

## Los bacteriófagos como herramienta para combatir infecciones en Acuicultura

Concepción Ronda<sup>1</sup>, Manuela Vázquez<sup>1</sup>, Rubens López<sup>2</sup>

<sup>1</sup> Centro de Información y Documentación, Consejo Superior de Investigaciones Científicas  
c/ Joaquín Costa 32, 28006 Madrid (España)  
e-mail: ronda@cindoc.csic.es

<sup>2</sup> Centro de Investigaciones Biológicas, Consejo Superior de Investigaciones Científicas  
c/ Velázquez 144, 28006 Madrid (España)

### Resumen

El uso de los bacteriófagos (fagos), los entes más abundantes en la naturaleza, como agentes terapéuticos se remonta a su descubrimiento a principios del pasado siglo. La aparición generalizada de resistencias bacterianas frente a los antibióticos unidos a los avances tecnológicos que permiten la preparación de fagos purificados y un mejor conocimiento molecular de los mismos ha llevado a reconsiderar los trabajos realizados en los países de la antigua Unión Soviética y a proponer el uso de los fagos, los virus que infectan a las bacterias, como una auténtica alternativa terapéutica. Se analizan en esta minirevisión los trabajos más relevantes realizados hasta el momento en el uso de la terapia fágica en Acuicultura y se discute, asimismo, la posibilidad de usar un novedoso método alternativo basado en el empleo de enzimas líticas, proteínas codificadas por los fagos, que se denominan enzibióticos.

*Palabras clave:* bacteriófagos, terapia fágica, acuicultura, enzibióticos

### Summary

#### Bacteriophages as tool to fight against infections in Aquaculture

Bacteriophages (phages), the most abundant entities in nature, have been proposed as therapeutic agents since they were isolated in the early years of the last century. The current antibiotic resistance of most pathogenic microorganisms together with the technical achievements in the study of phages has led to reconsider the work carried out for scientists of the former Soviet Union and to propose the use of bacterial viruses as a real therapeutic alternative. In this minireview we analyze the most relevant contribution on phage therapy in Aquaculture as well as the new possibility that offer the use of phage and phage products, like the lytic enzymes, named enzybiotics, as an alternative tool in therapy.

*Key words:* bacteriophages, phage therapy, aquaculture, enzybiotics

### Introducción

Hace casi seis lustros uno de los autores (C. Ronda) fue copartícipe, en la Universidad Rockefeller de Nueva York, del aislamiento del primer virus bacteriano que infectaba a *Streptococcus pneumoniae* (McDonnell y cols, 1975). Se trataba de un fago de la familia Siphoviridae que se obtuvo a partir de una muestra proporcionada por un hospital del Bronx. En los años transcurridos desde esa fecha los distintos fagos aislados en ese importante patógeno humano han servido en el laboratorio de Genética Bacteriana del Centro de Investigaciones Biológicas del CSIC para proporcionar importantes datos que han llevado a conocer importantes peculiaridades

de los diferentes fagos aislados desde entonces en neumococo así como a conseguir un mejor conocimiento de las características moleculares de este sistema, muy en particular, sobre las enzimas líticas del huésped y del parásito (García y cols, 1997).

