

Bacteriófagos: una herramienta para el control de *Salmonella* Enteritidis en granja de aves comerciales de postura

Bacteriophages: a tool for the control of *Salmonella* Enteritidis in commercial layer poultry farms

DOI: 10.34188/bjaerv4n4-003

Recebimento dos originais: 20/08/2021

Aceitação para publicação: 25/09/2021

Xoana Ortiz

Licenciada en Ciencias Bilógicas por la Universidad Nacional de Luján
Institución: Universidad Nacional de Luján, Departamento de Ciencias Básicas
Dirección: Ruta 5 y Avenida Constitución - (6700) Luján, Buenos Aires, Argentina
Correo electrónico: xoanaortiz@hotmail.com

Ricardo Anselmo

Doctor en Ciencias Aplicadas por la Universidad Nacional de Luján
Institución: Universidad Nacional de Luján, Departamento de Ciencias Básicas
Dirección: Ruta 5 y Avenida Constitución - (6700) Luján, Buenos Aires, Argentina
Correo electrónico: anselmoricardoj@gmail.com

Florencia Prosdócimo

Doctora en Ciencias Aplicadas por la Universidad Nacional de Luján
Institución: Universidad Nacional de Luján, Departamento de Tecnología
Dirección: Ruta 5 y Avenida Constitución - (6700) Luján, Buenos Aires, Argentina
Correo electrónico: florprosdocimo@gmail.com

Silvia Viora

Médica Veterinaria por la Universidad de Buenos Aires, Facultad de Ciencias Veterinarias
Institución: Universidad Nacional de Luján, Departamento de Ciencias Básicas
Dirección: Ruta 5 y Avenida Constitución - (6700) Luján, Buenos Aires, Argentina
Correo electrónico: sviora@gmail.com

Mauricio De Franceschi

Doctor en Ciencias Aplicadas por la Universidad Nacional de Luján
Institución: Universidad Nacional de Luján, Departamento de Tecnología
Dirección: Ruta 5 y Avenida Constitución - (6700) Luján, Buenos Aires, Argentina
Correo electrónico: mauriciodfp@gmail.com

Hebe Barrios

Doctora en Ciencias Biológicas por la Universidad de Buenos Aires, Facultad de Ciencias Exactas y Naturales
Institución: Universidad Nacional de Luján, Departamento de Ciencias Básicas
Dirección: Ruta 5 y Avenida Constitución - (6700) Luján, Buenos Aires, Argentina
Correo electrónico: barrioshebe@gmail.com

RESUMEN

Los bacteriófagos constituyen una novedad como bactericidas. Un cóctel de bacteriófagos F9 y F15, específicos para *Salmonella* Enteritidis (SE) y FSG, específico para *Salmonella* Gallinarum, fue utilizado sobre superficies contaminadas experimentalmente con SE. Quince rectángulos de polipropileno de 330 cm² y quince trozos de rejillas metálicas de 50 cm², fueron sumergidas en cultivo de 18 h de SE incubadas una hora a 37°C. Las unidades formadoras de colonia (UFC)/ml de SE fueron determinadas en las dos superficies y sometidas a: Tratamiento (T) 1: 5 materiales fueron rociados con 10⁹ unidades formadoras de placa (UFP)/ml de FSG, F9 y F15; T2: 5 materiales fueron rociados con 10⁹ UFP/ml de F9 y FSG; T3: 5 materiales fueron rociados con solución fisiológica. Los resultados determinaron que T1 disminuyó significativamente la carga bacteriana sobre metal de 4,3 log₁₀ UFC/cm² a 2,5 ± 0,22 log₁₀ UFC/cm², mientras que en superficies plásticas redujo la concentración de SE en 1,23 ± 0,26 log₁₀ UFC/cm² (ANOVA). Se concluye que el uso de bacteriófagos contribuiría al control de SE en producción de huevos.

