

# Prevención de la infección por *Salmonella enterica* subespecie *enterica* serotipo Enteritidis (*Salmonella* Enteritidis) en pollos mediante un bacteriófago<sup>#</sup>

Prevention of *Salmonella enterica* subespecie *enterica* serotype Enteritidis (*Salmonella* Enteritidis) infection in chickens using a bacteriophage

C Borie<sup>a\*</sup>, P Zurita<sup>a</sup>, ML Sánchez<sup>a</sup>, V Rojas<sup>a</sup>, J Santander<sup>b</sup>, J Robeson<sup>b</sup>

<sup>a</sup>Facultad de Ciencias Veterinarias y Pecuarias, Universidad de Chile, Santiago, Chile.

<sup>b</sup>Instituto de Biología, Pontificia Universidad Católica de Valparaíso, Valparaíso, Chile.

## SUMMARY

Infections caused by *Salmonella enterica* subespecies *enterica* serotype Enteritidis (*Salmonella* Enteritidis) are an important cause of foodborne diseases, epidemiologically associated with the consumption of poultry products. Since antibiotic treatments cause the appearance of multiresistant strains, phages can be used as an alternative method for controlling *S. Enteritidis* in the poultry industry. The aim of this study was to evaluate the effect of the bacteriophage f3αSE on the incidence of *Salmonella* Enteritidis in chickens. 15 broiler chickens of 10 days of age were arranged into 5 groups. Groups A and B received 1 ml of a phage suspension orally containing 10<sup>6</sup> and 10<sup>7</sup> PFU/dose, respectively. Two hours later, the birds were challenged orally with 1 ml of *Salmonella* Enteritidis (4 x 10<sup>6</sup> CFU/dose). The control group (C) only received the phage (10<sup>7</sup> PFU/dose) and the control group D was infected with *Salmonella* Enteritidis (4 x 10<sup>6</sup> CFU/dose); group E remained untreated and constituted the healthy control. Ten days post challenge, the chickens were euthanised by CO<sub>2</sub> inhalation and samples of intestine and organs were obtained for the re-isolation of the challenge strain and phage. The incidence of infection by *Salmonella* Enteritidis decreased (P = 0.028) in the group that received 10<sup>7</sup> PFU/dose (7/15 chickens) unlike the group that received a 10<sup>6</sup> PFU dose (8/15 chickens). The decrease in the incidence of *Salmonella* Enteritidis in chickens by using the phage f3αSE, indicates that it is possible to consider such phages as useful agents in the control of *Salmonella* Enteritidis infections.

*Palabras clave:* *Salmonella*, pollos, bacteriófagos.

*Key words:* *Salmonella*, chickens, bacteriophage.

## INTRODUCCION

*Salmonella enterica* subespecie *enterica* serotipo Enteritidis (SE) es un enteropatógeno frecuentemente involucrado en brotes de infecciones transmitidas por alimentos, asociadas al consumo de alimentos de origen aviar, tales como huevos y carnes insuficientemente cocidas (Prado y col 2002, Molback y Neimann 2002). En el sector avícola, la infección puede provocar serios problemas tanto en las gallinas de postura como en broiler; la infección a temprana edad puede producir mortalidad y disminución de la eficiencia productiva en las aves adultas, no obstante, la mayoría de las aves quedan en estado de portadoras asintomáticas (Barrow 1991, Gast 1994). Entre las medidas tradicionales de control y prevención destacan: utilización de prebióticos y probióticos, medidas de bioseguridad (control de roedores y aves migratorias), vacunación y antimicrobianos. Ninguna de estas medidas, aisladas o en asociación, ha logrado la eficiencia esperada por el sector avícola. Actualmente, el escenario de la salmonelosis se ha

complicado con la emergencia de cepas multirresistentes a antimicrobianos, limitando con ello el abordaje profiláctico en animales. Frente a este complejo escenario, reaparece el antiguo concepto de utilizar bacteriófagos líticos como terapia clínica y como medida preventiva.

