

Trabajo de investigación

Bacteriófagos para la detección de *Salmonella* ser. Gallinarum y *Salmonella* ser. Enteritidis en aves de postura

Bacteriophages for detection of Salmonella ser. Gallinarum and Salmonella ser. Enteritidis in laying hens

Xoana Ortiz¹, Florencia Prosdócimo², Hebe A. Barrios¹¹Departamento de Ciencias Básicas; ²Departamento de Tecnología, Universidad Nacional de Luján, Ruta 5 y Avenida Constitución, (6700) Luján. Buenos Aires, Argentina

(Recibido 11 de abril 2020; aceptado 8 de junio 2021)

e-mail: barrioshebe@gmail.com

RESUMEN

Los sistemas agroalimentarios exigen estrictas normas de bioseguridad. Los bacteriófagos son virus que infectan exclusivamente bacterias; cuando se replican lisan a la célula liberando partículas virales infectivas. A fin de determinar si en el guano la presencia de bacteriófagos que lisan *Salmonella* ser. Gallinarum (SG) y *Salmonella* ser. Enteritidis (SE) podrían indicar la presencia simultánea de estas bacterias, se analizaron muestras provenientes de siete granjas de aves ponedoras de los partidos de Luján y Mercedes. De los siete establecimientos, cuatro tenían galpones automáticos y los tres restantes galpones manuales. Para determinar la presencia de *Salmonella* spp se utilizaron técnicas microbiológicas, mientras que para detectar fagos líticos de SG y SE se empleó la técnica de spot test. En granjas manuales con tres filas de jaulas el muestreo comenzó en la primera línea, a 2 metros donde comienza el cono, a 4 metros de la segunda fila y a 6 metros de la tercera. Con un calorador se muestreó en forma de zig-zag. En granjas automáticas, se hizo funcionar las cintas de evacuación de guano tomándose muestras de material a intervalos regulares. Se aisló *Salmonella* spp en una granja automática y se detectaron fagos de SG en dos granjas manuales y en tres de las automáticas, mientras que en cuatro de las granjas automáticas y en dos de las manuales se hallaron fagos de SE. Detectar bacteriófagos es una técnica altamente sensible, que contribuiría en la vigilancia sanitaria alertando posibles infecciones, y viable de aplicar en planes de bioseguridad e higiene.

Palabras clave: *Salmonella* ser. Gallinarum, *Salmonella* ser. Enteritidis, bacteriófagos, guano

ABSTRACT

Agri-food systems require strict biosecurity standards. Bacteriophages are viruses that exclusively infect bacteria; when they replicate they lyse the cell releasing infective viral particles. In order to determine whether in the guano the presence of bacteriophages that lyse *Salmonella* ser. Gallinarum (SG) and *Salmonella* ser. Enteritidis (SE) could indicate the simultaneous presence of these bacteria, samples from seven layer poultry farms from the Luján and Mercedes districts were analyzed. Of the seven establishments, four had automatic farms and the remaining three had manual farms. Microbiological techniques were used to determine the presence of *Salmonella* spp, while the spot test technique was used to detect SG and SE lytic phages. In manual farms with three rows of cages, sampling began in the first line, 2 meters from where the cone begins, 4 meters from the second row and 6 meters from the third. With a drill hole, samples were collected in a zig-zag pattern. In automatic farms, guano evacuation belts were operated with material samples taken at regular intervals. *Salmonella* spp was isolated on an automatic farm and SG phages were detected in two manual farms and three of the automatic farms, while in four of the automatic farms and in two of the manual ones SE phages were found. Detecting bacteriophages is a highly sensitive technique, which would contribute to health surveillance alerting possible infections, and feasible to apply in biosafety and hygiene plans.

Keywords: *Salmonella* ser. Gallinarum, *Salmonella* ser. Enteritidis, bacteriophages, guano

INTRODUCCIÓN

Salmonella es un género bacteriano perteneciente a la familia Enterobacteriaceae. Son bacilos gramnegativos aerobios y anaerobios facultativos, y hasta la fecha se han identificado más de 2.500 serotipos que se encuentran en una gran diversidad de huéspedes¹.

