1997. Involvement of mitogen-activatedprotein kinase pathways in the nuclear responses and cytokine production induced by *Salmonella typhimurium* in cultured intestinal *la enteritidis* infection. Poult. Sci. 73:1267-1275.

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

- **HUECK, C.** 1998. Type III protein secretion systems in bacterial pathogens of animals and plants. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* 62(2):379-443.

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

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

- **JEFFREY, J.** 1999. Use of competitive exclusion products for poultry. Cooperative extension university of California. [en línea]. <<http://animalscience.ucdavis.edu/avian/pfs30.htm>> [consulta : 15-03-2004]

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

- **KRÜGER, E.; SANTANDER, J.; ZURITA, P.; BORIE, C.; ROBESON, J.** 2003. Persistencia en pollos de f3aSE, un bacteriófago biocontrolador de *Salmonella enteritidis*. *Acta Microbiol.* 9:113.

- **LABMED.** s.f. probióticos, prebióticos y simbióticos aproximación a una definición. [en línea]. <<http://www.labnutrición>> [consulta : 5-03-2004]

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

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

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

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

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

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

- **MURRAY, P.; KOBAYASHI, G.; PFALLER, M.; ROSENTHAL, K.** 1999. *Microbiología Médica.* 2ª ed. Harcourt Brace. Madrid, España. 755 p.

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

- **PARK, CH.; SHIMANURA, I.; FUKUNAGA, M.; MORI, K.; NAKAI, T.** 2000. Isolation of bacteriophages specific to a fish pathogen, *Pseudomonas plecoglossicida*, as a candidate for disease control. *Appl. Environ. Microbiol.* 66:1416-1422.

- **PRADO, V.; SOLARI, V.; ALVAREZ, 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. *Rev. Méd. Chile.* 130(5):495-501.

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

- **SANTANDER, J.; ROBESON, J.** 2002. Aislamiento y caracterización de bacteriófagos activos contra *Salmonella enteritidis* y su ensayo en *Salmonella pullorum*. *Acta Microbiol.* 8: 17-22.

- **SAG. SERVICIO AGRICOLA Y GANADERO.** 2000. Planteles avícolas de postura bajo control oficial (PABCO) manual de procedimientos. [en línea]. <<http://www.sag.gob.cl/Framearea.asp?cod=12>> [consulta : 18-03-2004].

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

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

- **SKLAR, I.; JOERGER, R.** 2001. Attempts to utilize bacteriophage to combat *Salmonella enterica* serovar *enteritidis* infection in chickens. *J. food safety.* 21: 15-29.

- **SMITH, H.; HUGGINS, M.** 1983. Effectiveness of phages in treating experimental *Escherichia coli* diarrhoea in calves, piglets and lambs. *J. Gen. Microbiol.* 129(8):2659-2675.

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

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

- **TEREBIZNIK, M.; VIEIRA, J.; MARCUS, S.; SLADE, A.; YIP, C.; TRIMBLE, W.; MEYER, T.; FINLAY, B.; GRINSTEIN, S.** 2002. Elimination of host cell PtdIns(4,5)P₂ by bacterial SigD promotes membrane fission during invasion by *Salmonella*. *Nat. Cell Biol.* 4: 766–773.

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

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

- **USDA, UNITED STATES DEPARTMENT OF AGRICULTURE.** 2002. Development of non-antibiotic alternatives for food-borne pathogen control in turkeys.[en línea].<http://www.ars.usda.gov/research/projects/projects.htm?ACCN_NO=404957&fy=2002> [consulta : 15-03-2004]

- **VAN DER WIELEN, P.; LIPMAN, L.; VAN KNAPEN, F.; BIESTERVELD, S.** 2002. Competitive exclusion of *Salmonella enterica* serovar Enteritidis by *Lactobacillus crispatus* and *Clostridium actatifermentans* in a sequencing fed-batch culture. Appl. Environ. Microbiol. 68(2):555-559.

- **WARWICK, C.; LAMBIRIS,A.; WESTWOOD, D.** 2001. Reptile-related salmonellosis. J. Roy. Soc. Med. 94:124-126

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

- **ZHOU, D.; GALÁN, J.** 2001. *Salmonella* entry into host cells:The work in concert of type III secreted efector proteins. Microbes and infection. 3 (14-15):1293-1298.

- **ZINSSER, F.** 1967. Microbiología de Zinsser. 3ª ed. Unión tipográfica editorial Hispano- Americana. México D.F. México. 1556 pp.