Los bacteriófagos líticos, descubiertos por Twort en 1915 y D'Herelle en 1917, son virus que replican al interior de una bacteria y la lisan. Cada tipo de fago reconoce una bacteria específica, se une a receptores de superficie, inyecta su genoma al interior de la célula para luego producir cientos de partículas virales que, gracias a sus enzimas, logran romper la pared celular bacteriana y liberar su progenie. En este proceso la célula bacteriana muere y el número de fagos se incrementa, amplificando el efecto antibacteriano (Görski y Weber-Dabrowska 2005, Hudson y col 2005). Hasta la fecha no se ha informado que los fagos produzcan lisis en células animales, humanas ni en plantas (Sulakvelidze y col 2001, Dabrowska y col 2005). Los primeros trabajos en animales se realizaron en la década del 80 en Gran Bretaña, con ratas experimentalmente inoculadas con *Escherichia coli* y, posteriormente, en ovejas, cerdos y terneros con diarrea por *E. coli*, logrando disminuir el número de patógenos en el tracto digestivo (Sulakvelidze y col 2001). Posteriormente, aparecen estudios en pollos y peces, con resultados promisorios en

# Financiado por Proyecto FIV 3718.

\* Casilla 2 Correo 15, La Granja, Santiago, Chile; cborie@uchile.cl

el área de la terapia médica (Nakai y col 1999, Park y col 2000, Huff y col 2003, Fiorentin y col 2005, Toro y col 2005, Wagenaar y col 2005).

La industria de alimentos también ha utilizado con éxito fagos para la reducción de enteropatógenos importantes en salud pública, específicamente en queso Cheddar (Modi y col 2001), manzanas y melones (Lerverentz y col 2001), canales de pollos broiler (Higgins y col 2005) y piel de pollos (Goode y col 2003). En agosto del año 2006, Estados Unidos de Norteamérica aprobó la utilización de una mezcla de 7 bacteriófagos líticos, contra *Listeria monocytogenes*, como aditivo alimenticio (Bren 2007).

En infecciones por *Salmonella* spp en aves, Sklar y Joerger (2001), Toro y col (2005) y Fiorentin y col (2005) demuestran que la administración oral de una mezcla de bacteriófagos permite la reducción de la colonización a nivel intestinal en pollos broiler experimentalmente infectados, disminuyendo con ello la posibilidad de contaminación en los productos derivados de ellos. La utilización de fagos líticos presenta numerosas ventajas, entre las cuales destacan la facilidad y bajo costo de su aislamiento y preparación, su escasa a nula acción lítica sobre bacterias de flora normal, su facilidad de administración por vía oral, respiratoria, intramuscular e intraperitoneal y menor tasa de resistencia bacteriana que los antimicrobianos (Sklar y Joerger 2001, Huff y col 2003, Górski y Weber-Dabrowska 2005, Toro y col 2005).

En Chile, Santander y Robeson (2002) aislaron fagos líticos contra *Salmonella* Enteritidis a partir de aguas servidas de planteles avícolas de la V Región. Uno de los fagos aislados, denominado f3αSE, es altamente lítico *in vitro* frente a cepas de *Salmonella* Pullorum y *Salmonella* Enteritidis, logrando disminuir el recuento bacteriano de 10<sup>8</sup> unidades formadoras de colonias/ml (UFC/ml) a 10<sup>3</sup> UFC/ml en 100 minutos. También, f3αSE demostró ser lítico en cepas de *Salmonella* Pullorum, de una manera similar que *Salmonella* Enteritidis. Este fago tolera un amplio rango de condiciones fisicoquímicas como congelamiento -20 °C y cambios de temperaturas entre 4 y 50 °C, pH entre 4-12, alta estabilidad en agua y condiciones de almacenamiento, que indican que posee potencial para ser utilizado en la industria avícola (Santander y Robeson 2007). Por otra parte, estudios *in vivo* utilizando el modelo animal *Caenorhabditis elegans* demostraron que el fago f3αSE fue eficaz en tratamientos de fagoprofilaxis contra *Salmonella* Enteritidis y *Salmonella* Pullorum (Santander y Robeson 2004). El objetivo de este trabajo fue determinar la capacidad del fago f3αSE, para reducir la incidencia de *Salmonella* Enteritidis en pollos experimentalmente infectados.

