

Autofagos: una medida para el control de *Salmonella* en Avicultura.

S. SEVILLA-NAVARRO^{1*}, V. CORTÉS¹, C. GARCÍA¹, C. MARÍN² y P. CATALÁ-GREGORI^{1,2}

¹Centro de Calidad Avícola y Alimentación Animal de la Comunidad Valenciana. Calle Nules, 16. 12539. Alquerías del Niño Perdido, Castellón, España. ²Universidad Cardenal Herrera-CEU, Calle Tirant Lo Blanch, 7. 46115. Alfara del Patriarca, Valencia, España *e-mail: s.sevilla@cecav.es

Salmonella spp. es uno de los principales patógenos causantes de toxiinfecciones alimentarias en Europa y mayoría de países industrializados. Los últimos datos publicados por la EFSA, recogen un total de 94.530 casos de salmonelosis humana en 2016, siendo los productos avícolas la principal fuente de infección. Para el control de la bacteria, además del Plan Nacional de Control de *Salmonella*, se han implantado rigurosos protocolos de bioseguridad y profilaxis. Sin embargo, en el último año la presencia de *Salmonella* Enteritidis, principal serotipo causante de las toxiinfecciones alimentarias, ha aumentado en gallina ponedora. Por este motivo, diversos grupos de investigación están estudiando alternativas para de control de *Salmonella* a nivel de campo, como el empleo de estrategias nutricionales o de bacteriófagos. Los bacteriófagos o fagos son virus que infectan a las células procariotas hasta producir su lisis. La principal aplicación es a través de cócteles que contengan 2 o más bacteriófagos, sin embargo, se han reportado resistencias. En este sentido, está descrita la posibilidad de emplear autofagos (fagos aislados directamente del mismo medio donde se encuentra la bacteria diana) frente a las cepas de campo cuando los cócteles ya no son eficaces, siendo más efectivo que un bacteriófago convencional comercial. En este contexto, el objetivo del estudio fue evaluar la aplicación experimental de los autofagos para el control de *S. Enteritidis* en gallina ponedora. El estudio se llevó a cabo en una nave experimental cuyo estatus sanitario reveló presencia de *S. Enteritidis*. Se aisló y fenotipó el autofago a partir de muestras ambientales tomadas de la misma nave donde se aisló la cepa y posteriormente fue aplicado para evaluar su efecto como herramienta de control de *Salmonella*. Se aplicó vía spray sobre los animales y sobre las superficies de la nave en dos tiempos separados por 24h. Se analizaron un total de 48 muestras (40 muestras de heces y 8 muestras de paños) tomadas en 4 sesiones de muestreo diferentes. Las muestras de paños tomadas previa aplicación del autofago dieron resultado de presencia de *Salmonella*, sin embargo, tras la primera aplicación del autofago, el 100% de las muestras de paños dieron ausencia a *Salmonella*. Por lo que respecta a las muestras de heces, se obtuvieron diferencias estadísticamente significativas entre los resultados obtenidos antes ($2.34_{\log_{10}}$ UFC/g) y después ($1.07_{\log_{10}}$ UFC/g) de la aplicación del autofago. Este estudio pone en evidencia que los autofagos se podrían emplear como medida complementaria en la limpieza y desinfección de las instalaciones con una gran eficacia y para reducir los recuentos de *Salmonella* en animales infectados. Además, el hecho de que el autofago eliminara la *Salmonella* del medio ambiente, aún con los animales en el interior de la nave, podría evitar la re-contaminación horizontal entre animales.

