

INFORME CIENTIFICO DE BECA

Legajo N°:

BECA DE estudio **PERIODO** 1/4/14 al 31/3/15

1. APELLIDO: ORTIZ

NOMBRES: Xoana Pamela

Dirección Particular: Calle: *N°:*

Localidad: San Miguel *CP:* 1663 *Tel:*

Dirección electrónica (donde desea recibir información): xoanaortiz@hotmail.com

2. TEMA DE INVESTIGACIÓN (Debe adjuntarse copia del plan de actividades presentado con la solicitud de Beca)

“Estudio de un bacteriófago lítico para el biocontrol de Salmonella Gallinarum en aves de postura”

3. OTROS DATOS (Completar lo que corresponda)

BECA DE ESTUDIO: 1º AÑO: *Fecha de iniciación:* 1/4/14

2º AÑO: *Fecha de iniciación:*

BECA DE PERFECCIONAMIENTO: 1º AÑO: *Fecha de iniciación:*

2º AÑO: *Fecha de iniciación:*

4. INSTITUCIÓN DONDE DESARROLLA LOS TRABAJOS

Universidad y/o Centro: Universidad Nacional de Luján

Facultad:

Departamento: Ciencias Básicas

Cátedra:

Otros:

Dirección: Calle: : Avenida Constitución y Ruta 5 *N°:*

Localidad: Luján *CP:* 6700 *Tel:* :+54(02323)4239

5. DIRECTOR DE BECA

Apellido y Nombres: Barrios Hebe Alicia

Dirección Particular: Calle: *N°:*

Localidad: Lujánb *CP:* 6.700 *Tel:*

Dirección electrónica: barrioshebe@gmail.com

6. EXPOSICIÓN SINTÉTICA DE LA LABOR DESARROLLADA EN EL PERIODO. (Debe exponerse la orientación impuesta a los trabajos, técnicas empleadas, métodos, etc., y dificultades encontradas en el desarrollo de los mismos, en el plano científico y material).

* Caracterización molecular del fago: Se probaron distintas técnicas de aislamiento y extracción del genoma viral encontrados en la literatura disponible, y se estudio la naturaleza del mismo.

Para el aislamiento se comenzó por realizar una previa concentración de los fagos, realizando una precipitación colocando PEG 6000 30% y NaCl 1.5 M a la solución de fagos en una relación de 2:4 volúmenes respectivamente, se centrifugó a 13000g por 30 minutos en centrifuga refrigerada a 4°C, previo a dejar la mezcla en heladera o en baño de hielo entre una a dos horas. Luego de eliminar sobrenadante, se resuspendió en 100 µl de agua destilada y estéril.

Se terminó realizando la incubación de los fagos con DNAsa y RNAsa (1 U), durante 30 minutos a 37°C. Luego se agregó EDTA 0.5M (pH 8) en una concentración final de 20mM, para degradar la cápside, proteinquinasa K (concentración final 50 ug/ml) y 0.5 % p/v de SDS. Posteriormente, se incubó una hora a 56°C.

Para eliminar las proteínas, se realizó una extracción con 0.5 ml de fenol equilibrado (pH 8), 0.5 ml de fenol/cloroformo (pH 8), y 0.5 ml de cloroformo, en cada caso se centrifuga en tubos eppendorf a 3000g, 5 minutos, eliminando fase orgánica y quedándose con la fase acuosa que se coloca en tubo limpio. El DNA se precipitó agregando acetato de potasio 3M pH 5.5 y etanol absoluto (1:1). Luego de centrifugar 5 minutos a 13000 g , el precipitado se lavó con etanol al 70% y se resuspendió en agua destilada.

Consecutivamente, en gel de agarosa al 1%, se sembraron alícuotas del material genético obtenido donde: se trató con DNAsa; se trató con RNAsa; y no se trató con ninguna enzima. Para así determinar la naturaleza del genoma del fago.

Se concluyó que el genoma viral del fago bajo estudio es de ADN. También se quiso determinar el tamaño del genoma pero solo se pudo hacer por comparación con otros genomas (bacterianos y marcadores de peso molecular) y no por la realización de un perfil de restricción (porque no se contaba con las enzimas de restricción necesarias).

Además se quiso caracterizar morfológicamente con la utilización de microscopia electrónica, pero no se llegó a tiempo de enviar la muestra para su análisis.

*Parámetros del ciclo lítico: Se determinaron los parámetros del ciclo lítico del fago de Salmonella gallinarum (constante de adsorción, periodo de eclipse y tamaño de explosión) mediante la cinética de adhesión del mismo a la bacteria huésped usando el recuento de placas de lisis, por el método de doble capa en agar LB, de las alícuotas tomadas a distintos tiempos, para poder determinar el título de fagos en cada tiempo de incubación.

Se inocularon 20 ml de caldo LB con 0,1 ml de un cultivo de 20 h del huésped correspondiente al fago en estudio (crecido en caldo LB sin agitación), el inóculo se incubó a 37°C en agitación (180 rpm) hasta una DO a 650nm de 0,1. En un Erlenmeyer de 100 ml, denominado "C", se colocaron 9 ml de caldo nutritivo y en otro, denominado "A", 9 ml del cultivo antes mencionado (el resto del cultivo se mantuvo en baño de hielo para recuento).

Los Erlenmeyers se dejaron en agitación (60 rpm) a 37°C durante 5 minutos y luego se les adicionó 1 ml de lisado del fago a analizar (de concentración 1×10^5 o 3×10^5 UFP/ml) a cada uno. Se tomaron muestras de 100 µl del Erlenmeyer "A" cada 1 minuto hasta, como mínimo, los 8 minutos, y por último se tomaron dos muestras de igual volumen del Erlenmeyer "C".

Cada muestra se pasó a un tubo Eppendorf con 0,90 ml de caldo nutritivo y 5 gotas de CHCl₃ que se mantuvieron en hielo durante al menos 10 minutos antes de comenzar la cinética. Los tubos se mezclaron por agitación y se dejaron en hielo hasta realizar los

recuentos en ágar nutritivo por el método de la doble capa. Asimismo se determinó el título del cultivo de Salmonella sembrando, por duplicado, 0,1 ml de la dilución correspondiente del cultivo en placas de ágar nutritivo.

