



ESPE
UNIVERSIDAD DE LAS FUERZAS ARMADAS
INNOVACIÓN PARA LA EXCELENCIA

**DEPARTAMENTO DE CIENCIAS DE LA VIDA Y LA
AGRICULTURA**

CARRERA DE INGENIERÍA EN BIOTECNOLOGÍA

**TRABAJO DE TITULACIÓN PREVIO A LA OBTENCIÓN DEL
TÍTULO DE INGENIERO EN BIOTECNOLOGÍA**

**TEMA: EVALUACIÓN DE PATOGENICIDAD Y USO DE
BACTERIÓFAGOS LÍTICOS COMO BIOCONTROL DE
Salmonella entérica subsp. *entérica* serovar Enteritidis EN
AVES DE CORRAL**

**AUTORES: ARIZA SUÁREZ, ROBERTO ANDRÉS,
NARANJO ESPINOSA, ANA BELÉN**

DIRECTORA: AYALA NAVARRETE, LIGIA PhD.

SANGOLQUÍ, 2017

CERTIFICACIÓN



DEPARTAMENTO DE CIENCIAS DE LA VIDA Y LA AGRICULTURA
CARRERA DE INGENIERÍA EN BIOTECNOLOGÍA

CERTIFICACIÓN

Certifico que el trabajo de titulación, “**EVALUACIÓN DE PATOGENICIDAD Y USO DE BACTERIÓFAGOS LÍTICOS COMO BIOCONTROL DE *Salmonella entérica subsp. entérica* serovar Enteritidis EN AVES DE CORRAL**” realizado por la señorita **ANA BELÉN NARANJO ESPINOSA** y el señor **ROBERTO ANDRÉS ARIZA SUÁREZ**, ha sido revisado en su totalidad y analizado por el software anti-plagio, el mismo cumple con los requisitos teóricos, científicos, técnicos, metodológicos y legales establecidos por la Universidad de Fuerzas Armadas ESPE, por lo tanto me permito acreditarlo y autorizar a la señorita **ANA BELÉN NARANJO ESPINOSA** y al señor **ROBERTO ANDRÉS ARIZA SUÁREZ** para que lo sustenten públicamente.

Sangolquí, 22 de Febrero del 2017

LIGIA AYALA NAVARRETE, PhD

DIRECTORA

AUTORÍA DE RESPONSABILIDAD



DEPARTAMENTO DE CIENCIAS DE LA VIDA Y LA AGRICULTURA

CARRERA DE INGENIERÍA EN BIOTECNOLOGÍA

AUTORÍA DE RESPONSABILIDAD

Nosotros, **ANA BELÉN NARANJO ESPINOSA**, con cédula de identidad N° 1720205234, y **ROBERTO ANDRÉS ARIZA SUÁREZ**, con cédula de identidad N° 719219584, declaramos que este trabajo de titulación “**EVALUACIÓN DE PATOGENICIDAD Y USO DE BACTERIÓFAGOS LÍTICOS COMO BIOCONTROL DE *Salmonella entérica* subsp. *entérica* serovar Enteritidis EN AVES DE CORRAL**” ha sido desarrollado considerando los métodos de investigación existentes, así como también se ha respetado los derechos intelectuales de terceros considerándose en las citas bibliográficas.

Consecuentemente declaramos que este trabajo es de nuestra autoría, en virtud de ello nos declaramos responsables del contenido, veracidad y alcance de la investigación mencionada.

Sangolquí, 22 de Febrero del 2017

ANA BELÉN NARANJO ESPINOSA

1720205234

ROBERTO ANDRÉS ARIZA SUÁREZ

1719219584

AUTORIZACIÓN**DEPARTAMENTO DE CIENCIAS DE LA VIDA Y LA AGRICULTURA****CARRERA DE INGENIERÍA EN BIOTECNOLOGÍA****AUTORIZACIÓN**

Nosotros, **ANA BELÉN NARANJO ESPINOSA** y **ROBERTO ANDRÉS ARIZA SUÁREZ**, autorizamos a la Universidad de las Fuerzas Armadas-ESPE publicar en la biblioteca Virtual de la institución el presente trabajo de titulación “**EVALUACIÓN DE PATOGENICIDAD Y USO DE BACTERIÓFAGOS LÍTICOS COMO BIOCONTROL DE *Salmonella entérica* subsp. *entérica* serovar Enteritidis EN AVES DE CORRAL**” cuyo contenido, ideas y criterios son de nuestra autoría y responsabilidad.

Sangolquí, 22 de Febrero del 2017**ANA BELÉN NARANJO ESPINOSA**

1720205234

ROBERTO ANDRÉS ARIZA SUÁREZ

1719219584

DEDICATORIA

Dedico este trabajo principalmente a Dios, quien me ha dado la fortaleza día a día para seguir adelante sin desfallecer. A mis padres, quienes con su amor y sacrificio me han dado todo el apoyo necesario cuando he atravesado por momentos difíciles.

A mi familia en general, porque nunca me han abandonado y me han permitido compartir con ellos buenos y malos momentos los cuales guardaré por siempre en mi mente y en mi corazón.

Ana Belén Naranjo Espinosa

DEDICATORIA

Dedico este trabajo a mi hijo Nicolás quien es mi fuerza, mi inspiración mi valentía para salir adelante y superarme cada día más. A mis padres, quienes con su apoyo, amor y sacrificio me han dado todo lo necesario para que siga adelante y logre mis metas.

A mis hermanos, porque me han permitido compartir con ellos buenos y malos momentos donde uno aprende apreciar cada detalle y lo convierte en la persona que es ahora.

Roberto Andrés Ariza Suárez

AGRADECIMIENTOS

Agradezco a Dios por haberme concedido la vida y por cuidarme siempre durante este arduo camino.

A mis queridos padres y hermanos, quienes han sido el pilar fundamental en mi vida y me han apoyado e impulsado siempre a conseguir mis metas cuando he estado a punto de desfallecer.

A mi directora de tesis, la Doctora Ligia Ayala, por sus grandes enseñanzas, infinita paciencia y por darme la apertura para ser parte de su grupo de investigación en los laboratorios de Ingeniería en Biotecnología de la Universidad de las Fuerzas Armadas-ESPE.

A la Doctora Marbel Torres, de quien he recibido un vasto conocimiento científico y quien ha aportado con un granito de arena para mi formación profesional.

Al Ingeniero Mario Ortiz por habernos extendido la mano y brindado su apoyo para que este proyecto sea llevado a cabo.

A todos los que conformamos el laboratorio de Virología/ Inmunología, pues hemos formado un excelente grupo de trabajo.

A mis mejores amigos Juan Francisco, Vivi, Sary, Tania, Stephanie y Dany, quienes han estado conmigo en los buenos y malos momentos.

A Beto y Mónica por haber logrado nuestro objetivo al culminar este proyecto que ha requerido de mucha perseverancia y esfuerzo.

Les agradezco a todos ustedes con toda mi alma y corazón. Gracias por estar presentes en mi vida. Los quiero mucho.

Ana Belén Naranjo Espinosa

AGRADECIMIENTOS

A mi padre quien fue mi apoyo y que ahora ya no se encuentra con nosotros, sé que desde el cielo me mira y está orgulloso porque culminé mis estudios y seguiré adelante superándome cada vez más y más.

A mi madre quien con su amor me ha impulsado para no rendirme y echarme hacia atrás. Ha sido mi pilar para que jamás me rinda y siga adelante.

A mi hijo Nicolás quien es mi todo, me llena de alegrías, y me recuerda que los sueños se hacen realidad y aunque parezca difícil jamás hay que rendirse.

A mi directora de tesis, la Doctora Ligia Ayala, por darme la apertura para ser parte de su grupo de investigación en los laboratorios de Ingeniería en Biotecnología de la Universidad de las Fuerzas Armadas-ESPE.

A la Doctora Marbel Torres, quien nos ha compartido su conocimiento científico para mi formación profesional.

A todos los que conformamos el laboratorio de Virología/ Inmunología, pues hemos formado un excelente grupo de trabajo.

A Anita por ser más que mi compañera de tesis se ha convertido en una gran amiga quien en buenos y malos momentos ha estado ahí.

Roberto Andrés Ariza Suárez

TABLA DE CONTENIDOS

CARÁTULA

CERTIFICACIÓN	ii
AUTORÍA DE RESPONSABILIDAD	iii
AUTORIZACIÓN	iv
DEDICATORIA	v
AGRADECIMIENTOS	vii
TABLA DE CONTENIDOS	ix
ÍNDICE DE FIGURAS	xiii
RESUMEN	xv
ABSTRACT	xvi
CAPÍTULO I	1
1. INTRODUCCIÓN	
1.1. Planteamiento del problema.....	1
1.2. Antecedentes	2
1.3. Justificación.....	4
1.4. Objetivos	6
1.4.1. Objetivo General	6
1.4.2. Objetivos Específicos	6
1.5. Marco teórico	6
1.5.1. Características generales de <i>Salmonella sp.</i>	6
1.5.2. Patogenicidad	7
1.5.3. Sistema inmune aviar.....	8
1.5.4. Interacciones huésped-parásito y síntomas clínicos en pollos.....	9
1.5.5. Biología de infección de Salmonellosis aviar	10
1.5.6. Pollos de engorde de raza Cobb	11
1.5.7. Bacteriófagos	12
1.5.7.1. Generalidades	12
1.5.7.2. Morfología y clasificación	13
1.5.7.3. Ciclo de replicación	14

1.5.7.4. Métodos utilizados para la detección y cuantificación de bacteriófagos.....	14
1.5.7.4.1. Spot test.....	14
1.5.7.4.2. Ensayo de doble capa.....	15
1.5.7.5. Terapia de fagos	15
1.5.8. Reacción en cadena de la polimerasa (PCR)	16
1.5.9. Hipótesis	17
1.5.9.1. Hipótesis para detección bacteriana	17
1.5.9.2. Hipótesis para biocontrol con bacteriófagos.....	17
CAPÍTULO II.....	18
2. MATERIALES Y MÉTODOS	
2.1. Participantes y zona de Estudio	18
2.1.1. Fase de laboratorio	18
2.1.2. Fase de campo	18
2.2. Período de Investigación.....	19
2.3. Procedimiento	19
2.3.1. Curva de crecimiento bacteriano para <i>Salmonella entérica</i>	19
2.3.2. Aumento de la concentración bacteriana	20
2.3.3. Animales de experimentación	21
2.3.4. Inoculación bacteriana	22
2.3.5. Prueba de flotación	23
2.3.6. Necropsia en aves y toma de muestras	24
2.3.7. Extracción y cuantificación de ADN total.....	25
2.3.8. Detección de presencia de <i>Salmonella entérica</i> mediante la técnica de diagnóstico molecular PCR	26
2.3.9. Ensayo SPOT TEST	27
2.3.10. Ensayo de doble capa.....	28
2.3.11. Enriquecimiento y escalado del cóctel de bacteriófagos líticos.....	29
2.3.12. Inoculación de <i>Salmonella entérica</i> y cóctel de bacteriófagos específicos PSEA-2.....	30
2.3.13. Detección de presencia de bacteria y bacteriófagos mediante la técnica molecular de diagnóstico PCR.....	33

2.3.14. Diseño experimental y análisis de datos	34
CAPÍTULO III.....	36
3. RESULTADOS	
3.1. Cinética bacteriana.....	36
3.2. Incremento de concentración del cóctel de bacteriófagos PSEA-2.	38
3.2.1. Estado infectivo de los bacteriófagos al inicio del experimento.....	38
3.2.2. Incremento de bacteriófagos mediante enriquecimientos	38
3.3. Experimento 1	40
3.3.1. Peso de pollos y presencia de diarrea	40
3.3.2. Evaluación de cambios superficiales en órganos.....	41
3.3.3. Caracterización molecular.....	43
3.3.3.1. Extracción y cuantificación de ADN total.....	43
3.3.3.2. Reacción en cadena de la polimerasa (PCR)	43
3.3.4. Análisis del experimento	43
3.4. Experimento 2	44
3.4.1. Peso de pollos y presencia de diarrea	44
3.4.2. Evaluación de cambios superficiales en órganos.....	45
3.4.3. Caracterización molecular.....	45
3.4.3.1. Extracción y cuantificación de ADN total.....	45
3.4.3.2. Reacción en cadena de la polimerasa (PCR)	46
3.4.4. Análisis del experimento	49
CAPÍTULO IV	52
4. DISCUSIÓN	
CAPÍTULO V	58
5. CONCLUSIONES	
CAPÍTULO VI	59
6. RECOMENDACIONES	
CAPÍTULO VII	60
7. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS	

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1	Tratamientos aplicados en pollos al día 11 después del nacimiento, grupos y vía de administración de <i>Salmonella entérica</i> subespecie <i>entérica</i> serovar Enteritidis.	23
Tabla 2	Composición de GoTaq® Green Master Mix	26
Tabla 3	Composición para un volumen de reacción de 20 uL para 40 muestras de hígado e intestino (Fase bacteria)	26
Tabla 4	Perfil térmico utilizado para amplificación (ST11/ST11).....	27
Tabla 5	Tratamientos aplicados a pollos, grupos y vía de administración de bacteriófagos y <i>Salmonella entérica</i> subespecie <i>entérica</i> serovar Enteritidis	30
Tabla 6	Composición para un volumen de reacción de 20 uL para 32 muestras de hígado e intestino (Fase bacteriófago)	33
Tabla 7	Perfil térmico utilizado para amplificación (HoMyP2F/HoMyP2R)..	34
Tabla 8	Valores de absorbancia, UFC´s y concentración bacteriana con <i>Salmonella entérica</i> durante el intervalo de 5 horas.	36
Tabla 9	Valores de densidad óptica de los cultivos bacterianos con (CF) y sin (SF) bacteriófagos después de 24 horas de incubación, de los enriquecimientos 1, 2 y 3.....	38
Tabla 10	Evaluación conjunta de cambios superficiales en hígado e intestino después del sacrificio de las aves. (Experimento 1). Promedio de cuatro observaciones donde se evaluó presencia/ausencia del síntoma.	42
Tabla 11	Evaluación conjunta de cambios superficiales en hígado e intestino después del sacrificio de las aves (Experimento 2). Promedio de cuatro observaciones donde se evaluó presencia/ausencia del síntoma.....	45

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1 Raza de pollos Cobb-500.	12
Figura 2 Morfotipos de virus de procariotas.....	13
Figura 3 Pollos de engorde de raza Cobb 500 de 1 día de nacimiento.	22
Figura 4 Necropsia: apertura de cavidad torácico-abdominal de aves de corral inoculadas con bacteria <i>Salmonella entérica</i>	25
Figura 5 Relación Absorbancia vs. UFC/mL con <i>Salmonella entérica</i>	37
Figura 6 Relación Absorbancia vs. Tiempo con <i>Salmonella entérica</i>	37
Figura 7 Spot test con un cultivo bacteriano de <i>Salmonella entérica</i> y el cóctel de bacteriófagos PSEA-2.....	39
Figura 8 Doble capa de la muestra de bacteriófagos líticos liofilizados	40
Figura 9 Cambio de coloración en hígado	41
Figura 10 Cambio de coloración en patas	41
Figura 11 Presencia de inflamación en intestino del animal del grupo que recibió la dosis media GO4.2H	42
Figura 12 Gráfico estadístico de componentes principales CPA para la primera fase experimental; correlación de variables presencia de diarrea, inflamación de intestino y daño hepático.	44
Figura 13 Inoculación vía oral en la segunda fase experimental. Productos de PCR para el par de primers ST11 y ST15 específicos para <i>Salmonella entérica</i> subespecie <i>entérica</i> serovar Enteritidis utilizando ADN de hígado..	46
Figura 14 Inoculación vía oral en la segunda fase experimental. Productos de PCR para el par de primers ST11 y ST15 específicos para <i>Salmonella entérica</i> subespecie <i>entérica</i> serovar Enteritidis utilizando ADN de intestino	47
Figura 15 Inoculación vía oral en la segunda fase experimental. Productos de PCR para el par de primers HoMyP2F/HoMyP2 utilizando ADN de hígado	48

Figura 16 Inoculación vía oral en la segunda fase experimental. Productos de PCR para el par de primers HoMyP2F/HoMyP2 utilizando ADN de intestino.	49
Figura 17. Gráfico estadístico de componentes principales CPA para la segunda fase experimental; correlación de variables presencia de diarrea, inflamación de intestino y daño hepático.	50

RESUMEN

Salmonella entérica subsp. *entérica* serovar Enteritidis, es causante de cuantiosas pérdidas económicas a nivel mundial debido al alto índice de mortalidad que ocasionan en aves de corral y a la alta incidencia de intoxicación por alimentos en humanos. Actualmente en la industria avícola se promueven diversas medidas de prevención y control para evitar la colonización e infección bacteriana. En este trabajo realizado en aves sexadas Cobb-500 infectadas, se utilizó un cóctel de bacteriófagos líticos específicos contra *Salmonella entérica* como método de biocontrol. Se emplearon dos fases de experimentación. En la primera fase, se determinó la patogenicidad de la bacteria y la mejor concentración para causar enfermedad. En la segunda fase, se trabajó con 80 pollos, 10 pollos por cada tratamiento: que consistieron en aplicaciones de bacteria y bacteriófagos a diferentes tiempos con el fin de determinar la mejor época de aplicación de los virus para un mejor control de la bacteria. Tanto en la primera como la segunda fase, se evaluó el estado físico, peso y presencia de diarrea en los animales a las 1,2 y 3 semanas post inoculación. En la primera fase se determinó que las tres concentraciones bacterianas empleadas 10^9 , 10^8 y 10^7 UFC/ml fueron efectivas para causar infección. La concentración de bacteriófagos y de bacteria empleada en la segunda fase fueron de 10^{10} UFP/mL y 10^8 UFC/ mL respectivamente, obteniendo que la aplicación con bacteriófagos un día después de la infección con bacterias mostro una mejor efectividad como control bacteriano. La presencia de bacteria y bacteriófagos en órganos (hígado e intestino) se confirmó mediante la técnica molecular de diagnóstico PCR.