En la industria avícola, las bacterias denominadas

salmonelas tíficas pertenecen al género *Salmonella* subespecie *enterica* serovar Gallinarum biovar Gallinarum (SG) provocan la afección denominada tifosis aviar, una de las principales enfermedades que afecta a las aves de postura. Esta enfermedad ha sido erradicada en muchos de los establecimientos industriales de varios países desarrollados, pero aún subsiste en explotaciones comerciales de Latinoamérica y América del Sur produciendo

pérdidas económicas importantes debido a las altas tasas de mortalidad, disminución en la producción y calidad de los huevos y altos costos veterinarios y de saneamiento de las instalaciones infectadas². Además, existen un grupo de enterobacterias denominadas salmonelas paratíficas que se pueden transmitir de animales a humanos, donde se destaca en especial *Salmonella* subespecie *enterica* serovar Enteritidis (SE) que puede generar gastroenteritis a aquellas personas que consuman huevos, carne o productos de animales contaminados con este microorganismo¹.

Los sistemas agroalimentarios exigen estrictas normas de bioseguridad. Muchos estudios colocan en evidencia que, aunque se tomen medidas para disminuir la presencia de *Salmonella* spp. en granjas, no se eliminan totalmente³⁻⁸.

A nivel nacional existe la Resolución Senasa N° 86/2016 donde se aprueba el "Programa de vigilancia y control de la contaminación por *Salmonella* spp. en granjas avícolas comerciales", destinado a disminuir la prevalencia de determinados serotipos de *Salmonellas* no específicas de huésped de las granjas avícolas de pollos de engorde y gallinas de postura como una medida fundamental para mitigar el riesgo de contaminación del producto avícola final, con gérmenes que pongan en riesgo la salud humana. En este, se indica utilizar el método descrito en el Anexo D de la Norma ISO 6579 (2002), para "Detección de *Salmonella* spp. en heces de animales y en muestras a nivel de producción primaria". Como medio selectivo se debe utilizar el medio semisólido Rappaport-Vassiliadis modificado (MSRV). Para la tipificación de una cepa de cada muestra positiva, como mínimo, se sigue el esquema White-Kauffmann-Le Minor. Como métodos alternativos se pueden utilizar las pruebas moleculares para identificación de genotipos. Cada laboratorio debe hacer la tipificación serológica (pruebas de aglutinación) utilizando los sueros polivalentes OS-A y OS-B. Todos aquellos aislamientos OS-A positivos se deben remitir a la DILAB del SENASA, para su serotipificación, ya que las serovares, Enteritidis, Typhimurium y Heidelberg pertenecen a este serogrupo⁹.

En el ámbito internacional, la legislación de la Unión Europea, el Reglamento 2160/2003/CE6 y la Directiva 2003/99/CE7 sirvieron de base para introducir una normativa sobre *Salmonella* a escala europea, y durante los siguientes años se introdujo la reglamentación específica para cada sector de producción. En el 2019 se publicó un nuevo Reglamento de la Unión Europea 2019/268 con el fin disminuir la prevalencia de la *Salmonella* en la cadena alimentaria, y el riesgo que supone para la salud pública¹⁰. Aquí, la detección de *Salmonella* spp. se llevará a cabo de conformidad con la norma EN/ISO 6579-1. Como medio selectivo existe la elección entre el caldo o el agar semisólido de Rappaport Vassiliadis (RVS o MSRV). Para la confirmación se debe tomar una colonia sospechosa, si los aislados son negativos se analiza hasta cuatro colonias tomándolas de diferentes medios. Se admite la confirmación bioquímica directa sobre la colonia sospechosa bien aislada, realizándose en paralelo una comprobación de la pureza en agar no selectivo. Para la realización del serotipado debe seguirse las directrices establecidas en el Informe Técnico ISO/TR 6579-3. Además, podrán utilizarse métodos alternativos si han sido validados de conformidad con la norma EN ISO 16140-2 (métodos de detección alternativos).

Los bacteriófagos, también conocidos como fagos, son virus que infectan sólo a células procariotas. Constituyen el sistema biológico más simple y abundante de la naturaleza: se estima que su población global es de aproximadamente 10³¹ partículas fágicas sobre la Tierra, coexistiendo en relación 10:1 con las bacterias a las que infectan. Los fagos líticos, al replicarse lisan la bacteria liberando partículas virales infectivas. Este ciclo multiplicativo constituye una

interesante perspectiva al elaborar rutinas de bioseguridad, ya que actuarían como amplificadores para detectar bacterias patógenas como SG y SE¹¹.