Palabras clave: bacteriófagos, *Salmonella* Enteritidis, aves de postura

ABSTRACT

Bacteriophages are a novelty as bactericides. A cocktail of bacteriophages F9 and F15, specific for *Salmonella* Enteritidis (SE) and FSG, specific for *Salmonella* Gallinarum, was used on surfaces experimentally contaminated with SE. Fifteen 330 cm² polypropylene rectangles and fifteen 50 cm² pieces of metal grids were immersed in culture for 18 hours of SE incubated for one hour at 37°C. Colony-forming units (CFU)/ml of SE were determined on the two surfaces and subjected to: Treatment (T) 1: 5 materials were sprayed with 10⁹ plaque-forming units (PFU)/ml of FSG, F9 and F15; T2: 5 materials were sprayed with 10⁹ PFU/ml of F9 and FSG; T3: 5 materials were sprayed with physiological solution. The results determined that T1 significantly decreased the bacterial load on metal: 4.3 log₁₀ CFU/cm² a 1.23 ± 0.22 log₁₀ CFU/cm² (ANOVA). The use of bacteriophages would contribute to the control of SE in poultry.

Keywords: bacteriophage, *Salmonella* Enteritidis, laying hens

1 INTRODUCCIÓN

Los bacteriófagos son virus que infectan y lisan específicamente a bacterias. Son muy abundantes en la naturaleza e inofensivos para el hombre, plantas y animales. Fueron descubiertos y descritos por primera vez por Frederick Twort en 1915 y más tarde por Felix d'Herelle en 1917, quien además hizo grandes aportes a su estudio. El ciclo lítico de un bacteriófago ocurre en tiempos variables y conduce a la liberación de entre 50 a 100 viriones que vuelven a infectar nuevas bacterias específicas repitiendo el ciclo lítico hasta lograr la eliminación de las células hospedadoras¹.

Salmonella enterica subespecie *enterica* serovar Enteritidis (SE) es una bacteria intestinal invasiva, no específica y no adaptada al huésped. Las aves comerciales constituyen uno de los principales reservorios; la carne de pollo y los huevos contaminados son la fuente más importante de contaminación para el hombre^{2,3}. SE tiene gran afinidad por el tracto reproductivo infectando oviducto, ovarios y el huevo en formación. Por ello se debe prestar particular atención en aves

reproductoras ya que son su principal fuente de diseminación, tanto por vía horizontal como vertical^{4,5}.

El incremento de cepas resistentes a múltiples antibióticos determinó la búsqueda de nuevas alternativas para el control de SE en granjas avícolas, como respuesta a las normativas vigentes, las que indican especialmente que el uso de antimicrobianos no debe afectar la salud humana y el medio ambiente³.

Los bacteriófagos, por su acción selectiva y multiplicación explosiva constituyen una herramienta complementaria para el control de SE, ya que logran evitar el uso masivo de tratamientos químicos que conducen a la selección y proliferación de bacterias resistentes⁶.

Los bacteriófagos también pueden usarse como agentes bactericidas en superficies inertes comúnmente denominadas fómites. Su aplicación en forma de spray ayudaría al control de las salmonelas en el ambiente, como complemento en los programas de desinfección e higiene. Además, dado que la mayoría de los desinfectantes se inactivan en presencia de materia orgánica, la aplicación de fagos sobre superficies contaminadas contribuiría a que los desinfectantes actúen más eficazmente⁷.

En trabajos anteriores se demostró que la actividad lítica de los fagos no se modifica en presencia de desinfectantes de uso común en avicultura y que permanecen intactos en las superficies luego de un tiempo de la aplicación⁸.

El objetivo del trabajo fue determinar si la aplicación de un cóctel de fagos disminuye el recuento de SE en superficies contaminadas experimentalmente.

2 MATERIAL Y MÉTODOS

2.1 BACTERIÓFAGOS

El bacteriófago específico para *Salmonella Gallinarum* (FSG) fue aislado de las heces de una gallina enferma de tifus⁹. Los bacteriófagos específicos para SE (F9 y F15) fueron aislados del río Luján, provincia de Buenos Aires, Argentina¹⁰.