PALABRAS CLAVE

- BIOCONTROL
- BACTERIÓFAGO
- BACTERIA
- AVES

ABSTRACT

Salmonella enterica subsp. *Enteric* serovar Enteritidis, is causing economic losses worldwide due to the high mortality in poultry and the high incidence of food poisoning in humans. Actually in the poultry industry various prevention and control measures are promoted to prevent bacterial colonization and infection. In this work in birds sexed Cobb-500 infected experimentally in the shed of poultry production installation of the experimental farm IASA-I, a cocktail of specific lithic bacteriophages for *Salmonella enterica* as a biocontrol method. Two experimental phases were used. In the first phase, to determined pathogenicity of the bacteria and the best concentration to cause disease. In the second phase, we worked with 80 chickens, 10 chickens for each treatment: they consisted of bacterial and bacteriophage applications at different times in order to determine the best time of application of the virus for a better control of the bacteria. In both the first and second phases, the physical status, weight and presence of diarrhea were evaluated in the animals at 1, 2 and 3 weeks after inoculation. In the first phase it was determined that the three bacterial concentrations used 10^9 , 10^8 and 10^7 CFU / ml were effective to cause infection. The concentration of bacteriophages and bacteria used in the second phase were 10^{10} PFU / mL and 10^8 UFC / mL respectively, the application with bacteriophages one day after infection with bacteria showed a better effectiveness as a bacterial control. The presence of bacteria and bacteriophages in organs (liver and intestine) were identified by molecular diagnostic PCR.

KEYWORDS

- BIOCONTROL
- BACTERIOPHAGE
- BACTERIUM
- BIRDS

CAPÍTULO I

1. INTRODUCCIÓN

1.1. Planteamiento del problema

Las enfermedades causadas por *Salmonella* sp., se encuentran ampliamente distribuidas en aves de corral de todas las edades y categorías. *Salmonella entérica*, es considerada una de las principales causas de las enfermedades transmitidas por alimentos y su incidencia ha aumentado significativamente durante los últimos años. Se estima que afecta anualmente a decenas de millones de personas de todo el mundo ya que éstas bacterias son contaminantes secundarios de los alimentos de origen animal. Generalmente la presencia de bacterias en los alimentos, es el resultado de una infección previa de los animales de abasto y provocan la contaminación de los productos de consumo humano (OMS, 2013).

Durante los últimos años se han reportado cepas de *Salmonella* resistentes a antibióticos como ampicilina, sulfonamidas y tetraciclinas que constituyen un problema de salud pública. Un estudio realizado en Estados Unidos con una cepa de *Salmonella entérica*, mostró resistencia al ácido nalidíxico que representa la estructura base a partir del cual se ha desarrollado una familia de antibióticos denominada quinolonas que son de amplio espectro antimicrobiano. Por tal motivo el uso de antibióticos hoy en día ya no es una forma de control efectiva. Actualmente se ha intensificado la búsqueda e implementación de nuevas técnicas de control que permitan contrarrestar la propagación y brote bacteriano ya que la posibilidad de que se genere resistencia bacteriana por el uso de antibióticos es alta (CDC, 2013).

Un método eficiente para el control de bacterias, es el uso de bacteriófagos. La primera aplicación de bacteriófagos como agente terapéutico fue en 1917 para combatir la disentería bacteriana provocada por

una enterobacteria del género *Shigella*. El uso exitoso de esta innovadora técnica de control, llevó a la creación de varias empresas en Alemania, Francia y Estados Unidos que se dedicaron a la producción y comercialización de preparaciones de fagos a partir de cultivos lisados de la bacteria diana. La fagoterapia tuvo su auge hasta los años 30 y tras la Segunda Guerra Mundial su uso como método de biocontrol comenzó a disminuir tras el descubrimiento de los antibióticos (Kutateladze & Adamia, 2010).

Los bacteriófagos líticos fueron empleados como una alternativa para el control de enfermedades bacterianas por muchos años, sin embargo no han sido lo suficientemente explotados debido a que se contaba con un fácil acceso a antibióticos. En esta era en la que los antibióticos no son una alternativa viable, los bacteriófagos están entre las pocas opciones que pueden proporcionarnos alimentos sanos, libres de agroquímicos, constituyen un sistema específico de biocontrol, son ecológicamente seguros y su producción es de bajo costo comparado con el uso de antibióticos.

1.2. Antecedentes

Salmonella entérica subsp. *entérica* serovar Enteritidis es una bacteria patogénica cuyo grado de importancia es elevado tanto en salud pública como en salud animal debido al impacto económico que ocasiona especialmente en la industria avícola (Figueroa & Rodriguez, 2005). En el mundo, las primeras infecciones reportadas por *Salmonella entérica* se registran en la década de los 80, extendiéndose de forma progresiva y provocando así, una gran preocupación mundial por el aumento de cepas multiresistentes que dificultan su abordaje terapéutico (Fica, Alexandre, Fernández, Fernández, Prat, & Heitmann, 2001).

Actualmente los alimentos elaborados para animales, tienen incorporados dentro de su formulación prebióticos como medida de prevención contra enfermedades, dichos componentes benefician al huésped debido a una estimulación selectiva del crecimiento de bacterias

benéficas a nivel intestinal (Heres, Engel, Urlings, & F., 2004), sin embargo, a pesar de la existencia de tales de mecanismos de prevención, no todos los animales son manejados bajo estas condiciones, de hecho, la mayoría de animales son manejados bajo entornos caseros y en condiciones sanitarias dudosas que los vuelve susceptibles a enfermedades.

El control de enfermedades se hace generalmente con antimicrobianos, los mismos que no son utilizados solamente como terapia para determinadas patologías, sino que los productores las emplean rutinariamente como parte del programa de prevención junto con el alimento de las aves. Además, su uso excesivo permite que las bacterias desarrollen resistencia. Datos que lo confirman es la aparición de cepas multiresistentes como la *Salmonella Typhimurium* DT104. En Ecuador la aplicación de antibióticos como primera alternativa de tratamiento es utilizada habitualmente, por lo que es de primordial interés incrementar la investigación de terapias alternativas como por ejemplo de fagos (Heres, Engel, Urlings, & F., 2004).

En los años 1915 y 1917, el inglés Frederick Twort bacteriólogo y el microbiólogo francocanadiense Félix d'Herelle, reportaron el aislamiento de entidades con potencial antibacteriano presumiendo que podían ser virus, pero es Félix d'Herelle el que confirma esta hipótesis y nombró a estas entidades como bacteriófagos de estructura simple, compuestos de proteínas y ácidos nucleicos. Al inicio, los fagos líticos se utilizaron como agentes terapéuticos y fue en el año de 1919 cuando se comprobó su eficacia frente a disentería por *Shigella* spp en un Hospital Pediátrico Francés (Sulakvelidze, Alavidze, & Morris, 2001). A pesar de los múltiples esfuerzos realizados para generalizar el uso de virus como agentes terapéuticos, éstos se fueron olvidando debido al descubrimiento de los antibióticos y al desconocimiento de la biología de los bacteriófagos.

En la actualidad, se conoce que los fagos solo reconocen células bacterianas, ya que presentan especificidad de receptores superficiales que solo están en las bacterias lo que les hace buenos candidatos para un tratamiento más efectivo, innovador, menos dañino para el hospedero y

eficiente para el control de bacterias patógenas (Gaviria, Biol, & González, 2011).

1.3. Justificación

Los microorganismos están presentes en todos los hábitats tales como agua, suelo, aire, incluso en el ser humano y en todos los seres vivos de los que el hombre se alimenta. De hecho, cualquier producto alimenticio, transformado o no, que el hombre consume, puede estar contaminado con microorganismos (Chai, y otros, 2012).

La salmonelosis es una enfermedad zoonótica causante de grandes pérdidas económicas a nivel mundial, puesto que tiene un alto índice de morbilidad y mortalidad. Es, además, una de las enfermedades transmitidas por alimentos (ETAS) más comunes y agresivas. En el Ecuador, se reportaron 9.908 casos de salmonelosis en el año 1990; para el año 2001 la cifra aumentó súbitamente a 18.772; sin embargo, esta cifra ha ido disminuyendo paulatinamente, registrándose en 2013 solamente 5.972 casos. Según estudios de población avícola realizados por CONAVE, desde 1990 hasta el 2012 se ha producido un incremento del consumo de carne de pollo de 360%, mientras que el consumo de huevos ha tenido un crecimiento de alrededor del 60%. Este incremento en el consumo de carne de pollo, está relacionado con la diseminación de enfermedades producidas por *Salmonella* por ello se extiende la búsqueda de nuevas estrategias de biocontrol que sean efectivas, y altamente específicas (Dirección Nacional de Vigilancia Epidemiológica, 2015).

Uno de los puntos importantes dentro del manejo de enfermedades, es el diagnóstico y detección del agente causal. Una vez conocido el agente causal, se requiere conocer las condiciones de experimentación que permitan establecer un buen sistema para el desarrollo de métodos eficientes de control. En el caso de *Salmonella sp.*, es necesario conocer la dosis bacteriana que puede causar infección en el animal, estableciéndose de esta manera, un umbral que de una pauta para su control. En aves de

corta edad, una determinada concentración de bacterias puede producir mortalidad y disminución de la eficiencia productiva en aves adultas (Dirección Nacional de Vigilancia Epidemiológica, 2015).

Las enfermedades bacterias han sido tradicionalmente controladas con antibióticos, lo que a la larga ha presentado inconvenientes debido a que estos químicos no son específicos, pueden actuar contra varios grupos de organismos o bacterias benéficas que cumplen funciones específicas dentro de sus hospederos ocasionando problemas al individuo (Chai, y otros, 2012).

El abuso de químicos a más de la toxicidad, ha generado la selección de nuevas cepas de bacterias resistentes a antibióticos, ya que la bacteria busca de todas formas subsistir. Al ser resistentes, estas pueden encontrarse en la heces que sirven de abono para otros cultivos y así propagarse con mayor facilidad a otros hospederos. Es por ello que una forma de controlar bacterias patógenas sin utilizar antibióticos y sin ocasionar daño al hospedero ni a su microflora, es el uso de virus que atacan a bacterias, comúnmente conocidos como bacteriófagos. Los bacteriófagos son parásitos obligados altamente específicos que cumplen con la función de infectar, parasitar y matar a la bacteria sin disturbar a otros tipos de bacteria benéficas presentes en el hospedero (Chai, y otros, 2012).

En el Ecuador, el uso de antibióticos como medida preventiva en la crianza de animales de granja, ha generado, en el caso de aves de corral, un incremento en el desarrollo bacterias resistentes. Por tal motivo la búsqueda de nuevos métodos para el biocontrol de bacterias infecciosas, sin la intervención de antibióticos, es una necesidad en nuestro país. El desarrollo de técnicas de biocontrol empleando bacteriófagos, brindaría alternativas seguras y sanas para combatir bacterias patógenas, siendo este estudio altamente beneficioso.

1.4. Objetivos

1.4.1. Objetivo General

- Establecer la dosis letal de *Salmonella entérica* subsp. entérica serovar Enteritidis y su biocontrol por medio de bacteriófagos líticos en aves de corral.

1.4.2. Objetivos Específicos

- Determinar la concentración bacteriana necesaria para causar enfermedad en pollos.
- Verificar la presencia de la bacteria en diferentes órganos post inoculación por medio de PCR.
- Determinar la eficiencia de la aplicación de bacteriófagos líticos específicos en pollos infectados con *Salmonella*.
- Verificar la presencia de los bacteriófagos líticos en órganos de pollos inoculados, por medio de PCR.

1.5. Marco teórico

1.5.1. Características generales de *Salmonella sp.*

El género *Salmonella* está formado por bacilos Gram negativos anaerobios facultativos no esporuladores pertenecientes a la familia Enterobacteriaceae (Caffer, Terragno, & Binsztein, 2008). *Salmonella entérica* es un enteropatógeno que se encuentra frecuentemente involucrado en brotes de infección transmitidos por alimentos de origen aviar (Borie, Zurita, Sánchez, Rojas, Santander, & Robeson, 2008).

Este género bacteriano se divide en dos especies: *Salmonella bongori* y *Salmonella entérica*, siendo esta última la de mayor importancia sanitaria. *Salmonella entérica* spp. a su vez, se divide en 6 subespecies: *entérica* (I), *salamae* (II), *arizonae* (IIIa), *diarizonae* (IIIb), *houtenae* (IV) e *indica* (VI). La subespecie entérica habitualmente se encuentra en animales de sangre caliente mientras que las subespecies II, IIIa, IIIb, IV and VI generalmente se

encuentran en animales de sangre fría y en el medio ambiente; sin embargo, todas estas pueden infectar a los seres humanos (Public Health Agency of Canada, 2011).

Como todas las enterobacterias, *Salmonella* sp. tiene tres tipos de antígenos: somático (O), flagelar (H) y de envoltura (Vi). Los antígenos O, son termoestables y su especificidad se basa en el componente polisacárido de la endotoxina. El antígeno H, es un antígeno flagelar proteico y termolábil. Este antígeno permite la movilidad bacteriana. Finalmente, el antígeno Vi es un antígeno capsular, el cual está relacionado con la virulencia del microorganismo (Ricci-Tam, 2008).

La mayoría de las bacterias incluidas la subespecie entérica presentan un conjunto de características metabólicas que incluye la fermentación de glucosa con producción de gas, fermentación de manitol, sorbitol y otros carbohidratos, pero no lactosa ni sacarosa. Utilizan habitualmente citrato como única fuente de carbono, pero no malonato, lo que la diferencia de otras subespecies como arizonae. Su fermentación es de tipo ácido mixta, con reacción negativa de Voges-Proskauer. Son en general productoras de ácido sulfhídrico, hidrolizan urea y fenilalanina y además reducen el nitrato a nitrito (Kumar, 2012).

Las bacterias pertenecientes a este género tienen la capacidad de crecer en un rango de temperatura entre 7- 49°C; sin embargo, algunos serotipos pueden crecer a 5,9 °C dependiendo del medio de cultivo donde se inocula. A temperaturas menores a 15 °C existe una reducción en el crecimiento bacteriano. Por otro lado, *Salmonella* puede crecer a un pH que varía entre 4 y 9; la tolerancia al ácido va a depender del tipo y tamaño del ácido al cual se expone el microorganismo (UERIA, 2011).

1.5.2. Patogenicidad

Salmonella sp. cuenta con cinco islas de patogenicidad, siendo las más importantes las islas SPI-1 y SPI-2. La isla de patogenicidad SPI-1 se encarga de promover la invasión de las células epiteliales intestinales, iniciar la respuesta inflamatoria en el tracto intestinal y además juega un rol

importante en la supervivencia bacteriana a nivel del hospedero. Por otra parte, está la isla de patogenicidad SPI-2, ésta es la encargada de la supervivencia y replicación bacteriana en los compartimentos intracelulares de los fagocitos, desde donde se diseminará la bacteria sistémicamente en los órganos del hospedero (Figuroa & Verdugo, 2005).

El mecanismo de patogenicidad involucra a varios genes que intervienen en la invasión, apoptosis de macrófagos y activación de cascadas de fosforilación dependientes de MAP cinasas y debido a la regulación coordinada de estos genes de virulencia, *Salmonella* sp. logra adaptarse a cambios ambientales que se den durante el proceso infeccioso. En lo que respecta a los mecanismos de adherencia, las bacterias poseen proteínas específicas denominadas adhesinas que les permiten reconocer receptores específicos para cada una de ellas. Las adhesinas tienen la capacidad de activar a los linfocitos B y neutrófilos, lo que resulta en una variedad de respuestas biológicas incluyendo proliferación celular y secreción de citosinas (Figuroa & Verdugo, 2005).

De manera general, las adhesinas de bacterias Gram negativas son: fimbria, fibrilla, flagelo, lipopolisacárido (LPS) y cápsula. Después de la infección bacteriana, *Salmonella* inicia su ciclo de infección invadiendo al hospedero a través de tejido linfoide y se adhiere a las células epiteliales del íleon y a las células M (Figuroa & Verdugo, 2005).

1.5.3. Sistema inmune aviar

El sistema inmunitario se puede dividir en dos partes principales: el innato o no específico y los componentes adaptativos o específicos. El sistema inmune innato es el principal reto para los patógenos invasores, mientras que el sistema inmune adaptativo proporciona una mayor protección al individuo, además genera memoria inmunológica permitiendo una respuesta más rápida frente al patógeno invasor. En lo que respecta a los componentes inmunológicos, se incluyen a las células fagocíticas y al sistema de complemento que componen el sistema inmune innato. Por otro

lado, se incluye a la capa de piel como la principal barrera física a la infección. La interacción de sistema innato y adaptativo incluyendo diferentes tipos de células y moléculas tales como citoquinas y anticuerpos constituyen de forma general la inmunidad del huésped (Hurley, McCusker, Fanning, & Martins, 2014).