Los fagos combinan varias propiedades que son deseables con el fin de detectar patógenos bacterianos: tienen una alta especificidad para sus células blanco; pueden ser usados para diferenciar entre células vivas y muertas; mantienen su actividad en diferentes condiciones ambientales eliminando la necesidad de un laborioso procesamiento previo de muestras; actúan como amplificadores de señal cuando atraviesan un ciclo de infección; y son baratos y fáciles de producir¹².

En la actualidad, el crecimiento del sector avícola trajo aparejado no sólo un aumento en la producción sino también en el volumen de desechos, en particular de guano. En gallinas de postura, el guano es la mezcla de deyecciones, a las que se unen la porción no digerible de los alimentos, las células de descamaciones de la mucosa del aparato digestivo, microorganismos de la microbiota intestinal, diversas sales minerales, plumas y restos de huevos rotos¹³.

Un indicador microbiológico es un microorganismo cuya presencia permite determinar la existencia de un patógeno. Los indicadores se usan generalmente, por ejemplo, en la determinación de la contaminación de las aguas, o la calidad microbiológica de los alimentos^{14,15}. Sabiendo que los fagos necesitan infectar bacterias para reproducirse, sólo se encontrarán en entornos que las contienen. Por lo tanto, para determinar si la presencia de bacteriófagos que lisan SG y SE en guano indica la posible presencia simultánea de estas bacterias patógenas, en el presente trabajo se realizó un análisis microbiológico para aislar *Salmonella* spp y cuantificar bacterias entéricas, y, por otro lado, se detectó la presencia de fagos líticos para SE y SG en muestras de guano de gallina.

MATERIALES Y MÉTODOS

Muestreo

Las muestras de guano fueron recolectadas de granjas de aves de postura en los partidos de Luján y Mercedes (provincia de Buenos Aires, Argentina) entre junio y octubre del 2017. De un total de diecisiete granjas que suman ambos partidos, se eligieron siete granjas (4 de ellas automáticas y 3 de ellas manuales) por su cercanía a la Universidad Nacional de Luján (Luján, Buenos Aires, Argentina).

Dado que todas las granjas poseían menos de 5 galpones, según lo establecido en la Resolución SENASA 86/2016, se tomaron 7 muestras, una de cada granja. En los galpones manuales con tres filas de jaulas el muestreo comenzó en la primera línea de jaulas, a 2 metros donde empezaba el cono, a 4 metros de la segunda fila y a 6 metros de la tercera. Con un calador desinfectado se muestreó en forma de zig-zag. En los galpones automáticos, se hizo funcionar las cintas de evacuación de guano tomándose muestras de material a intervalos de 10 minutos¹³.

Cepas bacterianas

Las células huéspedes utilizadas para el aislamiento de los fagos fueron la cepa SG INTA90 (cedida por el Dr. Horacio Terzolo, de la Estación Experimental Agropecuaria Balcarce del Instituto Nacional de Tecnología Agropecuaria, INTA-EEA Balcarce, Argentina) y la cepa SE Inc, aislada de una planta de incubación y caracterizada antigénicamente por el Instituto Malbrán.

Para determinar la especificidad viral de los fagos aislados se utilizaron cepas de: SG 88 (aislada de una gallina enferma de tifus, y cedida por el Dr. Ricardo Anselmo de la Universidad Nacional de Luján); SE 9 y SE 15 (aisladas del Río Luján, y cedidas por el Dr. Ricardo Anselmo de

la Universidad Nacional de Luján); SE INTA Nal R 12 (protocolo 285/94 resistente al ácido nalidixico, cedida por el Dr. Horacio Terzolo, de INTA-EEA Balcarce, Argentina); SE int (reaislada de intestino luego de cuatro pasajes en ave); SE híg (reaislada de hígado luego de cuatro pasajes en ave); *Pseudomonas* spp 1 (del cepario de la asignatura Microbiología General, Departamento de Ciencias Básicas, Universidad Nacional de Luján); *E. coli* (de INTA-EEA Balcarce, Argentina).