## MATERIAL Y METODOS

### CEPA DESAFIO

Se utilizó una cepa de *Salmonella* Enteritidis aislada de una gallina y donada por el Servicio Agrícola y Ganadero

(SAG) de Chile. Se seleccionó una doble mutante espontánea resistente a ácido nalidíxico (Nal<sup>r</sup>) y rifampicina (Rif<sup>r</sup>) y se incrementó su virulencia mediante seis pasajes en pollos. Se utilizó una dosis mínima infectante de 4 x 10<sup>6</sup> UFC/ml.

### BACTERIOFAGO

El fago f3αSE fue aislado y caracterizado por Santander y Robeson (2002) como un virus morfotipo 1. Para la dosificación en las aves, el fago se suspendió en agua destilada hasta obtener concentraciones de 10<sup>6</sup> unidades formadoras de placas/ml (UFP/ml) y 10<sup>7</sup> UFP/ml, correspondientes a una multiplicidad de infección (MOI) de 1 y 10, respectivamente.

### ANIMALES

Se trabajó con pollos broiler de un día de edad, adquiridos en un plantel de la Región Metropolitana y mantenidos con agua y alimento no medicado *ad libitum* en una Unidad para Animales de Experimentación. Los animales se criaron y manejaron de acuerdo a recomendaciones del Comité de Bioética de la Facultad de Ciencias Veterinarias y Pecuarias, Universidad de Chile. Todas las aves fueron negativas a *Salmonella* spp mediante cultivo tradicional de deposiciones obtenidas al día 3 de edad y fueron mantenidas bajo estrictas condiciones de bioseguridad para evitar una posible contaminación con cepas de campo.

### DISEÑO EXPERIMENTAL

A los 10 días de edad, los pollos fueron separados en 5 grupos de 15 animales cada uno (cuadro 1). El grupo A recibió por vía oral 1 ml del bacteriófago f3αSE en una dosis de 10<sup>6</sup> UFP/ml (MOI 1) y los grupos B y C recibieron 10<sup>7</sup> UFP/ml (MOI 10). Dos horas después, las aves de los grupos A, B y D fueron desafiadas vía oral con 4x10<sup>6</sup>

**Cuadro 1.** Diseño experimental.  
Experimental design.

Grupo	Número de aves	Tratamiento
A	15	Tratados con 10 <sup>6</sup> UFP de BF* e infectados con SE*
B	15	Tratados con 10 <sup>7</sup> UFP de BF e infectados con SE
C	15	Tratados con 10 <sup>7</sup> UFP de BF y No infectados con SE
D	15	No tratados con BF e infectados con SE
E	15	No tratados con BF ni infectados con SE

\* SE: *Salmonella* Enteritidis 4x10<sup>6</sup> UFC/dosis; BF: Bacteriófago f3αSE.

UFC/ml de *Salmonella* Enteritidis Nal<sup>r</sup> Rif<sup>r</sup>. Las aves del grupo D sólo recibieron el desafío con SE. El grupo E no recibió tratamiento con fago ni desafío bacteriano y se utilizó para detectar una posible transmisión accidental de fago y/o bacteria entre las unidades experimentales. La administración por vía oral, tanto de fagos como de la cepa desafío, se realizó mediante una cánula semirrígida adosada a una jeringa; para evitar reflujo, las aves se mantuvieron en ayuno de 4 horas previo a la inoculación.

A los 10 días postinfección (20 días de edad), todos los pollos fueron eutanasiados por inhalación de CO<sub>2</sub> (Beaver 2001) y de ellos se obtuvieron muestras individuales tanto de intestino completo como de “pool” de órganos (bazo, hígado y corazón). Las muestras se procesaron para detección de fagos y cepa desafío. La bacteriología cualitativa se realizó de acuerdo a la metodología descrita por Murray y Barton (1993), utilizando como enriquecimiento caldo Rappaport-Vassiliadis (Difco) y como medio selectivo, agar XLD (Difco) adicionado de ácido nalidíxico (Laboratorio Chile, 20 µg/ml) y rifampicina (Laboratorio Chile, 20 µg/ml). Todas las colonias sospechosas (centro negro y borde transparente) se identificaron mediante el kit de diagnóstico rápido BBL Crystal (Becton, Dickinson and Company) y por aglutinación con antisuero grupo D1 (Difco, St. Louis MO).