Los datos obtenidos se graficaron para determinar la constante de adsorción de cada aislado ensayado.

Lisis en un ciclo: Para la construcción de la curva de lisis en un ciclo y la determinación de los parámetros del ciclo lítico del fago.

Se termostató a 37°C en baño de agua un tubo Eppendorf conteniendo 0,1 ml de un lisado del fago filtrado (título aproximado 10E5 UFP/ml) al que se le añadieron 0,1 ml de cultivo de Salmonella gallinarum (SG) en fase exponencial crecida en caldo nutritivo con agitación (DO650nm= 0,18). La mezcla se agitó y se incubó durante 6 minutos para que se produzca la infección del fago. Se extrajeron 0,1 ml de esta mezcla y se adicionaron a 10 ml de caldo nutritivo termostató a 37°C. Se mezcló y se extrajeron 0,4 ml de la mezcla. Inmediatamente se sembraron 2 alícuotas de 0,1 ml de lo extraído en tubos de ágar nutritivo blando para determinar el número de bacterias infectadas por recuento por la técnica de la doble capa, y otros 0,1 ml se pasaron a un tubo con 0,9 ml de caldo nutritivo y 10 gotas de CHCl₃, se mezcló por agitación y se dejó a temperatura ambiente hasta realizar los recuentos correspondientes (esta alícuota corresponde al tiempo cero de la curva de lisis en un ciclo y al número de fagos libres no adsorbidos). Se tomaron alícuotas de 0,1 ml cada 5 minutos hasta los 55 minutos y se pasaron a sendos tubos de caldo nutritivo/CHCl₃. Finalmente se determinó el título de fagos a cada uno de los tiempos de incubación por recuento en doble capa en ágar nutritivo.

Se concluyó que: la constante de adsorción (K) es de 2,28 E-06 ml/min (en comparación a datos bibliográficos con otras constantes de adsorción, este valor de la velocidad de adhesión es alto, lo que indicaría la presencia de varios receptores de membrana disponibles sobre la superficie bacteriana, dado la rápida adsorción de las partículas virales sobre la superficie de las bacterias); el tamaño de explosión (b) que es el número de partículas que se libera por cada bacteria infectada es 5,22 UFP/UFC; y el periodo de eclipse (E) o sea el tiempo transcurrido desde la infección hasta la formación de las partículas de fago completas (infectivas) es 9.43 minutos

*Determinación de la especificidad viral (rango de huésped): Muestras de cepas de distintas serovariedades de Salmonella (tanto Gallinarum; Enteritidis; y muestras de salmonelas móviles incógnitas) obtenidas de granjas de pollos parrilleros y granjas de la zona, se incubaron overnight a 37°C para reactivarlas y tener un cultivo joven para realizar el ensayo. En placas de agar nutritivo, con marcador indeleble se dibujaron líneas en el fondo de las mismas, para dividir las en tres o cuatro partes. A su vez, se dibujó un círculo en el centro de cada uno de los sectores. Utilizando un anillo estéril, se estrió las bacterias en cada sector, sin dejar zonas sin cubrir. De la misma manera se realizó el procedimiento con cada una de las bacterias.

Utilizando una pipeta estéril, se añadió una gota del fago en cada sector en el área delimitada por el círculo. Una vez que se secan, se incuban las placas invertidas, a 37°C, por 24 hs.

Se observaron lisis total a parcial, tanto en muestras de gallinarum como en algunas de las cepas de S. Enteritidis

*Tolerancia de los fagos a un medio ácido: Se prepararon tres buffer fosfato salino (PBS) los cuales se ajustaron a tres valores de pH: 2, 3, y 6.5. Se incubaron los fagos con un título inicial de 10 E9 UFP, en presencia de cada uno de los buffer PBS durante 1 hora a 37°C, Una vez terminada la incubación, se tomó una alícuota de cada una de ellos (0.1 ml de fago)

y se mezcló con 0.5 ml de cultivo fresco de *S. gallinarum*, 2.5 ml de agar semisólido, y la mezcla se volcó inmediatamente en una placa de agar nutritivo. Una vez solidificado, se llevó a estufa a 37 °C, durante cuatro horas, y se observó la formación de calvas o placas de lisis.

Se determinó que en la placa donde los fagos fueron previamente expuestos en PBS a pH 2, hubo una menor formación de placas de lisis, bajando el número de UFP a 10⁶, y en cuanto a las calvas formadas se observó que en el centro de las mismas aún había presente algunas colonias bacterianas sin lisar. Este hecho sugiere que o bien la actividad lítica del fago se ve afectada o que esta en estado lisogénico.

Mientras que en las otras dos situaciones (a pH 3 y 6.5) donde los fagos se incubaron a pH superiores a 2, la actividad lítica no se vio afectada, ya que se observó la formación de calvas.

***Actividad lítica en medios hostiles:** Se realizaron una serie de diluciones (según el prospecto) a partir de una solución madre de desinfectantes de uso común en las granjas avícolas (medios hostiles) para determinar el efecto en la actividad lítica de fagos de *Salmonella*. en la actividad lítica de fagos de *Salmonella*. Los desinfectantes usados fueron: yodo, cresolina, amonio, lavandina y CID 20.

Se tomó 4,5 ml de cada dilución para incubarlo a 37° C con 0.5 ml de fago. Se tomaron 0.1 ml de cada una de las mezclas desinfectante/fago, que se colocaron en nuevos tubos de ensayo, en los cuales previamente se colocaron 0.5 ml de cultivo de *Salmonella gallinarum* (el cual previamente había crecido durante 24 horas en caldo nutritivo) y 2.5 ml de agar nutritivo semisólido. Esta mezcla se agitó y se volcó inmediatamente sobre placas de Petri que contenían agar nutritivo. Al solidificarse la capa de agar nutritivo semisólido se incubó en estufa a 37°C, para contarse el número de calvas que se formaron. El tiempo estimado en formarse un número significativo de calvas fue aproximadamente cuatro horas (aunque se fueron revisando las placas cada una hora). La mezcla desinfectante/fago se guardó y se plaqueo de la misma manera a las semanas 1, 2 y 3.