Determinación de *Salmonella* spp

Para detectar *Salmonella* spp se colocaron 25 g de guano en 225 ml de agua peptonada (Britania) y se incubó por 24 ± 2 h a 37°C; posteriormente se transfirió 0,1 ml en 10 ml de caldo Rapaport–Vassiliadis (Britania) con una incubación por 24 ± 1 h a 42°C. Luego se aisló por agotamiento una ansada del caldo de enriquecimiento en placa de agar XLD (Oxoid). Las colonias positivas para *Salmonella* se comprobaron por pruebas bioquímicas: agar hierro tres azúcares (TSI) (Oxoid), agar lisina hierro (LIA) (Britania), medio sulfuro-indol-movilidad (SIM), Indol (Britania), Rojo de metilo, Voges-Proskauer (Oxoid) y Citrato (Britania) (I.M.Vi.C.)¹⁶.

Se realizó una prueba de tipificación serológica utilizando sueros polivalentes somáticos A (OS-A) y B (OS-B).

Cuantificación de enterobacterias

La determinación de coliformes totales, coliformes fecales y *E. coli* se realizó por la técnica del Número Más Probable (NMP) para lo cual se utilizaron los medios: caldo lauril sulfato triptosa (Oxoid), caldo lactosa-verde brillante-bilis (Oxoid), agar eosina azul de metileno (Britania), agar nutritivo (Britania). Los datos obtenidos se expresaron en NMP/gramo (NMP/g). El límite máximo de detección de la técnica fue de >1.100 NMP/g.

Aislamiento y detección de fagos líticos

Para aislar fagos se disolvieron 5 g de guano en 10 ml de caldo nutritivo (Britania). Se incubó 24 h a 37°C junto a 500 µl de cepa huésped de SG o SE 10⁸ unidades formadoras de colonias/mililitro (UFC/ml) para aislar fagos de SG o SE respectivamente. Se centrifugó a 3.500 rpm el sobrenadante por 10 min, repitiendo la operación hasta no observar precipitado. Al volumen del centrifugado obtenido se agregó igual volumen de cloroformo con agitación y se comprobó presencia de fagos líticos de SE y SG por spot test¹⁷.

Para detectar la presencia de bacteriófagos por spot

test se mezcló 5 ml de agar nutritivo (Britania) 0,8% (m/v) fundido y templado a 50 ± 2°C con 0,5 ml de bacteria huésped (SE o SG) y se volcó la mezcla en una placa de Petri con agar nutritivo (Britania). Una vez solidificado, en la base de la placa de Petri se dibujó una cuadrícula y en cada cuadrado se rotuló con el lugar de procedencia de la muestra de guano, donde se colocó una gota (10 µl) de cada una de las suspensiones de fagos aislados de cada granja. Se dejó secar en flujo laminar, y se incubaron las placas a 37°C durante 24 h. La presencia de fagos se evidenció si se observaba la presencia de lisis en el lugar donde se sembró la gota.

De las muestras de materia fecal diluidas que dieron positivo a la presencia de fagos líticos, se realizó el método de la doble capa¹⁸ con el objetivo de escoger placas individuales y purificar en tres pasajes consecutivos.

Para determinar la especificidad viral de los fagos aislados, se enfrentaron distintas cepas bacterianas que se sembraron en agar nutritivo (Britania), y se observó si había lisis total o parcial luego de incubar las placas 48 h a 37°C. Para tal fin, con marcador indeleble se trazaron dos líneas en el fondo de una placa de agar nutritivo (Britania) dividiéndola en cuatro partes, y a su vez, se dibujó un círculo en el centro de cada uno de los 4 sectores. Con ansa estéril, se estrió la cepa bacteriana en el sector dentro del círculo que se dibujó. Utilizando una micropipeta, se añadió una gota (10 µl) de cada aislado de fago en cada sector en el área limitada por el círculo. Se dejó secar en flujo laminar y la placa se incubó a 37°C para realizar una primera lectura a las 24 h y una segunda verificación 24 h después. Se consideró lisis total a las 48 h.