Los leucocitos del sistema inmune innato incluyen a las células fagocíticas, células dendríticas, macrófagos y neutrófilos los mismos que pueden fagocitar antígenos o patógenos extraños. Estas células fagocíticas son reclutadas después de la liberación de señales de citoquinas específicas (Hurley, McCusker, Fanning, & Martins, 2014).

En cuanto a la fisiología de la bacteria en los diversos órganos, *Salmonella sp.* puede atravesar la barrera epitelial por transporte pasivo facilitado por las células dendríticas. Al llegar a la parte inferior del intestino, las bacterias se adhieren a la membrana de la mucosa e invaden las células epiteliales. Uno de los sitios específicos donde esto ocurre, es en las células de las placas de Peyer que se ubican en el intestino delgado, sitio en donde la bacteria se transloca a través de la barrera epitelial hacia los folículos subyacentes y los ganglios linfáticos del tejido linfoide. Cabe mencionar que, durante la etapa de infección, se puede dar lugar a infecciones secundarias debido a la difusión bacteriana a otros órganos como el hígado y el bazo (Hurley, McCusker, Fanning, & Martins, 2014).

1.5.4. Interacciones huésped-parásito y síntomas clínicos en pollos

Salmonella sp., invade las células fagocíticas y no fagocíticas incluyendo las células presentes en los folículos linfoides, el hígado y el bazo. Las células epiteliales, células dendríticas, neutrófilos y macrófagos identifican patrones moleculares asociados a patógenos (PAMP) tales como ADN bacteriano, flagelos y LPS. Por otro lado, los receptores de reconocimiento de patrones (RRP) que incluyen NLRs Y TLRs comprenden los primeros componentes del sistema inmune que funcionan para detectar los patógenos invasores (Hurley, McCusker, Fanning, & Martins, 2014).

La interacción entre *Salmonella* y su huésped depende de varios factores que incluyen a los antecedentes genéticos del huésped. Actualmente se han reportado estudios en los que existen diferencias significativas entre diversas líneas de aves en el nivel de colonización del tracto gastrointestinal. Otro aspecto a considerar es la edad de infección en aves, puesto que la salmonelosis en pollos jóvenes se caracteriza por los signos clínicos graves de enfermedad sistémica asociado con diarrea, deshidratación y alta tasas de mortalidad, mientras que pollos adultos pueden producir huevos contaminados con *Salmonella* sin evidencia de enfermedad (Omwandho & Kubota, 2010).

1.5.5. Biología de infección de Salmonellosis aviar

La Salmonellosis aviar se ha clasificado en cuatro grupos dependiendo de los síntomas presentes en aves:

- *S. pollorum*: las aves que la padecen, presentan diarrea con uratos blancos. El período de incubación es de 7 a 10 días.
- *S. gallinarum*: causa fiebre tifoidea en pollos. El período de incubación de la bacteria es de 4 a 5 días.
- Infección paratifoide: causada por alrededor de 150 especies de *Salmonella*. Esta enfermedad se produce especialmente por *Salmonella typhimurium* y *Salmonella enteritidis*. El período de incubación es de 5 días.
- *S.arizonae*: De similares características que la infección paratifoide. Esta enfermedad es rara en pollos, pero se transmite con mayor proporción en pavos (Gail, 1994).

El desarrollo de Salmonelosis en aves involucra tres fases, cada una de ellas posee una interacción significativa con el sistema inmune. Como se detalla a continuación:

Primera fase: en esta fase se desarrolla la invasión bacteriana a través de tracto gastrointestinal. *Salmonella* invade la vía oral-fecal a través de las placas de Peyer y las células M ubicadas en el íleon. La infección gastrointestinal induce enteritis en varias especies a través de la

combinación de las acciones realizadas por los efectores de la isla de patogenicidad SP-1, reconocimiento de los flagelos y LPS bacterianos a través de los receptores Toll-like y reconocimiento de receptores específicos. Esta infección induce una respuesta pro-inflamatoria mediada por citoquinas y quimioquinas que conduce al reclutamiento de neutrófilos (Chappell, Kaiser, Barrow, Jones, Jhonston, & Wigley, 2009).

Segunda fase: tras la invasión de *Salmonella*, las bacterias son tomadas por los macrófagos o células dendríticas y son transportadas a través del sistema linfático para la progresión de la infección sistémica en aves. Por otro lado, se da la intervención de la isla de patogenicidad SPI-2, ésta inyecta sus efectores dentro de la vacuola fagocítica de los macrófagos efectuando la secreción de citoquinas. Si no existe supervivencia de la bacteria dentro de los macrófagos, se produce una atenuación de la infección a nivel sistémico (Chappell, Kaiser, Barrow, Jones, Jhonston, & Wigley, 2009).

Tercera fase: en esta etapa, la infección puede ser borrada por la respuesta inmune, el ave puede morir tras la infección o puede desarrollar un estado de portador. Tras el establecimiento de la infección sistémica, si la replicación bacteriana no se controla, se conduce a una serie de lesiones en los órganos infectados, se da un progreso de anemia y septicemia que causa hemorragia, infiltración inflamatoria masiva y ulceración de la pared intestinal. La progresión a esta etapa por lo general resulta en la muerte del animal a los 6-10 días después de la infección. Por otro lado, en lo que respecta al estado persistente se puede mencionar que éste es menos frecuente y resulta del desarrollo de pequeños nichos bacterianos dentro de células específicas (Chappell, Kaiser, Barrow, Jones, Jhonston, & Wigley, 2009).

1.5.6. Pollos de engorde de raza Cobb

Los pollos de engorde Cobb, se caracterizan por su plumaje blanco, poseen alta eficiencia en términos de conversión alimenticia y elevadas

tasas de crecimiento (Figura 1). En la industria avícola se ha optado por la crianza y manejo de pollos con estas características que comparados con otras razas como Ross ofrecen mayor producción de carne y rendimiento. En el mercado existen tres variedades comerciales: Cobb-500, Cobb-700, y CossSasso (Pronavícola, 2012); (Navas & Maldonado, 2009). En el Anexo 1 se detallan las condiciones de manejo de pollos.



Figura 1. Raza de pollos Cobb-500.
Fuente: (Pronavícola, 2012)

Entre las principales características que poseen los pollos COBB-500 se puede mencionar las siguientes:

- Presentan alta viabilidad.
- Poseen una alta tasa de conversión alimenticia.
- Se adaptan fácilmente a variaciones climáticas.
- Poseen altas tasas en ganancia de peso (Navas & Maldonado, 2009).

1.5.7. Bacteriófagos

1.5.7.1. Generalidades

Los bacteriófagos también denominados “fagos” son virus especializados que infectan a las bacterias. Habitan en todos los sistemas

biológicos siendo los más abundantes del planeta. Son frecuentemente aislados de ambientes acuáticos y/o sedimentos o tierra (Salas, 2014).

1.5.7.2. Morfología y clasificación

Su morfología consiste de una cápside proteica y un tipo de ácido nucleico, ADN o ARN. La conformación y organización proteica de sus cápsides les confiere la habilidad de permanecer viables por largos períodos de tiempo en el ambiente en condiciones adversas (Segundo & Torres, 2010).

Los fagos se clasifican de acuerdo a sus características morfológicas, el tipo de ácido nucleico, forma de cápside, presencia o ausencia de envoltura lipídica del hospedero (Gómez & Vives, 2009). Existen 14 familias de virus de procariontas aceptadas y 5 familias que aún no poseen clasificación (Figura 2) (Ackermann H. , 1998).

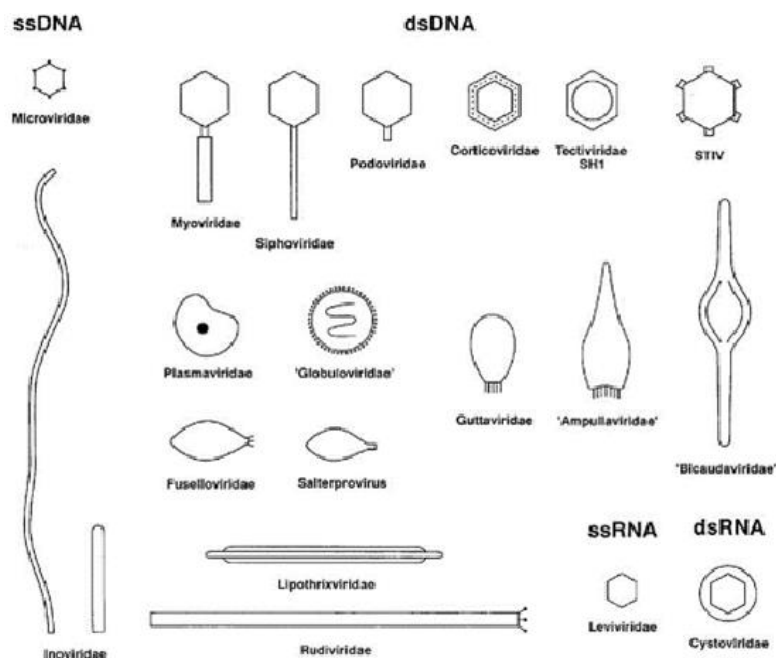


Figura 2. Morfotipos de virus de procariontas
Fuente: (Ackermann H. , 1998).

1.5.7.3. Ciclo de replicación

La primera fase del ciclo de replicación de un bacteriófago es la adsorción permitiéndole reconocer y fijarse a receptores específicos como proteínas o carbohidratos presentes en la cápsula, pared celular, flagelo, pilis de la superficie de la bacteria hospedadora, en segunda fase se genera la inyección del material genético viral provocando un ciclo lítico o uno lisogénico el cual depende de las condiciones en que se encuentre (Hendrix, Bacteriophage genomics, 2003).

Ciclo lítico: El fago ocupa la maquinaria de la bacteria huésped para replicar su material genético y sintetizar proteínas estructurales. Lo que conlleva al ensamblaje de nuevas partículas virales y liberación de éstas por lisis del hospedero, la bacteria (Gaviria, Biol, & González, 2011).

Ciclo lisogénico: el material genético del bacteriófago se integra al cromosoma bacteriano provocando que su ADN “profago”, se replique en el interior de la célula junto con el genoma bacteriano. Esto no produce la muerte de la bacteria huésped hasta que se da inducción del ciclo lítico (Gaviria, Biol, & González, 2011).

1.5.7.4. Métodos utilizados para la detección y cuantificación de bacteriófagos

1.5.7.4.1. Spot test

Spot test es un método empleado para determinar la presencia y actividad de bacteriófagos. Para su detección, pequeñas gotas de bacteriófagos se colocan sobre una placa preparada con la cepa bacteriana a ensayar. Esta prueba, además es utilizada en estudios de aislamiento y caracterización de bacteriófagos en los que se comprueba la capacidad de lisar otros huéspedes para evaluar el rango de hospedero utilizando colecciones bacterianas variadas (Khan Mirzaei & Nilsson, 2015).

1.5.7.4.2. Ensayo de doble capa

El ensayo de doble capa, es un método clásico empleado para la cuantificación de bacteriófagos que se basa en la detección de sus efectos sobre sus bacterias huéspedes. Se deposita una capa de agar semi-sólido que contiene la mezcla de bacterias huéspedes y bacteriófagos sobre una capa de agar sólido. La cuantificación de los bacteriófagos se realiza mediante el conteo de las unidades formadoras de placa (UFP) originadas por la acción lítica del bacteriófago o grupo de bacteriófagos sobre la bacteria huésped (Clokier & Kropinski, 2009).

1.5.7.5. Terapia de fagos

En los últimos años, han aparecido bacterias resistentes a los antibióticos, por lo que la fagoterapia ha retomado interés en el ámbito científico. Uno de los Países que ha utilizado la terapia de fagos fue la Unión Soviética desde la década de 1940 como alternativa a los antibióticos teniendo excelentes resultados. En el año 2006 la FDA de Estados Unidos aprobó como alternativa de tratamiento el uso de bacteriófagos en ciertas carnes para acabar con la bacteria *Listeria monocytogenes* (Hausler, 2006).

La fagoterapia representa una alternativa segura, confiable y específica con un alto grado de eficacia para el control de bacterias patógenas resistentes a antibióticos debido a la especificidad hacia el huésped, el uso de una sola dosis efectiva y la facilidad de encontrar nuevos fagos para bacterias fago-resistentes (Gomez & Vives, 2009).

En la fagoterapia existen algunos parámetros a ser considerados para analizar la eficacia y evitar inconvenientes al utilizar bacteriófagos *in vivo* e *in vitro*. Dependiendo del sitio de infección y la vía de administración los bacteriófagos tendrán una alta o baja capacidad de translocación y llegada al lugar de infección. Una vía de administración sencilla es la vía oral mediante la ingesta de alimento y agua de bebida. El título viral de inoculación de fagos debe ser igual o mayor a 10^9 UFP/ml debido a que se han realizado estudios en los que se muestra alta sensibilidad de bacteriófagos a

condiciones de pH bajo (Tsonos, Vandenneuvel, Briers, De Greve, Hernalsteens, & Lavigne, 2013).

Al emplear bacteriófagos como biocontrol, se debe estimar el tiempo de inoculación. Si el patógeno es demasiado virulento, la terapia de fagos en animales puede ser fallida ya que el animal puede morir antes de que los bacteriófagos ejerzan su acción lítica debido a la producción de toxinas y daños histológicos. (Tsonos, Vandenneuvel, Briers, De Greve, Hernalsteens, & Lavigne, 2013).

1.5.8. Reacción en cadena de la polimerasa (PCR)

La reacción en cadena de la polimerasa es un ensayo simple que permite obtener varias copias de un fragmento de ADN, utilizando un mecanismo de replicación *in vitro* que incluye el desenrollamiento del ADN bicatenario, formación de ADN monocatenario, duplicación y enrollamiento del ADN (Somma & Querci, 2010).

Cada ensayo de PCR requiere la presencia de un ADN molde, cebadores, nucleótidos y ADN polimerasa. El ADN polimerasa es la enzima clave que enlaza nucleótidos individuales para formar el producto de PCR. Los nucleótidos incluyen a las bases adenina, timina, citosina y guanina (A, T, C, G) que se encuentran en el ADN (Garibyan & Avashia, 2013).

Los cebadores son fragmentos de ADN corto que delimitan la secuencia que se desea amplificar y son complementarios a ésta. Por lo general, su tamaño oscila entre 15-25 pares de bases y la cantidad de G-C no debe ser más del 55% de la secuencia, caso contrario, se podrían formar dímeros de primers, es decir, productos inespecíficos (Garibyan & Avashia, 2013). La reacción en cadena de la polimerasa, básicamente es un proceso que se lleva a cabo en un ciclo repetitivo de tres fases:

Desnaturalización de ADN: es la separación de las dos cadenas que conforman esta molécula. Esta etapa se lleva a cabo elevando la temperatura a alrededor de 94°C.

Hibridación: los cebadores específicos se unen por complementariedad al ADN molde al descender la temperatura.

Elongación o extensión: consiste en la incorporación de nucleótidos complementarios, por parte de la enzima polimerasa a partir del extremo 3' (Garibyan & Avashia, 2013).

1.5.9. Hipótesis

1.5.9.1. Hipótesis para detección bacteriana

Existe diferencia significativa en el efecto que provocan diferentes concentraciones bacterianas en aves de corral.

1.5.9.2. Hipótesis para biocontrol con bacteriófagos

Existen diferencias significativas en el control de *Salmonella entérica* en aves de corral aplicando bacteriófagos a diferentes tiempos.

CAPÍTULO II

2. MATERIALES Y MÉTODOS

2.1. Participantes y zona de Estudio

El presente proyecto fue financiado por el Laboratorio de Virología-Inmunología de la carrera de Ingeniería en Biotecnología de la Universidad de las Fuerzas Armadas – ESPE y se llevó a cabo en dos fases:

2.1.1. Fase de laboratorio

El trabajo de laboratorio para el manejo de las bacterias y los fagos, se realizó en el laboratorio de Virología/ Inmunología perteneciente a la Carrera de Ingeniería en Biotecnología de la Universidad de las Fuerzas Armadas- ESPE, que se ubica en Sangolquí, Cantón Rumiñahui, provincia de Pichincha. La investigación es parte del proyecto llevado a cabo por el laboratorio de Virología/Inmunología para el desarrollo de un método de biocontrol de *Salmonella enterica* en aves de corral.

Las cepas bacterianas con antecedentes patogénicos y el coctel de bacteriófagos específicos fueron los mismos utilizados en los estudios *in vitro* realizados por Quiroz *et al.* (2015).

2.1.2. Fase de campo

El trabajo de campo se dividió en dos experimentos:

- Manejo de las condiciones experimentales óptimas para infectar aves de corral con *Salmonella entérica*.
- Control de *Salmonella entérica* utilizando bacteriófagos líticos.

Los dos experimentos se realizaron en el galpón avícola de la granja experimental del IASA-I Hacienda “El Prado”, localizada en el Cantón Rumiñahui, Provincia de Pichincha.

