

EVALUACIÓN DE DIFERENTES VÍAS DE ADMINISTRACIÓN DE UN FAGO LÍTICO EN GALLINAS COMERCIALES INFECTADAS EXPERIMENTALMENTE CON SALMONELLA GALLINARUM

Ortiz, Xoana¹; Barrios, Hebe².

Introducción

Una de las principales enfermedades que afecta a las aves de postura es la tifosis aviar (TA) causada por el patógeno *Salmonella enterica* subespecie *enterica* serovar *Gallinarum* biotipo *gallinarum* (SG), la cual produce importantes pérdidas económicas debido a las altas tasas de mortalidad, disminución en la producción de huevos, costos veterinarios y de saneamiento de las instalaciones. Este patógeno se transmite rápidamente mediante el contagio horizontal. La ingesta de heces infectadas con SG por pollos sanos es la vía más directa de infección, permitiendo una rápida propagación de la enfermedad. A pesar de que la tasa de transmisión vertical cumple un papel significativo en la epidemiología de la TA, la presencia de la bacteria en huevos provenientes de gallinas infectadas es relativamente baja; sin embargo es suficiente para propagar la afección, dado que los pollitos eclosionados a partir de huevos infectados actúan como vectores y multiplicadores, difundiendo la bacteria en los distintos lotes de la planta de incubación y posteriormente en los diversos establecimientos avícolas. Pueden actuar como vectores mecánicos de la enfermedad tanto los insectos, roedores y aves silvestres como otros animales y el ser humano. Asimismo, existen diferentes estrategias para controlar la contaminación de SG en avicultura, como higiene, manejo sanitario, eliminación de aves enfermas, vacunación y productos antimicrobianos. Los medicamentos profilácticos y terapéuticos más utilizados son los antibióticos, sin embargo su uso está restringido, no sólo por las consecuencias en salud pública que generan sino también por la aparición de cepas resistentes.

Debido a la limitada efectividad de las medidas de control antes mencionadas, los bacteriófagos líticos han mostrado un uso potencial como biocontroladores de SG en aves. Los bacteriófagos, también conocidos como fagos, son virus que infectan específicamente a bacterias y pueden provocar su muerte. Fueron descritos por primera vez por Frederick Twort y posteriormente, por Félix d'Herelle. No tienen su propio metabolismo, sino que dependen de la bacteria huésped donde se multiplican. Exhiben rangos limitados de huéspedes, generalmente tienen como objetivo cepas

¹Becaria doctoral CIC, Universidad Nacional de Luján. xoanaortiz@hotmail.com

²Universidad Nacional de Luján. barrioshebe@gmail.com

específicas, y pueden replicarse a través de ciclos líticos y ciclos lisogénicos. En un ciclo lítico o productivo ocurren varias etapas: Adsorción, penetración, síntesis de proteínas tempranas, replicación del material genético, maduración y liberación de los viriones maduros. En síntesis, una vez que se produce la interacción entre un bacteriófago y su célula hospedadora, se introduce el material genético al interior y se induce la síntesis de los componentes necesarios para fabricar más partículas víricas. Posteriormente, los diferentes componentes se ensamblan en una secuencia determinada, y por último, la lisozima del fago degrada la pared celular de la célula hospedadora, produce la lisis bacteriana, y se liberan los nuevos bacteriófagos.

El objetivo de este trabajo fue evaluar la eficiencia de un bacteriófago lítico específico como alternativa para el control de SG, administrado por vía oral durante una semana y por vía intramuscular con una y dos dosis, en pollitas de recría infectadas experimentalmente con SG.

Materiales y Métodos

El ensayo se realizó en el Bioterio Avícola ubicado en el Campo Experimental de la Universidad Nacional de Luján (UNLu), situado en Avenida Constitución y Ruta Nacional 5, Luján, provincia de Buenos Aires, Argentina.