Palabras clave: *Salmonella* Enteritidis; autofago; gallina ponedora; in-vivo

Salmonella is one of the main serotypes involved on gastrointestinal diseases in Europe and most industrialized countries. Last data published by the EFSA, showed a total of 94.530 cases of salmonellosis in humans, being poultry products the main source of infection. In order to control this bacterium in poultry industry, in addition to the National Control

Programs, biosecurity and vaccinations plans have been implemented. Nevertheless, the latest data published by the EFSA show an increase in *Salmonella* Enteritidis prevalence in laying hen flocks. For this reason, the implementation of innovative techniques such as phage therapy is needed to control *Salmonella* at farm level. Bacteriophages or phages are virus that infect and replicate in prokaryotic cells and are probably the most widely distributed and diverse entities in the biosphere. Most common bacteriophage applications are a cocktail of 2 or more bacteriophages, as it has been described that cocktails could remove different *Salmonella* serotypes, thus providing cross efficacy. Nevertheless, resistance to the bacteriophage cocktail has been reported, resulting in a decrease in their effectiveness. Some authors have reported the possibility of using autophage when commercial bacteriophage cocktails are not active against field strains. To our best knowledge, no autophage (bacteriophage isolated from the same environment where the pathogen is isolated) has been found to control *Salmonella* in laying hens. In this context, the aim of this study was to assess the application of autophage in reducing *S. Enteritidis* in environmental and fecal samples in a layer farm. To this end, the bacteriophage was isolated from the same farm where the bacteria was present and was applied onto the facility installations and the animals, at 2 different times. After challenges, swab cloths from facility surfaces and feces samples were collected at 3 times according to the time spent after the bacteriophage challenge. The results obtained in our study showed that all the surface samples collected from the farm facilities after phage therapy were negative for *Salmonella*. Concerning faces samples, statistical differences were found in *Salmonella* counts, before ($2.34_{\log_{10}}$ CFU/g) and after ($1.07_{\log_{10}}$ CFU/g) bacteriophage challenge. The study highlights the use of autophage therapy not only for *Salmonella* Enteritidis control in animals, but as a sanitizer in cleaning and disinfection. Thus, it could be a measure to avoid the horizontal transmission of *Salmonella* among the animals, as it could remove *Salmonella* from facilities with the presence of the animals.

Keywords: *Salmonella* Enteritidis; autophage; laying hens; in-vivo.

Introducción

Salmonella spp. es uno de los principales patógenos causantes de toxiinfecciones alimentarias en Europa y mayoría de países industrializados (EFSA, 2017). En 2016, los últimos datos publicados por la EFSA, recogen un total de 94.530 y 9.818 casos de salmonelosis en Europa y en España, siendo los productos avícolas la principal fuente de infección (EFSA, 2017).

La implantación del Plan Nacional de Control de *Salmonella* junto con los rigurosos protocolos de bioseguridad y profilaxis han ayudado a reducir la prevalencia de los principales serotipos causantes de las toxiinfecciones alimentarias (*Salmonella* Enteritidis (SE) y *Salmonella* Typhimurium (ST)) hasta los límites establecidos por la Unión Europea (ECDC y EFSA, 2017). Sin embargo, y a pesar de estas medidas, en el último año la presencia de SE ha aumentado en gallina ponedora (EFSA, 2017). Por este motivo, diversos grupos de investigación están estudiando técnicas alternativas para de control de *Salmonella* a nivel de campo, como el empleo de estrategias nutricionales o de bacteriófagos (Anderson et al., 2010; Carvalho et al., 2010; Fife et al., 2010; Filho et al., 2010; Wang et al., 2010).

Los bacteriófagos o fagos son virus que infectan a las células procariotas y se replican en su interior hasta producir su lisis (Kim et al., 2013; Adhikari et al., 2017). Se consideran que son los organismos más ubicuos del planeta y que tienen un papel muy importante manteniendo el equilibrio microbiológico de este (Wittebole et al., 2014). La eficacia de los bacteriófagos está determinada por la concentración en la que se encuentren, el tipo de ciclo de vida y la forma y tiempo de aplicación de los mismos (Wernicki et al., 2017). Numerosos autores han estudiado la eficacia de los bacteriófagos en granjas de pollos de engorde, donde han obtenido reducciones significativas en los recuentos de *Salmonella* (Atterbury et al., 2007, Borie et al., 2008, Ahmadi et al., 2016).

La principal aplicación de los fagos es a través de cócteles que contengan 2 o más bacteriófagos, sin embargo, se han desarrollado resistencias por parte de las bacterias con este tipo de aplicación (Wernicki et al., 2017). Está descrita la posibilidad de emplear autofagos frente a las cepas de campo cuando los cócteles ya no son eficaces. Definimos un autofago como un fago aislado directamente del mismo medio donde se encuentra la bacteria diana, creando así una solución más efectiva y específica que un bacteriófago comercial (Drulis-Kawa et al., 2012).