2.2 CEPA DE *SALMONELLA* ENTERITIDIS

La cepa bacteriana fue aislada de campo y caracterizada antigénicamente por el Instituto de Análisis Malbrán¹¹.

2.3 SUPERFICIES ENSAYADAS

Se utilizaron dos superficies diferentes que se encuentran en contacto con las aves en las granjas de producción: 15 rectángulos plásticos de polipropileno de 330 cm² y 15 trozos de rejas metálicas de 50 cm².

2.4 DESCRIPCIÓN DEL ENSAYO

Antes de comenzar las pruebas se verificó la ausencia de SE en cada una de las superficies, para lo cual se pasaron hisopos embebidos en solución fisiológica estéril (SF), los que se colocaron en frascos que contenían 150 ml de SF, para luego inocularse una alícuota del contenido de estos frascos en placas de Petri con agar Xilosa-Lisina-Desoxicolato (OXOID) para verificar la presencia o ausencia de colonias. Posteriormente, los diferentes materiales se sumergieron en un recipiente que contenía un cultivo de 18 h de SE, se secaron en flujo laminar y se incubaron 60 minutos a 37°C. Después de una hora, se determinó la cantidad de unidades formadoras de colonia por ml (UFC/ml) de SE. Luego, cada ensayo se sometió a tres tratamientos; Tratamiento 1 (T1): 5 porciones de rejas metálicas (RM) y 5 de polipropileno (PPL) fueron rociados con 10⁹ unidades formadoras de placa por ml (UFP/ml) del fago FSG, F9 y F15 (en igual proporción), Tratamiento 2 (T2): 5 RM y 5 PPL fueron rociadas con 10⁹ UFP/ml con los fagos F9 y FSG (en igual proporción), Tratamiento 3 (T3): 5 RM y 5 PPL fueron rociadas con SF. Cada pieza de material se roció tres veces de cada lado (una descarga de spray equivale a un volumen de 1 ml). Después de recibir el respectivo tratamiento, las superficies se dejaron secar en flujo laminar y se incubaron a 37°C durante 3 horas. Luego, con un hisopo, se tomaron muestras de las superficies de cada uno de los ensayos con sus distintos tratamientos y fueron colocadas en frascos que contenían 150 ml de SF, y posteriormente se realizó el recuento en placa de agar nutritivo (Laboratorios Britania) por el método de extensión en superficie. Los datos recolectados se transformaron a valores logarítmicos y se analizaron estadísticamente mediante ANOVA de un factor, y se utilizó la prueba de Tukey para comparar las medias de los tratamientos. Un valor de $p \leq 0,05$ fue considerado con significancia estadística.

3 RESULTADOS

En todas las superficies ensayadas se constató ausencia de SE antes de su inmersión en un cultivo de la bacteria y en los tratamientos (controles). Los resultados obtenidos (Tabla 1) demuestran que en aquellas superficies que recibieron el tratamiento T1 se observa una disminución de la carga bacteriana con respecto a las que recibieron T2 y T3.