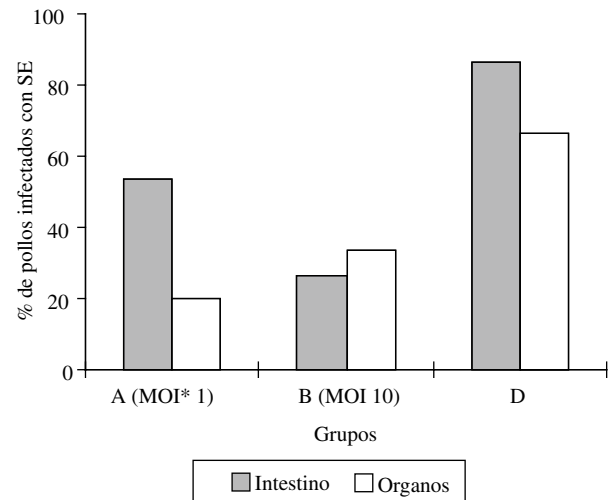
El aislamiento del fago a partir de las muestras sembradas en caldo Rappaport-Vassiliadis se realizó de acuerdo a lo descrito por Santander y Robeson (2002). Un ml de cada muestra se agregó a un caldo Luria Bertani (Difco) adicionado de rifampicina (100 µg/ml) y de 0,5 ml de una suspensión de SE ATCC 13076 Rif<sup>r</sup> de 24 horas de incubación a 37 °C. Luego de una agitación durante toda la noche, 1 ml se centrifugó a 10.000 x g durante 5 minutos. El sobrenadante se trató con cloroformo y fue sembrado sobre un cultivo de SE ATCC 13076, utilizando el método de la doble capa de agar; luego de una incubación a 37 °C se observó la formación de placas líticas.

#### ANÁLISIS DE RESULTADOS

La incidencia de infección por *Salmonella* Enteritidis se determinó mediante los resultados de los cultivos de intestino y/o “pool” de órganos de las aves infectadas. Se analizaron las diferencias de proporciones entre los grupos tratados y el grupo control de infección, mediante X<sup>2</sup> utilizando el programa estadístico Infostat version 2004 (Grupo Infostat, FCA, Universidad Nacional de Córdoba, Argentina).

#### RESULTADOS Y DISCUSION

Independiente de la muestra analizada, en las aves del grupo control de infección (grupo D), inoculadas con la dosis 4x10<sup>6</sup> UFC/ml de SE, se observó un alto porcentaje de infección (86,6%). La infección no alcanzó al 100% de las aves, probablemente debido a la baja virulencia de



Grupo A: tratado con 10<sup>6</sup> UFP/ml del bacteriófago (MOI 1). Grupo B: tratado con 10<sup>7</sup> UFP/ml del bacteriófago (MOI 10). Grupo D: solo infectado con SE. MOI\*: Multiplicidad de infección.

**Figura 1.** Aislamiento de *Salmonella* Enteritidis (SE) de pollos experimentalmente tratados con un bacteriófago e infectados con SE, según tipo de muestra, 10 días posterior a la infección.

*Salmonella* Enteritidis (SE) isolation from experimentally bacteriophage treated and SE infected chickens, according to type of samples, 10 days after infection.

la cepa y no a la dosis utilizada ya que ésta se encuentra dentro del rango más alto señalado en estudios similares. En este grupo se aisló la cepa desafío en el 66,6% de las muestras de “pool” de órganos y en 86,6% de las muestras de intestino completo (figura 1).