Se determinó que cuando se utiliza la mezcla fago/desinfectante preparado en el día, a las bacterias les cuesta crecer. Por lo que en un principio es mayor el poder desinfectante y no se puede observar actividad del fago.

A la semana, estas mismas mezclas utilizadas dejan crecer a las bacterias, y se observan formaciones de placas. El número de placas observadas no difiere del número que generalmente se obtiene utilizando el fago solo. Por lo que se concluye que los fagos que estuvieron en contacto con los desinfectantes, no vieron disminuida su vida útil (actividad lítica).

La diferencia que se observa es en el tamaño de las placas de lisis, siendo estas más grandes en los fagos en contacto con los desinfectantes (lo que podría deberse a que estos cambian la viscosidad del medio, lo que podría permitir un mayor desplazamiento del fago) Además, se dan placas de tamaños medianos a grande (en comparación al tamaño de placas de lisis pequeñas que acostumbramos a ver con el fago en medio semisólido al 0.8%) en los medios viscosos de yodo, cresolina y amonio.

Todo esto hace pensar que se puede utilizar la combinación de fago y desinfectantes.

Además se midieron el pH de los desinfectante, por medios de papel de pH, para tener un valor estimativo de la acidez o basicidad de los mismos, dado que en ensayos anteriores, donde se estudio la tolerancia del fago a actuar en medios de distinta acidez, se observó que la actividad de los fagos se veía reducida a pH menores a 2. Resultó ser que ninguno de los desinfectantes tenían pH más bajos que 2: el de mayor pH era 8 y el de mayor acidez era 4.

***Evaluación del comportamiento del fago en una granja en producción:**

Las aves sometidas a la experiencia fueron gallinas blancas ponedoras, de 80 semanas, que habían pasado la etapa de replume y que tenían una dosis de Bioquina.

Dentro del galpón se dividieron las jaulas para someter a distintos tratamientos:

TRATAMIENTO 1: Aves control

TRATAMIENTO 2: Aves con una dosis de fago por vía intramuscular

TRATAMIENTO 3: Aves con una dosis de fago por vía intramuscular y fago administrado a través de un pulverizador (spray) sobre las aves y la jaula.

Se recolectaron muestras de materia fecal previo administración de fago (para evidenciar la presencia de SG) y cada 30 días luego de haberlo administrado.

Tanto en los testigos como en las aves a las que se les administro fago por vía intramuscular no se aisló SG lo que se comprobó utilizando las técnicas correspondiente de aislamiento de Salmonella (pre-enriquecimiento de las muestras sembrando en caldo nutritivo, por 24 horas a 37 °C; posterior siembra de una alícuota del anterior en 10 ml de caldo Rapaport –Vassiliadis para incubación por 24 ±1 h a 42°C; luego aislamiento por agotamiento una ansada en placa en un medio selectivo y diferencial: agar XLD) y posterior pruebas bioquímicas (TSI/LIA/SIM e IMVIC).

Además, en aquellas muestras de hisopados de las jaulas roseadas con fago no se aislaron SG ni ninguna otra cepa de Salmonella comparándola con jaulas testigos (las no roseadas)

El análisis bacteriológico para evaluar la presencia de la enterobacteria, consistió en la obtención de porciones de muestras de los órganos (hígado y vesículas) que se colocaron individualmente en 10 ml de agua peptonada bufferada (APB) marca Oxoid a 37°C por 24 ± 2 h (pre-enriquecimiento) Posteriormente, se realizó un enriquecimiento, transfiriendo 0,1 ml de APB a 10 ml de caldo Rapaport –Vassiliadis con soja (RVS)-Oxoid-. Después de la incubación por 24 ±1 h a 42°C se aisló por agotamiento una ansada en placa en un medio selectivo y diferencial: agar verde brillante, las cuales luego se incubaron por un periodo de 24 ± 1h a 37 ° C. Luego de su aislamiento se identificó la bacteria por medio de pruebas bioquímicas específicas.

Tanto en aves testigos como en las tratadas con el fago no se detectó SG. Las aves continuaron con un buen ciclo de postura, la mortandad animal durante esos cuatro meses fue normal y comparado con otros galpones de la misma granja donde se realizó la experiencia, no hubo brote de tifus (mientras que en los otros galpones sí hubo).

Esta experiencia piloto se pudo realizar solo en una granja, pero para más datos comparativos no se pudieron llegar a acuerdos para hacerla en más granjas.

*Estudio de la actividad de los fagos frente a superficies: El ensayo aún no se realizó porque no se pudieron conseguir las piezas metálicas que generalmente se utilizan en las granjas avícolas para la construcción de las jaulas de las aves.

La metodología a usar será la siguiente: Utilizando piezas de metal (zinc) de 1 cm x 0,1 cm x 5 cm se contaminaran experimentalmente con SG durante 10 minutos agitando a intervalos regulares, y se las secará a temperatura ambiente bajo flujo laminar. Luego las piezas se sumergirán en tubos de ensayo conteniendo 10 ml de la solución de cada uno de los desinfectantes a evaluar y otras en una solución con de fago. Los controles se colocaran en tubos conteniendo solución fisiológica (SF). Luego, todas las piezas se secan a temperatura ambiente bajo flujo laminar e incubadas a 37°C durante 24 horas en Placas de Petri.

Posteriormente, cada una de las piezas serán enjuagadas en SF para extraer la bacteria que no fue neutralizada por los diferentes tratamientos. Tomando alícuotas de cada muestra, se sembrará sobre placas de agar nutritivo para el recuento de SG.

7. TRABAJOS DE INVESTIGACIÓN REALIZADOS O PUBLICADOS EN EL PERIODO.

7.1. PUBLICACIONES. Debe hacerse referencia, exclusivamente a aquellas publicaciones en la cual se halla hecho explícita mención de su calidad de Becario de la CIC. (Ver instructivo para la publicación de trabajos, comunicaciones, tesis, etc.). Toda publicación donde no figure dicha aclaración no debe ser adjuntada. Indicar el nombre de los autores de cada trabajo, en el mismo orden que aparecen en la publicación, informe o memoria técnica, donde fue publicado, volumen, página y año si corresponde; asignándole a cada uno un número. En cada trabajo que el investigador presente -si lo considerase de importancia- agregará una nota justificando el mismo y su grado de participación.