En este contexto, el objetivo del estudio fue evaluar la aplicación experimental de los autofagos para el control de SE en gallinas ponedoras.

Material y métodos

El estudio se llevó a cabo en una nave experimental cuyo estatus sanitario reveló presencia de SE. Se aisló y fenotipó el autofago a partir de muestras ambientales tomadas de la misma nave en la que se aisló la bacteria y, posteriormente fue aplicado para evaluar su efecto como herramienta de control de *Salmonella*.

Para confirmar el estatus sanitario de los animales y las instalaciones de la nave, previa aplicación del autofago, se tomaron 10 muestras de heces de manera aleatoria y 2 muestras de paños de las superficies de la nave. A continuación, se aplicó el autofago vía spray sobre los animales y sobre las superficies de la nave en dos tiempos separados por 24h. Para poder evaluar el efecto del autofago, se tomaron muestras de heces y paños en tres sesiones de muestreo diferentes (Figura 1). La primera toma de muestras se realizó 24h tras la primera aplicación (T1), la segunda 24h tras la segunda aplicación del autofago (T2), y la tercera, una semana después de la primera aplicación (T3). Para determinar la presencia de *Salmonella*, las muestras de paños se analizaron siguiendo la Norma ISO 6579-1:2017. Para determinar el recuento de *Salmonella* en heces, las muestras se analizaron siguiendo el recuento por Número Más Probable (Jarvis et al., 2010). Todos los análisis estadísticos se llevaron a cabo con el paquete estadístico SPSS 16.0 software (SPSS Inc., Chicago, IL).

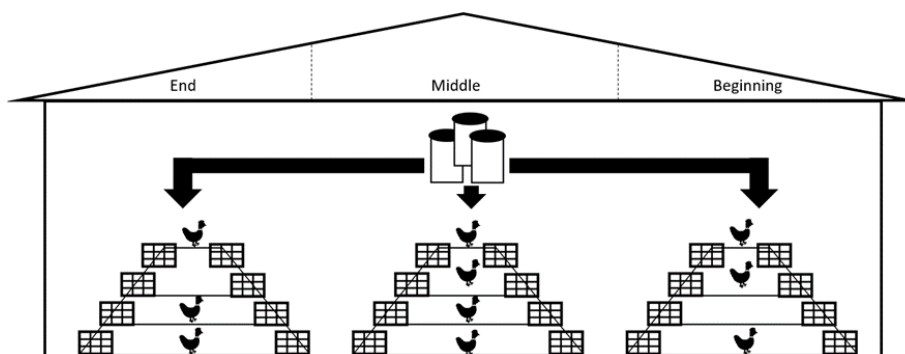


Figura 1. Puntos de donde se recogieron las muestras de heces. Cada gallina, representa un punto de muestreo.

Resultados y discusión

Por cada sesión de muestreo se tomaron 2 muestras de paños y 10 muestras de heces, por lo que se han analizado a lo largo del estudio un total de 48 muestras. Las muestras de superficie se analizaron a nivel cualitativo (presencia/ausencia de *Salmonella*) y las muestras de heces se llevaron a cabo ensayos cuantitativos (recuentos).

Las muestras de paños tomadas previa a la aplicación del bacteriófagos dieron resultado de presencia de SE, sin embargo, no se aisló la bacteria en las muestras de superficie tomadas después de las dos aplicaciones de bacteriófagos.

Por lo que respecta a las muestras de heces, se observaron reducciones estadísticamente significativas entre los recuentos de las muestras obtenidos antes ($2.34_{\log_{10}}$ CFU/g) y después de la aplicación ($1.07_{\log_{10}}$ CFU/g) del autofago. Por otra parte, dependiendo de la sesión de muestreo, los resultados obtenidos fueron los siguientes $2.34_{\log_{10}}$ CFU/g, $1.39_{\log_{10}}$ CFU/g, $0.56_{\log_{10}}$ CFU/g and $0.97_{\log_{10}}$ CFU/g, para T0, T1, T2 y T3, respectivamente (Figura 2). La mayor reducción de la excreción de *Salmonella*, se observó tras las 48h de la aplicación de la primera dosis de bacteriófago.

