

Revisión

Los bacteriófagos y sus productos génicos como agentes antimicrobianos

E. García y R. López

Departamento de Microbiología Molecular, Centro de Investigaciones Biológicas, CSIC, Madrid

RESUMEN

Los virus que infectan a las bacterias (bacteriófagos o fagos) fueron descubiertos hace casi 90 años y su empleo ha constituido una herramienta de trabajo fundamental para el espectacular desarrollo de la biología molecular. No obstante, los fagos, desde un principio, se vislumbraron como instrumentos adecuados para ser usados como agentes que permitieran combatir las enfermedades infecciosas causadas por bacterias. Este objetivo quedó relegado por el descubrimiento y empleo generalizado de los antibióticos. El preocupante y creciente desarrollo de las resistencias bacterianas ha hecho que, desde hace unos años, se piense de nuevo en los fagos como una alternativa terapéutica al uso de los antimicrobianos actuales. Se trataría de corregir los errores cometidos en el pasado y aprovechar la experiencia desarrollada durante años en los países de Europa del Este. En la presente revisión se analizan los trabajos realizados sobre el uso terapéutico de estos agentes, así como otras alternativas tales como el empleo de "enzibióticos", las enzimas líticas codificadas por los fagos.

Palabras clave: Bacteriófagos - Terapia fágica - Resistencia antibiótica

The bacteriophages and their gene products as antimicrobial agents

SUMMARY

The viruses that infect bacteria (bacteriophages or phages) were first isolated about 90 years ago. Phages have been fundamental tools in the development of molecular biology. Phages were early hypothesized as therapeutic agents for combatting pathogenic bacteria. However, the discovery and successful use of antibiotics to treat infectious diseases hindered this aim. The development of bacterial resistance to most available drugs has recently led researchers to test the possibilities of using phages as therapeutic agents. We review here recent achievements in this field, taking into consideration former bias in handling phages as well as previous achievements carried out in Eastern Europe where bacteriophages have been employed for decades as an alternative to antibiotics.

Key words: Bacteriophages - Phage therapy - Antibiotic resistance

INTRODUCCIÓN

Desde hace unos años se ha comenzado a reivindicar en la medicina occidental el papel que Félix d'Hérelle atribuyó originalmente a los fagos como agentes antimicrobianos. Tanto este francocanadiense en 1917 (1) como el británico F.W. Twort en 1915 (2) fueron capaces de demostrar las placas de lisis que se producían cuando se añadían extractos obtenidos de aguas fecales a cultivos bacterianos apropiados. No obstante, sólo D'Hérelle fue capaz de atribuir a agentes filtrables presentes en esas muestras de agua contaminadas un efecto antibacteriano, reivindicando así las observaciones realizadas unos años antes por Hankin (3) sobre la relativa salubridad de las aguas del río Ganges. Pese al éxito parcial que consiguió D'Hérelle en la aplicación terapéutica de los fagos, el tiempo vino a demostrar que no se disponía de medios técnicos adecuados para tratar racionalmente las muestras que contenían fagos, o quizás no se dedicó el suficiente esfuerzo humano en ese sentido. En cualquier caso, después de desarrollar un itinerante *curriculum vitae*, que incluyó la dirección de un laboratorio en el Instituto Pasteur de París y una cátedra en Yale, el carácter irascible de D'Hérelle le llevó a aceptar la invitación de Eliava para desarrollar el ilusionante proyecto de crear, en 1933, un instituto en Tiflis (Georgia) dedicado exclusivamente al estudio de los bacteriófagos. La labor realizada en este centro de investigación, así como en otros del antiguo bloque de la Europa del Este, especialmente el Instituto Hirszfeld de Inmunología y Terapia Experimental (Wroclaw, Polonia) fundado en 1953, está comenzando en la actualidad a ser apreciada en su justa medida. Buena referencia de la importancia creciente que está teniendo la utilización terapéutica de los fagos la dan numerosas revisiones que se han publicado en los dos últimos años sobre este tema (4-8).

LOS FAGOS Y LA BIOLOGÍA MOLECULAR

D'Hérelle fue el primero en utilizar los fagos para tratar la disentería en un niño de 12 años, observando que los síntomas de la enfermedad desaparecían después de una única inyección de fagos. No obstante, el éxito que acompañó al uso terapéutico de la penicilina desde 1942 relegó el estudio de los fagos con fines clínicos a un olvido casi total. Como ya se ha apuntado, los antiguos países de la Europa del Este fueron una excepción, y el uso de los fagos para combatir las infecciones, con todas las reservas que conlleva la falta de controles científicos contrastados, invita a una reflexión sobre sus esperanzadores resultados, en particular en uso tópico y en el tratamiento de disenterías.

