



Original/Otros

Empleo de bacteriófagos frente a *Salmonella enteritidis* como herramienta de prevención

Cristina García¹, Clara Marín², Pablo Catalá-Gregori¹ y Jose Miguel Soriano³

¹Centro de Calidad Avícola y Alimentación Animal de la Comunidad Valenciana CECAV, Alquerías del Niño Perdido, Castellón.
²Facultad de Veterinaria, Departamento de Producción y Sanidad Animal, Salud Pública Veterinaria y Ciencia y Tecnología de los Alimentos, Universidad CEU Cardenal Herrera (Moncada), Valencia. ³Unidad Mixta de Investigación en Endocrinología, Nutrición y Dietética Clínica. Universitat de València- Instituto de Investigación Sanitaria La Fe (Valencia), España.

Resumen

Introducción: la salmonelosis es una enfermedad de alta prevalencia, siendo la búsqueda de herramientas preventivas para evitar la contaminación una prioridad a nivel de salud pública.

Objetivo: en el presente trabajo se evaluó el efecto *in vitro* de bacteriófagos frente a *Salmonella enteritidis* como una herramienta de prevención.

Método: se realizaron dos pruebas con tres concentraciones de bacteriófagos frente a dos cepas de *Salmonella enteritidis* inoculadas en muestras de heces frescas de gallinas ponedoras, y el correspondiente control positivo. Así, se testaron cuatro grupos en cada una de las dos pruebas. Cada grupo experimental contó con dos réplicas, y en cada réplica se incubaron tres placas. Las concentraciones ensayadas fueron tres: solución comercial (5×10^7 pfu/mL), y dos diluciones de la misma (1/10 y 1/30). Una de las cepas testada fue la cepa CECT 4300, cepa certificada de la Colección Española de Cultivo Tipo, y la otra una cepa de campo aislada en una explotación de ponedoras sacrificadas. Ambas cepas se inocularon en muestras de heces a la dosis de $1,3 \times 10^5$ ufc/g de heces en cada uno de los cuatro grupos. Se procedió con el aislamiento e identificación de la bacteria por ISO 6579 a varios tiempos desde la inoculación: 1 minuto, 24 h y 7 días.

Resultados: en la primera prueba, con la cepa certificada, se aisló *Salmonella* en todos los grupos a tiempo 1 minuto. A las 24 h se aisló *Salmonella* en todos los grupos excepto en una de las réplicas tratada con la dilución 1/10 de bacteriófagos, en una de las placas de la otra réplica tratada con la dilución 1/10, y en dos placas de cada una de las dos réplicas tratadas con la solución comercial. A partir de los 7 días ya no se aisló la bacteria de ninguno de los grupos experimentales. En la segunda prueba, con la cepa de campo, se aisló *Salmonella* en todos los grupos a tiempo 1 minuto. A las 24 h se aisló *Salmonella* en todos los grupos excepto en una de las réplicas tratada con la

USE OF BACTERIOPHAGES AGAINST *SALMONELLA ENTERITIDIS*: A PREVENTION TOOL

Abstract

Introduction: salmonellosis is a highly prevalent disease still searching for preventive tools to avoid contamination level priority public health.

Objective: the *in vitro* effect of bacteriophages against *Salmonella enteritidis* was evaluated as a prevention tool.

Method: two tests with three concentrations of bacteriophages were conducted against two strains of *Salmonella Enteritidis* inoculated in fresh faeces of laying hens. Each test had a positive control. Thus, four groups in each test were evaluated. Each experimental group included two replicates, and three plates were incubated per replicate.

The concentrations tested were three: commercial solution (5×10^7 pfu/mL), and two dilutions (1/10 and 1/30). One of the strains tested was CECT 4300, a certified strain of Colección Española de Cultivo Tipo and the other a field isolated strain in a sacrificed hen farm. Both strains were inoculated at 1.3×10^5 cfu/g of faeces in each of the four groups. Isolation and identification of bacteria by ISO6579 was done at various times after inoculation: 1 minute, 24 hours and 7 days.

Results: in the first test, with certified strain, *Salmonella* was isolated in all groups at time 1 minute. After 24 hours, *Salmonella* was isolated in all groups except in one of the replicas treated with 1/10 dilution of bacteriophages, one of the other replica plate treated with 1/10 dilution, and two plates of the two replicas treated with the commercial solution. After 7 days, the bacteria were not isolated from any of the experimental groups. In the second test, with the field strain, *Salmonella* was isolated in all groups at time 1 minute. After 24 hours, *Salmonella*

Correspondencia: José M. Soriano.

Unidad Mixta de Investigación en Endocrinología, Nutrición y Dietética Clínica.

Universitat de València. Instituto de Investigación Sanitaria La Fe.
Avenida Fernando Abril Martorell, 106 Torre A. 46026 Valencia.
E-mail: jose.soriano@uv.es

Recibido: 15-III-2015.

Aceptado: 22-IV-2015.

dilución 1/10 de bacteriófagos y en las dos réplicas tratadas con la solución comercial. Al igual que en la prueba primera, a los 7 días tampoco se aisló *Salmonella* en ninguno de los grupos experimentales.