2.2. Período de Investigación

El proyecto fue realizado en un período de once meses, comenzando con el manejo de bacterias y virus en laboratorio seguidos por la inoculación de los microorganismos en sus hospederos. Esta fase se inició en enero del 2016; concluyendo la parte experimental de campo a inicios de octubre del mismo año.

2.3. Procedimiento

2.3.1. Curva de crecimiento bacteriano para *Salmonella entérica*

La curva de crecimiento permite determinar la cinética microbiana, estableciendo mediante la representación gráfica cuatro fases: latencia, exponencial, estacionaria y declive o muerte celular. En este estudio, se determinó la curva de crecimiento para *Salmonella entérica* con la finalidad de establecer el inicio y culminación de la fase exponencial, etapa en la que las bacterias se encuentran metabólicamente activas y en constante replicación.

Para la elaboración de la curva de crecimiento, se consideró la metodología empleada por Quiroz *et al.* (2015). Para ello se colocaron 900uL de medio de triptosa a la mitad de la concentración y 100uL de cultivo bacteriano fresco de 24h en una celda. Se midió su densidad óptica (OD) en un espectrofotómetro a 600nm. Con el OD obtenido se realizó el siguiente cálculo para obtener V1:

$$OD_1 * V_1 = OD_2 * V_2$$

$$V_1 = \frac{OD_2 * V_2}{OD_1}$$

Dónde:

OD₁= OD*10

OD₂= 0.05; Rango 0.01-0.08

V₂= 25mL de medio de cultivo contenido en el matraz (Amrita University, 2011).

Del volumen contenido en el matraz, se extrajo V1, y se colocó la cantidad de V1 del cultivo bacteriano de 24h, completando así el volumen inicial de 25mL. Se tomó una alícuota de 1 mL del matraz y se colocó en un tubo eppendorf de 1.5mL. A continuación, se llevó el matraz a incubar con agitación a 170 rpm durante 30 minutos. Se colocó 900uL del tubo eppendorf una celda para medir su absorbancia en el espectrofotómetro a 600 nm; con los 100 uL restantes de la alícuota de 1ml, se realizó diluciones seriadas hasta la dilución 10^{-7} .

Se sembró 100uL de las diluciones 10^{-5} , 10^{-6} y 10^{-7} sobre agar nutriente. Se incubó a 37°C durante 24h. Se repitió este procedimiento hasta alcanzar el T10 con intervalos de 30min. Al transcurrir las 24 h de incubación, se realizó el conteo de las unidades formadoras de colonias (UFC). Para el obtener la concentración bacteriana se realizó el siguiente cálculo:

$$\frac{\text{UFC}}{\text{mL}} = \frac{\text{No. Colonias}}{10^{-x} \cdot v}$$

Dónde:

UFC= unidades formadoras de colonia

V= volumen de bacteria diluida añadida a la caja

X= Número de dilución (Quiroz, 2015).

2.3.2. Aumento de la concentración bacteriana

Los tiempos de generación dependen del tipo de microorganismo, ya que unos crecen rápidamente y otros tienen tiempos de generación de varias horas o incluso días. En nuestro estudio, se necesita una concentración bacteriana determinada para inocular en las aves. La concentración de interés es de 10^9 UFC/ml, siendo ésta dosis mayor a la dosis de infección media (10^8 UFC/ml) reportada en otros estudios (Borie, Zurita, Sánchez, Rojas, Santander, & Robeson, 2008).

Para iniciar con el ensayo, se necesitó de un cultivo bacteriano fresco de 24 horas. Se tomó 1 mL de éste y se lo sembró en 50 mL de medio triptosa (1/2) concentración. Posteriormente se dejó en incubación durante 3 horas, con agitación a 170rpm y temperatura de 37°C. Se tomó 1mL del cultivo bacteriano de 3 horas y se midió la absorbancia en el espectrofotómetro a 600nm. Se centrifugó el tubo de 50 mL a 3000rpm durante 10 minutos y se retiró el sobrenadante. A continuación, se adicionó al pellet suero fisiológico estéril. Finalmente se realizó diluciones seriadas del concentrado bacteriano en un tubo eppendorf de 1.5 mL con suero fisiológico y se midió la absorbancia a 600nm.

2.3.3. Animales de experimentación

Se utilizaron 180 pollos machos Cobb-500 (Figura 3) de un día de edad, provenientes de un criadero comercial. Las aves fueron vacunadas al octavo día de nacimiento contra la enfermedad provocada por el virus de Marek (MDV) o *gallid herpesvirus 2* (GaHV-2) y adicionalmente recibieron la vacuna GUMBO-VAC contra la enfermedad de Gumboro ocasionada por el virus de *bursitis infecciosa* (IBDV) y la vacuna NEW-BRON contra la enfermedad de Newcastle y Bronquitis infecciosa aviar (BIA). Adicionalmente las aves fueron criadas con temperatura controlada (30°C- 36°C) y ventilación adecuada. Todos los animales fueron alimentados con una formulación sin antibióticos (Anexo 2) y agua sin cloro.



Figura 3. Pollos de engorde de raza Cobb 500 de 1 día de nacimiento.

2.3.4. Inoculación bacteriana

Los animales fueron distribuidos en 5 grupos (Administración vía nasal) y 5 grupos (Administración vía oral) (Tabla 1). Al onceavo día se inoculó por vía nasal y oral 60 pollos con diferentes concentraciones de *Salmonella entérica*, de los cuáles 20 pollos recibieron la dosis bacteriana más alta (10^9 UFC/mL), 20 pollos recibieron la dosis media (10^8 UFC/mL) y a los 20 pollos restantes se les administró la dosis baja (10^7 UFC/mL). El volumen de inoculación del concentrado bacteriano fue de 25 uL para la primera inoculación y 25 uL para la re-inoculación. Durante esta fase se evaluó el estado físico de los pollos a las 1, 2 y 3 semanas post inoculación, valorando parámetros como el peso y la presencia de diarrea en el animal.

Tabla 1.

Tratamientos aplicados en pollos al día 11 después del nacimiento, grupos y vía de administración de *Salmonella entérica* subespecie *entérica* serovar Enteritidis.

Grupos	Tratamiento	Vía de administración	Nomenclatura
1	Control Negativo administración de suero fisiológico	Oral y nasal	GO1/GN1
2	Control Negativo administración de antibiótico ZINAPROM en dos dosis	Oral y nasal	GO2/GN2
3	Administración de <i>Salmonella entérica</i> subespecie <i>entérica</i> serovar Enteritidis (Dosis alta: 10^9 UFC/ml)	Oral y nasal	GO3/GN3
4	Administración de <i>Salmonella entérica</i> subespecie <i>entérica</i> serovar Enteritidis (Dosis media: 10^8 UFC/ml)	Oral y nasal	GO4/GN4
5	Administración de <i>Salmonella entérica</i> subespecie <i>entérica</i> serovar Enteritidis (Dosis baja: 10^7 UFC/ml)	Oral y nasal	GO5/GN5

2.3.5. Prueba de flotación

La diarrea en aves de corral puede ser producida por varias causas entre ellas *Salmonella*. Con el objeto de descartar uno de los agentes causales más comunes como las coccidias, se llevó a cabo la prueba de flotación que es la más utilizada en estos casos. Para ello se recolectó muestras de heces de las aves que presentaban diarrea. En un tubo

ependorf de 1.5 mL que contenía la muestra, se colocó 500uL de solución salina hipersaturada (SSHS) y se agitó vigorosamente hasta disolverla. Posteriormente se transfirió la muestra disuelta en la solución salina a un tubo de ensayo y se colocó SSHS hasta llegar al borde dejando un menisco convexo. Se colocó un cubreobjetos y se esperó 30 minutos para que los huevecillos del parásito se adhieran al cubreobjetos. A continuación, se retiró cuidadosamente el cubreobjetos y se lo colocó sobre un portaobjetos para su observación en el microscopio a 10X.

2.3.6. Necropsia en aves y toma de muestras

Una vez transcurrido el tiempo de experimentación, se realizó la necropsia en aves para observar físicamente el daño hepático e intestinal debido a la presencia de la bacteria y a la vez tomar muestras histológicas para su análisis en el laboratorio.

Se comenzó con una dislocación cervical para causar la muerte del animal y posteriormente se abrió la cavidad torácico-abdominal según protocolo de la Universidad de Murcia (Anexo 3). Se extrajo el bazo, luego se desprendió el hígado separándolo del paquete digestivo y finalmente se extrajeron los intestinos (Figura 4). Se examinó cada uno de los órganos y se lo clasifico por su apariencia mediante la presencia/ausencia de inflamación en intestino y cambio de coloración en hígado (marmoleado). Los órganos fueron almacenados en fundas ziploc rotuladas y a una temperatura de -80°C.



Figura 4. Necropsia: apertura de cavidad torácico-abdominal de aves de corral inoculadas con bacteria *Salmonella entérica*.

2.3.7. Extracción y cuantificación de ADN total

Para el proceso de extracción de ADN, se utilizó DNAzol reagent y se ejecutó el protocolo sugerido por (Life Technology, 2000). En el ensayo se utilizó 100mg aproximadamente de muestra de tejido (hígado e intestino) (Anexo 4).

Para eliminar residuos proteicos, la preparación que contenía DNA, se centrifugó una vez más a 12000 rpm por 10 min y se transfirió el sobrenadante a un nuevo tubo.

La cuantificación se llevó a cabo en un espectrofotómetro Nanodrop 2000 que además de valores de concentración, también da valores de relación 260/280 (ADN/proteínas) y 260/230 (ADN/ solventes orgánicos) los mismos que aportan pureza y calidad de las muestras de ADN obtenidas. Todas las muestras de ADN fueron llevadas a una concentración de 20 ng/uL.

2.3.8. Detección de presencia de *Salmonella entérica* mediante la técnica de diagnóstico molecular PCR


Se ejecutó una PCR para detectar la presencia de *Salmonella entérica* en los órganos infectados. Para los ensayos de PCR, se utilizó la enzima GoTaq® Green (Promega Corporation, 2012). La composición de la GoTaq Green y la composición para un volumen de reacción de 20uL se muestran en la Tabla 2 y Tabla 3. Se realizó amplificaciones de los ADN extraídos de los diferentes órganos de cada tratamiento. Para las amplificaciones se utilizó como control positivo ADN de órganos infectados *in vitro* y como control negativo ADN de órganos sin infectar. Para el ensayo se utilizó el par de primers ST11/ST15 para el gen de patogenicidad JEO402-1 utilizados en el proyecto de Recalde (2015). El producto de amplificación tiene un tamaño de 429pb y el protocolo del termociclador ejecutado se muestra en la Tabla 4.

Tabla 2.
Composición de GoTaq® Green Master Mix

Componente	Concentración
dnTP	400Um
MgCl ₂	3 mM
Taq polimerasa	3mM
pH	8.5

Tabla 3.
Composición para un volumen de reacción de 20 uL para 40 muestras de hígado e intestino (Fase bacteria)

Componente	Concentración	Volumen RX 1	Volumen RX 40
H ₂ O destilada ultrapura		3 uL	120.6 uL
Gotaq Green	1x	10 uL	402 uL

Continua 

Primer Forward	10uM	1 uL	40.2 uL
Primer Reverse	10uM	1 uL	40.2 uL
Volumen ADN (c/u)	20ng/uL	5uL	

Tabla 4.
Perfil térmico utilizado para amplificación (ST11/ST11)

Proceso	Temperatura (°C)	Tiempo	No. Ciclos
Desnaturalización inicial	94	5min	1
Desnaturalización	94	30s	
Hibridación	65	30s	35
Extensión	72	1min	
Extensión final	72	1min	1
Holding	12	∞	1

La reacción se corrió en un termociclador marca BIO-RAD modelo C1000-Touch. Los productos de PCR fueron fraccionados en geles de agarosa al 2%, y visualizados con SYBR® SafeDNA y en buffer TBE 1X. El tamaño de amplicones se determinó con un marcador de peso molecular de DNA de 100 bp de marca LabNet. Los resultados de la amplificación fueron fotodocumentados en un transiluminador Biodoc-it™ System.

2.3.9. Ensayo SPOT TEST

Este ensayo permite evaluar cualitativamente la presencia y actividad de bacteriófagos. Se lo realizó cada vez que se necesitaba comprobar de una manera rápida las condiciones de infectividad de los cocteles de fagos. Inicialmente se dispersa 500 uL de cultivo bacteriano fresco (24h de crecimiento) sobre la superficie de una caja Petri con agar nutriente. Se deja secar durante 40 minutos. Posteriormente se coloca 10 uL de una solución con fagos. Se incuba por 24 horas y se evalúa la presencia de áreas de inhibición del crecimiento bacteriano en los lugares donde hubieron fagos

específicos para la bacteria que se puso inicialmente (Khan Mirzaei & Nilsson, 2015).

2.3.10. Ensayo de doble capa

Es un ensayo que permite conocer la concentración de fagos en solución utilizando un sistema de dos tipos de agar. Una mezcla líquida con agar en concentraciones entre 0.4 a 0.6% más bacteria y bacteriófago es depositado en la superficie de platos Petri con agar sólido de 1,5%.

Para obtener el título viral del cóctel de bacteriófagos PSEA-2, se diluyó inicialmente 100 uL de muestra con 900uL de agua destilada. A continuación, se realizó diluciones seriadas hasta 10^{-10} .

Se colocó a baño maría tubos que contenían 2,5 mL de agar triptosa 0,4 % enriquecido para mantener el medio líquido y evitar su solidificación. Se dispensó 50 uL de cultivo bacteriano fresco de 24h y 100 uL de la dilución de interés en el tubo que contenía el medio. Se homogenizó la mezcla suavemente y se vertió sobre cajas con medio agar nutriente sólido. Se extendió la mezcla cuidadosamente por toda la superficie del medio y se dejó en reposo durante 1h hasta que el medio se solidifique totalmente. Se incubó a 37°C durante 24h.

Una vez transcurrido el tiempo de incubación, se realizó el conteo del número de las unidades formadoras de placas (UFP) para determinar el título viral de la siguiente manera:

$$\frac{\text{UFP}}{\text{mL}} = \frac{\text{No. placas}}{d \cdot 0.1}$$

Dónde:

d= dilución de interés

2.3.11. Enriquecimiento y escalado del cóctel de bacteriófagos líticos

Para esta etapa, de incremento de la cantidad de fagos, se inició con un cultivo fresco de 24h de crecimiento de *Salmonella entérica* en medio Triptosa 0.5X y una alícuota del coctel de bacteriófagos.

Para obtener 1 litro de bacteriófagos, se comenzó sembrando 2mL de la cepa de *Salmonella entérica* obtenida del cultivo de 24h en dos erlenmeyers conteniendo 62.5 mL de medio de cultivo estéril y se incubó por 3 horas a 37 °C con agitación de 170 rpm. Transcurridas las 3 horas, se midió la absorbancia extrayendo 1ml de cada erlenmeyer. Al primer matraz se agregó 62.5 ml de los bacteriófagos específicos y en el segundo matraz se agregó 62.5 ml de agua destilada estéril. Se dejó en incubación por 24 horas a 37 °C con agitación de 170 rpm. Al día siguiente se midió la absorbancia de las dos muestras: con bacteriófagos y con agua destilada.

Luego de este proceso, se purificaron los bacteriófagos mediante centrifugación a 4000 rpm durante 30 minutos a 18 °C. Se recolectó el sobrenadante y se lo filtró con filtros estériles de 0.45 μ m y 0.20 μ m. Se realizaron tres enriquecimientos consecutivos, haciendo una relación de 1:1 medio de cultivo con bacteria: filtrado con fagos hasta alcanzar el volumen de 1L del cóctel de bacteriófagos.

Para incrementar aún más la concentración de bacteriófagos, se liofilizó 1L de muestra enriquecida. Después de 96h, se obtuvo 5g de polvo de muestra. Ésta fue almacenada a temperatura ambiente, sellada herméticamente con parafilm y en condiciones de oscuridad para su conservación y posterior uso.

Para relacionar la cantidad de bacteriófagos por peso seco de liofilizado, se hizo un ensayo de doble capa. Para ello se resuspendió 10 mg del liofilizado en 250 μ L de buffer SM y se dejó en hidratación durante 1h. Antes de realizar las diluciones seriadas, se homogenizó la muestra resuspendida en buffer SM para evitar grumos.

2.3.12. Inoculación de *Salmonella entérica* y cóctel de bacteriófagos específicos PSEA-2.

Se trabajó con 80 pollos de 11 días de edad los cuales fueron distribuidos en Grupos de 10 pollos. Se aplicaron 8 tratamientos incluidos dos controles (Tabla 5). La forma de administración fue vía oral aplicado directamente en el pico del ave.

Tabla 5.

