

RESUMEN

Salmonella es una de las principales causas de toxiinfecciones alimentarias en el mundo. En Estados Unidos, causa cerca de 1,2 millones de casos anuales, de los cuales 23.000 son hospitalizados y 450 fallecen. En Europa, los últimos datos recogidos por la Autoridad Europea de Seguridad Alimentaria publicaron un total de 94.203 casos, de los cuales 8.730 fueron en España. La principal fuente de la infección son los productos de origen animal, principalmente los huevos y la carne de pollo, siendo *Salmonella* Enteritidis, *Salmonella* Typhimurium y *Salmonella* Typhimurium monofásica los principales serotipos relacionados con las toxiinfecciones humanas. Sin embargo, en los últimos años está aumentando la prevalencia de otros serotipos de gran relevancia para la salud pública, como *Salmonella* Infantis, llegando a ser el más prevalente en pollo de engorde.

Los Programas Nacionales de Control de *Salmonella* junto con las medidas de bioseguridad, protocolos de limpieza y desinfección, así como buenas prácticas de higiene, han logrado reducir la prevalencia de la bacteria a nivel de campo. Sin embargo, cada año siguen surgiendo nuevos casos de salmonelosis en la especie humana, y se sigue detectando la presencia de la bacteria en las explotaciones avícolas. Por ello, se continúan buscando nuevas alternativas en la lucha contra la bacteria, como pueden ser el empleo de aditivos en el pienso, un buen manejo a nivel de campo o el uso de bacteriófagos.

Los bacteriófagos son virus ubicuos en el ambiente y se encuentran ampliamente distribuidos en la naturaleza. Son microorganismos que atacan específicamente a bacterias, alterándolas hasta destruirlas. Estas características hacen de los fagos una herramienta muy prometedora para la eliminación de *Salmonella* en explotaciones avícolas como medida complementaria a la limpieza y desinfección, y como una herramienta más de control para incluir en las buenas prácticas de higiene a nivel de campo.

En este contexto, en esta tesis doctoral hemos centrado nuestros estudios en conocer la diversidad fágica en las explotaciones avícolas, y estudiar la aplicación de la terapia fágica para el control de *Salmonella* como medida complementaria a la limpieza y desinfección.

Para ello, se realizaron tres experimentos durante el periodo de enero de 2017 y diciembre de 2019, en los que se aislaron bacteriófagos de diferentes muestras procedentes de granjas avícolas y se estudió su epidemiología para después multiplicarlos y enfrentarlos a dos de los principales serotipos, *Salmonella* Enteritidis y *Salmonella* Infantis.

El objetivo del **primer experimento** fue evaluar la prevalencia de bacteriófagos frente a *Salmonella* en granjas comerciales de gallinas ponedoras y broilers. Para ello, se aislaron bacteriófagos específicos de *Salmonella* a partir de 141 muestras de heces de granjas de gallinas ponedoras (n = 108) y broilers (n = 33) localizadas en la Comunidad Valenciana. Para el aislamiento de los fagos, se emplearon los serotipos más relevantes aislados en avicultura (*Salmonella* Enteritidis, *Salmonella* Typhimurium, *Salmonella* Typhimurium monofásica, *Salmonella* Infantis, *Salmonella* Hadar, *Salmonella* Virchow, *Salmonella* Senftenberg, *Salmonella* Ohio y *Salmonella* Kentucky). El análisis de las muestras reveló que el 100% presentaban fagos frente a *Salmonella*, siendo los más prevalentes los bacteriófagos frente a *Salmonella* Enteritidis (93%), seguidos de *Salmonella* Virchow (59%), *Salmonella* Typhimurium (55%), *Salmonella* Infantis (52%) y *Salmonella* Ohio (51%). Estos resultados indican que las granjas avícolas podrían representar una importante fuente de fagos de *Salmonella*. Además, se ha observado una estrecha relación entre la prevalencia de bacteriófagos frente a *Salmonella* y la prevalencia de serotipos de *Salmonella* en las granjas avícolas, lo que sugiere que los fagos coexisten con su serotipo. Además, el hecho de aislar un mayor número de bacteriófagos frente a *Salmonella* Enteritidis sugiere que la vacuna sea una doble medida de control, ya que inmuniza a los animales y aumenta la prevalencia de fagos contra los aislados de importancia en salud pública. Por último, a mayor concentración bacteriana en el medioambiente puede aumentar la probabilidad de aislar bacteriófagos frente a ella. En este contexto, se podrían aislar los bacteriófagos presentes en las granjas contaminadas con *Salmonella*, aumentar su concentración y aplicarlos frente a las mismas granjas avícolas positivas a *Salmonella*.

El objetivo del **segundo experimento** fue evaluar el efecto de los bacteriófagos contra *Salmonella* Infantis y *Salmonella* Enteritidis en las superficies de las granjas, y evaluar la aplicación del procedimiento de los bacteriófagos como desinfectante contra *Salmonella* en las condiciones de campo. En este estudio se seleccionaron dos serotipos de gran relevancia en la producción avícola (*Salmonella* Infantis y *Salmonella* Enteritidis) para contaminar las superficies del suelo. Posteriormente, se aplicaron contra ellos dos

bacteriófagos aislados de las mismas granjas avícolas. El estudio se realizó dentro de una granja experimental para imitar las condiciones de producción reales. La concentración de *Salmonella* Infantis y *Salmonella* Enteritidis en las superficies de la nave disminuyó en $4,55 \log_{10}$ UFC/mL y $3,85 \log_{10}$ UFC/mL, respectivamente, después de dos aplicaciones consecutivas de bacteriófagos. La mayor reducción de *Salmonella* Infantis y *Salmonella* Enteritidis se obtuvo el 5º día después de la primera aplicación ($7 \log_{10}$ CFU/mL y $4,1 \log_{10}$ CFU/mL, respectivamente). Estos resultados ponen de manifiesto que los bacteriófagos podrían ser una herramienta prometedora para utilizar en combinación con los procedimientos de limpieza y desinfección. Sin embargo, es necesario realizar más estudios para demostrar la eficacia de los bacteriófagos como desinfectantes en las explotaciones comerciales.

Por último, el objetivo del **tercer experimento** fue evaluar la aplicación experimental de los autofagos para el control de *Salmonella* Enteritidis en una granja de gallinas ponedoras contaminada de forma natural. El estudio se llevó a cabo en una nave experimental cuyo estatus sanitario reveló presencia de *Salmonella* Enteritidis. Se aisló y fenotipó el autofago a partir de muestras ambientales tomadas de la misma nave donde 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, todas de las muestras de paños dieron ausencia a *Salmonella*. Por lo que respecta a los recuentos obtenidos de las muestras de heces tras la aplicación del bacteriófago sobre los animales, 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, no solo como una medida para reducir la excreción de *Salmonella* por parte de los animales infectados, sino como medida complementaria en la limpieza y desinfección de las instalaciones con una gran eficacia. 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.

En conclusión, los bacteriófagos son virus específicos de bacterias que pueden utilizarse no solo como antimicrobianos para tratar la infección de animales, sino también como una herramienta complementaria del proceso de limpieza y desinfección de las granjas avícolas. Los resultados más relevantes que se han obtenido de esta tesis doctoral es que el sector avícola dispone de una herramienta prometedora, económica y ecológica capaz de reducir significativamente la prevalencia de *Salmonella* cuando las medidas actuales no son capaces de eliminarla de las granjas avícolas. Sin embargo, se necesitan más estudios para demostrar la eficacia de los fagos en combinación con otras medidas de control actuales, como los aditivos o los protocolos de limpieza y desinfección.