RESULTADOS

Detección de *Salmonella* spp y cuantificación de enterobacterias

De las muestras de guano analizadas sólo se detectó *Salmonella* móvil en una de las granjas automáticas. Por técnicas bioquímicas convencionales y posterior prueba aglutinación se determinó que se trataba de una *Salmonella* spp que reaccionaba al suero OS-B, por lo que se descartó que la bacteria aislada perteneciera a la serovariedad Enteritidis, Typhimurium o Heidelberg.

Los valores obtenidos de enterobacterias se observan en la Tabla 1, donde los resultados de las siete muestras analizadas demostraron un recuento >1.100 de bacterias entéricas.

Tabla 1. Cuantificación de bacterias entéricas (NMP/g) en muestras de guano de gallinas de postura

Granjas	NMP/g		
	Coliformes totales	Coliformes fecales	<i>E. coli</i>
(A) Manual	>1.100	210	9,1
(B) Manual	>1.100	>1.100	9,1
(C) Automática	>1.100	>1.100	7,3
(D) Automática	>1.100	>1.100	44
(E) Manual	>1.100	28	11
(F) Automática	>1.100	>1.100	210
(G) Automática	>1.100	>1.100	7,3

Aislamiento y detección de fagos líticos

Se pudo aislar fagos en seis de las siete granjas muestreadas cuando se usó como célula huésped SG y SE. De las muestras de guano de los galpones manuales se aisló un total de dos fagos líticos usando SE como célula huésped y dos utilizando SG, lo que determinó un total de cuatro fagos que producían lisis parcial de SE o SG en el spot test, mientras que de las muestras de guano de los galpones automáticos se aislaron siete fagos líticos donde algunos producían lisis total o parcial en cepas de SE o SG en el spot test, siendo cuatro los bacteriófagos que se aislaron con SE y tres con SG.

Solamente dos fagos, aislados cada uno de dos granjas

automáticas diferentes, y cuya célula huésped fue SE, produjeron placas de lisis total en el spot test.

Estos dos bacteriófagos que produjeron lisis total de la cepa de SE se purificaron y posteriormente se enfrentaron a cepas de *Salmonella* de origen aviar, de origen ambiental, la cepa de *Salmonella* spp móvil aislada de una de las granjas automáticas muestreadas, una cepa de *Pseudomonas* spp y una cepa de *E. coli*. Las lecturas de las placas a las 48 h se detallan en la Tabla 2. Se observó que ambos fagos además de producir la lisis total de la cepa de SE utilizada para aislarlos, también tenían la capacidad de lisar totalmente cepas de SG y SE aislados de aves, y parcialmente SE aislados de ambiente.

Tabla 2. Actividad lítica de fagos A y B frente a diferentes cepas bacterianas

Cepa bacteriana	Fuente y/o lugar de aislamiento	Fago A de Granja automática F	Fago B de Granja automática G
SG 88	Heces	+	+
SG INTA90 ^a	Balcarce, Argentina	+	+
SE Inc ^a	Planta de incubación	+	+
SE 9	Río Luján	-	P
SE 15	Río Luján	P	P
SE int	Intestino	+	-
SE híg	Hígado	+	P
<i>Salmonella</i> spp A ^b	Heces	-	-
SE INTA NaI R12	Balcarce, Argentina	-	-
<i>Pseudomonas</i> spp. 1	Tierra de cultivo	-	-
<i>E. coli</i> INTA	Balcarce, Argentina	-	-

Salmonella Gallinarum (SG); *Salmonella* Enteritidis (SE); lisis total (+); lisis parcial (P); lisis negativa (-); ^a bacteria huésped;

^b corresponde a cepa que se logró aislar durante el procesamiento de las muestras de guano en una de las granjas.

DISCUSIÓN

En este estudio se planteó determinar si la presencia de bacteriófagos que lisan SG y SE en guano indican la posible presencia simultánea de estas bacterias patógenas.

De las siete muestras de guano analizadas, sólo en una de ellas se evidenció la presencia de *Salmonella* spp por métodos microbiológicos convencionales, y se comprobó por serología que era una *Salmonella* que reaccionaba al suero OS-B, por lo tanto, no era de la serovariedad Gallinarum ni Enteritidis. El bajo aislamiento de la enterobacteria podría explicarse por la resistencia natural que poseen las aves contra patógenos entéricos a medida que se desarrolla su microbiota intestinal y su sistema inmune. Así mismo, si las aves tienen una buena alimentación, con una apropiada desinfección y limpieza de su entorno, podría contribuir a reducir el riesgo de contaminación^{4,19}. Algunos autores también reportan su dificultad para encontrar *Salmonella* en guano por lo que, además del análisis de las heces de los animales, se hacen muestreos ambientales^{20,21}.