Mientras tanto, en Occidente, no cabe duda de que los bacteriófagos han proporcionado un valioso material que ha contribuido de forma fundamental al espectacular desarrollo de la biología molecular. Los experimentos de Meselson y Stahl (9) empleando fagos marcados radiactivamente permitieron confirmar, de forma definitiva, los trabajos fundamentales de Avery y su escuela (10) para demostrar que los ácidos nucleicos constituían la base química de los genes. La aparente simplicidad de las partículas fágicas y el impulso proporcionado por Delbrück, Hershey y Luria fueron fundamentales para el despegue de lo que sería la biología molecular (11).

ORÍGENES Y REGRESO DE LA FAGOTERAPIA

Los esfuerzos realizados para generalizar el uso de los fagos como agentes terapéuticos en las décadas de 1920 y 1930 fueron cayendo en el olvido por diversas razones. Un papel muy importante fue el desempeñado por la Asociación Médica Americana (*American Medical Association*) cuando recomendó que dejara de emplearse este tipo de tratamientos (12, 13). Visto en perspectiva, el rechazo se debió a diversas razones, entre las que cabe destacar el desconocimiento de la biología de los fagos, pues se llegó a afirmar en una de las revisiones citadas que un fago es "una proteína de alto peso molecular que parece formarse a partir de un precursor que se origina en el interior de la bacteria". A este respecto, debe recordarse que las primeras fotografías al microscopio electrónico que permitían determinar la estructura de un fago no se realizaron hasta 1943 (14). Otras razones fueron el diseño erróneo de los protocolos experimentales y la falta de controles adecuados en tales experimentos. Todo ello condujo al abandono del uso terapéutico de los fagos en Occidente, a pesar incluso de que algunas compañías farmacéuticas habían comercializado, ya en 1940, preparaciones de fagos para uso humano. Para promover el uso extensivo de los antibióticos, a partir del año 1944 se extremaron los cuidados con el fin de evitar los muchos errores cometidos en los protocolos experimentales usados en el empleo de los fagos con fines terapéuticos. Entre los problemas que condujeron al fallo terapéutico de la terapia fágica cabe destacar los siguientes:

- La falta de un control adecuado para demostrar que se empleaban fagos claramente líticos y, aún mejor, que se dispusiera de un cóctel de tales fagos para eludir el posible desarrollo de resistencia en una especie determinada.
- Eliminación de las bacterias a partir de las cuales se preparaban los fagos por simple filtración en condiciones de

esterilidad y de restos bacterianos en los preparados fágicos para uso clínico. Estos restos celulares podían producir reacciones indeseadas en el enfermo a causa, por ejemplo, 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.

- Ausencia de estudios de farmacocinética que evitaran la rápida eliminación de las partículas fágicas de la sangre. Geier y cols. (15) sugirieron que los fagos eran eliminados del torrente sanguíneo vía anticuerpos desarrollados en los ratones donde se realizaban los ensayos. La razón de la pérdida de eficacia terapéutica en estos fagos se debería, sin embargo, a que quedan atrapados en el bazo, que actuaría como un filtro. De hecho, los fagos permanecían viables en el bazo durante varios días y no aparecían neutralizados por los neutrófilos ni fagocitados por los macrófagos.
- Controles adecuados para evitar utilizar fagos atemperados, es decir, capaces de integrarse en el genoma de la célula huésped dando lugar a una bacteria lisogénica. Estos fagos deben ser descartados como agentes terapéuticos ya que no pueden producir una lisis rápida ni un crecimiento exponencial en las cantidades necesarias para conseguir una eficacia total, así como porque pueden originar en la bacteria que infecten fenómenos de conversión fágica mediante la transmisión de factores de virulencia que pueden codificar en su genoma.
- Debe tenerse en cuenta el uso apropiado de controles, pues en la mayoría de los experimentos realizados por D'Hérelle no se tuvo en cuenta el empleo de placebos para así probar la eficacia real de los fagos. Ésta es una prueba fundamental que ha sido argumentada de forma repetida para cuestionar muy seriamente el éxito que la medicina de los países del Este ha atribuido a la terapia fágica.