Tratamientos aplicados a pollos, grupos y vía de administración de bacteriófagos y *Salmonella entérica* subespecie *entérica* serovar Enteritidis

Grupos	Tratamiento	Vía de administración	Nomenclatura
1	Control Negativo. Administración de ZINAPRIM en tres dosis	Oral	GO1
2	Control Positivo administración de <i>Salmonella entérica</i> subespecie <i>entérica</i> serovar Enteritidis al día 13 del nacimiento (Dosis: 10^8 UFC/ml)	Oral	GO2
3	Control fagos. Administración de bacteriófagos líticos al día 12 de nacimiento. (Dosis: 10^{11} UFP/ml)	Oral	GO3
4	Administración del cóctel de bacteriófagos 2 días consecutivos (día 11 y 12 de nacimiento) antes de la infección bacteriana. (Dosis: 10^{11} UFP/ml)	Oral	GO4
	Administración de		

Continúa



Grupos	Tratamiento	Vía de administración	Nomenclatura
	<p><i>Salmonella entérica</i> subespecie <i>entérica</i> serovar Enteritidis al día 13 de nacimiento. (Dosis: 10⁸ UFC/ml)</p>		
5	<p>Administración del cóctel de bacteriófagos un día antes de la infección (día 12 de nacimiento). (Dosis: 10¹¹ UFP/ml)</p>	Oral	GO5
	<p>Administración de <i>Salmonella entérica</i> subespecie <i>entérica</i> serovar Enteritidis al día 13 de nacimiento. (Dosis: 10⁸ UFC/ml)</p>		
6	<p>Administración del coctel de bacteriófagos un día después de la infección (día 14 de nacimiento). (Dosis: 10¹¹ UFP/ml)</p>	Oral	GO6
	<p>Administración de <i>Salmonella entérica</i> subespecie <i>entérica</i> serovar Enteritidis al día 13 de nacimiento. (Dosis: 10⁸ UFC/ml)</p>		
7	<p>Infección simultánea al día 13 de nacimiento. Administración del coctel de bacteriófagos (Dosis: 10¹¹ UFP/ml)</p>	Oral	GO7

Continúa 

Grupos	Tratamiento	Vía de administración	Nomenclatura
	Administración de <i>Salmonella entérica</i> subespecie <i>entérica</i> serovar Enteritidis al día 13 de nacimiento. (Dosis: 10^8 UFC/ml)		
8	Administración del coctel de bacteriófagos un día antes y un día después de la infección bacteriana. (Día 12 y 14 de nacimiento). (Dosis: 10^{11} UFP/ml)	Oral	GO8
	Administración de <i>Salmonella entérica</i> subespecie <i>entérica</i> serovar Enteritidis al día 13 de nacimiento. (Dosis: 10^8 UFC/ml)		

La aplicación de tratamiento comenzó al día 13 después del nacimiento. El número de aves infectadas *in vivo* con *Salmonella entérica* fue de 60. Los animales recibieron una dosis bacteriana media de 10^8 UFC/mL. La concentración de bacteriófagos inoculada fue de 10^{10} UFP/mL. El volumen de inoculación del concentrado bacteriano y de bacteriófago fue de 25 uL.

Durante el experimento se evaluó el estado físico de los pollos antes de empezar la investigación, a las 1, 2 y 3 semanas post inoculación. Durante esta etapa se valoró parámetros como el peso y la presencia de diarrea en el animal. Al inicio de la 4ta semana post inoculación, se procedió con el sacrificio de las aves de estudio mediante dislocación cervical (Anexo 3). El muestreo se llevó a cabo con la metodología descrita en el experimento anterior.

2.3.13. Detección de presencia de bacteria y bacteriófagos mediante la técnica molecular de diagnóstico PCR

Se ejecutó una PCR para detectar la presencia de *Salmonella entérica* y bacteriófagos líticos en los órganos infectados. La composición para un volumen de reacción de 20uL se muestra en la Tabla 6. Para el ensayo se utilizó el par de primers ST11/ST15 para el gen de patogenicidad JEO402-1 específico para *Salmonella* (Recalde J. , 2015); (Aabo, Rasmussen, Rossen, Sørensen, & Olsen, 1993) y el par de primers HoMyP2F/HoMyP2R diseñados por Torres (2016), específico para bacteriófagos de la familia Myoviridae. El producto de amplificación tiene un tamaño de 429pb para los primers específicos para *Salmonella entérica* y de 145 pb para el gen específico de las enzimas líticas Holinas y lisozimas para la detección de la presencia del cóctel de bacteriófagos respectivamente. El protocolo del termociclador ejecutado se muestra en la Tabla 4 y Tabla 7.

Tabla 6.

Composición para un volumen de reacción de 20 uL para 32 muestras de hígado e intestino (Fase bacteriófago)

Componente	Concentración	Volumen RX 1	Volumen RX 32
H ₂ O destilada ultrapura		3 uL	96.6 uL
Gotaq Green	1x	10 uL	322 uL
Primer Forward	10uM	1 uL	32.2 uL
Primer Reverse	10uM	1 uL	32.2 uL
Volumen ADN (c/u)	20ng/uL	5uL	

Tabla 7.
Perfil térmico utilizado para amplificación (HoMyP2F/HoMyP2R)

Proceso	Temperatura (°C)	Tiempo	No. Ciclos
Desnaturalización inicial	94	5min	1
Desnaturalización	94	30s	
Hibridación	62	30s	35
Extensión	72	1min	
Extensión final	72	1min	1
Holding	12	∞	1

Para la corrida electroforética y visualización de amplicones, se utilizó la metodología usada en el experimento anterior.

2.3.14. Diseño experimental y análisis de datos

Las variables fueron analizadas en el paquete estadístico INFOSTAT. Se efectuó un diseño en bloques completamente al azar. Todas las unidades experimentales (pollitos) fueron homogéneas. El peso inicial de los pollitos fue de 50 gramos de toda la camada. Los tratamientos que se asignaron a las aves fueron al azar. La variable de clasificación fue el tratamiento y las variables de respuesta fueron: peso, presencia de diarrea, daño hepático, inflamación intestinal. El número de repeticiones fue de 10 aves por cada tratamiento tanto en la primera fase como en la segunda fase.

Para el análisis estadístico de los valores del peso obtenidos durante la 1era, 2da y 3era semana, se realizó un análisis de varianza y comparación de medias por el método de Duncan con un nivel de significancia de 0.05. Adicionalmente se realizó una prueba de normalidad Shapiro-Wilks para los pesos con la finalidad de que las variables de respuesta se ajusten a una distribución normal.

Para analizar las variables de respuesta como la presencia de diarrea, daño hepático, presencia de inflamación en intestino, presencia y ausencia de bandas al utilizar la técnica molecular PCR, se realizó un análisis multivariado de conglomerados componentes principales CPA que permite implementar diferentes procesos descritos por un conjunto de valores de varias variables.

CAPÍTULO III

3. RESULTADOS

3.1. Cinética bacteriana

Al realizar la curva de crecimiento, se obtuvo diferentes valores de absorbancia y UFC's dependiendo del tiempo de incubación, obteniendo así, diversas concentraciones de *Salmonella entérica* medidas en UFC/mL. El tiempo de lectura se calculó tomando en cuenta un intervalo de 5 horas. A valores de absorbancia menores a 0.08 UA (unidades de absorbancia), la concentración bacteriana se encontraba en el rango de 10^6 UFC/mL, por lo que el valor de absorbancia era directamente proporcional al crecimiento bacteriano medido en unidades de UFC/mL (Tabla 8).

Tabla 8.

Valores de absorbancia, UFC's y concentración bacteriana con *Salmonella entérica* durante el intervalo de 5 horas.

	Tiempo (h)	Absorbancia	UFC	UFC/mL
T0	0	0.020	2	2.00E+06
T1	0.5	0.039	3	3.00E+06
T2	1	0.088	38	3.80E+07
T3	1.5	0.151	68	6.80E+07
T4	2	0.196	104	1.04E+08
T5	2.5	0.220	115	1.15E+08
T6	3	0.270	150	1.50E+08
T7	3.5	0.288	178	1.78E+08
T8	4	0.296	180	1.80E+08
T9	4.5	0.308	185	1.85E+08
T10	5	0.343	210	2.10E+08

Al graficar la relación existente entre las medidas de absorbancia a una DO de 600 nm y las UFC que crecieron en caja Petri se obtuvo la curva Absorbancia vs. UFC/mL (Figura 5).

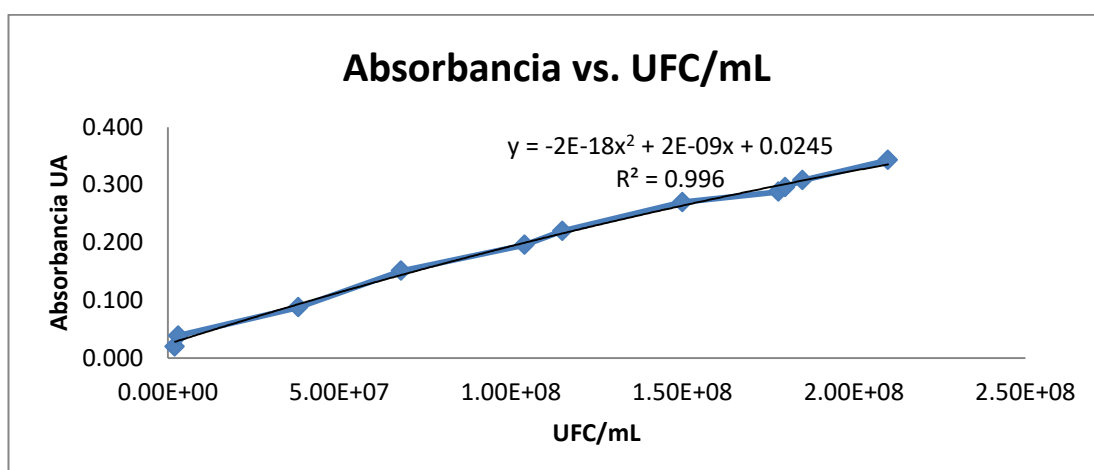


Figura 5. Relación Absorbancia vs. UFC/mL con *Salmonella entérica*.

Al graficar los valores de Absorbancia vs. Tiempo se identificó el inicio de la fase exponencial a los 30 minutos y culminación a las 5 horas (Figura 6).

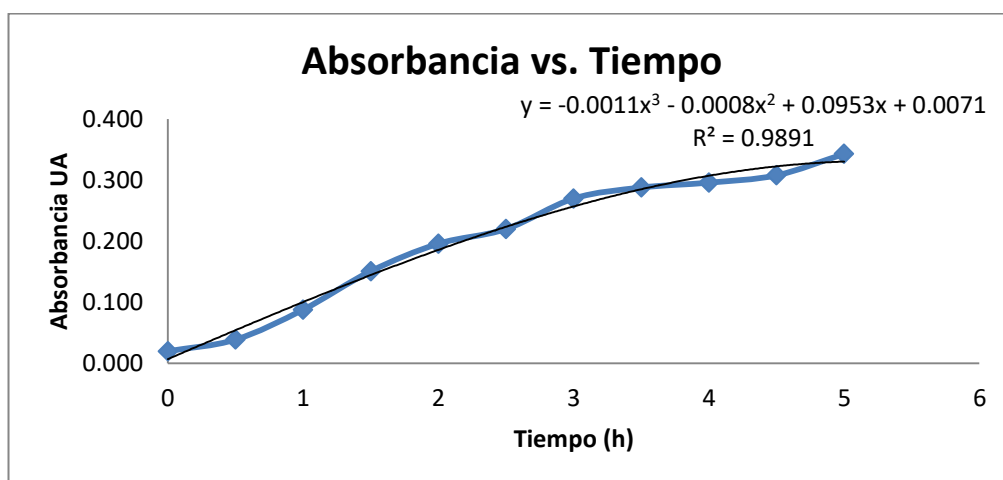


Figura 6. Relación Absorbancia vs. Tiempo con *Salmonella entérica*.

3.2. Incremento de concentración del cóctel de bacteriófagos PSEA-2

3.2.1. Estado infectivo de los bacteriófagos al inicio del experimento

La concentración inicial del cóctel de bacteriófagos PSEA-2 fue de 0.98×10^8 UFP/mL. Dicha concentración era muy baja para su uso como biocontrol en aves de corral, por ello se realizó un incremento de bacteriófagos mediante enriquecimientos múltiples.

3.2.2. Incremento de bacteriófagos mediante enriquecimientos

Con el objeto de incrementar la concentración y el volumen de bacteriófagos para estudios posteriores, se realizaron tres enriquecimientos consecutivos del cóctel PSEA-2. En cada etapa se utilizó una relación 1:1 (medio de cultivo con bacteria: filtrado con fagos) hasta obtener un litro del coctel (Tabla 9). Para confirmar la acción de los bacteriófagos, se realizó un Spot test, observándose lisis celular, evidenciada con la inhibición de crecimiento bacteriano en los lugares donde se depositó la muestra con fagos. La muestra con agua estéril no produjo ningún halo de inhibición (Figura 7).

Tabla 9.

Valores de densidad óptica de los cultivos bacterianos con (CF) y sin (SF) bacteriófagos después de 24 horas de incubación, de los enriquecimientos 1, 2 y 3.

No. Enriquecimiento	Densidad óptica (DO)	
	SF	CF
1	1.151	1.290
2	0.774	0.499
3	0.812	0.744

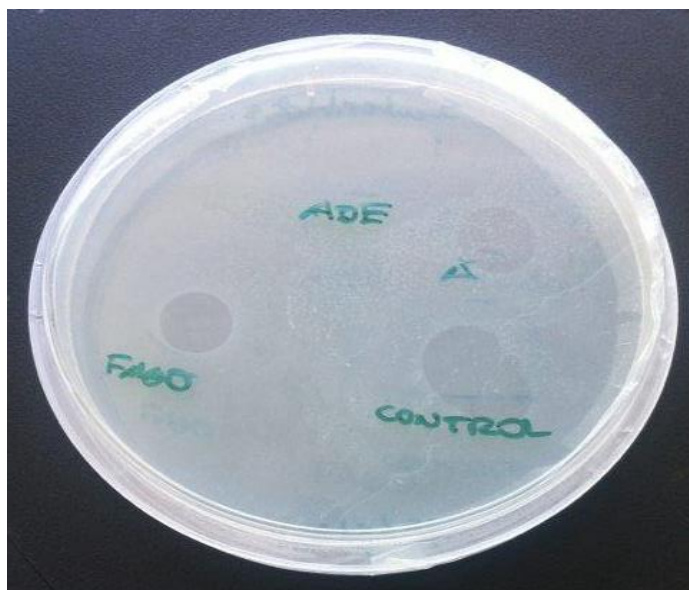


Figura 7. Spot test con un cultivo bacteriano de *Salmonella entérica* y el cóctel de bacteriófagos PSEA-2. ADE) 10 uL Agua destilada estéril; A) 10 uL de cóctel de bacteriófagos antes de su escalado y enriquecimiento; FAGO) 10 uL de cóctel de bacteriófagos después de su escalado y enriquecimiento; CONTROL) 10 uL de cóctel de bacteriófagos PSEA-2 del stock almacenado a 4°C. Las áreas más claras (transparentes) representan ausencia de crecimiento bacteriano por efecto del fago.

A pesar de que se hicieron múltiples enriquecimientos, se llegó a una concentración viral de 10^7 UFP/ml que se determinó por doble capa. La concentración de bacteriófagos requerida para ser utilizada como control biológico (por bibliografía) estaba en el orden de 1×10^{10} UFP/mL. Por lo tanto, se liofilizó el litro de cóctel de bacteriófagos obtenido.

Con el liofilizado, se realizó un ensayo de doble capa para determinar la concentración por peso seco, obteniendo un título viral de $2,6 \times 10^{10}$ UFP/mL al resuspender 10mg de fago liofilizado en 250uL de buffer SM (Figura 8).

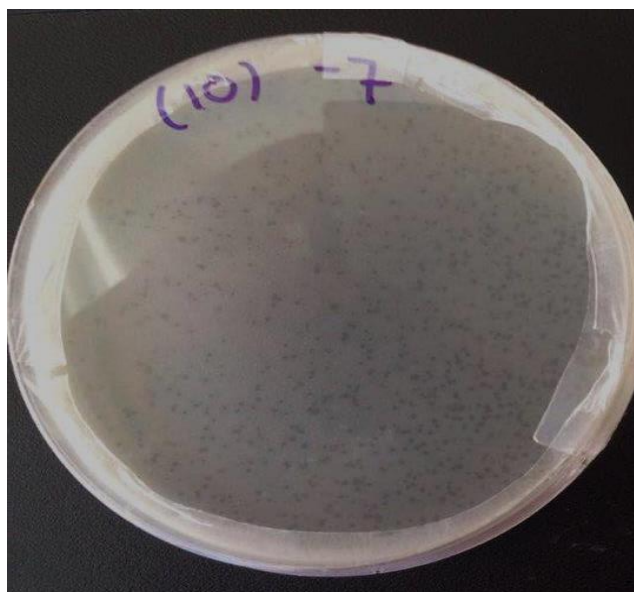


Figura 8. Doble capa de la muestra de bacteriófagos líticos liofilizados. Las áreas sin crecimiento bacteriano (transparentes) se denominan placas y se forman por la acción lítica de los bacteriófagos.

3.3. Experimento 1

En este experimento se evaluaron las condiciones experimentales óptimas para infectar aves de corral con *Salmonella entérica*.

3.3.1. Peso de pollos y presencia de diarrea

Durante la primera, segunda y tercera semana de nacimiento, se tomó el peso de las aves y se determinó la presencia de diarrea en las camas (Anexo 6).