Un recuento de coliformes totales con la técnica del NMP >1.100 NMP/g, determina que en las muestras de guano conviven una alta variedad de enterobacterias y no sólo

Salmonella, por lo cual, podría ser conveniente el empleo de otras técnicas o métodos adicionales más específicos para la detección de *Salmonella* spp en guano en los sistemas productivos de aves de postura, como por ejemplo la técnica de PCR (reacción en cadena de la polimerasa)²².

Por otro lado, con respecto a la presencia de fagos en el guano de gallinas, en seis de las siete granjas donde se recolectó guano se pudo aislar bacteriófagos líticos de *Salmonella* de dos serovariedades: Gallinarum y Enteritidis. Como *Salmonella* es un agente patógeno que habita en el tracto gastrointestinal de los animales, la posibilidad de aislar fagos que infecten esta bacteria es alta si se buscan en el intestino de los animales o en sus heces. Debería darse especial atención a la presencia de estos fagos en guano porque podrían indicar la presencia de sus células blancas aún en el ambiente^{23,24}. Sin embargo, estas seis granjas positivas a la presencia de bacteriófagos fueron negativas en la presencia de *Salmonella* spp. Algunos autores han reportado resultados similares en sus investigaciones²⁵⁻²⁷ en otros entornos (corrales de engorda de ganado y granjas de cerdos), destacando que, si bien no se puede generalizar con el número limitado de muestras que se han recolectado, la presencia de fagos de *Salmonella* sugiere que todos

estos ambientes tuvieron en algún momento contacto con *Salmonella*, a pesar de que actualmente pueden ser negativo para la célula huésped. En nuestro caso, el bajo número de muestras de guano recolectadas (7 muestras en total) con la imposibilidad de realizar un análisis estadístico, no podríamos aseverar que *Salmonella* spp permanece en el ambiente, pero si estaría indicando que estuvo presente en algún momento.

Hay que tener en cuenta que los bacteriófagos son parásitos intracelulares estrictos, que para reproducirse necesitan infectar a una bacteria, por lo que ambos tienen una dinámica poblacional descrita por el modelo depredador-presa: la bacteria puede presentar diversos mecanismos de defensa contra el fago, y éste, a su vez puede generar nuevas variantes para superar las barreras presentadas por las bacterias y optimizar su ciclo de infección. Por lo tanto, si una muestra es positiva para fagos pero negativa para su bacteria huésped, podría ser un indicio del rol del fago en el control de la población de *Salmonella* en el ambiente²⁷.

Se ha reportado la capacidad de *Salmonella* para sobrevivir largos periodos en el ambiente^{21,28} y adaptarse a condiciones ambientales especiales, por ejemplo, mediante la formación de biofilms^{29,30}. La supervivencia de su célula blanco implicaría a su vez que estén presentes los

bacteriófagos que las infectan, ya que el fago y el huésped tienen una relación muy cercana y comparten su medio ambiente. Así mismo, como se planteó con anterioridad, hay que tener en cuenta que la limpieza y desinfección no es garantía de la eliminación total de las bacterias³⁻⁸.

A pesar del bajo número de muestras de guano analizadas en este estudio, determinar la presencia de bacteriófagos que lisan SG y SE en guano podría ser una prueba que complementaría el aislamiento y seguimiento de *Salmonella* en aves, y permitiría incrementar estrategias de control y prevención del patógeno, acciones imprescindibles para evitar el riesgo de contaminación de los subproductos derivados de la producción avícola.

Agradecimientos

Los autores agradecen la cooperación de médicos veterinarios, asesores, técnicos, granjeros y dueños de los establecimientos que permitieron la recolección de muestras.

El presente trabajo ha sido financiado por el Departamento de Ciencias Básicas de la Universidad Nacional de Luján.

Conflicto de Intereses

Ninguno.