Aún se necesitan muchos datos farmacológicos rigurosos con respecto al empleo terapéutico de los fagos, así como controles toxicológicos, para que se pueda proponer su uso más generalizado en los países occidentales. Así, aunque los fagos se localizan en el hígado, el bazo y el páncreas a las 10 horas de su administración, parece que pueden persistir en el cuerpo humano durante varios días. La actividad bactericida de los fagos se basa en su replicación en el interior de la bacteria, pero se cree que pueden existir diferentes formas de replicación que, en cualquier caso, implican una serie de acontecimientos que requieren la actividad de varios genes estructurales y reguladores. Con un

enfoque clínico, los fagos parecen ser inocuos y así han sido utilizados por vía oral en píldoras o jarabes en dosis de 10^5 a 10^{11} unidades formadoras de placas (UFP), por vía rectal, como aerosoles y en forma tópica sin que se hayan descrito complicaciones graves. Este comportamiento no es del todo extraño si tenemos en cuenta la abundancia de los fagos en el medio ambiente (ca. 10^8 /ml) o en el agua del mar ($2,5 \times 10^8$ /ml), y además son consumidos regularmente en los alimentos y son colonizadores habituales del intestino humano. No obstante, es preciso tener más datos sobre la capacidad de un fago determinado para transportar genes bacterianos (transducción generalizada) o sobre si poseen en su genoma secuencias similares a aquellas que están implicadas en resistencias a antibióticos, antes de ser empleados como agentes terapéuticos.

Como se ha señalado anteriormente, con el empleo generalizado de los antibióticos para combatir las infecciones, durante casi cuarenta años se abandonó en Occidente cualquier tipo de investigación sobre el uso de los fagos como agentes terapéuticos, aunque se usaron de forma extensa en análisis genéticos y para establecer las bases de la biología molecular. No obstante, en la década de 1980 de nuevo se empezó a usar los bacteriófagos, tímidamente todavía, en animales de experimentación en los países occidentales, y se vio que eran capaces de proteger a las ratas de infecciones sistémicas experimentales. En este sentido, los trabajos de Smith y Huggins (16) se pueden considerar como un auténtico punto de inflexión al retomar de nuevo la importancia de estos organismos en la terapia animal, ya que ampliaron su campo de experimentación con terneros, ovejas y cerdos, obteniendo resultados muy esperanzadores (17). Estos autores concluyeron que el empleo de fagos para combatir infecciones causadas por *Escherichia coli* en ratas era más eficaz que el uso de antibióticos tales como cloranfenicol, tetraciclina y otros. Trabajos más recientes (18) han justificado estos resultados al observar que una única inyección de fagos propiciaba la multiplicación de la población fágica, que así superaba de forma considerable a la de la bacteria huésped.

LA FAGOTERAPIA Y SU USO ACTUAL EN HUMANOS

Pese a los problemas políticos y económicos que han venido padeciendo los países del antiguo bloque soviético después de la caída del muro de Berlín en 1991, la terapia fágica ha continuado empleándose en algunos de estos países, particularmente en Polonia y en Georgia. En este último caso, el centro de investigación de Tiflis, fundado por D'Hérelle y Eliava, ha sido el productor de cepas de fagos

para la antigua Unión Soviética. Por otra parte, varios investigadores polacos del Instituto Hirschfeld, fundado en 1953, han proporcionado datos convincentes sobre el tratamiento de 550 casos de infecciones bacterianas supurativas (enfisemas, peritonitis, osteomielitis y otras) en humanos. Se trataba en su mayor parte de casos crónicos y estaban implicadas bacterias resistentes a casi todo el arsenal de antibióticos disponible. Entre estos microorganismos se encuentran *Staphylococcus aureus*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Klebsiella pneumoniae* y *E. coli*. Se han documentado curaciones en un 90% de los casos, cesando la supuración y cerrándose las heridas y las fístulas (19). Los fagos se administraron por vía oral previo tratamiento de los pacientes con antiácidos y gelatina, para así proteger a los fagos de la acidez gástrica, y posteriormente se comprobaba que los fagos llegaban al torrente sanguíneo. Más recientemente, los mismos investigadores polacos han publicado que, de 1300 casos tratados, el número de curaciones se elevaba al 86% en infecciones producidas por diferentes patógenos (20). Por otra parte, en la actualidad, aun superando grandes dificultades económicas debidas al cambio que experimenta ese país en su conversión a la economía de mercado, el centro de Tiflis prepara una gran cantidad de fagos para combatir la disentería entre las tropas rusas, aunque aún se requiere, para dar validez científica a su empleo, que estos tratamientos aporten datos más concluyentes con controles a doble ciego. Ha sido publicada (5) una muy documentada revisión sobre el uso terapéutico de los fagos en estos dos centros de investigación.