El Bioterio tiene una habitación de 16 m² en el que se disponen 12 jaulas de 30 cm de ancho x 45 cm de largo. Los bebederos son tipo "niple" y los comederos tipo canaleta. El ambiente semicontrolado es a través de un sistema de aire filtrado por medio de filtros tipo Hepa y temperatura constante a 25°C por calefacción a gas.

Aves: Se utilizaron pollitas de la línea Hy-Line de 6 semanas de edad provenientes de una granja de la zona de influencia de la UNLu, que fueron alojadas en las jaulas experimentales

Alimento: Las aves fueron alimentadas con una ración balanceada comercial (Tabla 1) de acuerdo con los requerimientos y consumo de la línea (Hy-Line variedad W-36, 2016) y agua *ad-libitum*. Una muestra del alimento fue analizada para verificar ausencia de *Salmonella* spp.

Tabla 1. Tabla de componentes e ingredientes de la ración balanceada para la etapa de recría (Fuente: Ganave. Grupo Pilar S.A)

RECRÍA LÍNEA DOMESTICA									
Composición centesimal	Pt (mín)	EE (mín)	F (máx)	HR (máx)	MT (máx)	Ca	P	PA	ED
	12%	3%	7%	13%	8%	0,8/1,2%	0,6/1,0%	0,3/0,45%	2300Kcal/Kg MS
Ingredientes	Maíz, sorgo, trigo, cebada, avena, alfalfa deshidratada, afrechillo de trigo, harina de girasol, harina de soja, harina de algodón, soja integral, gluten meal, ceniza de hueso, harina de pescado, harina de carne, cloruro de sodio, conchilla, óxido de zinc, óxido cúprico, óxido manganeso, sulfato ferroso, iodato de calcio, carbonato de cobalto, selenito de sodio, antioxidante.								

Referencias: Pt: Proteína// EE: Extracto etéreo// F: Fibra// HR: Humedad// MT: Minerales totales// Ca: Calcio// P: Fósforo// PA: Fósforo asimilable// ED: Energía digestible

Cepa de inoculación: Las pollitas fueron desafiadas por vía ingluvial con 10^4 unidades formadoras de colonia (ufc)/ave de SGINTA90, cedida por el Dr. Terzolo.

Bacteriófago: De la vesícula biliar de una gallina comercial enferma de tifus, se aisló y se identificó bioquímicamente y antigénicamente SG. La materia fecal de esa ave se colocó en caldo nutritivo y se inoculó con el cultivo de SG, incubando a 35°C por una noche. Una alícuota del enriquecimiento se descontaminó con cloroformo, se agitó y conservó a 4°C . La presencia de fagos se comprobó por el método de doble capa de agar (Kropinski *et al.*, 2009) y se conservó en caldo nutritivo más cloroformo.

Diseño Experimental: Se realizaron dos experiencias, utilizando diferentes vías de administración y dosis del fago. En la experiencia 1 se utilizó la vía oral, mientras que en la experiencia 2 se utilizó la vía intramuscular (im).

Experiencia 1: las aves fueron separadas en 4 grupos y recibieron los siguientes tratamientos:

Tratamiento 1 (T1): ocho aves testigo

Tratamiento 2 (T2): ocho aves infectadas con SG

Tratamiento 3 (T3): ocho aves infectadas con SG y tratadas con fago oral

Tratamiento 4 (T4): ocho aves tratadas con fago oral

Experiencia 2: las aves fueron separadas en 4 grupos y recibieron los siguientes tratamientos:

Tratamiento 1 (T1): diez aves testigo

Tratamiento 2 (T2): diez aves infectadas experimentalmente con SG.