Se realizó un análisis de varianza (Anexos 7, 8 y 9). No hubo variación significativa en los pesos de aves entre tratamientos con diferentes concentraciones de la bacteria. Al realizar la prueba de normalidad Shapiro-Wilks para los pesos, los resultados se ajustan a una distribución normal. (Anexo 10, 11 y 12).

3.3.2. Evaluación de cambios superficiales en órganos

Se notó ligeros cambios de coloración en el hígado (marmoleado) y patas de animales infectados en relación a los no infectados (Figuras 9 y 10). Adicionalmente se observó inflamación en varias secciones del intestino, especialmente en el saco duodenal (Figura 11, Tabla 10 y Anexo 5).



Figura 9. Cambio de coloración en hígado. GO2.1H) Hígado de animal sano del grupo control (administración de antibiótico) GO4.1H) Hígado de animal del grupo que recibió la dosis media de bacterias, se observa zonas con diferente color (marmoleado).



Figura 10. Cambio de coloración en patas. GO2.1) Patas de animal sano del grupo control (administración de antibiótico), se observa zonas anaranjadas. GO4.2) Patas de animal del grupo que recibió la dosis media de bacterias, se observa zonas pálidas.

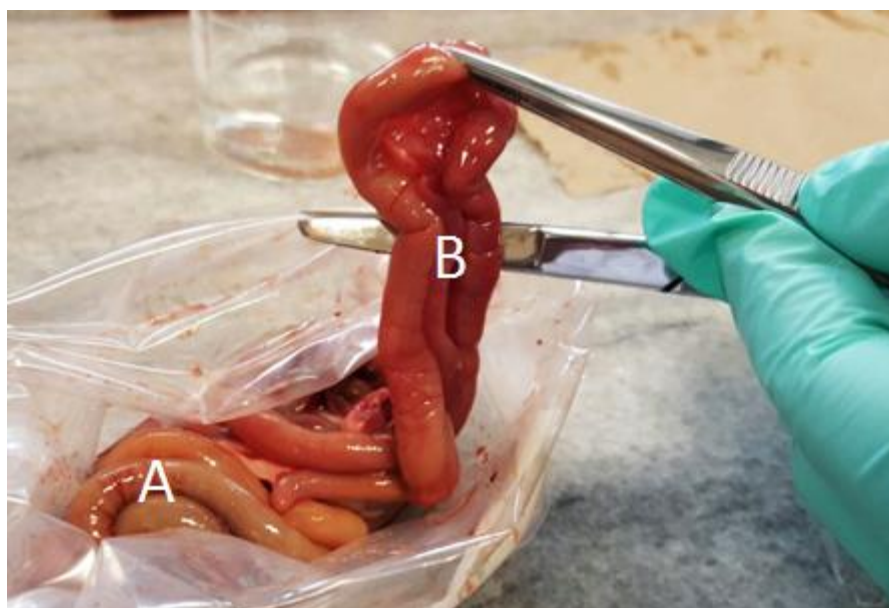


Figura 11. Presencia de inflamación en intestino del animal del grupo que recibió la dosis media GO4.2H A) Sección sana sin inflamación B) Sección inflamada

Tabla 10.

Evaluación conjunta de cambios superficiales en hígado e intestino después del sacrificio de las aves. (Experimento 1). Promedio de cuatro observaciones donde se evaluó presencia/ausencia del síntoma.

Evaluación conjunta de cambios superficiales en órganos		
Grupo	Hígado	Intestino
GO1	0	0.25
GN1	0	0
GO2	0	0
GN2	0	0
GO3	0	0.75
GN3	0.75	1
GO4	1	0.75
GN4	0.75	1
GO5	0.50	1
GN5	1	1

3.3.3. Caracterización molecular

3.3.3.1. Extracción y cuantificación de ADN total

Se extrajo ADN total de órganos infectados. Los resultados de la cuantificación de ADN extraído de hígado e intestino se muestran en los Anexos 13 y 14.

3.3.3.2. Reacción en cadena de la polimerasa (PCR)

Las muestras de los grupos que tenían bacteria presentaron bandas con un tamaño aproximado de 420 pb para los primers ST11/ST15 (Anexos 15, 16,17 y 18).

3.3.4. Análisis del experimento

Para analizar las variables de respuesta como la presencia de diarrea, daño hepático, presencia de inflamación en intestino, se realizó un análisis de componentes principales (CPA). Los vectores proyectados con línea continua de color blanco representan las variables de respuesta y la cercanía de los puntos hacia los vectores determina cuál de los grupos presenta mayor asociación a dicha variable de respuesta.

El factor o componente principal se interpreta en función de las observaciones (puntos) más correlacionados con él, en este caso el valor de la variable de respuesta correspondiente al daño intestinal es alto (0.95) como para ser declarado componente principal 1 (CP1) seguido de la presencia de diarrea (0.84) que corresponde al componente principal 2 (CP2) (Anexo 19). En cuanto a la correlación entre variables, existe correlación positiva entre las tres variables de respuesta, siendo más fuerte la correlación entre el daño intestinal y la presencia de diarrea. Los grupos control GO1 y GO2, ubicados la parte superior izquierda (1er cuadrante), presentan diarrea, sin embargo, no presentan afectaciones a nivel de órganos; los grupos control GN1 y GN2, ubicados la parte inferior izquierda (3er cuadrante), toman valores muy bajos para todas las variables de

respuesta por lo tanto no presentan afectaciones en órganos ni presencia de diarrea.

Los grupos GO3 (dosis bacteriana alta por vía oral), GN4 (dosis bacteriana media por vía nasal), GO5 (dosis bacteriana baja por vía oral) y GN3 (dosis bacteriana alta por vía nasal) ubicados en la parte superior derecha (2do cuadrante), poseen las tres características estudiadas, es decir, presentan diarrea, daño hepático e intestinal. Por otro lado, los grupos GO4 (dosis bacteriana media por vía oral) y GN5 (dosis bacteriana baja por vía nasal) ubicados en la parte inferior derecha (4to cuadrante), presentan daño intestinal y hepático más no presentan diarrea (Figura 12 y Anexo 20).

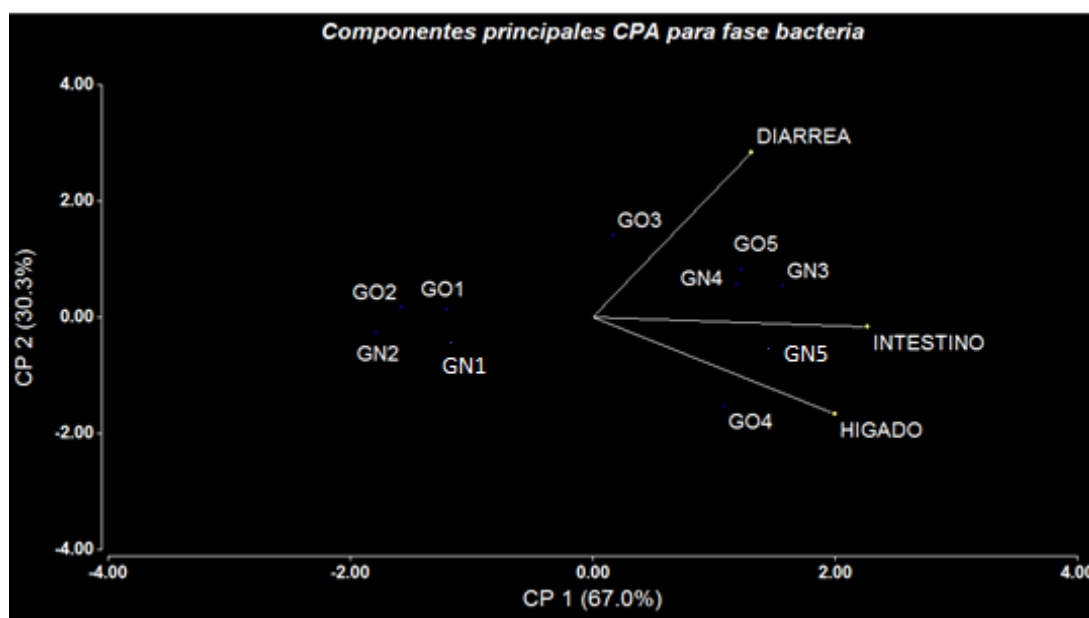


Figura 12. Gráfico estadístico de componentes principales CPA para la primera fase experimental; correlación de variables presencia de diarrea, inflamación de intestino y daño hepático.

3.4. Experimento 2

3.4.1. Peso de pollos y presencia de diarrea

Se aplicó el mismo análisis estadístico, toma de pesos y detección de presencia de diarrea de la misma manera que en la primera fase experimental (Anexos 21, 22, 23, y 24). A pesar de que los datos de peso se

ajustan a una distribución normal, de acuerdo a la prueba de Shapiro Wilks, el ANOVA no mostró diferencias significativas con respecto a los controles positivos y negativos (Anexos 25,26 y 27).

3.4.2. Evaluación de cambios superficiales en órganos

Se observó ligeros cambios de coloración en el hígado e intestinos de animales infectados por bacteria en comparación con los grupos en los que se aplicó bacteriófagos (Tabla 11 y Anexo 5).

Tabla 11.

Evaluación conjunta de cambios superficiales en hígado e intestino después del sacrificio de las aves (Experimento 2). Promedio de cuatro observaciones donde se evaluó presencia/ausencia del síntoma.

Evaluación conjunta de cambios superficiales en órganos		
Grupo	Hígado	Intestino
GO1	0.25	0
GO2	1	1
GO3	0.75	1
GO4	0.25	0.75
GO5	0	1
GO6	0.75	0.25
GO7	0	0
GO8	0.50	1

3.4.3. Caracterización molecular

3.4.3.1. Extracción y cuantificación de ADN total

Se extrajo ADN total de órganos correspondientes a todos los tratamientos evaluados. Los resultados de la cuantificación de ADN extraído de hígado e intestino se muestran en el (Anexos 28 y 29).

3.4.3.2. Reacción en cadena de la polimerasa (PCR)

Las reacciones de PCR con los primers ST11/ST15 específicos para *Salmonella* y el ADN extraído de órganos, presentaron bandas con un tamaño aproximado de 420 pb (Figuras 13 y 14) y 145pb para los primers de bacteriófagos HoMyP2F/HoMyP2R (Figuras 15 y 16)

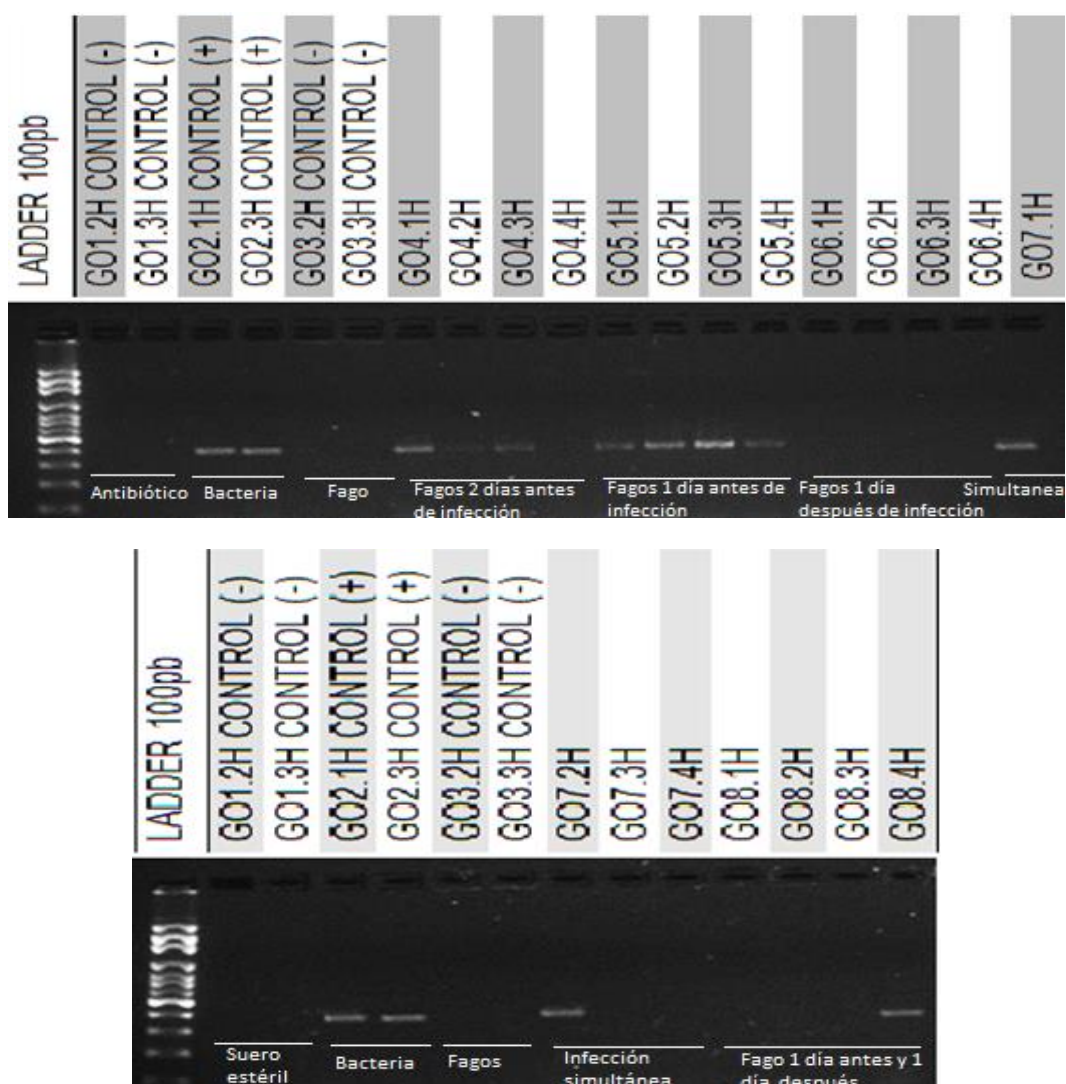


Figura 13. Inoculación vía oral en la segunda fase experimental. Productos de PCR para el par de primers **ST11** y **ST15** específicos para *Salmonella* entérica subespecie entérica serovar Enteritidis utilizando ADN de **hígado**. **Nota:** Ladder: Marcador molecular 100bp, Control positivo: hígado infectado con bacteria, Control negativo: hígado sin infectar (tratamiento con antibiótico); Control negativo: hígado infectado *in vivo* (cóctel de bacteriófagos líticos). Gel 2% de agarosa.

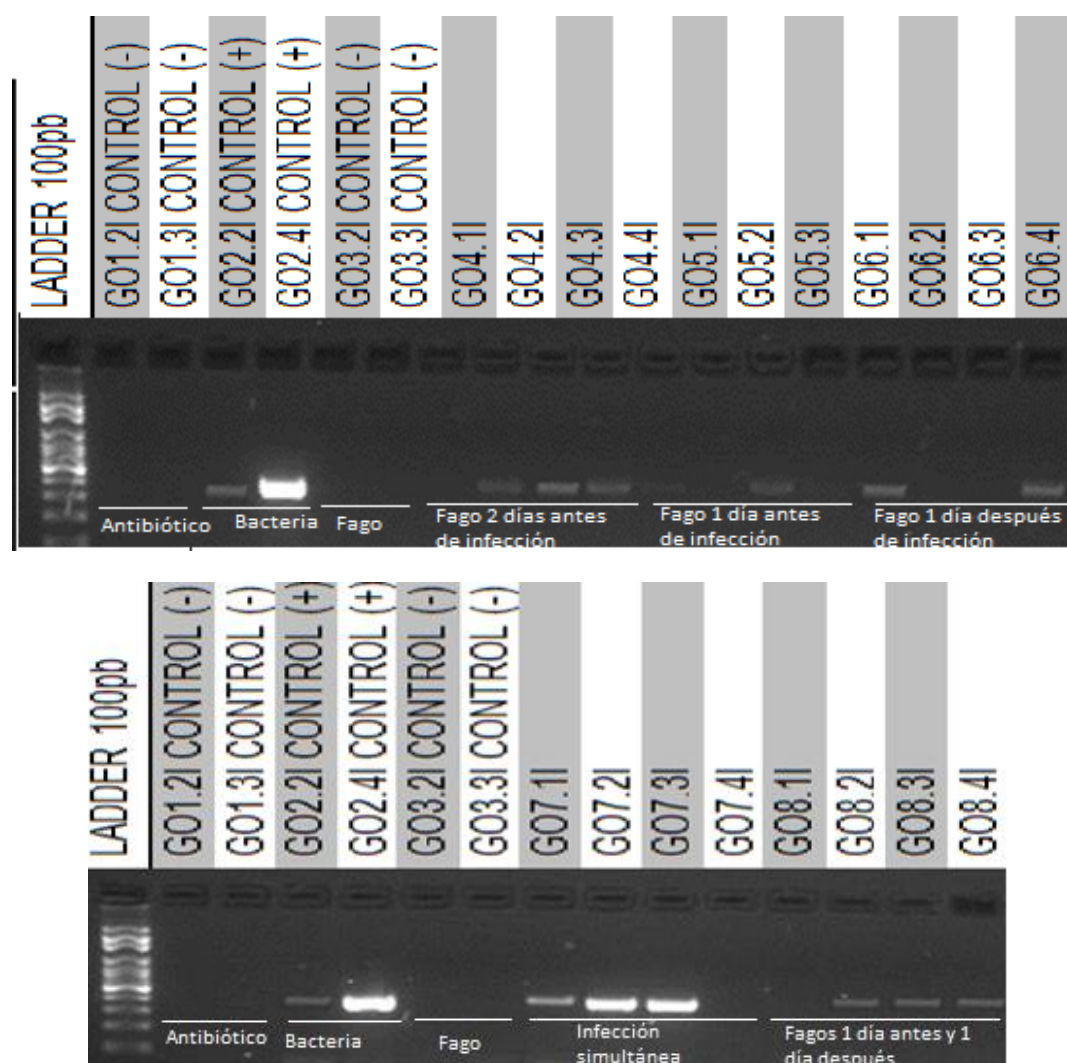


Figura 14. Inoculación vía oral en la segunda fase experimental. Productos de PCR para el par de primers **ST11** y **ST15** específicos para *Salmonella enterica* subespecie *enterica* serovar Enteritidis utilizando ADN de **intestino**. **Nota:** Ladder: Marcador molecular 100bp, Control positivo: intestino infectado con bacteria, Control negativo: intestino sin infectar (tratamiento con antibiótico); Control negativo: intestino infectado *in vivo* (cóctel de bacteriófagos líticos). Gel 2% de agarosa.