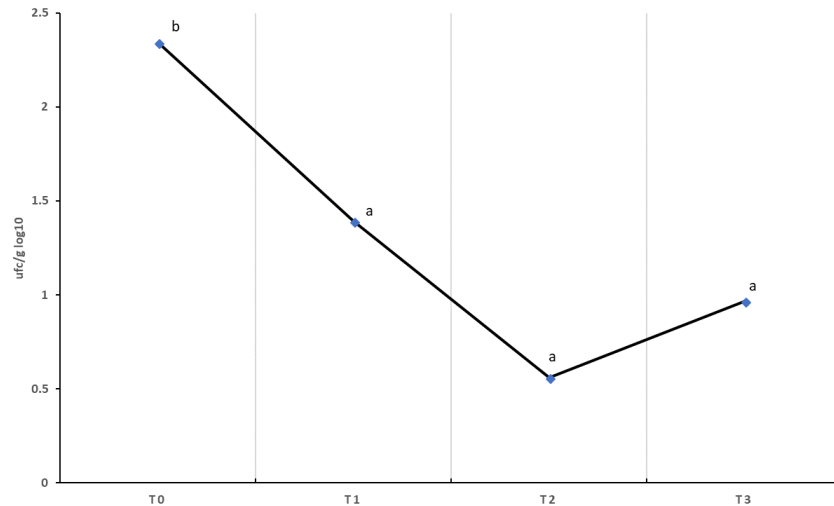


Figura 2. Recuento de *Salmonella* en muestras de heces antes (T0) y después (T1, T2 y T3) de la aplicación del bacteriófago. T0: toma de muestras antes del desafío con el bacteriófago; T1: toma de muestras 24h después de la aplicación del bacteriófago; T2: toma de muestras 24h después de la aplicación de la segunda dosis del bacteriófago; T3: toma de muestras 1 semana después de la primera aplicación del bacteriófago; ^{a, b} diferentes superíndices representan diferencias estadísticamente significativas ($p < 0.05$).

La caracterización fenotípica del bacteriófago, mostró un fago de 200 nm con cabeza icosaédrica que se podía corresponder con la familia *Myoviridae*. Además, el diámetro y la lisis clara de las placas fágica indicaron que se trataba de un bacteriófago lítico (Figura 3) (Jurczak-Kurek et al., 2016).

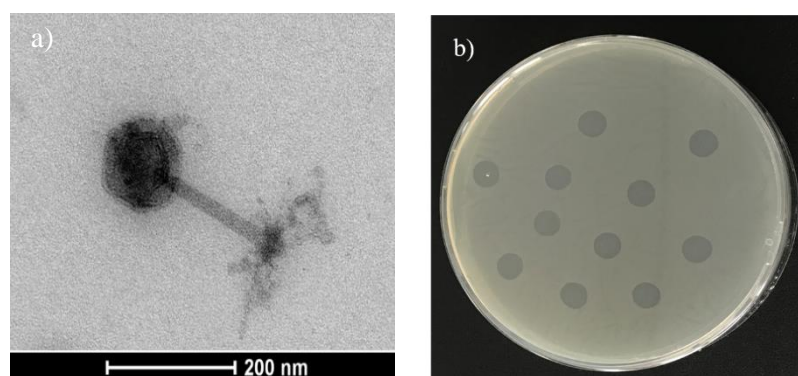


Figura 3. Caracterización fenotípica del bacteriófago. a) Vista al microscopio electrónico. b) Halos de lisis que representa el efecto del bacteriófago sobre cultivo de SE (Sevilla-Navarro et al., 2018).

Los resultados de este estudio ponen de manifiesto la ausencia de *Salmonella* en las instalaciones de la explotación tras la aplicación del autofago. Además, se observó una reducción significativa en los recuentos de heces, tras la aplicación dos veces consecutivas del bacteriófago.