El efecto del tratamiento con el fago f3αSE (MOI 1 y 10) sobre la incidencia de la infección se observa en la figura 1. En el grupo A, que recibió el fago con una MOI de 1 (10<sup>6</sup> UFP/dosis), se infectaron 8 de 15 pollos (53,3%, p = 0,0619) y 13 de 15 en el grupo control de infección (86,6%). El aislamiento de la cepa desafío en el grupo A fue más frecuente en las muestras de intestino completo que en “pool” de órganos (figura 1). En el caso del grupo B, que recibió el fago con una MOI de 10 (10<sup>7</sup> UFP/dosis), se infectaron 7 de 15 aves (46,6%, p = 0,028). El aislamiento de SE en intestino y “pool” de órganos de las aves del grupo B fue similar en ambos tipos de muestras (figura 1).

Diversas experiencias han demostrado que la multiplicidad de infección (MOI) juega un rol importante en el éxito de las fagoterapias. Goode y col (2003) utilizaron MOI en rangos de 10<sup>2</sup> a 10<sup>5</sup> para reducir la cantidad de *Salmonella* spp en piel de pollos, pero sólo la MOI 10<sup>5</sup> logró eliminar la bacteria completamente de la piel de las aves. De la misma forma, Huff y col (2006), utilizando multiplicidades de 10<sup>2</sup>, 10<sup>4</sup>, 10<sup>6</sup> y 10<sup>8</sup> UFP del fago SPRO2, concluyeron que la MOI de 10<sup>4</sup> fue capaz de reducir significativamente la tasa de mortalidad de pollos infectados con una cepa de *E. coli*. Aunque los fagos son capaces

de multiplicarse en la célula hospedadora, las terapias con bacteriófagos de mayor éxito han sido aquellas que utilizan una MOI elevada (Goode y col 2003, Huff y col 2003, Fiorentin y col 2005, Wagenaar y col 2005). Hasta la fecha, no existen en la literatura evidencias que sugieran utilizar dosis bajas de fagos. La menor actividad lítica del fago sobre *Salmonella* a nivel intestinal, en las aves que recibieron una MOI de 1, se podría explicar, en parte, por la presencia en la mucosa intestinal de un medio viscoso que actuaría como barrera física, impidiendo el encuentro entre bacteria y fago (Sklar y Joerger 2001).

El objetivo de este trabajo fue prevenir la colonización intestinal de *Salmonella* y por ello las aves recibieron el fago antes y no después de la infección con SE. En experiencias con otras bacterias, Huff y col (2003), empleando *E. coli*, observaron una disminución significativa de la mortalidad en pollos cuando administraron el fago, mediante aerosoles, inmediatamente después de la infección; cuando los desafíos con *E. coli* fueron 24-48 horas después no se observaron buenos resultados. Sin embargo, cuando la administración del fago fue por vía intramuscular, lograron buenos resultados con el desafío realizado 24-48 horas después. Por otro lado, experiencias realizadas en pollos para prevenir la colonización intestinal de *Campylobacter jejuni*, donde el fago se dosificó tan temprano como a los 3 días antes del desafío, sólo se logró retardar la colonización pero no prevenirla (Wagenaar y col 2005). Barrow y col (1998) señalan que fagos dosificados en pollos hasta 2 días antes de la inoculación con *E. coli* otorgaron protección, pero no cuando se dosificaron cinco días antes del desafío.

En relación a la detección del virus, en los grupos A, B y C se aislaron tanto en intestino como en órganos (cuadro 2), demostrando que este fago presenta una permanencia sistémica de al menos 10 días, constituyendo esto una potencial ventaja en la prevención de futuras reinfecciones en las aves.

En el grupo E, control sano, las muestras fueron negativas a *Salmonella* Enteritidis y a bacteriófago, demostrando ausencia de contaminación accidental entre los diferentes grupos experimentales.

Durante los 10 días de la experiencia los animales no evidenciaron cambios de comportamiento ni manifestaciones clínicas. En la necropsia no se observaron lesiones macroscópicas sugerentes de alguna patología, lo que refuerza el concepto de inocuidad de los fagos.

**Cuadro 2.** Detección de fagos en pollos tratados con un bacteriófago e infectados con *Salmonella* Enteritidis, 10 días posterior a la infección.

Phage detection in bacteriophage treated and infected chickens with *Salmonella* Enteritidis, 10 days after infection.