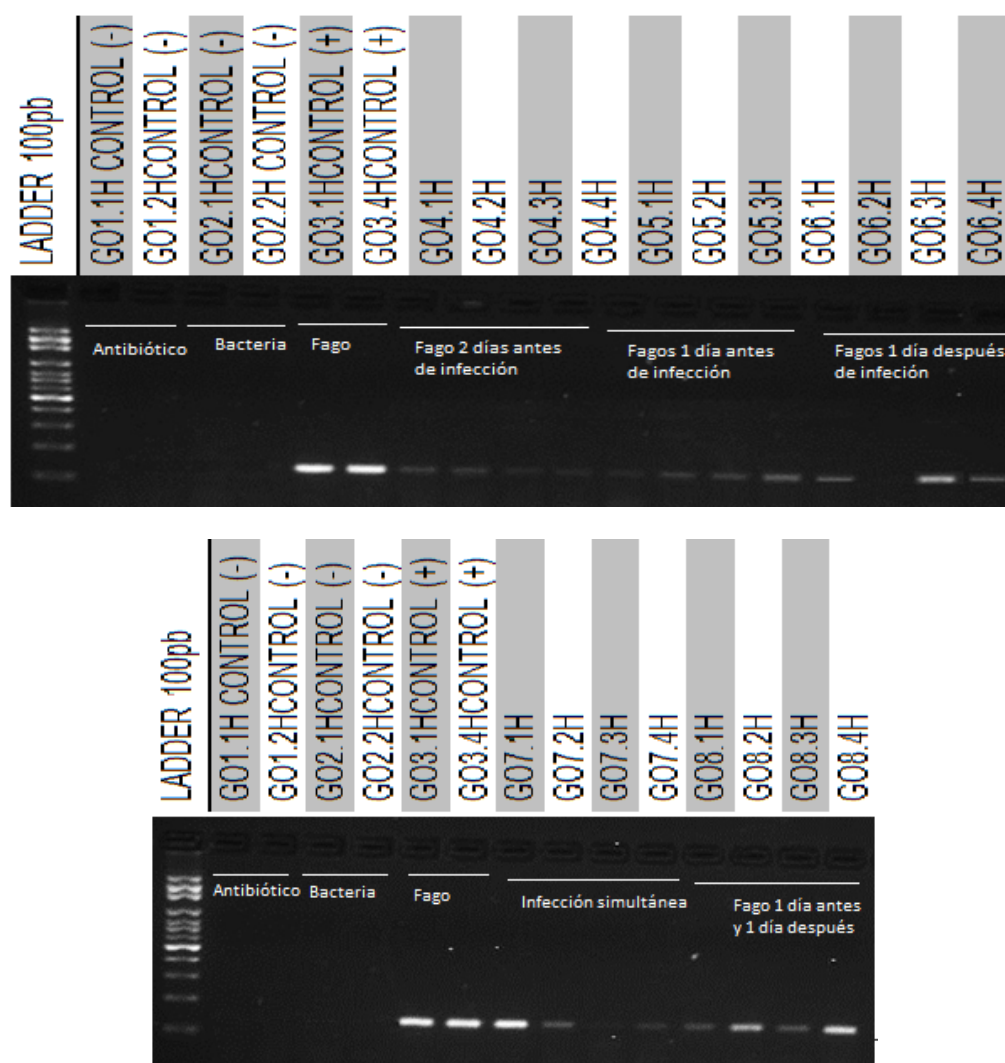


Figura 15. Inoculación vía oral en la segunda fase experimental. Productos de PCR para el par de primers **HoMyP2F/HoMyP2** utilizando ADN de **hígado**.

Nota: Ladder: Marcador molecular 100bp, Control positivo: hígado infectado *in vivo* con bacteriófagos líticos, Control negativo: hígado sin infectar (tratamiento con antibiótico); Control negativo: hígado infectado (bacteria). Gel 2% de agarosa.

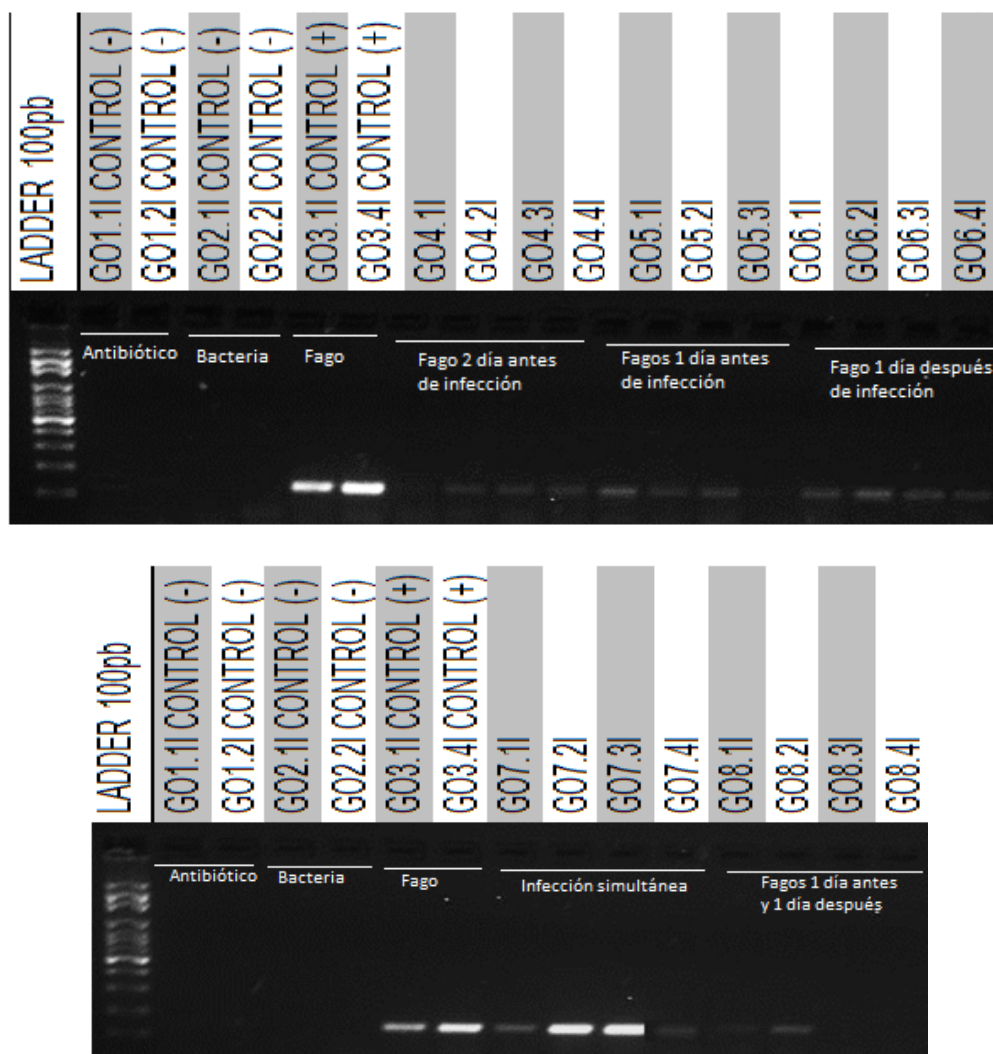


Figura 16. Inoculación vía oral en la segunda fase experimental. Productos de PCR para el par de primers **HoMyP2F/HoMyP2** utilizando ADN de intestino.

Nota: Ladder: Marcador molecular 100bp, Control positivo: intestino infectado *in vivo* con bacteriófagos líticos, Control negativo: intestino sin infectar (tratamiento con antibiótico); Control negativo: intestino infectado (bacteria). Gel 2% de agarosa.

3.4.4. Análisis del experimento

De igual manera que en análisis del experimento anterior, se evaluaron las variables de respuesta definidas como presencia de diarrea, daño hepático y daño intestinal. El valor de la variable de respuesta correspondiente al daño hepático fue el más alto (0.85) como para ser declarado como componente principal 1 (CP1) seguido de la presencia de diarrea (0.79) que corresponde al componente principal 2 (CP2) (Anexo 30). En cuanto a la correlación entre variables, al formar un ángulo menor a 90°

entre los vectores, existe correlación positiva entre las tres variables de respuesta, siendo más fuerte la correlación entre el daño hepático y la presencia de diarrea.

Los grupos control GO1 (control con antibiótico), GO3 (control fago) y GO7 (infección simultánea), ubicados en la parte inferior izquierda (3er cuadrante), no presentan afectaciones en órganos ni presencia de diarrea al tomar valores muy bajos para las características estudiadas. En la parte superior izquierda (1er cuadrante), se sitúa el grupo GO6 (coctel de bacteriófagos un día después de la infección bacteriana), este tratamiento no presenta daño hepático ni presencia de diarrea, pero sí daño intestinal.

Los grupos GO8 (bacteriófagos un día antes y un día después de la infección bacteriana), GO4 (fagos dos días consecutivos antes de la infección bacteriana) y GO2 (control bacteria), situados en la parte superior derecha (2do cuadrante), presentan las tres características estudiadas, es decir presentan daño a nivel hepático e intestinal así como también presencia de diarrea. El grupo GO5 (fago un día antes de la infección bacteriana), ubicado en la parte inferior derecha (4to cuadrante), muestra daño hepático y presencia de diarrea (Figura 17 y Anexo 31).

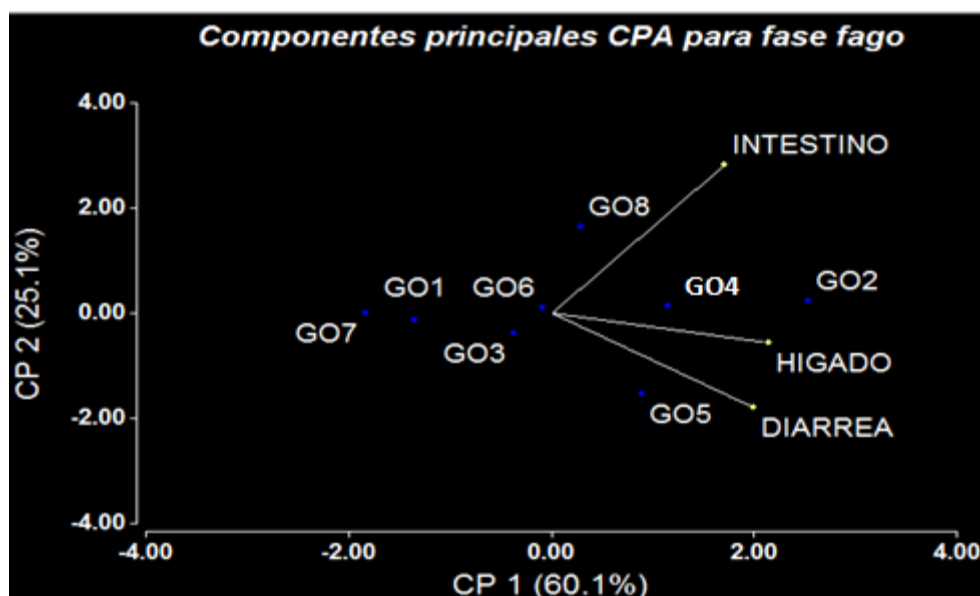


Figura 17. Gráfico estadístico de componentes principales CPA para la segunda fase experimental; correlación de variables presencia de diarrea, inflamación de intestino y daño hepático.

Los resultados de PCR confirman la presencia de la bacteria y bacteriófagos en los tejidos evaluados (Figuras 13, 14,15 y 16).

CAPÍTULO IV

4. DISCUSIÓN

El uso rutinario de antibióticos en el combate de infecciones bacterianas constituye un serio problema a nivel mundial debido a la resistencia microbiana que genera, haciendo que los tratamientos convencionales se vuelvan ineficaces y que se requieran nuevas medidas para evitar la propagación de enfermedades. Este estudio se orientó a la evaluación de patogenicidad y uso de bacteriófagos líticos específicos para *Salmonella entérica* como método de biocontrol en aves infectadas *in vivo*.

Para la evaluación de la cinética microbiana de *Salmonella entérica*, se siguió la metodología empleada por Quiroz (2015). Los resultados obtenidos coinciden con los reportados por Bautista (2009), en los que se obtienen valores aproximados de absorbancia de 0.250UA a las 3 horas de incubación. Por otro lado Quiroz (2015), menciona que normalmente el crecimiento de *Salmonella entérica* alcanza valores de absorbancia de 0.800 UA con una concentración bacteriana de 10^8 UFC/mL a las 8 horas de incubación a 37°C y 170rpm. Dichos valores difieren dependiendo del medio de cultivo ya que al utilizar medio BHI (brain heart infusión) se requiere de 18 horas para iniciar la fase estacionaria, comparadas con las 8 horas requeridas en este ensayo al emplear medio Triptosa 0.5X (Bautista, 2009).

En la primera fase de experimentación, se determinó que existió contaminación entre los tratamientos, principalmente con los grupos control. Las posibles causas fueron la mala manipulación e inexperiencia del operador al ingresar a las diferentes zonas sin la debida vestimenta de protección y la manipulación del alimento con las manos. Según Williams (2012), al momento de ingresar a una cama hecha de aserrín, ésta se encontrara húmeda debido a los desechos biológicos que las aves generan como son orina y heces, al pisarlas con los zapatos, los restos biológicos quedaran pegados a la suela, llevando así la contaminación a diferentes

zonas. Es por ello que el uso de zapatones, guantes individuales para cada sección es obligatorio para evitar posibles contaminaciones.

Otra causa fue la distancia entre experimentos ya que estos se encontraban unos a continuación de otros mediados por una malla con huecos grandes que al principio las aves podían atravesar. Una debida separación por tratamientos es de suma importancia para el éxito del experimento, ya que evita posibles contaminaciones ocasionadas por la cercanía entre los animales contaminados y no contaminados (Álvarez, 2010).

En el segundo experimento esta situación fue corregida. Cada tratamiento fue separado por un cubículo del mismo tamaño que el utilizado para hospedar las aves y el tamaño de los agujeros de la malla fue más pequeño con lo cual los animales estuvieron confinados en el lugar asignado para cada tratamiento. Entre los parámetros evaluados, estuvo la presencia de diarrea que fue observada en la mayoría de las aves desafiadas. Según Gail (1994) y Hurley *et al* (2014), es muy común este síntoma ante la infección bacteriana con serotipos como *Salmonella* no tífica (SNT), en este caso *Salmonella entérica*, y puede ser uno de los principales síntomas durante la etapa inicial de infección, impidiendo una adecuada absorción de nutrientes y provocando deshidratación en el ave.

Durante la evaluación del estado físico y presencia de síntomas de diarrea en los pollos, y con el fin de descartar la presencia de coccidiosis aviar, se tomaron muestras de heces para su análisis. Según Gail (1994), coccidiosis es una de las enfermedades intestinales parasitarias cuya principal manifestación clínica es la diarrea, que en casos severos puede presentar sangre. En nuestro estudio no se obtuvo presencia de coccidiosis. Por lo tanto asumimos que la diarrea observada fue una reacción a la bacteria que se inoculó.

En el primer experimento, para evaluar la dosis mínima para causar infección en aves jóvenes, nuestros resultados difirieron con los reportados por Audisio *et al.* (2001), pues en su estudio se emplea valores de 1×10^7 UFC/mL como dosis mínima infectante logrando un alto porcentaje de

infección y mortalidad en las aves desafiadas. En nuestro estudio, se utilizaron tres dosis de infección, 10^9 , 10^8 y 10^7 UFC/ml. Aunque los resultados no fueron extremos, se obtuvo infección con las tres concentraciones. En el segundo experimento se decidió por lo tanto utilizar una dosis de infección de 10^8 UFC/ml. A pesar de que se obtuvieron tejidos infectados en los dos ensayos, no hubo mortalidad ni pérdida de peso en aves. Esto se debió posiblemente a que la cepa utilizada no era muy invasiva y este comportamiento bacteriano coincide con los estudios reportados por Toro *et al* (2001) y Borie *et al.* (2008) en los cuales la cepa utilizada no causó perforación del intestino o necrosis de las células de las placas de Peyer y a pesar del daño ocasionado en los tejidos no hubo mortalidad en los individuos.