7.2. PUBLICACIONES EN PRENSA. (Aceptados para su publicación. Acompañar copia de cada uno de los trabajos y comprobante de aceptación, indicando lugar a que ha sido remitido. Ver punto 7.1.)

7.3. PUBLICACIONES ENVIADAS Y AUN NO ACEPTADAS PARA SU PUBLICACIÓN. (Adjuntar copia de cada uno de los trabajos. Ver punto 7.1.)

7.4. PUBLICACIONES TERMINADAS Y AUN NO ENVIADAS PARA SU PUBLICACIÓN. (Adjuntar resúmenes de no más de 200 palabras)

Evaluación de diferentes vías de administración de un fago lítico en gallinas comerciales infectadas experimentalmente con Salmonella Gallinarum

Resumen

Una de las principales enfermedades que afecta a las aves de postura es la Tifosis Aviar (TA), causada por Salmonella entérica subespecie entérica serovar Gallinarum biotipo Gallinarum (SG). Este patógeno se transmite rápidamente mediante el contagio horizontal, mientras que la transmisión vertical cumple un papel significativo en la epidemiología de la TA. Existen diferentes medidas para controlar la contaminación de SG en avicultura, como bioseguridad, vacunación y productos antimicrobianos. Los medicamentos profilácticos y terapéuticos más utilizados son los antibióticos, pero su uso está restringido por la aparición de cepas resistentes y sus consecuencias en salud pública. En este sentido, los bacteriófagos líticos han mostrado un uso potencial como biocontroladores de SG en aves. Se evaluó la eficiencia de un bacteriófago lítico específico, administrado por vía oral durante una semana y por vía intramuscular (im) con una y dos dosis, en pollitas de recría con desafío de SG. La aplicación de bacteriófagos redujo la infección y la colonización de SG en órganos (ovario y oviducto, hígado, ciego e intestino); permitiendo un normal desarrollo de las aves. Con dos dosis de fago im se logró una mayor reducción de la infección y una menor colonización de SG en los órganos analizados

7.5. COMUNICACIONES. (No consignar los trabajos anotados en los subtítulos anteriores)

7.6. TRABAJOS EN REALIZACIÓN. (Indicar en forma breve el estado en que se encuentran)
Se presentaran resúmenes y datos de los trabajos realizados con los bacteriófagos durante el periodo 2014 en los siguientes congresos:

*EL XXIV CONGRESO LATINOAMERICANO DE AVICULTURA - Guayaquil 2015 a realizarse del 8 al 11 de septiembre de 2015.

*CAV 2015- XI Congreso Argentino de virología- II Congreso latinoamericano de Virología- del 23 al 26 de JUNIO de 2015; Palais Rogue, Jerónimo Salguero 1443/39. Ciudad autónoma de Buenos Aires , Argentina.

8. OTROS TRABAJOS REALIZADOS. (Publicaciones de divulgación, textos, etc.)

8.1. DOCENCIA

8.2. DIVULGACIÓN

8.3. OTROS

9. ASISTENCIA A REUNIONES CIENTÍFICAS. (Se indicará la denominación, lugar y fecha de realización y títulos de los trabajos o comunicaciones presentadas)

10. CURSOS DE PERFECCIONAMIENTO, VIAJES DE ESTUDIO, ETC. (Señalar características del curso o motivo del viaje, duración, instituciones visitadas y si se realizó algún entrenamiento)

1-Curso "Interacciones virus-hospedador. Modelos de estudio y caracterización", teórico para conocer e interpretar los abordajes experimentales actuales para el estudio de las diferentes interacciones virus hospedador. Se abordaron tres modelos diferentes de interacción virus hospedador como forma de abarcar un espectro amplio de cursos de las infecciones virales en hospedadores humanos, bacterianos y protozoarios.

Fecha de Realización: 10-10-14 al 5-12-14 Carga horaria: 40 hs.

Organizado por: Universidad Nacional de Luján.

2-Curso de Posgrado de Inmunología bovina y aviar, teórico/práctico para profundizar conocimientos de inmunología en cuanto a la evaluación de la inmunidad celular en bovinos y pollos.

Fecha de Realización: 01-09-14 al 06-09-14 Carga horaria: 45 hs. (20 hs Teóricas, 25 hs Prácticas)

Organizado por: Institutos de Virología y de Biotecnología del Centro de Investigaciones en Ciencias Veterinarias y Agronómicas del Instituto Nacional de Tecnología Agropecuaria, Castelar y el Laboratorio de Biología Celular y Molecular Aplicada - Facultad de Ciencias Veterinarias, Universidad Nacional del Litoral.

11. DISTINCIONES O PREMIOS OBTENIDOS EN EL PERIODO

12. TAREAS DOCENTES DESARROLLADAS EN EL PERIODO

13. OTROS ELEMENTOS DE JUICIO NO CONTEMPLADOS EN LOS TÍTULOS ANTERIORES (Bajo este punto se indicará todo lo que se considere de interés para la evaluación de la tarea cumplida en el período)

Informalmente participo en la detección de Salmonella en granjas de la zona de Luján y alrededores en muestras de materia fecal de gallinas, alimentos, agua y huevos. Además de ayudar en la recolección de muestras en ensayos con coccidios.

Así mismo, durante el período que abarcó la Beca, se realizaron obras de construcción y ampliación del bioterio avícola, lo que imposibilitó la realización de los ensayos en las jaulas experimentales como estaba previsto en el Plan de Actividades. Las obras concluyeron en el mes de diciembre de 2014, y el bioterio se habilitó en el mes de febrero de 2015, pudiéndose recién ahora realizar las pruebas experimentales previstas.

14. TITULO DEL PLAN DE TRABAJO A REALIZAR EN EL PERIODO DE PRORROGA O DE CAMBIO DE CATEGORÍA (Deberá indicarse claramente las acciones a desarrollar)

“Estudio de un bacteriófago lítico para el biocontrol de Salmonella Gallinarum en aves de postura”

*Evaluación de la eficacia de la administración del fago, de antibióticos y de la vacuna 9R en gallinas de postura infectadas experimentalmente con SG, a través del aislamiento y recuento de la enterobacteria en el tracto digestivo y órganos reproductivos.