Los bacteriófagos son los entes más abundantes de la biosfera, y se ha estimado que existen  $10^{10}$  fagos por cada litro de agua de mar, lo que representa un excelente mecanismo de control de las bacterias marinas, ya que se produce un equilibrio entre las bacterias que se multiplican y los fagos que destruyen una parte de esa población bacteriana. El organismo humano, está acostumbrado al contacto con los fagos ya que son consumidos regularmente en los alimentos, son colonizadores habituales del intestino humano y son muy abundantes en el medio ambiente (casi  $10^8$  millones por  $\text{cm}^3$ ). De aquí que no resulte extraño que los fagos no produzcan graves efectos inmunológicos sobre los animales. Desde el descubrimiento de los fagos por D'Herelle y Twort (d'Herelle, 1917; Twort, 1915) hasta los años 40 del pasado siglo, estos organismos se usaron, en muchas ocasiones con éxito, para combatir diversas enfermedades infecciosas. El uso generalizado de los antibióticos después de la II Guerra Mundial, unido al inconveniente de emplear con fines terapéuticos preparaciones de fagos poco purificadas, ya que contenían restos celulares y carecían de adecuados controles mediante el uso de placebos, condujeron al abandono de la fagoterapia. No obstante, y pese a los problemas políticos y económicos que han venido sufriendo los países del antiguo bloque soviético, los fagos fueron usados durante décadas en esos países. Incluso después de la caída del muro de Berlín en 1991, la terapia fágica ha continuado siendo empleada en algunos de los mencionados países, particularmente en Polonia y en Georgia (Sulakvelidze y cols, 2001). En este último país, el centro de investigación de Tiflis, fundado por d'Herelle y Eliava en 1923, ha sido el productor de cepas de fagos para la antigua Unión Soviética. Asimismo, varios investigadores polacos del Instituto Hirszfeld, fundado en 1953, han proporcionados datos convincentes sobre el tratamientos de 550 casos de infecciones bacterianas supurativas (enfisemas, peritonitis, osteomielitis y otras) en humanos. Se trataba en su mayor parte de casos crónicos en los que estaban implicadas bacterias resistentes a casi todo el arsenal de antibióticos de que se disponía. Entre estos microorganismos se encuentran: *Staphylococcus aureus*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Klebsiella pneumoniae* y *Escherichia coli* (Sulakvelidze y cols, 2001). Estos investigadores han documentado curaciones en un 90% de los casos puestas de manifiesto por el cese de las supuraciones y en la cicatrización de las heridas y fistulas. La prevención por tratamiento con fagos de las graves, y a menudo irreversibles, infecciones por *Pseudomonas* en quemados parece muy exitosa. Los fagos en estos casos se administraron tópicamente o por vía oral previo tratamiento de los pacientes con antiácidos y gelatina para así proteger a los fagos de la acidez gástrica y comprobación posterior de que los fagos usados llegaban al torrente sanguíneo.

---

### **Aportaciones recientes**

---

Actualmente se dispone de medios adecuados para conseguir preparaciones de fagos altamente purificadas y los países occidentales han comenzado a mirar con un cierto interés el empleo de los fagos en terapia clínica y en el tratamiento de los alimentos. Así, cabe citar su uso para el biocontrol de *E. coli* 0157, asociada con la producción de colitis hemorrágicas, por eliminación de la flora bacteriana de los vegetales frescos y se han usado fagos en ensayos animales sobre enterococos altamente resistentes a vancomicina, el antibiótico que representa el último recurso en enfermedades

nosocomiales. Los ensayos veterinarios en animales estabulados son también muy alentadores y los trabajos del grupo de Smith representan el primer impulso para reactivar en Occidente el uso de los fagos con fines terapéuticos (Smith y cols, 1987). Por ahora se trata solo de una alternativa terapéutica en ciernes pero la emergencia global de resistencias en patógenos bacterianos ha llevado a reevaluar el potencial de los bacteriófagos en el tratamiento de esas infecciones (Biswas y cols, 2002; Merrill y cols, 1996).