Grupo	Detección en órganos	Detección en intestino
A	3/15	8/15
B	9/15	3/15
C	6/15	6/15

Los resultados obtenidos, sumados a la facilidad de aislamiento y bajo costo de preparación del fago, su termotolerancia y estabilidad en agua destilada, permiten sugerir que los fagos podrían ser considerados como una herramienta alternativa, complementaria a los métodos de control y prevención de *Salmonella* actualmente vigentes.

## RESUMEN

Las infecciones por *Salmonella* Enteritidis son una causa importante de enfermedades transmitidas por alimentos, epidemiológicamente asociada al consumo de productos derivados de las aves. Ya que el tratamiento con antimicrobianos causa la aparición de cepas multirresistentes, los fagos pueden ser usados como método alternativo para controlar *S. Enteritidis* en la industria avícola. El propósito de este trabajo fue evaluar el efecto del bacteriófago f3αSE sobre la incidencia de *S. Enteritidis* en pollos. Se formaron 5 grupos de 15 pollos broiler de 10 días de edad; los grupos experimentales A y B recibieron vía oral 1 ml del fago, conteniendo 10<sup>6</sup> y 10<sup>7</sup> UFP/dosis, respectivamente. Dos horas después, las aves fueron desafiadas con 1 ml de *S. Enteritidis* (4 x 10<sup>6</sup> UFC/dosis). El grupo C sólo recibió fagos (10<sup>7</sup> UFP/dosis) y el grupo D sólo *S. Enteritidis* (4 x 10<sup>6</sup> UFC/dosis); el grupo E no recibió tratamiento y constituyó el grupo control sano. Diez días postinfección, los pollos recibieron eutanasia por inhalación de gas, obteniéndose por cada ave muestras de intestino y órganos para el reaislamiento de la cepa desafío y del fago. La incidencia de infección por *S. Enteritidis* se redujo en el grupo que recibió 10<sup>7</sup> UFP/dosis (p = 0,028) (7/15 aves) del bacteriófago, no así en el grupo que recibió la dosis de 10<sup>6</sup> UFP (p = 0,061) (8/15 aves). La disminución de la incidencia de *S. Enteritidis* en pollos, lograda mediante el fago f3αSE, permite considerarlo como una posible alternativa al uso de antimicrobianos en el control de *Salmonella*.

## REFERENCIAS

- Barrow P. 1991. Experimental infection of chickens with *Salmonella enteritidis*. *Avian Pathol* 22, 651-669.
- Barrow P, M Lovell, A Berchieri. 1998. Use of lytic bacteriophage for control of experimental *Escherichia coli* septicemia and meningitis chickens and calves. *Clin Diagn Lab Immunol* 5, 294-298.
- Beaver B. 2001. 2000 Report of the American Veterinary Medical Association Panel of Euthanasia. *J Am Vet Med Anim* 218, 669-696.
- Bren L. 2007. Bacteria-eating virus approved as food additive. *FDA Consum* 41, 20-22.
- Dabrowska K, K Switala-Jelen, A Opolski, B Weber-Dabrowska, A Górski. 2005. Bacteriophage penetration in vertebrates. *J Appl Microbiol* 98, 7-13.
- Fiorentin L, D Nilson, W Barioni. 2005. Oral treatment with bacteriophages reduces the concentration of *Salmonella enteritidis* PT4 in caecal contents of broilers. *Avian Pathol* 34, 258-263.
- Gast R. 1994. Understanding *Salmonella enteritidis* in laying chickens: the contributions of experimental infection. *Int J Food Microbiol* 21, 107-116.
- Goode D, VM Allen, PA Barrow. 2003. Reduction of experimental *Salmonella* and *Campylobacter* contamination of chicken skin by application of lytic bacteriophage. *Appl Environ Microbiol* 69, 5032-5036.
- Górski A, B Weber-Dabrowska. 2005. The potential role of endogenous bacteriophages in controlling invading pathogens. *Cell Mol Life Sci* 62, 511-519.
- Higgins JP, SE Higgins, KL Guebntner, W Huff, AM Donoghue, DJ Donoghue, BM Hargis. 2005. Use of bacteriophage treatment to reduce *Salmonella* in poultry products. *Poultry Sci* 84, 1141-1145.