REFERENCIAS

- who.int [Internet]. WHO (World Health Organization) Salmonella Non Typhoideal; 2018 Disponible en: [https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/salmonella-\(non-typhoidal\)](https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/salmonella-(non-typhoidal))
- Chacana P, Terzolo H. Revisión sobre pullorosis y tifosis aviar. Nuevos enfoques para viejos conceptos. Rev. Med. Vet. 2003; 84:14-20.
- Christensen JP, Brown DJ, Madsen M, Olsen JE, Bisgaard M. Hatchery-borne *Salmonella enterica* serovar Tennessee infections in broilers. Avian Pathol. 1997;26(1):155-168.
- Gama NMSQ, Berchieri Jr A, Fernandes SA. Occurrence of *Salmonella* sp in laying hens. Braz. J. Poult. Sci. 2003; 5(1), 15-21.
- Marin C, Balasch S, Vega S, Lainez M. Sources of *Salmonella* contamination during broiler production in Eastern Spain. Prev Vet Med. 2011; 98(1): 39-45.
- Rose N, Beaudeau F, Drouin P, Toux JY, Rose V, Colin P. Risk factors for *Salmonella enterica* subsp. enterica contamination in French broiler-chicken flocks at the end of the rearing period. Prev Vet Med. 1999; 39(4): 265-277.
- Duc VM, Nakamoto Y, Fujiwara A, Toyofuku H, Obi T, Chuma T. Prevalence of *Salmonella* in broiler chickens in Kagoshima, Japan in 2009 to 2012 and the relationship between serovars changing and antimicrobial resistance. BMC Vet Res. 2019;15(1):1-8.
- Djeffal S, Mamache B, Elgroud R, Hireche S, Bouaziz O. Prevalence and risk factors for *Salmonella* spp. contamination in broiler chicken farms and slaughterhouses in the northeast of Algeria. Vet World. 2018;11(8):1102-1108.
- SENASA. Manual de procedimientos de la Resolución Senasa N° 86/2016. Programa de vigilancia y control de la contaminación por *Salmonella* spp en granja avícolas comerciales, 2018. [Online; consultado 9 Jun 2020] http://www.senasa.gob.ar/sites/default/files/ARBOL_SENASA/ANIMAL/AVES/PROD_PRIMARIA/SANIDAD_ANIMAL/MANUALES/resol._senasa_86_2016-manual_de_procedimientos_vigilancia_y_control_de_salmonella_spp_en_granjas_avicolas_comerciales_.pdf
- Unión Europea. Diario oficial de la Unión Europea. Oficina de Publicaciones. REGLAMENTOS. 2019; L46: 11-16. [Online; consultado 9 Ene 2021] <https://eur-lex.europa.eu/legal-content/ES/TXT/PDF/?uri=CELEX:32019R0268&from=EN>
- Wernicki A, Nowaczek A, Urban-Chmiel R. Bacteriophage therapy to combat bacterial infections in poultry. Virol J. 2017; 14(1):179; 1-13.
- Schmelcher M, Loessner MJ. Application of bacteriophages for detection of foodborne pathogens. Bacteriophage. 2014; 4(1): e28137.
- Leonardi E. Mejores técnicas disponibles en la gestión ambiental de residuos de la producción intensiva de aves. Revista SNS-Senasa, 2013, 1:37-46. [Online; consultado 9 Jun 2020] https://www.researchgate.net/publication/283578387_Leonardi_E_2013_Mejores_tecnicas_disponibles_en_la_gestion_ambiental_de_residuos_de_la_produccion_intensiva_de_aves_Revista_SNS_Vol_1_No_1_Invierno_junio-agosto_de_2013
- Ríos-Tobón S, Agudelo-Cadavid RM, Gutiérrez-Builes LA. Patógenos e indicadores microbiológicos de calidad del agua para consumo humano. Revista Facultad Nacional de Salud Pública. 2017. 35 (2): 236-247.
- Rivera Z, Maldonado EJ, Rios R. Comparación de coliformes y colifagos como indicadores microbiológicos de la calidad del agua en los embalses Dos Bocas y Las Curias en Puerto Rico. J.Appl. Microbiol. 2001; 82, 281-286
- Caffer M, Terragno R. Manual de procedimientos para la caracterización de *Salmonella*. Ministerio de Salud. Buenos Aires, Argentina. Subsecretaría de Investigación y Tecnología ANLIS Dr. Carlos G. Malbrán. Instituto Nacional de Enfermedades Infecciosas. Departamento de Bacteriología. Servicio de Enterobacterias, 2001, p. 5-11. [Online; consultado 9 Jun 2020] <https://docplayer.es/12601568-Manual-de-procedimientos-para-la-caracterizacion-de-salmonella.html>
- Mazzocco A, Waddell TE, Lingohr E, Johnson RP. Enumeration of Bacteriophages Using the Small Drop Plaque Assay System. En: Clokie MRJ, Kropinski AM, editors. Bacteriophages. Meth-