## **Fagoterapia en Acuicultura**

---

Como ya se ha señalado, los fagos abundan en las aguas marinas y se ha puesto de manifiesto la presencia de los mismos en los análisis de riñones de peces sanos con una incidencia de casi un 3%. Esto ha dado argumentos para suponer que esta observación puede ser el resultado de la muerte in vivo de bacterias en los ambientes naturales lo que podría redundar en una mayor supervivencia de los peces infectados por bacterias (Nakai y Park, 2002). Recientemente, investigadores japoneses han puesto a punto métodos que permiten evaluar la capacidad de los fagos como agentes terapéuticos en acuicultura (Nakai y cols, 1999; Park y cols, 2000). Los peces y mariscos cultivados sufren la constante amenaza de las infecciones bacterianas y es frecuente el uso de antimicrobianos o probióticos para la prevención de las mismas (Dopazo y cols, 1988). No obstante, el uso prolongado de antibióticos trae consigo el desarrollo de resistencias frente a estos agentes lo que ha motivado la búsqueda de soluciones alternativas entre las que se cuenta la vacunación. Sin embargo, el desarrollo de vacunas en Acuicultura es un campo prácticamente inexplorado hasta el momento. Hace unos años se publicaron los primeros trabajos sobre aislamiento y caracterización de bacteriófagos aislados de bacterias que infectaban a los peces pero las primeras aproximaciones experimentales al uso de fagoterapia en peces son recientes y se deben fundamentalmente al grupo de Nakai (Nakai y Park, 2002).

Los trabajos realizados en Japón en fagoterapia aplicada a los peces se han centrado hasta el momento en el tratamiento de las infecciones en ayu (*Plecoglossus altivelis*) y en pez limón del Japón (*Seriola quinqueradiata*). En esta última especie se producen frecuentes infecciones causadas por *Lactococcus garviae* un patógeno oportunista que se multiplica en un intervalo de temperaturas entre 17°C y 41°C y es ubicua en ambientes donde se cultivan peces y existen condiciones de estrés tales como superpoblación, baja calidad de las aguas de los estanques, exceso o deficiencia en la cantidad de nutrientes, etc. Estos factores, a veces, son difíciles de controlar en la práctica, lo que obliga en ocasiones a recurrir al uso de quimioterapia para evitar las infecciones bacterianas y las correspondientes pérdidas económicas. Con este fin se ha permitido el uso en Japón de hasta 25 antibióticos diferentes, cuyo uso frecuente ha conducido a la aparición de cepas bacterianas resistentes a muchos de ellos (Kusuda y Kawai, 1998).

Se han aislado fagos, denominados PLgY y PLgW, que infectan a *L. garviae*, a partir de peces cultivados enfermos así como de peces capturados en mar abierto (Nakai y cols, 1999). La lista de aislamientos fágicos ha ido en aumento y se ha podido hacer fagotipia en esta especie bacteriana hasta identificar 14 tipos diferentes de *L. garviae*, aunque el 90% de las cepas de este microorganismo son sensible a los fagos PLgY y PLgW. Estos fagos son muy estables y resisten libremente durante al menos 3 días en agua de mar a temperaturas y salinidad variables y bajos pH, condiciones que facilitan la colonización del tracto digestivo. Todas estas propiedades apuntan hacia una

supervivencia relativamente larga de los fagos lo que facilitaría el encuentro con las bacterias a las que debe infectar.

Los efectos protectores de los fagos PLgY y PLgW frente a *L. garviae* se han ensayado utilizando la vía peritoneal, mediante inyecciones de fagos purificados o bien por vía oral en peces jóvenes infectados experimentalmente con la bacteria. Se ha observado una supervivencia del 100% de los peces inoculados con fagos, frente al 20% de aquellos que sólo fueron tratados con *L. garviae*. En los peces tratados con fagos por vía peritoneal, incluso varias horas después de la infección, se constató un efecto protector. Asimismo, se observaron resultados positivos cuando se utilizó la vía oral para introducir fago mediante alimentos impregnados con los mismos, siendo detectados estos fagos en bazo e intestino pasadas 48 horas, a una concentración máxima de  $10^6$  UFP g<sup>-1</sup>. No se observó la presencia de anticuerpos neutralizantes en los peces que habían recibido inyecciones sucesivas de fagos (Nakai y Park, 2002). Esta última e interesante observación está en consonancia con lo que se ha señalado en otros sistemas animales donde se ha visto que la administración parenteral de fagos da lugar al desarrollo de anticuerpos pero no se ha demostrado si se generan anticuerpos cuando se utiliza la vía oral o tópica para la curación con fagos y se ignora el tiempo de permanencia de tales anticuerpos en el torrente sanguíneo (Kucharewicz-Krukowska y Slopek, 1987).