Conclusiones: el empleo de bacteriófagos contribuyó a reducir los aislamientos de *Salmonella enteritidis* en las muestras de heces a las 24 h de su aplicación, por lo que podría ser considerado una herramienta de prevención. A los 7 días tras la inoculación de la bacteria no se aisló la misma en ninguno de los grupos experimentales.

(Nutr Hosp. 2015;31:2740-2742)

DOI:10.3305/nh.2015.31.6.8975

Palabras clave: *Bacteriófago*. *In-vitro*. *Salmonella enteritidis*. ISO 6579.

Introducción

La salmonelosis humana presenta una destacada prevalencia¹ y forma parte del grupo de enfermedades de transmisión alimentaria con graves consecuencias económicas, sociales y sanitarias. Los principales factores de riesgo de intoxicación alimentaria causada por *Salmonella* están relacionadas con las aves de corral tales como carne de pollo o huevos poco cocinados. Entre las salmonelas más importantes asociadas con el pollo y huevos se encuentra la *Salmonella* entérica serovar Enteritidis (*S. Enteritidis*). Éste es un serotipo que ha entrado en la industria avícola intensiva y puede causar la infección y la contaminación de los productos avícolas, con ausencia de la enfermedad clínica. El control de salmonelas en la etapa de producción primaria es de importancia primordial. Se puede prevenir la introducción de esta bacteria en la cadena alimentaria y por tanto, reducir la intoxicación entre los consumidores². Una de las prácticas utilizadas en las explotaciones para controlar la salmonela es el uso de antibióticos. Sin embargo, el elevado grado de resistencia de la bacteria plantea limitaciones graves en las posibilidades del tratamiento eficaz.

Los bacteriófagos (fagos) son virus que matan bacterias³. Los fagos han sido propuestos como alternativa al uso de antibióticos basado en su capacidad para invadir y perturbar el metabolismo bacteriano, que causa la lisis de las bacterias⁴.

Los bacteriófagos son específicos para cada bacteria previniendo la destrucción de la flora circundante; se adhieren a la pared bacteriana contribuyendo a atenuar factores de virulencia; no inducen fenómenos alérgicos; no se han detectado efectos secundarios (son inofensivos para los animales, las plantas y para el medio ambiente); pueden ser usados como tratamiento preventivo y para higienización; continúan multiplicándose hasta que la infección con el huésped se mantenga (terminan su acción cuando ya no hay bacteria huésped); se utilizan en una única aplicación y no tienen intervalo de seguridad⁵.

En este trabajo se evaluó el efecto *in-vitro* de bacteriófagos frente a *Salmonella enteritidis*. Para ello, se

was isolated in all groups except in one of the replicas treated with 1/10 dilution of bacteriophages and the two replicas treated with the commercial solution. *Salmonella* was not isolated in any of the experimental groups at 7 days.

Conclusions: the use of bacteriophages reduced *Salmonella enteritidis* isolates in faeces at 24 hours after the application, so it could be considered as a prevention tool. At 7 days after inoculation of bacteria, no one was isolated in any of the experimental groups.

(Nutr Hosp. 2015;31:2740-2742)

DOI:10.3305/nh.2015.31.6.8975

Key words: *Bacteriophage*. *In-vitro*. *Salmonella enteritidis*. ISO6579.

realizaron dos pruebas con tres concentraciones de bacteriófagos frente a dos cepas de *Salmonella enteritidis* (una cepa de referencia y una cepa aislada en campo) inoculadas en muestras de heces frescas de gallinas ponedoras, y el correspondiente control positivo. Así, se testaron cuatro grupos en cada una de las dos pruebas.

Material y métodos

En este trabajo se evaluó el efecto *in-vitro* de bacteriófagos frente a *Salmonella enteritidis*, inoculada en muestras de heces frescas de gallinas ponedoras. Para ello, se realizaron dos pruebas con dos cepas de *Salmonella enteritidis*. Las cepas inoculadas fueron: cepa CECT 4300, cepa certificada de la Colección Española de Cultivo Tipo y cepa de campo aislada en una explotación de ponedoras sacrificada. Se emplearon dos cepas con orígenes diferentes para evaluar posibles diferencias en cuanto a la resistencia a la acción del tratamiento o la viabilidad de la cepa inoculada en heces y mantenida a 25°C. La inoculación se realizó sobre heces de gallinas ponedoras libres de *Salmonella* spp. Para garantizar la ausencia de este microorganismo se analizaron las heces 10 veces por el método ISO 6579:2002/Amd. 1:2007^{6,7}, con resultado de ausencia de *Salmonella* spp. Posteriormente, se adicionó 100 mL de una solución de 10⁶ u.f.c./mL de cada una de las cepas sobre 2 kg de estas heces (equivalente a 0.4 m² de la cinta). Por tanto, ambas cepas se inocularon en muestras de heces a la dosis de 1.3×10⁵ ufc/g de heces.