En trabajos recientes, Merrill y cols. (21) han propuesto que pequeñas variaciones en las proteínas de la cabeza del fago λ podrían dar lugar a fagos mutantes que eludirían mejor al sistema reticuloendotelial, y han desarrollado un protocolo experimental que consiste en un tratamiento inicial de los animales de experimentación con fagos y el posterior aislamiento, en sangre, de aquellos mutantes que no hayan sido retenidos por el sistema reticuloendotelial. El resultado fue la obtención de un mutante cuya única variación era la alteración de la proteína E de la cápsida que presentaba la sustitución de un residuo de ácido glutámico por otro de lisina, un aminoácido básico. Aparentemente, se produce una alteración de la estructura tridimensional de la proteína E que permite evadir el control por el sistema reticuloendotelial. No obstante, la validez de este proceso ha sido cuestionada, en particular si los fagos se administran por vía oral o tópica. Además, se ha propuesto que la cinética de actuación de los fagos es más rápida que la producción de anticuerpos neutralizantes por parte del huésped. Aún más, esta técnica ha sido puesta en tela de juicio por otros grupos (22) y se cree que podría ser más sencillo el

uso no selectivo de mutantes en terapia fágica para resolver el problema de la eliminación de los fagos por el sistema reticuloendotelial, con lo cual se limitaría a administrar de forma repetida el mismo fago en lugar de realizar una serie de pases del mismo y la posterior selección de mutantes.

Otro problema a tener en cuenta es la producción de anticuerpos neutralizantes del fago. Parece ser que la administración parenteral de fagos da lugar al desarrollo de anticuerpos (23). Sin embargo, 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. Finalmente, el desarrollo de resistencias bacterianas frente a los fagos, aunque se considera que es diez veces más bajo que con los antibióticos, se podría evitar utilizando "cócteles" de fagos, como se hace con el uso simultáneo de dos o tres antibióticos.

Entre los ejemplos más destacados y recientes sobre el uso de la terapia fágica cabe citar su empleo para el control biológico de *E. coli* O157, que produce colitis hemorrágicas, por eliminación de la flora bacteriana de los vegetales frescos (24). Asimismo, se han usado fagos sobre enterococos nosocomiales. Recientemente se ha demostrado que el uso de una inyección de 3×10^8 UFP administrada 45 minutos después de que los ratones fueran inoculados con cepas patógenas de *Enterococcus faecium* resistentes a la vancomicina, permitió la curación del 100% de los animales inoculados (25). También se pudo comprobar que, como era de esperar, la curación sólo se producía cuando se usaron aquellas cepas de fago capaces de infectar *in vitro* a la cepa usada en los ratones.

ENZIMAS LÍTICAS FÁGICAS COMO ANTIBIÓTICOS: ENZIBIÓTICOS

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. 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, etc.

Experimentos llevados a cabo en 1993 con plantas transgénicas de patata que expresaban el gen de la lisozima del fago T4 demostraron que tales plantas eran resistentes a la infección por el fitopatógeno *Erwinia carotovora* (26). Siguiendo un planteamiento análogo, muy recientemente, el grupo de Vincent Fischetti de la Universidad Rockefeller ha utilizado la capacidad bactericida de las enzimas líticas codificadas por los fagos para prevenir y eliminar microorganismos patógenos en ratones colonizados por estreptococos del grupo A y neumococos (27, 28). En el caso de

Streptococcus pyogenes se usó una enzima lítica purificada a partir de un extracto crudo de un lisado de fago. Diez nanogramos (1000 U) de enzima purificada fueron suficientes para esterilizar un cultivo de 10^7 bacterias en cinco segundos. En un modelo murino, 250 U de enzima instiladas en la cavidad bucal proporcionaban protección frente a 10^7 bacterias del grupo A sin afectar al resto de la microbiota comensal.