Tratamiento 3 (T3): dieciséis aves infectadas con SG y con 1 dosis de fago im

Tratamiento 4 (T4): doce aves infectadas con SG y con 2 dosis de fago im

Inoculación con SG y administración del fago: En la experiencia 1, durante 3 días previos a la infección con SG las aves de los T3 y T4 recibieron una dosis de fago oral (vía ingluvial) de 1 ml por ave de 10^9 unidades formadoras de placa (ufp). Las aves de los T2 y T3 fueron inoculadas experimentalmente por vía ingluvial con $1,49 \times 10^4$ ufc/ave de SGINTA90. Transcurridas 2 horas post-infección (pi) se les administró a las aves de los T3 y T4 una dosis de fago oral. A las aves de los T3 y T4 se les siguió administrando fago oral durante 4 días pi. A las aves del T1 no se les administró SG ni fueron tratadas con el fago, constituyendo el grupo control sano. En la experiencia 2 se inoculó por vía ingluvial una dosis de $1,21 \times 10^4$ ufc/ave de SGINTA90 a los T2, T3 y T4. A las 3 horas pi se les administró por vía im 1 dosis de fago a las aves de los T3 y T4 (10^9 ufp/ave). A los 4 días pi las aves del T4 recibieron una segunda dosis del fago por vía im de 10^9 ufp/ave. A las aves del T1 no se les administró SG ni fueron tratadas con el fago, constituyendo el grupo control sano.

Análisis Bacteriológico: Los procedimientos de aislamientos de SG se realizaron de acuerdo a la norma ISO 6579: 2002 (Caffer y Terrango, 2001; ANMAT, 2013). La detección, aislamiento e identificación de SG en las muestras de alimento, materia fecal y órganos tomadas en el ensayo se analizó llevando a cabo un pre-enriquecimiento en agua peptonadabufferada (APB) y luego se incubó en estufa a 37°C durante $18 \text{ h} \pm 2 \text{ h}$. Posteriormente, se transfirió 0,1 ml del cultivo obtenido en la etapa anterior a un tubo de ensayo con 10 ml de Rapaport-Vassiliadis Soja (RVS) y se incubó a $42^\circ\text{C} \pm 1^\circ\text{C}$ durante $24 \text{ h} \pm 3 \text{ h}$. De los cultivos de RVS obtenidos previamente, se tomó una ansada y se sembró por aislamiento en un medio sólido selectivo de agar xilosa lisina desoxicolato (XLD). Las placas fueron incubadas a $37^\circ\text{C} \pm 1^\circ\text{C}$ durante $24 \text{ h} \pm 3 \text{ h}$. Se examinaron las placas después de la incubación para determinar la presencia de colonias típicas de SG. La identificación se confirmó por las técnicas bioquímicas TSI (agar triple azúcar hierro), LIA (agar lisina hierro) y movilidad (agar SIM). Para realizar bacteriología cuantitativa, de acuerdo al peso de las muestras se respetó una dilución 1:10, luego de una homogeneización con vortex se tomó 1 ml del cultivo de APB, se realizaron las diluciones correspondientes y se sembraron en superficie en placas de Petri con XLD. Las placas se incubaron a $37^\circ\text{C} \pm 1^\circ\text{C}$ por $24 \text{ h} \pm 3 \text{ h}$ y posteriormente se contaron las ufc/g.

Toma de muestras: El día de llegada de las aves al Bioterio, en ambas experiencias, se tomaron muestras de alimento (25 g de alimento en 250 ml de APB), de materia fecal (10 g en 90 ml de APB) y de órganos provenientes de un ave para verificar ausencia de SG, tanto en el alimento comercial como en las aves. En la experiencia 1, a las 18 horas, 4 y 10 días pi se tomaron muestras de 10 g de materia fecal por jaula y se las colocó en 90 ml de APB para realizar bacteriología cuantitativa. En los mismos momentos, en las aves de los cuatro tratamientos, se realizó un hisopado cloacal individual. Cada hisopo de los respectivos tratamientos fue colocado en un tubo que contenía 10 ml de APB, para luego continuar con el estudio bacteriológico convencional. En el día 11 pi, todos los animales de los cuatro tratamientos fueron sacrificados según las normativas internacionales vigentes (AVMA, 2013) y se tomaron muestras de los siguientes órganos: hígado, intestino, ovario-oviducto y ciego. En la experiencia 2, a los 4 y 11 días pi se tomaron muestras de 10 g de materia fecal por jaula para realizar bacteriología cuantitativa (Caffer y Terrango, 2001; ANMAT, 2013). Todas las aves fueron sacrificadas en el día 11 pi bajo las normativas internacionales vigentes (AVMA, 2013) y se les extrajo los mismos órganos de la experiencia 1.