*Aislamiento y cuantificación de SG en superficies contaminadas experimentalmente, tratadas con el fago y con desinfectantes de uso en avicultura.

*Evaluación del comportamiento del fago en distintas granjas en producción de la zona de Luján como también en los alrededores y en Plantas de Incubación.

*Análisis estadísticos.

*Divulgación de los resultados en congresos y revistas especializadas.

Condiciones de Presentación

A. El Informe Científico deberá presentarse dentro de una carpeta, con la documentación abrochada y en cuyo rótulo figure el Apellido y Nombre del Becario, la que deberá incluir:

- a. Una copia en papel A-4 (puntos 1 al 14).
- b. Las copias de publicaciones y toda otra documentación respaldatoria, deben agregarse al término del desarrollo del informe
- c. Informe del Director de tareas con la opinión del desarrollo del becario (en sobre cerrado).

Nota: El Becario que desee ser considerado a los fines de una prórroga, deberá solicitarlo en el formulario correspondiente, en los períodos que se establezcan en los cronogramas anuales.

.....
Firma del Director

.....
Firma del Becario

1. Denominación del trabajo: “Estudio de un bacteriófago lítico para el biocontrol de *Salmonella Gallinarum* en aves de postura”

2. Definición del problema y estado actual del conocimiento

La fagoterapia es el uso de fagos específicos de bacterias patógenas para el tratamiento de infecciones. Los fagos son virus que presentan tropismo sólo por bacterias específicas, inocuos para células eucariotas. Una vez que reconocen receptores específicos de la superficie bacteriana, estos virus inyectan su genoma e inmediatamente comienza el ciclo multiplicativo generando cientos de partículas virales, que luego del ensamblaje y maduración, con la ayuda de enzimas propias del virus, provocan la lisis de la pared celular bacteriana, liberando la progenie viral. Los bacteriófagos liberados infectan otras células susceptibles cercanas y se repite el ciclo de multiplicación viral dentro de esas células, amplificando de esta manera el efecto bactericida (Górski y Weber-Dabrowska, 2005; Hudson y col., 2005).

El uso de bacteriófagos para el tratamiento de infecciones fue planteado por primera vez por Félix d'Herelle en 1917, como un posible tratamiento de *Shigella dysenteriae* en personas enfermas de difteria. En países de Europa del este se ha continuado con este tratamiento hasta 1950 y 1960 (Kropinski, 2006; Inal, 2003).

Por otra parte, en 1928 Alexander Fleming descubrió un hongo capaz de inhibir el crecimiento de una bacteria, identificado como *Penicillium chydogenum*. Más tarde denominó penicilina a este inhibidor activo de los hongos. La enorme utilidad de los antibióticos no se evidenció hasta la década de 1940, cuando fue evaluada en ensayos clínicos y producida en forma masiva, desplazando la utilización de los bacteriófagos.

Un problema muy importante asociado con los antimicrobianos es la aparición y la diseminación de nuevas variedades de microorganismos resistentes. En el transcurso de los años cada vez más microorganismos han desarrollado resistencia a los antibióticos que en algún momento fueron eficaces contra ellos. La aparición de cepas microbianas multirresistentes es resultado de cambios genéticos de los microorganismos que les permiten tolerar cierta cantidad de un antimicrobiano que normalmente los inhibiría (Tórtora y col., 2007).

En la medicina veterinaria, en especial en la producción avícola, es frecuente la administración de aditivos en los alimentos. Entre ellos se encuentran los antibióticos que se utilizan como promotores de crecimiento, también denominados modificadores digestivos. El uso masivo y muchas veces inadecuado de los antibióticos en producción animal, en particular en avicultura, se asocia como responsable de la aparición de cepas resistentes en seres humanos como consecuencia de la acumulación de residuos en carnes y huevos (Official Journal European Union, 2003).

La tifosis aviar (TA) es causada por *Salmonella enterica* subespecie *enterica* serovar Gallinarum biovar Gallinarum (SG). Esta enterobacteria es huésped específica de aves con una baja incidencia zoonótica. En las aves provoca septicemia con aumento de la mortalidad y signos claros de anemia, depresión y abundante diarrea. En las gallinas en producción se observa una marcada baja de postura. La forma de transmisión de la TA en granjas de aves de postura es, principalmente, por contacto entre aves y por transmisión vertical. La eliminación esporádica de la bacteria por las heces también constituye una fuente de contaminación ambiental. Asimismo, roedores e insectos actúan como vectores mecánicos de la enfermedad, contribuyendo al ciclo de infección y perpetuación de la TA en el ambiente de la granja.

El control de esta enfermedad puede lograrse a través de programas de bioseguridad, higiene, manejo sanitario y eliminación de los planteles enfermos. En efecto, a pesar de su amplia distribución, la TA ha podido ser erradicada en las aves de postura comerciales, en la mayoría de los países desarrollados de Europa Occidental, Estados Unidos, Canadá, Australia y Japón. No obstante, en los últimos años han aparecido brotes de esta enfermedad en algunos países europeos, lo que demuestra la necesidad de buscar nuevas alternativas de control de la enfermedad (Chacana y Terzolo, 2003; Young-Ju y col, 2003; OIE, 2012).

La vacuna más utilizada para el control de la TA es una vacuna inactivada proveniente de una cepa rugosa denominada 9R. La vacuna se administra por vía intramuscular a las 8 semanas de vida, con un refuerzo a las 16 semanas. La vacunación reduce la mortalidad y estimula la producción de anticuerpos transitorios, pero no previene la infección con cepas virulentas de campo. Por estas razones, en muchos casos se recomienda la utilización de antimicrobianos antes y después de la vacunación (OIE, 2012).

Los bacteriófagos líticos constituyen una alternativa novedosa para el control de la TA dada su alta especificidad de infección y una cinética tal que la dosis inicial se incrementa exponencialmente al alcanzar la célula blanco, con un mecanismo de acción totalmente diferente al de los antibióticos y un bajo costo en su producción (Joerger, R, 2003, Lim y col., 2011).