La creciente aparición de resistencias antimicrobianas está alentando la búsqueda de nuevas alternativas como la terapia fágica (Nilsson, 2014; Ahmadi et al., 2016). Los bacteriófagos están ampliamente distribuidos por el mundo y muchos son los estudios que muestran su eficacia en avicultura. Autores han observado resultados prometedores en el tratamiento de enfermedades en la industria avícola, sin embargo, otros han visto que la terapia con cócteles de bacteriófagos no resulta completamente eficaz (Nilsson et al., 2014; Wernicki et al., 2017). La eficacia de la terapia viene determinada por la propia bacteria, por el bacteriófago y por los mecanismos de adaptación de la bacteria, por ejemplo, *Salmonella* es un microorganismo intracelular por lo que puede evadir la acción del bacteriófago al quedar acantonada en el interior de células eucariotas (Silva et al., 2012).

Adhikari et al. (2017) mostraron resultados similares a los nuestros, ya que observaron, en gallina ponedora, una reducción en la excreción de *Salmonella* 6 días después de la aplicación del bacteriófago. Sin embargo, otros autores como Filho et al. (2007), observaron que la terapia fágica administrada vía oral solo era eficaz las primeras 24-48h del tratamiento, sugiriendo que la bacteria podría adquirir resistencias frente a ellos. Estos resultados pueden deberse a la diferencia de edad, el tipo de administración, las condiciones experimentales del estudio o a la propia especificidad del bacteriófago frente a la bacteria diana (Huff et al., 2003; Adhikari et al., 2017; Wernicki et al., 2017).

La elevada especificidad de los bacteriófagos por la bacteria diana, la ratio coste-beneficio, la fácil administración y los pocos efectos adversos que presentan sobre el animal, hacen de la terapia fágica una solución prometedora para el control de *Salmonella* y otros patógenos en el sector avícola (Drulis-Kawa et al., 2012; Nikkahdi et al., 2017).

Este estudio pone en evidencia que los autofagos no solo podrían ser una medida preventiva para el control de patógenos en avicultura, sino que también se podría emplear como medida complementaria en la limpieza y desinfección de las instalaciones. Además, el hecho de que el autofago eliminara la *Salmonella* del medio ambiente, aún con los animales en el interior de la nave, podría evitar la re-contaminación horizontal entre animales infectados y no infectados.

Bibliografía

ADHIKARI, PA., COSBY, D.E., COX, N.A., LEE, J.H., and KIM W.K. 2017. Effect of dietary bacteriophage supplementation on internal organs, fecal excretion, and ileal immune response in laying hens challenged by *Salmonella* Enteritidis. *Poult. Sci.* **96**:3264-3271.

AHMADI, M., AMIR KARIMI TORSHIZI, M., RAHIMI, S., and DENNEHY, J.J. 2016. Prophylactic Bacteriophage administration more effective than post-infection Administration in Reducing *Salmonella* enterica serovar Enteritidis shedding in quail. *Frontiers Microb.* **7**: 1253.

ANDERSON, P.N., HUME, M.E., BYRD, J.A., HERNANDEZ, C., STEVENS, S.M., STRINGFELLOW, K., and CALDWELL, D.J. 2010. Processing, products and food safety. *Poult Sci.* **89**:2030-2037.

ATTERBURY, R. J., DILLON, E., SWIFT, C., CONNERTON, P.L., FROST, J.A., DODD, C.E.R., REES, C.ED., and CONNERTON, I.F. 2007. Correlation of *Campylobacter* bacteriophage with reduced presence of hosts in broiler chicken ceca. *Appl Environ Microbiol.* **71**:4885-4887.

BORIE, C., SANCHEZ, M.L., NAVARRO, C., RAMÍREZ, S., MORALES, M.A., RETAMALES, J., and ROBESON, J. 2009. Aerosol spray treatment with bacteriophages and competitive exclusion reduces *Salmonella* enteritidis infection in chickens. *Avian Dis.* **53**:250-254.

CARVALHO, C., GANNON, M., HALFHIDE, D.E., SANTOS, S.B., HAYES, C.M., ROE, J.M., and AZEREDO, J. The in vivo efficacy of two administrations routes of a phage cocktail to reduce numbers of *Campylobacter coli* and *Campylobacter jejuni* in chickens. 2010. *BCM. Microbio.* **10**:232.