Registro de Datos: Semanalmente, se registró el peso de las aves. El consumo de alimento se evaluó a partir del momento de infección con SG y hasta el final de la experiencia. La mortandad se registró diariamente. Los resultados de los aislamientos de SG en las muestras de órganos fueron expresados como porcentaje de aves infectadas (aves positivas a SG). Se compararon las medias del peso de las aves vivas al inicio y al final de las experiencias con el test de Tukey ($p \leq 0,05$).

Resultados

Los análisis bacteriológicos realizados tanto en el alimento comercial como en las aves al inicio de ambos ensayos determinaron ausencia de SG. Durante el desarrollo de las dos experiencias la mortandad de las pollitas fue siempre de 0%.

Las aves consumieron en promedio 61g/día de alimento balanceado. La evolución de los pesos fue la esperada de acuerdo a la línea comercial (Hy-Line W-36, 2016). Los tratamientos aplicados no influyeron de manera negativa en el desarrollo y crecimiento de las pollitas, las cuales alcanzaron el mismo crecimiento en todos los tratamientos. En la última semana de los ensayos, en las dos experiencias se registraron menores pesos en las aves del T2, que corresponden a las infectadas experimentalmente con

SG y no tratadas con el fago. Sin embargo, estas diferencias no fueron estadísticamente significativas con respecto al grupo testigo T1 (Tabla 2 y Tabla 3).

Tabla 2. Experiencia 1: Promedios de los pesos iniciales y finales de las aves de cada tratamiento.

Tratamiento	Peso Inicial (g)	Peso final (g)
T1	481a	784a
T2	483a	695a
T3	474a	739a
T4	469a	746a

Letras iguales sin diferencia significativa ($p \leq 0,05$)

Tabla 3. Experiencia 2: Promedio de los pesos iniciales y finales de las aves de cada tratamiento.

Tratamiento	Peso inicial (g)	Peso final (g)
T1	430a	569ab
T2	447a	530b
T3	437a	606a
T4	431a	607a

Letras iguales no presentan diferencias significativas ($p \leq 0,05$)

Los recuentos bacteriológicos de SG realizados a partir de las muestras de materia fecal e hisopados cloacales, de la experiencia 1, a las 18 horas pi dieron negativos para todos los tratamientos. A los 4 días pi, tanto el análisis bacteriológico de los hisopados cloacales de todos los tratamientos, como el recuento de SG en las muestras de materia fecal de los T1 y T4 resultaron negativos, mientras que los recuentos de SG en materia fecal de los T2 y T3 fueron positivos con valores que van desde 7×10^5 a 2×10^4 ufc/g para el T2 y de 1×10^5 a 9×10^5 ufc/g para T3. A los 10 días pi los hisopados cloacales, a excepción de los T1 y T4, los cuales no fueron infectados con SG, manifestaron un aislamiento de SG positivo de 4/8 para T2 y 3/8 para T3. Los resultados de los aislamientos de SG en las muestras de órganos se expresan en la

Tabla 4 como cantidad de aves infectadas (presencia de SG) en relación con la cantidad total de aves inoculadas para cada muestra.

Tabla 4. Experiencia 1: Resultados de los aislamientos de SG en las muestras de órganos

	Ovario		Ciego		Hígado		Intestino	
	P/T	%/T	P/T	%/T	P/T	%/T	P/T	%/T
T2	3/8	37,5	2/8	25	6/8	75	1/8	12,5
T3	5/8	62,5	6/8	75	0/8	0	7/8	87,5

P/T: Aves positivas/ Total de aves inoculadas

%/T: porcentaje de aves positivas a SG sobre el total de aves inoculadas.