Existen numerosos trabajos sobre la aplicación de fagos para el biocontrol de patógenos en los diferentes eslabones de la cadena productiva. En la producción primaria, se realizaron estudios en el control de *Salmonella* en aves (Hurley y col, 2008, Vandeplost y col., 2010, Lim y col., 2011, Borie y col., 2011) y de *E. coli* 0157:H7 en bovinos (O'Flynn y col., 2004, Viscardi y col., 2008). En lo referente a la producción de alimentos, la *Food and Drug Administration* (FDA) aprobó dos cocktails comerciales de fagos para el biocontrol de *Listeria monocytogenes* en diversos productos listos para el consumo: ListShield™ (Intralyrix, Inc. www.intralytix.com) y Listex™ P10 (EBI Food Safety www.ebifoodsafety.com).

Los bacteriófagos también pueden usarse como agentes bactericidas en superficies. Su aplicación en forma de spray ayudaría al control de SG en el ambiente, como complemento en los programas de desinfección e higiene. Además, dado que la mayoría de los desinfectantes se inactivan en presencia de materia orgánica, la aplicación de fagos sobre superficies contaminadas contribuiría a que los desinfectantes actúen más eficazmente (Huff y col., 2003).

El proyecto tiene por finalidad brindar herramientas de control y prevención de SG en granjas de gallinas comerciales, que tiendan a la optimización productiva de los animales como el primer eslabón en la cadena agroalimentaria. Es por ello que los resultados proyectados en el trabajo tendrán una fuerte transferencia en la Industria Avícola, en concordancia al compromiso de la Universidad Nacional de Luján (UNLu) hacia este sector.

3. Trabajo previo realizado referente a este proyecto

El grupo de trabajo de la UNLu viene realizando diversos estudios en el sector de producción pecuaria, bajo el Programa de Investigación en Microbiología Aplicada a la Avicultura, que posee varios proyectos, entre ellos el denominado: "Uso de Bacteriófagos para el control de *Salmonella* Gallinarum y *Salmonella* Enteritidis en producción avícola." (CDD-CB: 042-11). El primer trabajo de este proyecto consistió

en el aislamiento del bacteriófago a partir de las heces de un ave enferma de tífus (Prosdócimo y col, 2010). Luego se utilizó este mismo fago en gallinas en producción, las que fueron infectadas experimentalmente con SG. Los resultados indicaron que el fago disminuyó el desarrollo de la infección bacteriana y permitió la ovoposición normal (Prosdócimo y col, 2010). También se evaluó el efecto del fago lítico contra SG utilizando dos vías de administración: oral e intramuscular (i.m). Para la administración oral se utilizaron varias dosis con un elevado título de virus, para asegurar su llegada a los órganos blanco, pues se determinó su sensibilidad a pH 2, mientras que para la vía i.m. se utilizó sólo una dosis. Como no existió diferencia entre las dos vías de administración, se propuso la vía i.m. como la más adecuada (Prosdócimo y col. 2012). Se evaluó además el efecto de múltiples inoculaciones, utilizando dos dosis del fago por vía i.m (día 0 y día 4 posinfección). No hubo diferencias significativas entre una o dos inoculaciones del virus, por lo que se decidió que todas las experiencias se realizaran utilizando una dosis de fago (Estos resultados serán presentados en las XIIIV Jornadas de Divulgación Técnico- Científicas 2013; Jornada Latinoamericana Facultad de Ciencias Veterinarias UNR; II Congreso de Desarrollo Ganadero Sustentable, a desarrollarse el martes 27 de agosto de 2013 en Casilda, Santa Fe). Por otra parte, mediante ensayos *in vitro* se determinó que el fago no era lítico para las cepas atenuadas utilizadas para la fabricación de vacunas 9R (resultados que serán presentados al XIII Congreso Argentino de Microbiología 2013 y II Congreso de Microbiología Agrícola y Ambiental 2013, Buenos Aires, Argentina).

4. Objetivo General

Implementar una propuesta de control y prevención de SG en granjas con aves de postura que incluya la aplicación de bacteriófagos tanto como agentes terapéuticos como de control ambiental.

Objetivos Particulares

1. Caracterizar molecularmente el bacteriófago
2. Determinar los parámetros del ciclo lítico
3. Estudiar el comportamiento del fago en presencia de desinfectantes de uso en avicultura.
4. Evaluar la eficacia de la administración del fago, de antibióticos y de la vacuna 9R en gallinas de postura infectadas experimentalmente con SG, a través del aislamiento y recuento de la enterobacteria en el tracto digestivo y órganos reproductivos
5. Aislar y cuantificar SG en superficies contaminadas experimentalmente tratadas con el fago y con desinfectantes de uso en avicultura.
6. Evaluar el comportamiento del fago en distintas granjas en producción

5. Métodos y Técnicas a emplear

- a) Caracterización molecular del fago: a través de distintas técnicas de aislamiento y extracción del genoma viral, se determinará su naturaleza y el perfil de restricción del genoma del fago, que permitirá estimar su tamaño.

Además el fago se caracterizará morfológicamente, con la utilización de microscopía electrónica.

b) Parámetros del ciclo lítico: se determinarán los parámetros del ciclo lítico del fago de SG: constante de adsorción, período de eclipse y tamaño de explosión, y mediante la cinética de adhesión a la bacteria huésped, a partir de alícuotas tomadas a distintos tiempos de incubación, se realizará recuento de placas de lisis por el método de doble capa en agar para determinar el título de fagos a cada tiempo analizado. Brevemente se describe la técnica de doble capa que se utilizará para el recuento de fagos: a 0,2 ml de cultivo en fase estacionaria de la bacteria huésped se incorporarán 0,1 ml de la muestra correspondiente del fago y se agregarán 3,5 ml de agar blando (agar-agar 0,7%); esta mezcla se volcará en cajas de Petri que contengan 10 ml de agar nutritivo, las que se dejarán secar bajo flujo laminar durante 15 minutos y luego se incubarán, con el agar hacia arriba, durante 3 horas a 37°C.