- ods and Protocols, Volume 1: Isolation, Characterization, and Interactions, Vol. 501, New York, USA, Humana Press, 2009, p. 81-85.
18. Kropinski AM, Mazzocco A, Waddell TE, Lingohr E, Johnson RP. Enumeration of bacteriophages by double agar overlay plaque assay. En: Clokie MRJ, Kropinski AM, editors. Bacteriophages. Methods and Protocols, Volume 1: Isolation, Characterization, and Interactions, Vol. 501, New York, USA, Humana Press, 2009, p. 69-76.
 19. McWhorter AR, Chousalkar KK. From hatch to egg grading: monitoring of Salmonella shedding in free-range egg production systems. *Vet Res.* 2019; 50(1): 58.
 20. Berghaus RD, Thayer SG, Law BF, Mild RM, Hofacre CL, Singer RS. Enumeration of Salmonella and Campylobacter spp. in environmental farm samples and processing plant carcass rinses from commercial broiler chicken flocks. *Appl Env. Microbiol.* 2013; 79(13), 4106-4114.
 21. Hruby, C. E., Soupir, M. L., Moorman, T. B., Pederson, C., Kanwar, R. Salmonella and fecal indicator bacteria survival in soils amended with poultry manure. *Water Air Soil Pollut* 2018.;229(2), 1-14.
 22. Soria MC, Soria MA, Bueno DJ, Godano EI, Gómez SC, Via-Butron IA, Padin VM, Rogé AD. Salmonella spp. contamination in commercial layer hen farms using different types of samples and detection methods. *Poult Sci.* 2017;96(8): 2820-2830.
 23. Pulido-Landínez M. Food safety - Salmonella update in broilers. *Anim. Feed Sci. Technol.* 2019; 250: 53-58.
 24. Martín-Díaz J, Lucena F, Blanch AR, Jofre J. Indicator bacteriophages in sludge, biosolids, sediments and soils. *Environ Res.* 2020; 182:109133, 1-7.
 25. Higgins JP, Andreatti Filho RL, Higgins SE, Wolfenden AD, Tellez G, Hargis BM. Evaluation of Salmonella-lytic properties of bacteriophages isolated from commercial broiler houses. *Avian Dis.* 2008; 52(1):139-142.
 26. Switt AI, den Bakker HC, Vongkamjan K, Hoelzer K, Warnick LD, Cummings KJ, Wiedmann M. Salmonella bacteriophage diversity reflects host diversity on dairy farms. *Food Microbiol.* 2013; 36(2): 275-285.
 27. Xie Y, Savell JW, Arnold AN, Gehring KB, Gill JJ, Taylor TM. Prevalence and Characterization of Salmonella enterica and Salmonella Bacteriophages Recovered from Beef Cattle Feedlots in South Texas. *J Food Prot.* 2016; 79(8):1332-1340.
 28. Bres PA. Optimización de la digestión anaeróbica del guano de aves ponedoras. Tesis Doctoral. Instituto de Investigación e Ingeniería Ambiental, Universidad Nacional de San Martín. 2019.
 29. Marin C, Hernandez A, Lainez M. Biofilm development capacity of Salmonella strains isolated in poultry risk factors and their resistance against disinfectants. *Poult Sci.* 2009; 88(2): 424-431
 30. Lianou A, Koutsoumanis KP. Strain variability of the biofilm-forming ability of Salmonella enterica under various environmental conditions. *Int J. Food Microbiol* 2012; 160(2): 171-178.



Este artículo está bajo una Licencia Creative Commons. Atribución-No Comercial-Sin Derivadas 4.0 Internacional <https://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/4.0/deed.es>