En los aislamientos del ovario, ciego e intestinos se observa una mayor incidencia de SG en el T3, con un porcentaje de aislamiento entre el 62,5 y 87,5%. En el hígado en cambio, se puede ver una clara ventaja en la utilización de bacteriófagos; todas las aves del T3 dieron negativas a la presencia de SG. Las muestras de los T1 y T4 dieron todas negativas a la presencia de SG.

En la experiencia 2, los recuentos de colonias de SG en las muestras de materia fecal recolectadas a los 4 días pi resultaron negativas para todos los tratamientos. A los 11 días pi, los recuentos de materia fecal fueron positivos para los tratamientos infectados experimentalmente con SG. Como se esperaba, en las muestras del T1 no se encontró SG. Los recuentos de los T2 y T3 tienen un orden de magnitud de $1,6 \times 10^5$ ufc/g para T2 y $2,9 \times 10^5$ para T3, mientras que los recuentos de T4 fueron desde $3,2 \times 10^4$ a 8×10^3 ufc/g.

En los aislamientos de las muestras de órganos se observó una disminución de la incidencia de SG en los T3 y T4 en comparación con el T2 en lo que respecta a ovario e hígado (Tabla 5). En el T4 se evidenció una marcada disminución en la recuperación de SG en todos los órganos muestreados (Tabla 5). En consecuencia las aves del T4 muestran una ventaja en la utilización de doble dosis de fago.

Tabla5. Experiencia 2: Resultados de los aislamientos de SG en las muestras de órganos

	Ovario		Ciego		Hígado		Intestino	
	P/T	%/T	P/T	%/T	P/T	%/T	P/T	%/T
T2	4/10	40	3/10	30	3/10	30	3/10	30
T3	5/16	31,25	5/16	31,25	3/16	18,75	7/16	43,75
T4	2/12	16,7	1/12	8,3	2/12	16,7	2/12	16,7

P/T: Aves positivas/ Total de aves inoculadas

%/T: porcentaje de aves positivas a SG sobre el total de aves inoculadas.

Discusión

Varios investigadores han demostrado que la efectividad de los fagos se ve afectada por los pH ácidos. En este sentido, Lim y colaboradores utilizaron una dosis de 10^6 ufp como aditivo en el alimento de aves y comprobaron que la viabilidad de un bacteriófago por vía oral se puede reducir rápidamente bajo las condiciones ácidas del estómago y en presencia de enzimas digestivas y otros compuestos tales como bilis (Limet *al.*, 2011). De la misma forma, Spricigo, en su experiencia seleccionó el fago UAB-phi78 el cual mostró una elevada estabilidad a temperaturas de 25, 30 y 37°C y a pH comprendidos entre 4 y 9, aunque su infectividad disminuyó significativamente a pH 2 (Spricigo, 2011). Esto concuerda con nuestra evaluación. Ensayos previos realizados *in vitro* con nuestro fago fue demostrada la sensibilidad en pH menores a 3 (Prosdócimoet *al.*, 2012). Según datos registrados en bibliografía, en gallinas comerciales, el pH más bajo se registra en el proventrículo y molleja (pH 2,5), por lo que se deduce que la actividad lítica de este fago puede verse disminuida por dicha causa por lo que sería necesario utilizar un título más elevado del virus, cuando es administrado por vía oral, para lograr la llegada a los órganos blanco.

Por otra parte, en la experiencia *in vivo*, todas las aves que recibieron el fago por vía oral y fueron desafiadas con SG, resultaron positivas al aislamiento de SG. Por lo tanto, es muy probable que este bacteriófago fuera afectado durante el pasaje gástrico y disminuya su viabilidad.