c) Estudio del comportamiento del fago en presencia de desinfectantes de uso en avicultura: se analizará el efecto de la exposición del fago a diferentes desinfectantes, como amonio cuaternario, ácido acético, glutaraldehído y lavandina, a partir de concentraciones que habitualmente se utilizan en las granjas de producción. En tubos conteniendo 10 ml de las diluciones correspondientes de cada desinfectante se agregará 1 ml del fago, incubando la mezcla a temperatura ambiente. Cada 10 minutos, completando un ciclo de 60 minutos, se tomarán alícuotas para realizar el recuento de fagos por el método de doble capa. Se utilizará como blanco un tubo conteniendo 10 ml de PBS adicionado con 1 ml de fago.

d) Aves: se utilizarán pollitas de la línea Hyline de 6 a 9 semanas de edad, libres de *Salmonella* spp, alimentadas con una ración balanceada comercial de acuerdo a los requerimientos y el consumo de la línea. Las aves serán alojadas en las jaulas experimentales del Bioterio Avícola de la UNLu.

e) Cepa desafío: las pollitas serán desafiadas por vía ingluvial con 104 unidades formadoras de colonia (ufc) por ave de SG INTA90 (cedida por el Dr Horacio Terzolo de la Estación Experimental Agropecuaria Balcarce del Instituto Nacional de Tecnología Agropecuaria, INTA-EEA Balcarce, Argentina).

f) Fago lítico: se utilizará el fago aislado de las heces de un ave enferma (Prosdócimo y col., 2010). Se administrará por vía i.m. 10^9 unidades formadoras de placa (ufp).

g) Antibióticos (ATB): se utilizará Kanamicina al 10% y Gentamicina al 5% ambos ATB aminoglucósidos.

h) Vacunas 9R: se probarán dos vacunas de fabricación nacional.

i) Diseño experimental

Las pollitas Hyline de 6 a 9 semanas de edad recibirán los siguientes tratamientos

Tratamiento 1: aves control

Tratamiento 2: aves infectadas con SG

Tratamiento 3: aves infectadas con SG y tratadas con el fago

Tratamiento 4: aves infectadas con SG y tratadas con ATB

Tratamiento 5: aves infectadas con SG, tratadas con ATB y fago

Tratamiento 6: aves infectadas con SG y vacunada con 9R

Tratamiento 7: aves infectadas con SG, vacunadas con 9R y tratadas con el fago

Tratamiento 8: aves infectadas con SG, vacunadas con 9R y tratadas con ATB

En los tratamientos que correspondan, los animales infectados con SG recibirán a las dos horas posinfección (p.i) fago, ATB y 9R por vía i.m,

A los 11 días p.i. las aves serán sacrificadas y se les extraerán los siguientes órganos: hígado, intestino, ciego y ovario, a los que se les realizará el correspondiente análisis bacteriológico.

- j) Análisis bacteriológico: para evaluar la presencia de la enterobacteria, porciones de muestras de los órganos serán colocadas individualmente en 10 ml de agua peptonada bufferada (APB) marca Oxoid a 37°C por 24 ± 2 h. Posteriormente, se realizará un pre-enriquecimiento, transfiriendo 0,1 ml de APB a 10 ml de caldo Rapaport –Vassiliadis con soja (RVS)-Oxoid-. Después de la incubación por 24 ±1 h a 42°C se aislará por agotamiento una ansada en placa en un medio selectivo y diferencial: agar verde brillante. Las placas serán incubadas posteriormente por un periodo de 24 ± 1h a 37 ° C. Luego de su aislamiento se identificará la bacteria por medio de las pruebas bioquímicas específicas (Voogt y col, 2001). Para la cuantificación de SG, las muestras se colocarán en tubos con 9 ml de agua peptonada, que se agitará vigorosamente durante 30 segundos en un agitador “Vortex”, luego se transferirá una alícuota a medio selectivo diferencial específico incubándose por 24 horas a 37° C.
- k) Experiencias en superficies: piezas de metal (zinc) de 1 cm x 0,1 cm x 5 cm serán contaminadas experimentalmente con 10⁷ufc/ml de SG y secadas a temperatura ambiente bajo flujo laminar. Luego las piezas serán sumergidas en tubos de ensayo conteniendo 10 ml de la solución de cada uno de los desinfectantes a evaluar y otras serán sumergidas en una solución con 10⁹ ufp/ml de fago. Los controles serán colocados en tubos conteniendo solución fisiológica (SF). Luego, todas las piezas serán secadas a temperatura ambiente bajo flujo laminar e incubadas a 37°C durante 24 horas. A continuación, cada una de las piezas serán enjuagadas en SF para extraer la bacteria que no fue neutralizada por los diferentes tratamientos. Se realizará el recuento de SG por la metodología descripta anteriormente.
- l) Evaluación del comportamiento del fago en distintas granjas en producción: en aquellas granjas que posean recurrencia de TA se inoculará por un lado 10⁹ ufp/ml de fago por vía i.m y, por el otro, las superficies serán tratadas con una solución spray conteniendo 10⁹ ufp/ml de fago.
- m) Análisis estadístico: para analizar los resultados se utilizará el programa SPSS.

6. Cronograma mensual de actividades a desarrollar en el período de la beca

Mes 1: Caracterización molecular del fago.

Mes 2: Determinación de los parámetros del ciclo lítico.

Mes 3: Estudio del comportamiento del fago en presencia de desinfectantes de uso en avicultura.

Mes 4 a mes 7: Evaluación de la eficacia de la administración del fago, de antibióticos y de la vacuna 9R en gallinas de postura infectadas experimentalmente con SG, a través del aislamiento y recuento de la enterobacteria en el tracto digestivo y órganos reproductivos.

Mes 8: Aislamiento y cuantificación de SG en superficies contaminadas experimentalmente, tratadas con el fago y con desinfectantes de uso en avicultura.

Mes 9 a mes 10: Evaluación del comportamiento del fago en distintas granjas en producción.

Mes 11: Análisis estadísticos.

Mes 12: Divulgación de los resultados en congresos y revistas especializadas.