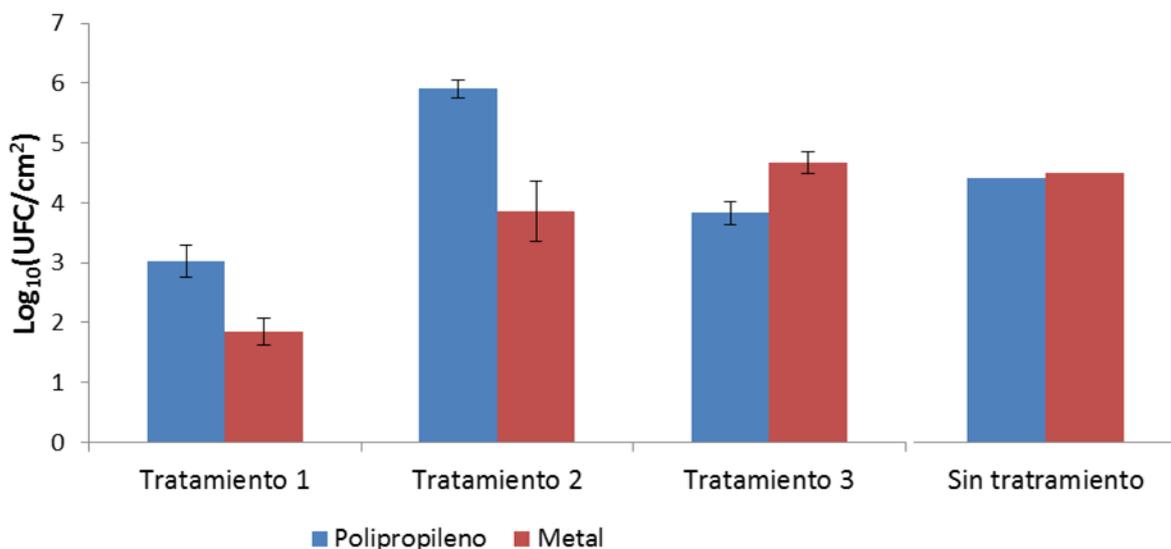
Tabla 1: Recuento de bacterias en UFC/cm² de las diferentes superficies. Tratamiento 1: rociados con fagos FSG, F9 y F15; Tratamiento 2: rociadas con los fagos F9 y FSG; Tratamiento 3: rociadas con SF. La concentración del cultivo

de SE en las que se sumergieron los materiales de polipropileno al inicio fue de $1,33 \times 10^7$ y las metálicas fue de $3,7 \times 10^6$ UFC/ml).

UFC/cm ²	Control	Incubación de 60 min	Tratamiento 1 (T1)	Tratamiento 2 (T2)	Tratamiento 3 (T3)
Polipropileno	0	$1,82 \times 10^4$	$2,27 \times 10^3$	$8,68 \times 10^5$	$1,05 \times 10^4$
			$6,82 \times 10^2$	$5,68 \times 10^5$	$9,55 \times 10^3$
			$9,09 \times 10^2$	$6,23 \times 10^5$	$8,18 \times 10^3$
			$2,00 \times 10^3$	$6,86 \times 10^5$	$3,05 \times 10^3$
			$4,82 \times 10^2$	$1,52 \times 10^6$	$5,45 \times 10^3$
Metal	0	$2,19 \times 10^4$	$3,00 \times 10^1$	$8,10 \times 10^2$	$1,02 \times 10^5$
			$6,00 \times 10^1$	$1,29 \times 10^4$	$4,50 \times 10^4$
			$1,20 \times 10^2$	$1,38 \times 10^4$	$3,60 \times 10^4$
			$6,00 \times 10^1$	$1,86 \times 10^4$	$3,30 \times 10^4$
			$1,20 \times 10^2$	$7,20 \times 10^3$	$4,20 \times 10^4$

Mediante ANOVA de un factor se comprobó que existe una diferencia significativa entre todos los tratamientos tanto cuando se aplica a las superficies plásticas como a las metálicas ($p \leq 0,05$). Si se compara T1 con T2, tanto en los materiales de polipropileno y en los de metal, hay diferencia entre ambos, siendo el de mayor eficiencia el cóctel de tres fagos (T1), dado que en las superficies plásticas redujo la concentración de SE en $1,23 \pm 0,26 \log_{10}$ UFC/cm² y $2,50 \pm 0,22 \log_{10}$ UFC/cm² en superficies metálicas, luego de mantenerse en estufa por 3 horas a 37°C (Figura 1).

Figura 1: Recuento de SE en superficie. Tratamiento 1: rociados con fagos FSG, F9 y F15; Tratamiento 2: rociadas con los fagos F9 y FSG; Tratamiento 3: rociadas con SF; Sin tratamiento: incubación de 60 min. 5 repeticiones para cada tratamiento, se observa diferencias significativas entre todos ellos ($p \leq 0,5$). Barras de error indican el desvío estándar.