Con respecto a los tejidos reproductivos (ovario y oviducto), Borie y colaboradores obtuvieron en su experiencia que la administración de fagos no disminuyó la incidencia

de infección con *Salmonella* Enteritidis (SE) (Borie *et al.*, 2011). Similares resultados se obtuvieron en éste trabajo, encontrándose que la actividad lítica de los fagos no afectaría a SG en el tejido ovárico, pero sí en el hígado con una disminución en los aislamientos. Esto comprueba la efectividad del tratamiento con bacteriófagos y la importancia productiva que implica lograr disminuir la incidencia de SG en un órgano tan importante como el hígado. El hígado es centro de muchas actividades digestivas, metabólicas y productivas; es siempre amenazado por toxinas microbianas y químicas, las cuales pueden causarle distintos grados de daño hepático, afectando sus funciones lo que tendrá repercusiones a nivel sanitario y productivo del animal. También, se destaca que no se observaron cambios en la evolución de las pollitas de recría; en ese sentido Borie y colaboradores no encontraron cambios en el comportamiento de las aves administrándolo por vía oral (Borie *et al.*, 2011). Como también Henriques y colaboradores observaron que el grupo de aves tratado con fagos no perdió masa corporal, el peso medio fue similar al del grupo control no desafiado y más alto que el del grupo no tratado y desafiado con *Salmonella* (Henriques *et al.*, 2013). Esto concuerda con los resultados obtenidos en ésta experiencia (Tabla 2 y Tabla 3) ya que en ambas vías de administración ninguno de los tratamientos, en especial aquellos que involucraron la aplicación de bacteriófagos y la infección experimental con SG, afectaron negativamente el desarrollo y crecimiento de las pollitas.

Varios autores comprobaron la disminución de la infección de *Salmonella spp.* y la menor colonización de dicha bacteria en los órganos gracias a la utilización de terapias fágicas. Borie y colaboradores obtuvieron como resultado una reducción de la infección con SE de un 33,3% en aves que recibieron 10^6 ufp/dosis de fago y de un 40% en las que recibieron 10^7 ufp/dosis con respecto a las aves infectadas experimentalmente con SE y no tratadas con fago (Borie *et al.*, 2011). De la misma forma Lim y colaboradores observaron una menor incidencia de SG en los aislamientos de las muestras de órganos y una disminución en la mortalidad de los pollos tratados con bacteriófagos en comparación con los no tratados (Lim *et al.*, 2011). Como también Prosdócimo y colaboradores obtuvieron por resultado una reducción de la infección con SG del 20% en aves tratadas con fagos, las cuales continuaron con una ovoposición normal, en comparación con las infectadas con SG que no recibieron el fago e interrumpieron la postura de huevos (Prosdócimo *et al.*, 2010). En nuestros ensayos, tanto en la experiencia 1 como en la 2 se observa una marcada disminución de presencia de SG en hígado. Sin embargo, los mejores resultados en el resto de los órganos se obtuvieron en la experiencia 2.

En esta última, donde la vía de administración del fago fue im, se analizó la respuesta frente a una o dos dosis de aplicación para comprobar si se obtienen resultados que demuestren de una manera más clara las ventajas de la utilización de bacteriófagos como tratamiento terapéutico de SG en la industria avícola.

Como ocurrió en la experiencia 1, en ésta segunda evaluación, se observa una disminución de los aislamientos de SG en el hígado del 18,75% y 16,7% para el T3 y T4 respectivamente. Por el contrario en ésta experiencia se encontró una reducción en los aislamientos de SG en ambos tratamientos en el ovario (T3: 31,25% - T4: 16,7%), ciego (T3: 31,25% - T4: 8,3%) e intestino (T3: 43,75% -T4: 16,7%).

En conclusión, la aplicación de bacteriófagos reduce la infección causada por SG y la colonización que hace la bacteria en los órganos (ovario y oviducto, hígado, ciego e intestino); de manera que el crecimiento y desarrollo de las aves no se ve afectado en las aves de recría. La dosis de aplicación del fago es un factor clave para reducir la infección y colonización de los órganos con SG. Por lo tanto, creemos que administrar el fago por vía im ayudaría a complementar la acción de los ATB en las aves enfermas.