Al realizar el análisis estadístico utilizando el método de componentes principales para evaluar la presencia de daño hepático, inflamación intestinal y diarrea, durante la primera fase experimental, los grupos que contenían la bacteria en diferentes dosis presentaron inflamación intestinal. Los síntomas de las aves del grupo con menor dosis de bacteria estuvieron más asociados con la presencia de diarrea y los pollitos del grupo con dosis media de bacteria estuvieron asociados con daño hepático evidenciado por la presencia de zonas marmoleadas. Las tres variables en estudio presentaron correlación positiva lo que quiere decir que son adecuados para evaluar la presencia de bacteria. En un estudio realizado por Albala (2007), se evaluaron muestras de intestino y un pool de órganos (hígado, corazón y bazo), obteniendo un porcentaje de infección del 40% post inoculación bacteriana.

La existencia de bandas obtenidas con PCR utilizando primers específicos de *Salmonella entérica* corroboraron la presencia de la bacteria en los tejidos evaluados con los tratamientos donde se inoculó la bacteria, lo cual no es raro porque según Hurley *et al.* (2014), durante una infección bacteriana sostenida, las infecciones secundarias pueden ocurrir debido a la diseminación de las bacterias hacia otros órganos en los que se incluye el hígado, intestino, bazo y vesícula biliar.

En el segundo experimento para evaluar la eficiencia de bacteriófagos en el control de bacterias, y con las correcciones logísticas correspondientes, se determinó que los grupos inoculados con bacteria y bacteriófago (GO6 y GO8) presentaron una leve inflamación del intestino, al realizar la prueba de diagnóstico molecular, se pudo comprobar la presencia bacteriana en solo un individuo de los cuatro examinados. En estas mismas muestras se identificó la presencia de bacteriófagos líticos en la mayoría de los ejemplares. No sabemos si la falta de detección de la bacteria se debe a falla del operador o la ausencia de la bacteria por efecto de los bacteriófagos. En el tratamiento donde se inocularon al mismo tiempo bacterias y bacteriófagos (GO7), no hubo presencia de síntomas, ni alteraciones en órganos aunque la presencia de los dos microorganismos en intestino e hígado fue detectada por medio de PCR. Este resultado sugiere que el uso de bacteriófagos puede ser empleado eficientemente como terapia curativa. En un estudio realizado por Sklar & Joerger (2001), al emplear una mezcla de bacteriófagos se logró disminuir los recuentos de *Salmonella entérica* desde $88,3 \times 10^5$ UFC/g a $19,9 \times 10^5$ UFC/g al analizar muestras de heces.

En los dos tratamientos donde primero se inoculó el fago y después la bacteria (GO4 y GO5) hubo síntomas en el intestino e hígado y en uno de ellos la presencia de diarrea en todos los individuos. La detección molecular de bacteria en estos dos grupos fue de más del 80% de las muestras. Éstos resultados sugieren que el orden en que se usen los bacteriófagos incide en el tipo de control que se obtenga. Es evidente que para utilizar bacteriófagos líticos como biocontrol, necesariamente debe estar presente la bacteria ya que los bacteriófagos no pueden ejercer su acción lítica en ausencia de su bacteria blanco. Además según Albala (2007), los bacteriófagos son capaces de atravesar el epitelio intestinal e incluso difundirse hacia varios tejidos pudiendo llegar al cerebro ya que los fagos son capaces de atravesar la barrera hematoencefálica en búsqueda de la bacteria blanco a la cual se adherirán y multiplicarán.

Aparentemente los fagos no causaron daño en el intestino porque en el control donde se inocularon solo fagos, el intestino tuvo una apariencia normal y las aves no tuvieron diarrea, sin embargo, el hígado si tuvo una reacción que debería ser comprobada. Por el contrario la presencia de la bacteria fue detectada molecular y sintomáticamente por la presencia de diarrea, irritación del intestino y marmoleado del hígado en todos los especímenes inoculados.

Durante el segundo experimento (control de bacterias utilizando bacteriófagos), la detección molecular de bacteriófagos fue mucho más eficiente con un 85% de las muestras positivas mientras que la bacteria se detectó en un promedio del 60% de las muestras analizadas.

Según Dabrowska (2001), en la actualidad se ha visto que los bacteriófagos al ser de naturaleza vírica, son reconocidos por el sistema inmune del animal generando así anticuerpos, los cuales inactivan a los bacteriófagos y provoca que sean removidos de circulación por el sistema retículo-endotelial, siendo esto una desventaja en la fagoterapia. Para contrarrestar una rápida remoción es necesario administrar una alta dosis de bacteriófagos o trabajar con variantes de bacteriófagos. En un estudio realizado por Merrill (1996), al trabajar con bacteriófagos mutados, estos resistían mayores lapsos de tiempo en el organismo en comparación a otros bacteriófagos no mutados. Es importante mencionar que diferentes tipos de bacteriófagos pueden estimular diferentes tipos de anticuerpos por la diferenciación de sus antígenos. Los bacteriófagos relacionados entre sí, usualmente comparten antígenos similares que estimulan a la producción de anticuerpos capaces de reaccionar cruzadamente con especies de bacteriófagos relacionados (Santibáñez, 2008).

En cuanto a la factibilidad de uso de bacteriófagos, se debe destacar que no se notaron cambios conductuales en los animales que podrían sugerir un efecto adverso ante su uso, tampoco se evidenció una lesión intestinal, ni daño hepático asociado al uso de fagos. Además, al utilizar un coctel de bacteriófagos específicos para *Salmonella entérica*, éstos no son

capaces de causar lisis bacteriana de la flora normal de las aves (Albala Moreno, 2007). El estudio previo de rango de hospedero realizado por Quiroz (2015), corrobora los resultados obtenidos, pues en su estudio, los bacteriófagos del coctel PSEA-2 provocaron lisis total únicamente en los cultivos de *Salmonella enteritidis* y *Salmonella infantis* y no en los cultivos de *Escherichia Coli*, *Pseudomona fluorescens*, *Citrobacter freundii* y *Enterobacter agglomerans*.

Con estos experimentos se demuestra que los bacteriófagos líticos funcionan *in vivo* como biocontrol de *Salmonella entérica* y podrían ser una excelente alternativa frente al excesivo uso de antibióticos. Este es el primer estudio de este tipo llevado a cabo en Ecuador.

CAPÍTULO V

5. CONCLUSIONES

Los individuos inoculados con *Salmonella entérica* subsp *entérica* serovar Enteritis, mostraron irritación intestinal, marmoleado en hígado y diarrea; la presencia de la bacteria en los órganos afectados fue determinada a través de la prueba molecular de diagnóstico PCR.

Las tres concentraciones bacterianas empleadas 10^9 , 10^8 y 10^7 UFC/ml fueron efectivas para causar infección en aves de corral, permitiendo así la diseminación de *Salmonella entérica* a nivel sistémico.

El cóctel de bacteriófagos PSEA-2, presentó actividad lítica para *Salmonella entérica* subsp. *entérica* serovar Enteritidis en experimentos *in vitro* e *in vivo*.

El mejor tratamiento para el control de la bacteria fue la administración de bacteriófagos líticos un día después de la infección con bacterias.

Mediante la técnica de PCR fue posible detectar la presencia de bacteria y bacteriófagos, en todos los tratamientos y eso permitió relacionar la efectividad de los mismos.

La confiabilidad de la prueba de PCR se demostró con una amplificación nula en los controles negativos y bandas correspondientes en las muestras inoculadas.

CAPÍTULO VI

6. RECOMENDACIONES

Se recomienda realizar ensayos para determinar las condiciones óptimas de conservación para bacteriófagos ya que la actividad lítica podría verse disminuida al emplear diversas condiciones fisicoquímicas.

Se debería realizar experimentos con diferentes dosis de bacteriófagos, a fin de optimizar su uso en actividades de producción.

Se deberían repetir este tipo de experimentos utilizando bacterias más agresivas que permitan visualizar las bondades de los bacteriófagos como biocontrol.

Debido a la eficiencia demostrada por los bacteriófagos, se debe continuar las investigaciones con otras bacterias patogénicas que afecten a distintos sectores de la producción agropecuaria.

Se deberían realizar experimentos donde se compare el efecto de bacteriófagos en relación a antibióticos.

CAPÍTULO VII

7. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Aabo, S., Rasmussen, O., Rossen, L., Sørensen, P., & Olsen, J. (1993). Salmonella identification by the polymerase chain reaction. *Molecular and Cellular Probes*, 171-178.
- Ackermann, H. (1998). Tailed bacteriophages: The caudovirales. *Advances in Virus Research*.
- Albala Moreno, I. (2007). Biocontrol de Salmonella enteritidis en aves mediante el uso de bacteriófagos.
- Amrita University. (2011). VALYUE@Amrita. Retrieved from Bacterial Growth Curve: <http://vlab.amrita.edu/?sub=3&brch=73&sim=1105&cnt=2>
- Bautista, G. (2009). *Evaluación en 3 microambientes diferentes de la termoresistencia de una cepa de Salmonella spp aislada de compost*. Retrieved from <http://www.javeriana.edu.co/biblos/tesis/ciencias/tesis235.pdf>
- Borie, C., Zurita, P., Sánchez, M., Rojas, V., Santander, J., & Robeson, J. (2008). Prevención de la infección por Salmonella enterica subespecie enterica serotipo enteritidis en pollos mediante un bacteriófago. *Arch Med Vet*.
- Caffer, M., Terragno, R., & Binsztein, N. (2008). *Manual de procedimientos para el diagnóstico y la caracterización de salmonella*. Retrieved from <http://fos.panalimentos.org/LinkClick.aspx?fileticket=TBG6ogqxF1U%3D&tabid=783&mid=1713&language=es-ES>
- CDC. (2013). National Antimicrobial Resistance Monitoring System for Enteric Bacteria (NARMS), Human Isolated Final Report.
- Chai, S., White, P., Lathrop, S., Solghan, S., Medus, C., McGlinchey, B., et al. (2012). Salmonella enterica Serotype Enteritidis: Increasing Incidence of Domestically Acquired Infections. *CID*.
- Chappell, L., Kaiser, P., Barrow, P., Jones, M., Jhonston, C., & Wigley, P. (2009). The immunobiology of avian systemic salmonellosis. *ELSEVIER*, 53-59.

- Clokie, M., & Kropinski, A. (2009). Bacteriophages: methods and protocols. *Springer*, 50-53.
- Dirección Nacional de Vigilancia Epidemiológica. (2015, Febrero 4). Ministerio de Salud Pública. *ANUARIO DE VIGILANCIA EPIDEMIOLÓGICA 1994 - 2013*.
- Drahovská, H., Turňa, J., Píknová, L., Kuchta, T., Sztításová, I., Škarková, A., et al. (2001). Detection of Salmonella by polymerase chain reaction targeted to fimC gene. *Biologia*.
- Fica, A., Alexandre, M., Fernández, A., Fernández, J., Prat, S., & Heitmann, I. (2001). *Cambios Epidemiológicos de la Salmonelosis en Chile*. Chile.
- Figueroa, I. M., & Rodríguez, A. V. (2005). Mecanismos moleculares de patogenicidad de
- Gail, D. (1994). *The Chicken Health Handbook*. United States: Storey Books.
- Garibyan, L., & Avashia, N. (2013). Polymerase Chain Reaction. *Journal of Investigative Dermatology*.
- Gaviria, A., Biol, & González. (2011). *Técnica para aislamiento de bacteriófagos específicos para E.coliDH5α a partir de aguas residuales*. Colombia: Universidad del Quindío.
- Gómez, M., & Vives, M. (2009). *Bacteriófagos: virus de bacterias que curan infecciones*. Apuntes científicos uniandinos: 36-46.
- Hausler, T. (2006). Viruses vs. Superbugs. 378-380.
- Hendrix, R. (2003). *Bacteriophage genomics*. Elsevier, 506-511.
- Heres, L., Engel, H., Urlings, J., & F., V. (2004). *Effect of acidified feed on susceptibility of broiler chickens to intestinal infection by Campylobacter and Salmonella*. *Vet. Microbiol.* 99:259-267. .
- Hurley, D., McCusker, M., Fanning, S., & Martins, M. (2014). Salmonella-host interaction-Modulation of the host innate immune system. *Frontiers in immunology*.
- Khan Mirzaei, M., & Nilsson, A. (2015). Isolation of Phages for Phage Therapy: A Comparison of Spot Tests and Efficiency of Plating Analyses for Determination of Host Range and Efficacy. *PLoS ONE*, 10(3).

- Kumar, R. (2012). *Cochin University of Science and Technology*. Retrieved from Biochemical and molecular investigations on Salmonella Serovars from seafood: <http://hdl.handle.net/10603/4888>
- Kutateladze, M., & Adamia, R. (2010). Bacteriophages as potential new therapeutics to replace or supplement antibiotics. *Elsevier*.
- Life Technology. (2000). *DNAzol reagent Genomic DNA isolation reagent*. Retrieved from http://emerald.tufts.edu/~mcourt01/Documents/DNAzol_protocol_for_DNA_extraction.pdf
- Navas, S., & Maldonado, R. (2009). *Evaluación de las razas de pollos parrilleros Ross 308 y Cobb 500 en condiciones de altura*. Ibarra, Ecuador: Universidad Técnica del Norte.
- OMS. (2013, Agosto). *Organización Mundial de la Salud*. Retrieved Julio 22, 2015, from <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs139/es/>
- Omwandho, C., & Kubota, T. (2010). Salmonella entericaserovar Enteritidis: a Mini-review of Contamination Routes and Limitations to Effective Control. *JARQ*.
- Promega Corporation. (2012). *GoTaq® Green Master Mix Product*. Information Sheet, USA.
- Pronavícola. (2012). *Guía de manejo del pollo de engorde*. Retrieved from www.pronavicola.com/contenido/manuales/Cobb.pdf
- Public Health Agency of Canada. (2011, 02 18). *Public Health Agency of Canada*. Retrieved from SALMONELLA ENTERICA SPP.: <http://www.phac-aspc.gc.ca/lab-bio/res/psds-ftss/salmonella-ent-eng.php>
- Quiroz, E. (2015). *Aislamiento y caracterización de bacteriófagos líticos específicos para Salmonella spp. aisladas de aves de corral*. Sangolquí: Universidad de las Fuerzas Armadas ESPE, Departamento de Ciencias de la Vida y la Agricultura.
- Recalde, J. (2015). *Aislamiento y caracterización de Salmonella en aves de corral utilizando pruebas bioquímicas y moleculares*. Tesis de grado, Universidad de las Fuerzas Armadas - ESPE, Departamento de Ciencias de la Vida y la Agricultura, Sangolquí.

- Ricci-Tam, C. (2008, July). *Salmonella – description, pathogenesis, symptoms*. Retrieved from <http://cosmos.ucdavis.edu/archives/2008/cluster7/ricci-tam.pdf>
- Rodríguez, K. (2013). Plan de exportación de babaco para la compañía Agro-Productos del Ecuador “El Migrante Cia. Ltda.” de la ciudad de Saraguro al mercado europeo para el año 2013. 12-14.
- Salas, R. (2014). *Aislamiento de bacteriófagos*. Retrieved from Universidad Nacional Federico Villareal: https://www.academia.edu/7494030/Aislamiento_de_bacteriofagos
- Segundo, H., & Torres, L. (2010). *Bacteriophages as an alternative in the treatment of bacterial infection diseases (Phage Therapy)*. México: Facultad de Farmacia, Universidad Autónoma del Estado de Morelos.
- Somma , M., & Querci, M. (2010). *JRC*. Retrieved from Análisis de la presencia de organismos genéticamente modificados en muestras de alimentos. Sección 6: Reacción en Cadena de la Polimerasa: <http://gmo-crl.jrc.ec.europa.eu/capacitybuilding/manuals/Manual%20ES/Sesi%C3%B3n6.pdf>
- Sulakvelidze, A., Alavidze, Z., & Morris, G. (2001). *Bacteriophage therapy. Antimicrobial agents and chemotherapy*. . 45 (3): 649-659.
- Torres, J. (2016). Identificación molecular de familias de bacteriófagos en dos cocteles de dos cepas de *Salmonella entérica* aislada de aves de corral. Tesis de grado, Universidad de las Fuerzas Armadas - ESPE, Departamento de Ciencias de la Vida y la Agricultura, Sangolquí.
- Tsonos, J., Vandenheuvel, D., Briers, Y., De Greve, H., Hernalsteens, J., & Lavigne, R. (2013). Hurdles in bacteriophage therapy: deconstructing the parameters. *Elsevier*.
- UERIA. (2011). *Instituto Nacional de Salud*. Retrieved from Perfil de riesgo *Salmonella* spp. (no tifoideas) en pollo entero y en piezas: <http://www.ins.gov.co/lineas-de-accion/investigacion/ueria/Publicaciones/PERFIL%20SALMONELLA%20SPP.pdf>
- Universidad de Murcia. (2014). *Necropsia en aves*. Retrieved from <http://ocw.um.es/cc.-de-la-salud/anatomia-patologica-especial-3/practicas-1/guia-necropsia-aves.pdf>