4 DISCUSIÓN

En el presente trabajo se logró disminuir la carga bacteriana de superficies contaminadas experimentalmente con SE a través del uso de un cóctel de fagos. Se probaron cócteles preparados

con dos y tres bacteriófagos, y en base a los resultados obtenidos se comprobó que el cóctel de tres fagos tuvo una mejor efectividad en la reducción de *Salmonella* en superficie.

La prevención de la infección por SE en aves comerciales es muy importante para la salud pública. SE es el serotipo más común que causa toxiinfecciones alimentarias en humanos identificándose siempre a las aves como principal fuente de infección ¹².

En medicina veterinaria el uso de antimicrobianos está asociado a la aparición de nuevas variedades de microorganismos resistentes. En este sentido, en lo que respecta al sector avícola, se ha incrementado la búsqueda de agentes naturales con acción bactericida ¹³.

Existen trabajos que utilizan bacteriófagos como aditivos en los alimentos en donde demuestran una marcada disminución en la infección de SE y SG en aves comerciales y consecuentemente un control en la transmisión horizontal ^{14 15}.

La utilización de cócteles de bacteriófagos como agentes desinfectantes disminuiría la presencia de bacterias resistentes y ayudaría en la lisis de las poblaciones bacterianas más rápida y eficazmente y con efecto prolongado. Su eficacia ya ha sido comprobada en el área de la industria del procesamiento de alimentos ^{16 17 18 19}. Nuestros resultados demuestran que los bacteriófagos utilizados son capaces de disminuir las poblaciones de SE en las superficies ensayadas y pueden ser empleados como agentes bactericidas. Teniendo en cuenta que la reducción de la concentración de *Salmonella* en los materiales tratados con los tres bacteriófagos fue significativa, podría considerarse que la desinfección de las superficies con cócteles podría reducir la presencia de este patógeno en las granjas. En nuestro ensayo la carga a la que se expuso las superficies es superior a la que podrían llegar a tener o alcanzar en las granjas de aves ponedoras, debido a la limpieza y condiciones climáticas del ambiente, muy diferente al entorno estable presente en un laboratorio.

Estas experiencias demuestran que el uso de bacteriófagos puede ser una muy buena estrategia para utilizarlos como bactericida natural ofreciendo varias ventajas como, bajo costo económico, mayor eficacia en la lisis de las poblaciones bacterianas, efectividad sobre las superficies en que se encuentran en contacto las aves y ausencia de toxicidad para los animales y el hombre. La inclusión de bacteriófagos como agentes bactericidas en los programas de higiene y desinfección constituiría una excelente herramienta para disminuir la utilización de otros agentes químicos y consecuentemente, preservar el medio ambiente.

5 CONCLUSIONES

El uso de cócteles de bacteriófagos líticos ofrecen la posibilidad de utilizarlos como una herramienta complementaria, segura y eficaz para el biocontrol de SE en los ambientes de las granjas de aves comerciales de postura.

AGRADECIMIENTOS

Los autores agradecen el respaldo y la financiación del Departamento de Ciencias Básicas de la Universidad Nacional de Luján.