DRULIS-KAWA, Z., MAJKOWSKA-SKROBEK, G., B. MACIEJEWSKA, B., DELATTRE, A. S., and LAVIGNE, R. 2012. Learning for bacteriophages-Advantages and Limitations of phage and phage-encoded protein applications. *Curr Protein Pept Sci.* **13**:699-722.

EFSA (European Food Safety Authority) and ECDC (European Centre for Disease Prevention and Control), 2017. The European Union summary report on trends and sources of zoonoses, zoonotic agents and food-borne outbreaks in 2016. *EFSA Journal* 2017;**15**(12):5077, 228 pp. <https://doi.org/10.2903/j.efsa.2017.5077>.

European Centre for Disease Prevention and Control and the European Food Safety Authority. Multi-country outbreak of *Salmonella* Enteritidis phage type 8 MLVA type 2-9-7-3-2 and 2-9-6-3-2 infections, 7 March 2017. ECDC and EFSA: Stockholm and Parma; 2017.

FIFE, M.S., HOWELL, J.S., SALMON, N., HOCKING, P.M., VAN DIEMEN, P.M., JONES, M.A., STEVENS, M.P., and KAISER, P. 2010. Genome-wide SNP analysis identifies major QLT for *Salmonella* colonization in the chicken. *Anim Genet.* **42**:134-140.

FILHO, R.A.C.P., BOLDRIN DE PAVAIA, J., DA SILVA, M.D., DE ALMEIDA, A.M., and JUNIOR, A.B. 2010. Control of *Salmonella* Enteritidis and *Salmonella* Gallinarum in birds by using live vaccine candidate containing attenuated *Salmonella* Gallinarum mutant strain. *Vaccine.* **28**:2853-2859.

FILHO, R. HIGGINS, L., HIGGINS, J.P., GAONA, S.E., WOLFENDEN, A.D., TELLEZ, G., and HARGIS, B.M. 2007. Ability of bacteriophages isolated from different sources to reduce *Salmonella enterica* serovar enteritidis in vitro and in vivo. *Poult Sci.* **86**:1904-1909.

FRAVALO, P.H., HASCOET, Y., LE FELLIC, M., QUEGUMER, S., PETTON, J., and SALVAT, G. 2003. Convenient method for rapid and quantitative assessment of *Salmonella* enteric contamination: the mini-MSRV MPN technique. *J Rapid Methods Autom Microbiol.* **11**:81-88.

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

ISO 6579-1:2017 (Annex D). 2017. Microbiology of food and animal feeding stuffs. Horizontal method for the detection of *Salmonella* spp. International Organization for Standardization. Genève, Switzerland.

KIM, K.H., LEE, G.Y., JANG, J.C., KIM, J.E., and KIM, Y.Y. 2013. Evaluation of anti-SE bacteriophage as feed additives to prevent *Salmonella* Enteritidis (SE) in broiler. *Asian-Australasian. J. Anim. Sci.* **26**:386-393.

SEVILLA-NAVARRO, S., MARÍN, C., CORTÉS, V., GARCÍA, C., and CATALÁ-GREGORI, P. 2018. Autophage as a control measure for *Salmonella* in laying hens. *Poult. Sci.* **0**:1-6.

SILVA, M. 2012. Classical Labeling of Bacterial Pathogens According to Their Lifestyle in the Host: Inconsistencies and Alternatives. *Front Microbiol.* **29**:71.

WANG, S., PHILLIPPY, A.M., DENG, K., RUI, X., LI, Z., TORTORELLO, M. L., and ZHANG, W. 2010. Transcriptomic Responses of *Salmonella enterica* Serovars Enteritidis and Typhimurium to Chlorine-Based Oxidative Stress. *J. Appl Environ Microbiol.* **76**:5013-5024.

WERNICKI, A., NOWACZEK, A., and URBAN-CHMIEL, R. 2017. Bacteriophage therapy to combat bacterial infections in poultry. *Virologia*. 14:179.