Otro ejemplo significativo del empleo de la fagoterapia en acuicultura lo proporciona el caso del ayu, la especie más popular en Japón entre los peces de agua dulce tanto para alimentación como con fines de pesca deportiva. *Pseudomonas plecoglossicida* es la principal bacteria patógena de esta especie y se ha revelado que cepas resistentes que surgen como resultado del tratamiento con antibióticos son la causa de una gran mortalidad en piscifactorías. Park y colaboradores (2000) han aislado un fago de la familia Myoviridae (PPpW-3) y un Siphoviridae (PPp-W4) que cuando fueron empleados con fines terapéuticos mediante alimentos impregnados con los mismos. En los cultivos de control tratados con bacterias se detectó una mortalidad acumulativa del 65% de los peces al cabo de una semana mientras que en aquellos que también había sido tratados con fagos morían sólo un 22%. Asimismo, el uso conjunto de los dos fagos señalados arriba proporcionaba una mayor protección frente a la infección. Resulta interesante reseñar que la carga bacteriana detectada en los riñones de peces tratados solo con bacterias entre las 3 y 12 horas después de la infección no fue detectada en los peces que recibieron fagos por vía digestiva aunque sí se aislaron los fagos usados en los experimentos.

## **Perspectivas futuras**

---

Los datos resumidos anteriormente indican que tanto en Acuicultura, como en otros campos de la biología, se deben ampliar los datos y la metodología de que se dispone en la actualidad para conocer en mayor detalle los límites auténticos del uso de los fagos como agentes terapéuticos tanto por sí mismos como complemento al uso de los antibióticos para la protección frente a las infecciones bacterianas. El empleo de fagos en el control de enfermedades bacterianas en acuicultura parece prometedor según los datos que acabamos de revisar, y además presenta la ventaja de que la vía oral de tratamiento mediante la impregnación de los alimentos reporta resultados esperanzadores ya que los bajos niveles de pH del estómago e intestino no parecen representar una barrera biológica para los fagos ensayados hasta el momento. Por otra parte la piel y las agallas parecen una buena vía para el tratamiento con fagos. No obstante, es preciso aislar un mayor número de fagos para conseguir entidades

más agresivas frente a las bacterias que mejoren los resultados terapéuticos obtenidos hasta el momento.

Entre los problemas que condujeron al fallo terapéutico en el uso de los fagos en el pasado siglo cabe destacar la falta de controles adecuados para demostrar que se empleaban fagos claramente líticos evitando los fagos atemperados, es decir, aquellos capaces de integrarse en el genoma de la célula huésped dando lugar a una bacteria lisogénica. Este tipo de fagos debe ser descartado en el uso como agentes terapéuticos ya que no pueden producir una lisis rápida ni un crecimiento exponencial en cantidades necesarias para conseguir una eficacia total, y, con frecuencia, son fagos que pueden llevar genes que contribuyen a la virulencia de la bacteria lisogénica a la que se integra el fago en cuestión. Otro factor negativo en el uso de los fagos en los primeros tiempos de su empleo terapéutico lo constituía el hecho de que no se eliminaban los restos bacterianos de los lisados crudos lo que provocaba rechazos en el enfermo a causa de las endotoxinas contenidas en tales preparados. Este problema es en la actualidad fácil de superar con el empleo de fagos purificados mediante el uso de gradientes de cloruro de cesio y separación en ultracentrífuga por densidad de flotación.

Otro tipo de mejora en el uso de los fagos como agentes terapéuticos se centrará en estimular los estudios farmacocinéticos que evitarán la rápida eliminación de las partículas fágicas del aparato circulatorio. Además, debe tenerse en cuenta el uso apropiado de controles en los ensayos que se realicen ya que en la mayoría de los experimentos desarrollados por d'Herelle no se tuvo en cuenta el empleo de placebos para así probar la eficacia real de los fagos que se empleaban. Esta es una prueba fundamental que ha sido usada para cuestionar muy seriamente el éxito que la medicina de los países del este ha atribuido a la terapia fágica.