- Hudson JA, C Billington, G Carey-Smith, G Greening. 2005. Bacteriophages as biocontrol agents in food. *J Food Prot* 68, 426-437.
- Huff WE, GR Huff, NC Rath, JM Balog, AM Donoghue. 2003. Evaluation of aerosol spray and intramuscular injection of bacteriophage to treat an *Escherichia coli* respiratory infection. *Poult Sci* 82, 1108-1112.
- Huff WE, GR Huff, NC Rath, AM Donoghue. 2006. Evaluation of the influence of bacteriophage titer on the treatment of colibacillosis in broiler chicken. *Poult Sci* 85, 1373-1377.
- Leverentz B, WS Conway, Z Alavidze, WJ Janisiewicz, Y Fuchs, MJ Camp, E Chigladze, A Sulakvelidze. 2001. Examination of bacteriophage as a biocontrol method for *Salmonella* on fresh-cut fruit: a model study. *J Food Prot* 64, 1116-1121.
- Murray CJ, M Barton. 1993. Salmonellosis bacteriology. In: Corner LA, Baugust TJ (eds). *Australian standard diagnostic techniques for animal diseases*. Australia, Pp 3-8.
- Modi R, Y Hirvi, A Hill, MW Griffiths. 2001. Effect of phage on survival of *Salmonella enteritidis* during manufacture and storage of cheddar cheese made from raw and pasteurized milk. *J Food Prot* 64, 927-933.
- Molback K, K Neimann. 2002. Risk factors for sporadic infection with *Salmonella enteritidis*, Denmark, 1997-1999. *Am J Epidemiol* 156, 654-661.
- Nakai T, R Sugimoto, KH Park, S Matsuoka, K Mori, T Nishioka, K Maruyama. 1999. Protective effects of bacteriophage on experimental *Lactococcus garvieae* infection in Yellowtail. *Dis Aquat Organ* 37, 33-41.
- Park SC, I Shimamura, M Fukunaga, KI Mori, T Nakai. 2000. Isolation of bacteriophages specific to a fish pathogen, *Pseudomonas plecoglossica*, as a candidate for disease control. *Appl Environ Microbiol* 66, 1416-1422.
- Prado V, V Solari, I Alvarez, C Arellano, R Vidal, M Carreño, N Madani, D Fuentes, M O'Ryan, V Muñoz. 2002. Situación epidemiológica de las enfermedades transmitidas por alimentos en Santiago de Chile: Periodo 1999-2000. *Rev Med Chil* 130, 495-501.
- Santander J, J Robeson. 2002. Aislamiento y caracterización de bacteriófagos líticos contra *Salmonella* Enteritidis y su ensayo sobre *Salmonella* Pullorum. *Acta Microbiol* 8, 17-22.
- Santander J, J Robeson. 2004. Phage prophylaxis against *Salmonella enteritidis* using *Caenorhabditis elegans* as an assay system. *Electronic J Biotechnol* 7, 11-14.
- Santander J, J Robeson. 2007. Survival properties of bacteriophages active against *Salmonella enterica* serovars Enteritidis and Pullorum with potential for biocontrol in the poultry industry. *American Society for Microbiology, April 14, Branch Meeting, Arizona-Nevada, Flagstaff, AZ, USA*.
- Sklar IB, RD Joerger. 2001. Attempts to utilize bacteriophage to combat *Salmonella enterica* serovar *enteritidis* infection in chickens. *J Food Saf* 21, 15-29.
- Sulakvelidze A, Z Alavidze, JG Morris. 2001. Bacteriophage therapy. *Antimicrob Agents Chemother* 45, 649-659.
- Toro H, SB Price, S McKee, FJ Hoerr, J Khreling, M Perdue, L Bauersmeister. 2005. Use of bacteriophages in combination with competitive exclusion to reduce *Salmonella* from infected chickens. *Avian Dis* 49, 118-124.
- Wagenaar JA, MAP Van Bergen, MA Mueller, TM Wassenaar, RM Carlton. 2005. Phage therapy reduces *Campylobacter jejuni* colonization in broilers. *Vet Microbiol* 109, 275-283.