REFERENCIAS

1. Segundo-Arizmendi N, Hernández-Baltazar E, Villegas O, Torres-Angeles O. Los bacteriófagos como una alternativa en el tratamiento de enfermedades infecciosas Bacterianas (Fagoterapia). *Revista Mexicana de Ciencias Farmacéuticas*. 2010; 41, 17-26.
2. Taylor M, Leslie M, Ritson M, *et al.* Investigation of the concurrent emergence of *Salmonella* enteritidis in humans and poultry in British Columbia, Canada, 2008-2010. *Zoonoses Public Health*. 2012; 59(8): 584-592.
3. OIE. Organización Mundial de Sanidad Animal-Una sola salud (2013), doi: <http://www.oie.int/es/para-los-periodistas/onehealth-es/> (consultado junio 2021).
4. De Buck J, Van Immerseel F, Haesebrouck F, Ducatelle R. Colonization of the chicken reproductive tract and egg contamination by *Salmonella*. *Journal of Applied Microbiology*. 2004; 97(2): 233-245.
5. Prosdócimo, F. Patogénesis experimental de *Salmonella* Enteritidis y *Salmonella* Gallinarum en producción avícola. Tesis Doctoral. Universidad Nacional de Luján (2014).
6. Borie C, Hauva C, Quiroga J, Bravo V, Sánchez M L, *et al.* Uso de bacteriófagos en gallinas de postura infectadas con *Salmonella* enterica serotipo Enteritidis: prevención de la colonización intestinal y reproductiva. *Archivos Medicina Veterinaria*. 2011; 43: 85-89.
7. Huff WE, Huff GR, Rath NC, Balog JM, Donoghue AM. Evaluation of aerosol spray and intramuscular injection of bacteriophage to treat an *Escherichia coli* respiratory infection. *Poultry Science*. 2003; 82(7): 1108-1112.
8. Ortiz, X. y Barrios, H. Presencia residual de un bacteriófago lítico aplicado en granjas de aves de postura. XXXVI Reunión Científica Anual de la Sociedad Argentina de Virología. Ciudad Autónoma de Buenos Aires, Argentina (2016).
9. Prosdócimo, F. *et al.* Evaluación de un bacteriófago para la prevención de *Salmonella* Gallinarum en aves de postura. *Revista Argentina de Microbiología*. 2010; 42: 114.
10. Anselmo, R. Evaluación de la eficacia de la fagotipia como marcador epidemiológico complementario para cepas de *Salmonella* Enteritidis de la ciudad de Luján. Tesis Doctoral. Universidad Nacional de Luján (2012).
11. Caffer, M. y Terragno, R. Manual de procedimientos para la caracterización de *Salmonella*. Ministerio de Salud. Subsecretaría de Investigación y Tecnología ANLIS "Dr. Carlos G. Malbrán Departamento de Bacteriología Servicio Enterobacterias (2001).
12. Ahmed R, Soule G, Demczuk WH, *et al.* Epidemiologic typing of *Salmonella* enterica serotype enteritidis in a Canada-wide outbreak of gastroenteritis due to contaminated cheese. *Journal of Clinical Microbiology* 2000; 38: 2403-2406.
13. Steiner, T. Natural Growth as a Key to Animal Performance. *Managing Gut Health*. University Press. Nottingham, UK (2006).
14. Lim TH, Lee DH, Lee YN, *et al.* Efficacy of bacteriophage therapy on horizontal transmission of *Salmonella* Gallinarum on commercial layer chickens. *Avian Diseases*. 2011; 55: 435-438.

15. Lim TH, Kim MS, Lee DH, *et al.* Use of bacteriophage for biological control of *Salmonella* Enteritidis infection in chicken. *Veterinary Science*. 2012; 93: 1173-1178.
16. Duc H M, Son, H M, Honjoh K I, Miyamoto T. Isolation and application of bacteriophages to reduce *Salmonella* contamination in raw chicken meat. *LWT*. 2018; 91: 353-360.
17. Hooton SP, Atterbury RJ, Connerton IF. Application of a bacteriophage cocktail to reduce *Salmonella* Typhimurium U288 contamination on pig skin. *International Journal Food Microbiology*. 2011; 151(2): 157-163.
18. Bai J, Jeon B, Ryu S. Effective inhibition of *Salmonella* Typhimurium in fresh produce by a phage cocktail targeting multiple host receptors. *Food Microbiology*. 2019; 77: 52-60.
19. Huang C, Virk SM, Shi J, *et al.* Isolation, Characterization, and Application of Bacteriophage LPSE1 Against *Salmonella* enterica in Ready to Eat (RTE) Foods. *Frontiers in Microbiology*. 2018; 9: 1046.