Entre las ventajas que reporta la terapia fágica sobre la antibiótica cabe destacar:

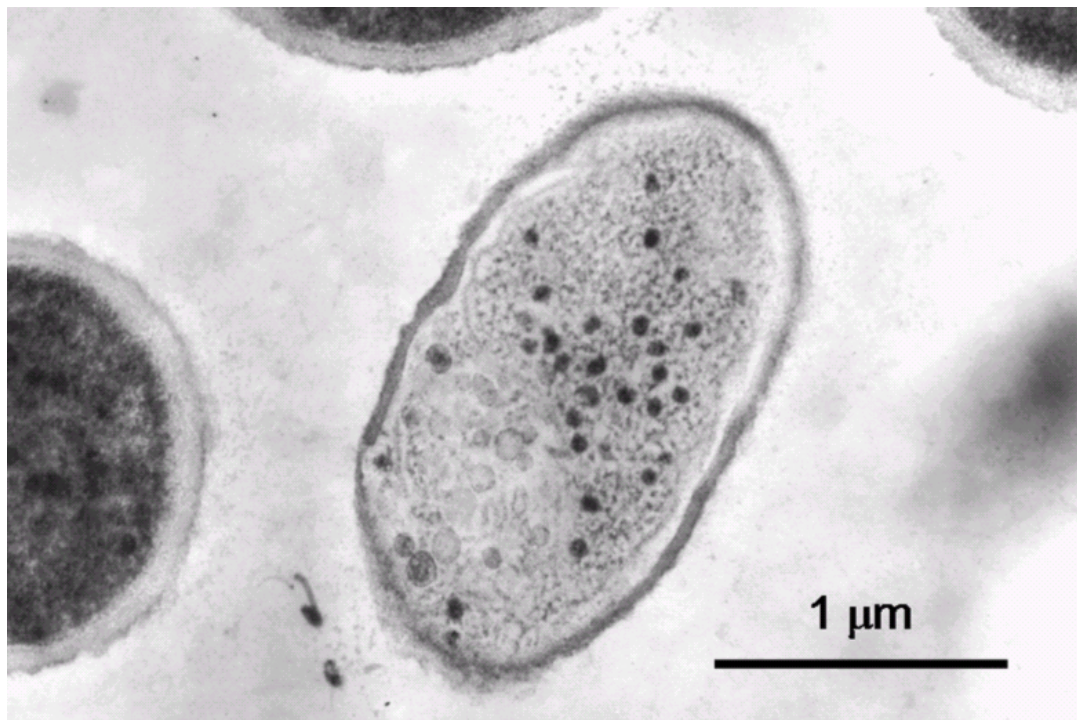
- a) la alta especificidad de los fagos para un determinado huésped que se quiera combatir evitando de esa manera la eliminación de la microbiota que puede resultar beneficiosa para los peces;
- b) la facilidad de alternar fagos o usar un cóctel de fagos para eludir la aparición de resistencias de la bacteria huésped frente a un determinado fago. Esta condición implica disponer de una variedad de fagos que puedan ser usados para una determinada bacteria. Se trata de una circunstancia fácil de superar habida cuenta de la gran abundancia de fagos en el medio marino;
- c) la baja respuesta inmunogénica que inducen los fagos en muchos de los huéspedes analizados hasta el momento, en particular en el caso de los pocos peces en los que se ha usado la fagoterapia de forma experimental.