Bibliografía

- ANMAT, RenalOA y Ministerio de Salud (2011). Análisis microbiológico de los alimentos. Metodología analítica oficial. Disponible en: http://www.anmat.gov.ar/renaloa/docs/Analisis_microbiologico_de_los_alimentos_Vol_I.pdf. Consultado (08/2017).
- AVMA Guidelines for the Euthanasia of Animals: 2013 Edition. American Veterinary Medical Association 1931 N. Meacham Road Schaumburg, IL 60173.ISBN 978-1-882691-21-0Version 2013.0.1.Pág.: 1-102. (2013)
- BORIE, C., HAUVA,C., QUIROGA, J., BRAVO, V., ML SÁNCHEZ, M. L., MORALES, M. A., RETAMAL, P., RETAMALES, J., y ROBESON, J.(2011). Uso de bacteriófagos en gallinas de postura infectadas con Salmonella entérica serotipo Enteritidis: prevención de la colonización intestinal y reproductiva. Arch Med Vet, 43: 85-89. <http://dx.doi.org/10.4067/S0301-732X2011000100012>
- CAFFER, M.; TERRAGNO, R. (2001). Manual de procedimientos para la caracterización de Salmonella. Ministerio de Salud. Buenos Aires, Argentina. Subsecretaría de Investigación y Tecnología ANLIS "Dr. Carlos G. Malbrán. Instituto

Nacional de Enfermedades Infecciosas". Departamento de Bacteriología. Servicio de Enterobacterias.

-HENRIQUES, A.; SERENO, R. y ALMEIDA, A. (2013). Reducing Salmonella Horizontal Transmission During Egg Incubation by Phage Therapy. *Foodborne Pathogens and Disease*, 10(8): 718-722. <https://doi.org/10.1089/fpd.2012.1363>

-HY-LINE, 2012. Guía de manejo comercial. Hy-Line variedad W36 2009-2011. Disponible en: http://www.hyline.com/userdocs/pages/36_COM_SPN.pdf

-KROPINSKI, A. M.; MAZZOCCO, A.; WADDELL, T. E.; LINGOHR, E.; JOHNSON, R. P. (2009). Enumeration of Bacteriophages by Double Agar Overlay Plaque Assay. *Bacteriophages: Methods and Protocols, Volume 1: Isolation, Characterization, and Interactions*. Humana Press 501: 69-76.

-LIM, T-H.; LEE, D-H.; LEE, Y-N.; PARK, J-K.; YOUN, H-N.; KIM, M-S.; LEE, H-J.; YANG, S-Y.; CHO, Y-W.; LEE, J-B.; PARK, S-Y.; CHO, I-S. Y SONG, C-S.(2011). Efficacy of Bacteriophage Therapy on Horizontal Transmission of Salmonella Gallinarum on Comercial Layer Chickens. *Aviandiseases* 55: 435-438.

-PROSDÓCIMO, F.; ANSELMO, R.; OLIVETTO, N.; GOMEZ, I.; VIORA, S.; DE FRANCESCHI, M. y BARRIOS, H. (2010). Evaluación de un bacteriófago para la prevención de Salmonella Gallinarum en aves de postura. *Revista Argentina de Microbiología* 42. Suplemento 1: 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. IV Congreso Argentino de Microbiología de Alimentos. III Simposio Argentino de Conservación de Alimentos. Buenos Aires, Argentina.

-SPRICIGO, D. (2011). La desinfección basada en bacteriófagos como herramienta de biocontrol de Salmonella en alimentos. Tesis doctoral. Departamento de Genética y Microbiología. Universidad Autónoma de Barcelona. Disponible en: <https://pdfs.semanticscholar.org/36de/60c7b5c5179b8a6ad6a33e0d1b4ceeb94e60.pdf>