7. Bibliografía

- Borie, C.; Hauva, C.; Quiroga, V.; Bravo, V.; Sánchez, M.; Morales, M.; Retamal, P.; Retamales, J.; Robeson, J. 2011. Uso de bacteriófagos en gallinas de postura infectadas con *Salmonella enterica* serotipo Enteritidis: prevención de la colonización intestinal y reproductiva. Arch. Med. Vet. 43: 85-89
- Chacana, P.; Terzolo, H. 2003. Revisión sobre pullorosis y tifosis aviar. Nuevos enfoques para viejos conceptos. Rev. Med. Vet., 84: 14-20
- Górsky, A.; Weber-Dabrowska, B. 2005. The potential role of endogenous bacteriophages in controlling invading pathogens. Cell. Mol. Life Sci. 62: 511-519
- Hudson, J.; Billington, C.; Carey-Smith, G.; Greening, G. 2005. Bacteriophages as biocontrol agents in food. J. Food Prot. 68: 426-437
- Huff, W.; Huff, G.; Rath, N.; Balog, J.; Donoghue, A. 2003. Evaluation of aerosol spray and intramuscular injection of bacteriophage to treat an *Escherichia coli* respiratory infection. Poult. Sci., 82: 1108-1112
- Hurley, A.; Maurer, J.; Lee, M. 2008. Using bacteriophages to modulate *Salmonella* colonization of the chicken's gastrointestinal tract: lessons learned from in silico and in vivo modeling. Avian Dis 52: 599-607
- Inal, J. 2003. Phage therapy: a reappraisal of bacteriophages as antibiotics. Arch Immunol Ther Exp (Warsz) 51: 237-244
- Joerger, R. 2003. Alternatives to antibiotics: bacteriocinas, antimicrobial peptides and Bacteriophages. Poult. Sci. 82: 640-647
- Kropinski, A. 2006. Phage Therapy - Everything Old is New Again. Can J Infect Dis Med Microbiol 17: 297-306
- Lim, T.; Lee, D.; Lee, Y.; Park, J.; Youn, H.; Kim, M.; Lee, H.; Yang, S.; Cho, W.; Lee, J.; Park, S.; Choi, I.; Song, C. 2011. Efficacy of bacteriophage therapy on horizontal transmission of *Salmonella Gallinarum* on commercial layer chickens. Avian Dis., 55: 435-438
- O'Flynn, G., Ross, R.; Fitzgerald, G.; Coffey, A. 2004. Evaluation of a cocktail of three bacteriophages for biocontrol of *Escherichia coli* O157:H7. Appl Environ. Microbiol. 70: 3417-3424
- Official Journal of the European Union. 2003. Regulation 1831/2003 on additives for use in animal nutrition.
- OIE 2012. Territorial manual. http://www.oie.int/en/international_standard_sehing/terrestrial_manual/access_online/

- Prosdócimo, F.; Anselmo, R.; Oliveto, N.; Gomez, I.; Viora, S.; De Franceschi M.; Barrios, H. 2010. Evaluación de un bacteriófago para la prevención de *Salmonella Gallinarum* en aves de postura. Rev. Arg. Microbiol. 42: 114
- Prosdócimo, F.; Anselmo, R.; Ortiz, X.; Vignoni, E.; Viora, S.; Marenda F.; De Franceschi M.; Barrios, H. 2012. Administración de un fago lítico para el control de *Salmonella Gallinarum* en gallinas comerciales de postura. XI Congreso Latinoamericano de Microbiología e Higiene de Alimentos. Argentina.
- Tórtora, G.; Funke, B.; Case, C. 2007. Introducción a la Microbiología. 9a ed. Buenos Aires, Medicina Panamericana
- Vandeplass, S.; Dubois Dauphin, R.; Beckers, Y.; Thonart, P.; Thewis, A. 2010. Salmonella in chicken: current and developing strategies to reduce contamination at farm level. J Food Prot 73: 774-785
- Viscardi, M.; Perugini, A.; Auriemma, C.; Capuano, F.; Morabito, S.; K. P. Kim, K.; Loessner, M.; Iovane, G. 2008. Isolation and characterisation of two novel coliphages with high potential to control antibiotic-resistant pathogenic Escherichia coli (EHEC and EPEC). Int J Antimicrob Agents 31: 152-157
- Voogt, N.; Raes, M.; Wannet, W.; Henken, A.; van de Giessen, A. 2001. Comparison of selective enrichment media for the detection of Salmonella in poultry faeces. Lett. Appl. Microbiol. 32:89-92
- Young-Ju, L.; Ki-Seuk, K.; Yong-Kuk, K.; Ryun-Bin, T. 2003. Biochemical characteristics and antimicrobial susceptibility of *Salmonella Gallinarum* isolated in Korea. J. Vet. Sci. 4: 161-166

8. Vinculación del plan de trabajo con otros proyectos de investigación en ejecución en el mismo lugar de trabajo

Como fue mencionado en el punto 3, este plan de trabajo se vincula directamente con el proyecto: "Uso de Bacteriófagos para el control de *Salmonella Gallinarum* y *Salmonella Enteritidis* en producción avícola." (CDD-CB: 042-11), que forma parte del Programa de Investigación en Microbiología Aplicada a la Avicultura, que se desarrolla en el Departamento de Ciencias Básicas de la UNLu.

Lugar de trabajo

9. Identificación del lugar donde se realizará el plan de trabajo.

El plan de trabajo realizará bajo la dependencia del Departamento de Ciencias Básicas de la UNLu. Los ensayos se llevarán a cabo en los laboratorios de la UNLu y en el bioterio avícola ubicado en el campo experimental.

10. Descripción de la infraestructura y servicios disponibles en relación a los requerimientos del plan de trabajo

La investigación se realizará en la Universidad Nacional de Luján que posee en su campo experimental un bioterio avícola que cuenta con jaulas experimentales (unidades de aislamiento) con ambiente semicontrolado, comedero manual tipo canaleta, bebederos individuales tipo niple con bandeja antigoteo, luz eléctrica tipo campana ubicada en el centro de cada jaula y un tanque dosificador de agua. La sala además está equipada con una estufa a gas de tiro balanceado, un extractor de aire con filtro tipo Hepa y un termómetro digital. Además, en el mismo predio funciona el Laboratorio de Referencia de Microbiología y Sanidad Avícola en el marco del Plan Nacional de Sanidad Avícola y el Programa de Control de las Micoplasmosis y Salmonelosis de las aves. Asimismo se cuenta con acceso a redes de internet; correo electrónico y base de datos. La Universidad cuenta con un laboratorio de Biología Molecular con equipamiento específico para la realización de las técnicas descriptas en el proyecto.