### **Las enzimas líticas fágicas como antibióticos: enzibióticos**

Una interesante alternativa al uso de fagos intactos para combatir a las bacterias patógenas se centra en el empleo algunos productos fágicos, en concreto las enzimas líticas codificadas por el genoma de los fagos. Las enzimas líticas de los fagos se utilizan para destruir la pared bacteriana desde el interior de la célula infectada y así facilitar la liberación de la descendencia fágica (figura 1). Estas enzimas reciben diferentes denominaciones de acuerdo con el enlace químico que destruyen en la pared del huésped. De esta manera, se habla de lisozimas, amidasas,

glucosaminidasas, endopeptidasas y transglucosidasas. El grupo de Vicent Fischetti de la Universidad Rockefeller ha empleado recientemente tales enzimas para prevenir y eliminar microorganismos patógenos de ratones colonizados por estreptococos grupo A y neumococos (Loeffler y cols, 2001; Nelson y cols, 2001). En el caso del grupo A se usó una enzima lítica, específica para los grupos A, C y para estreptococos, que fue purificada a partir de un extracto crudo de un lisado de fago. Con el empleo de 10 ng (1000 U) de enzima purificada estos autores demostraron que eran suficientes para esterilizar un cultivo de  $10^7$  bacterias en 5 seg. En el modelo murino, 250 unidades de enzima añadidas en la cavidad bucal proporcionaban protección frente a  $10^7$  bacterias del grupo A sin afectar al resto de la microbiota indígena.

**Figura 1. Microfotografía electrónica de células de *S. pneumoniae* infectadas con el fago Dp-1.** Se pueden observar las partículas de fagos en el interior de las células (puntos negros). La célula del centro ha comenzado la lisis como resultado de la actividad de la enzima lítica (Pal) sintetizada por el fago Dp-1 y se observan algunas partículas fágicas ya liberadas (ángulo inferior izquierdo). La célula de la izquierda aún muestra su pared celular intacta pero también se visualizan los fagos en su interior.



En el caso de *Streptococcus pneumoniae* se pudo demostrar que cuando se usaba la amidasa Pal, cuyo gen fue clonado a partir del genoma del fago Dp-1 (Sheehan y cols, 1997), bastaban, asimismo, unos pocos segundos para destruir 15 serotipos muy comunes, incluyendo algunos con alta resistencia frente a penicilina, empleando para ello 100 U/ml de Pal. En experimentos in vivo usando ratones que habían sido previamente colonizados, se comprobó que un solo tratamiento con Pal bastaba para erradicar a los portadores, observándose, asimismo, que el tratamiento no afectaba a otros microorganismos que normalmente colonizan la orofaringe y no se observó la presencia de neumococos resistentes frente a Pal. Fischetti postula que estas enzimas fágicas usadas para el control de patógenos podrían ser designadas como "enzibióticos". Los detractores de esta técnica aducen que es más fácil desarrollar resistencia frente a estos enzibióticos que mediante el empleo de cócteles de fagos,