Para cada prueba, la mezcla de heces inoculada se repartió en 4 porciones de 500 g. Cada porción constituye la muestra de análisis de un grupo experimental. Una de las porciones se pulverizó con 2 mL de una solución comercial de bacteriófagos Bio-S107 de Controvet Genetics (5×10⁷ pfu/mL), otra con 2 mL de una dilución 1/10 (5×10⁶ pfu/mL) y otra con 2 mL de una dilución 1/30 (1.6×10⁶ pfu/mL), de la misma. La última porción es el control positivo y no fue tratada con bacteriófagos.

Las cuatro porciones de heces se repartieron en dos subporciones.

Por tanto, en cada prueba se testaron tres concentraciones de bacteriófagos y el correspondiente control. Se realizaron dos réplicas (una réplica de cada subporción) de cada grupo experimental

Se tomaron 25 gramos de cada subporción y se analizaron según la ISO 6579:2002/Amd. 1:2007^{6,7}, teniendo en cuenta que se sembraron tres placas de Rappaport-Vassiliadis semisólido modificado (MSRV) de cada submuestra. El ensayo se realizó a distintos tiempos desde la incubación: 1 minuto, 24h y 7 días.

Las submuestras se mantuvieron a $25\pm 2^{\circ}\text{C}$ entre cada análisis, controlando la temperatura con sondas calibradas.

Resultados y discusión

En la primera prueba, con la cepa certificada, se aisló *Salmonella* en todos los grupos a tiempo 1 minuto. A las 24h se aisló *Salmonella* en todos los grupos excepto en una de las réplicas tratada con la dilución 1/10 de bacteriófagos, en una de las placas de la otra réplica tratada con la dilución 1/10, y en dos placas de cada una de las dos réplicas tratadas con la solución comercial de bacteriófagos.

En la segunda prueba, con la cepa de campo, se aisló *Salmonella* en todos los grupos a tiempo 1 minuto. A las 24h se aisló *Salmonella* en todos los grupos excepto en una de las réplicas tratada con la dilución 1/10 de bacteriófagos y en las dos réplicas tratadas con la solución comercial de bacteriófagos. A los 7 días, no se aisló *Salmonella* en ninguno de los grupos experimentales de las dos pruebas. Comparando los resultados obtenidos con ambas cepas, no se han detectado diferencias a excepción de los resultados a las 24 horas en las muestras tratadas con la dilución 1/10 y dilución pura de bacteriófagos, donde parece que el efecto es ligeramente mayor frente a la cepa de campo.

Algunos estudios han demostrado que matrices con a_w menor o igual a 0.93 no sustentan el crecimiento de *Salmonella*⁸. La deshidratación de las heces a 25°C podría ser el motivo por el cual no se ha aislado *Salmonella* a los 7 días en los controles positivos en ambas pruebas.

Como conclusión, el empleo de bacteriófagos contribuyó a reducir los aislamientos de *Salmonella enteritidis* en las muestras de heces a las 24h de su aplicación, por lo que podría ser considerado una herramienta de prevención. Por otro lado, la solución de bacteriófagos resulta ligeramente más eficaz frente a la cepa de campo que frente a la cepa certificada. Teniendo en cuenta los resultados obtenidos, este estudio podría complementarse reduciendo los tiempos entre los análisis, es decir, realizando el ensayo de *Salmonella* al minuto, a las 24 horas, a las 48 horas, a las 72 horas, etc. desde la inoculación. De esta forma, se evaluaría la reducción de los aislamientos de *Salmonella enteritidis* por acción de los bacteriófagos en función del tiempo durante el periodo en el que el control positivo es viable en las condiciones experimentales.

Referencias

1. Mølbak K, Neimann J. Risk factors for sporadic infection with *Salmonella enteritidis*, Denmark, 1997-1999. *Am J Epidemiol* 2002; 156: 654-61.
2. Fiorentin L, Vieira ND, Barioni W Jr. Oral treatment with bacteriophages reduces the concentration of *Salmonella enteritidis* PT4 in caecal contents of broilers. *Avian Pathol* 2005; 34: 258-63.
3. Huff WE, Huff GR, Rath NC, Donoghue AM. The potential and limitations of the development of bacteriophage therapeutics for the poultry industry. *Poultry Sci* 2013; 92: 930-4.
4. Oliveira A, Sereno R, Azeredo J. In vivo efficiency evaluation of a phage cocktail in controlling severe colibacillosis in confined conditions and experimental poultry houses. *Vet Microbiol* 2010; 146: 303-8.
5. Sereno R. Fagoterapia en Avicultura Industrial en Portugal. *Controlvet Genetics. IV Jornada de Sanidad Avícola CECAV*. 2013.
6. ISO 6579:2002. Microbiology of food and animal feeding stuffs. Horizontal method for the detection of *Salmonella* spp.
7. ISO 6579:2002/Amd. 1:2007. Microbiology of food and animal feeding stuffs. Horizontal method for the detection of *Salmonella* spp. Amendment 1: Annex D: Detection of *Salmonella* spp. in animal faeces and in environmental samples from the primary production stage.
8. D'Aoust JY. *Salmonella*. In: M. P. Doyle (Ed.) *Foodborne Bacterial Pathogens*. Marcel Dekker, Inc., New York. 1989. p. 327-445.