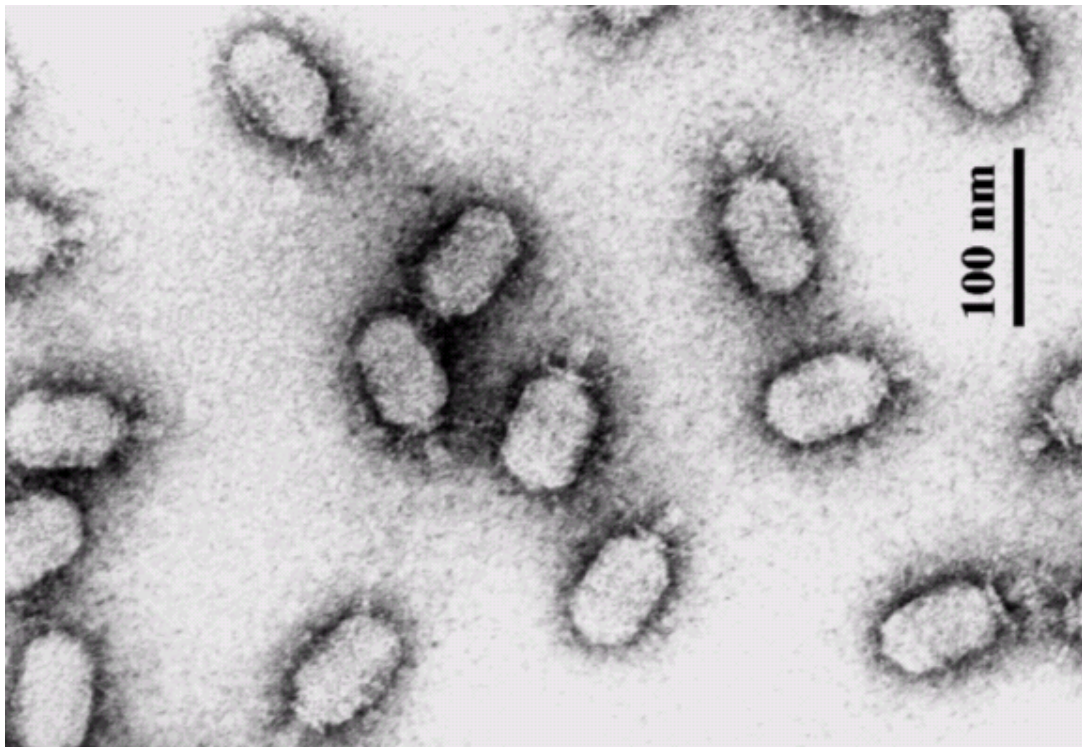


como se planteó anteriormente, aunque hasta ahora no se han detectado bacterias resistentes frente a las enzimas líticas.

Recientemente, se ha conseguido aislar una amidasa producida por un fago que infecta a *Bacillus anthracis* que, como en los casos anteriores se ha mostrado muy eficaz en los ensayos realizados in vitro y con el empleo de modelos murinos de infección, así como en la detección de esporas del carbunco que constituye un arma biológica de destrucción masiva (Schuch y cols, 2002).

Actualmente el grupo de investigación del Centro de Investigaciones Biológicas del CSIC en colaboración con investigadores del Centro de Microbiología del Instituto Carlos III de Majadahonda está investigando el empleo las lisozimas codificadas por fagos de neumococo pertenecientes a la familia Podoviridae (figura 2) aislados anteriormente (Ronda y cols, 1981). Experimentos preliminares muestran que ese tipo de enzima lítica se muestra incluso más eficaz que las amidasas usadas hasta el momento cuando se ha empleado la vía peritoneal en el modelo murino.

**Figura 2: Micrografía electrónica del fago Cp-1.** Cp-1 es un fago lítico de *S. pneumoniae* aislado en 1980 y que, como otros fagos de esta bacteria, ha sido ampliamente estudiado en el laboratorio de los autores (García y cols, 1997). De los genes *cpl*, clonados en *E. coli* se han aislado las lisozimas Cpl1 y Cpl7 que se emplean como "enzibióticos" en experimentos animales.



El estudio de los fagos y de algunos de los productos por ellos codificados se presenta como un área de investigación prometedora en los próximos años a la hora de desarrollar nuevos mecanismos de antibiosis que tan necesarios son a causa de la creciente resistencia de las bacterias frente a los antibióticos clásicos. Al ser España uno de los grandes consumidores de productos marinos se considera de la mayor importancia que se estimule este tipo de aproximaciones experimentales que podrían constituir un eficaz método para evitar grandes pérdidas económicas en piscifactorías. Aunque la utilidad de la fagoterapia es una materia controvertida conviene recordar con Sulakvelidze que el uso de los antibióticos durante más de medio siglo nos ha

enseñado que nunca podremos ganar la guerra contra las bacterias, pero quizás con los fagos podamos intentar al menos cambiar el equilibrio biológico de forma favorable (Sulakvelidze y Morris, 2001).

## Agradecimientos

Este trabajo está subvencionado con los fondos del proyecto BCM2000-1002 de la Dirección General de Investigación Científica y Técnica y Proyecto Tel 99-0868. CICYT2000-2002.

## Bibliografía

1. Biswas, B., S. Adhya, P. Washart, B. Paul, A. N. Trostel, B. Powel, R. Carlton, C.R. Merrill. (2002). Bacteriophage therapy rescues mice bacteremic from a clinical isolate of vancomycin-resistant *Enterococcus faecium*. *Infect Immun* 70, 587-598
2. d'Hérelle, F. (1917). Sur un microbe invisible antagoniste des bacilles dysentériques. *Compt Rend Acad. Sci* 165, 373-375
3. Dopazo, C.P., M.L. Lemos, C. Lodeiros, J. Bolinches, J L. Barja, A.E. Toranzo. (1988). Inhibitory activity of antibiotic-producing marine bacteria against fish pathogens. *J. Appl. Bacteriol.* 65, 97-101
4. García, P., A. C. Martín, R. López. (1997). Bacteriophages of *Streptococcus pneumoniae*: a molecular approach. *Microb. Drug Resist.* 3, 165-176
5. Kucharewicz-Krukowska, A., S. Slopek. (1987). Immunogenic effect of bacteriophage in patients subjected to phage therapy. *Arch. Immunol. Ther. Exp. (Warsz)* 5, 553-561.
6. Kusuda, R., K. Kawai. (1998). Bacterial diseases of culture marine fish in Japan. *Fish Pathol.* 33, 221-227
7. Loeffler, J.M., D. Nelson, V.A. Fischetti. (2001). Rapid killing of *Streptococcus pneumoniae* with a bacteriophage cell wall hydrolase. *Science* 294, 2170-2172
8. McDonnell, M., C. Ronda-Lain, A. Tomasz. (1975). "Diplophage": a bacteriophage of *Diplococcus pneumoniae*. *Virology* 63, 577-582
9. Merrill, C.R., B. Biswas, R. Carlton, N.C. Jensen, G.J. Creed, S. Zullo, S. Adhya. (1996). Long-circulating bacteriophage as antibacterial agents. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 93,3 188-3192
10. Nakai, T., S.C. Park. (2002). Bacteriophage therapy of infectious diseases in aquaculture. *Res. Microbiol.* 153, 13-18
11. Nakai, T., R. Sugimoto, K.H. Park, S. Matsuoka, K. Mori, T. Nishioka, K. Maruyama. (1999). Protective effects of bacteriophage on experimental *Lactococcus garviae* infection in yellowtail. *Dis. Aquat Org* 37, 33-41
12. Nelson, D., L. Loomis, V.A. Fischetti. (2001). Prevention and elimination of upper respiratory colonization of mice by group A streptococci by using a bacteriophage lytic enzyme. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 98, 4107-4112.
13. Park, S.C., I. Shimamura, M. Fukunaga, K. Mori, T. Nakai. (2000). Isolation of bacteriophages specific to a fish pathogen, *Pseudomonas plecoglossidica*, as a candidate for disease control. *Appl. Environ. Microbiol.* 66, 1416-1422
14. Ronda, C., R. López, E. García. (1981). Isolation and characterization of a new bacteriophage, Cp-1, infecting *Streptococcus pneumoniae*. *J. Virol.* 40, 551-559
15. Schuch, R., D. Nelson, V.A. Fischetti. (2002). A bacteriolytic agent that detects and kills *Bacillus anthracis*. *Nature* 418, 884-889
16. Sheehan, M.M., J.L. García, R. López, P. García. (1997). The lytic enzyme of the pneumococcal phage Dp-1: a chimeric lysin of intergeneric origin. *Mol. Microbiol.* 25, 717-725
17. Smith, H.W., M.B. Huggins, K.M. Shaw. (1987). The control of experimental *Escherichia coli* diarrhoea in calves by means of bacteriophages. *J. Gen. Microbiol.* 133, 1111-1126
18. Stone, R. (2002). Stalin's forgotten cure. *Science* 298, 728-731
19. Sulakvelidze, A., A.Z., J.G. Morris Jr. (2001). Bacteriophage therapy. *Antimicrob. Agents Chemother.* 208, 649-659
20. Twort, F.W. (1915). An investigation on the nature of ultramicroscopic viruses. *Lancet* ii, 1241-1243