En el caso de *Streptococcus pneumoniae* se pudo demostrar que con la amidasa Pal, cuyo gen fue clonado en nuestro laboratorio a partir del genoma del fago Dp-1 (29), bastaban asimismo unos pocos segundos para destruir 15 serotipos muy comunes, incluyendo algunos con alta resistencia a la penicilina, empleando para ello 100 U/ml de Pal (Fig. 1). En experimentos con ratones que habían sido previamente colonizados se comprobó que un único tratamiento con Pal bastaba para erradicar el estado de portador, observándose también que el tratamiento no sólo no afectaba a otros microorganismos que normalmente colonizan la orofaringe, sino que tampoco aparecían neumococos resistentes a la enzima. Fischetti propone que estas enzimas fágicas usadas para el control de patógenos podrían ser lla-

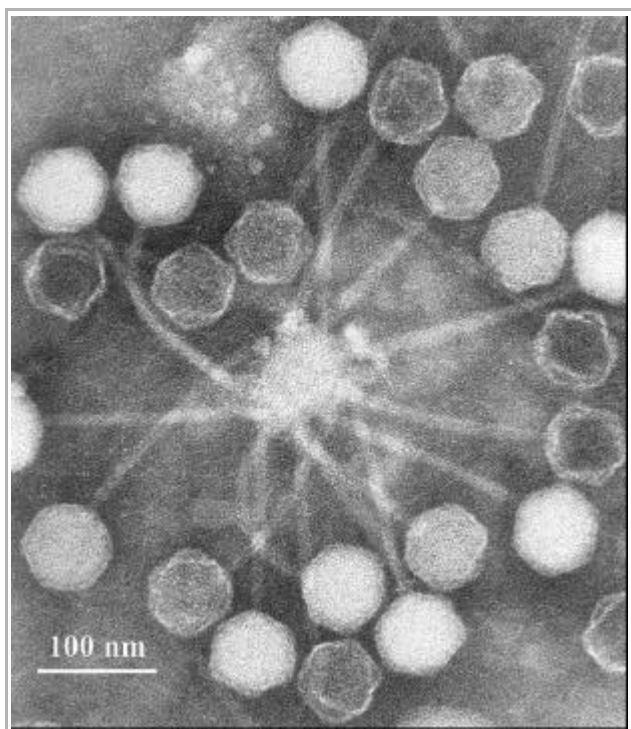


Figura 1. Microfotografía electrónica del fago Dp-1. Se trata de un fago lítico de *S. pneumoniae* aislado en 1975 y que, como otros fagos de neumococo, ha sido ampliamente estudiado en el laboratorio de los autores (33). A partir de un clon de *E. coli* que sobreexpresaba el gen *pal* del fago Dp-1 se purificó la amidasa (Pal) que se empleó en el trabajo de Fischetti comentado en el texto (28).

madas “enzibióticos”. Los detractores de esta técnica aducen que es más fácil desarrollar resistencia con los enzibióticos que con los cócteles de fagos, aunque hasta ahora no se han detectado bacterias resistentes a las enzimas líticas.

PERSPECTIVAS FUTURAS

Se ha pronosticado con sobradas razones que es posible que, en ciertas enfermedades infecciosas, hayamos vuelto a la era preantibiótica. En lo que existe acuerdo generalizado es en que, tanto con el empleo de fagos como de alguno de los productos fágicos, estamos ante terapias novedosas y prometedoras que, usadas junto con los antibióticos, pueden proporcionar un medio muy eficaz para combatir el preocupante problema de la aparición de bacterias resistentes a todo el arsenal antibiótico de que se dispone. Todo ello propicia un escenario que garantiza la realización de nuevos estudios en el campo de la terapia fágica.

En teoría, la terapia fágica presenta evidentes ventajas frente a la antibioticoterapia:

- En general, los antibióticos poseen un espectro de actividad notablemente amplio, mientras que los fagos son estrictamente específicos, por lo cual no producen el efecto de eliminación de la microbiota comensal beneficiosa.
- Los antibióticos pueden tener efectos colaterales indeseados (alergias, contraindicaciones durante el embarazo, efectos tóxicos en ciertos órganos), mientras que existen pruebas de la inocuidad de las preparaciones fágicas purificadas.
- Los fagos son igualmente eficaces sobre bacterias sensibles o multirresistentes.
- La producción de antibióticos es bastante costosa, mientras que la de fagos acarrea unos costes reducidos.
- La búsqueda de nuevos antibióticos es difícil, mientras que la naturaleza constituye una fuente virtualmente inagotable de fagos.

Es indudable que, a la luz de nuestros conocimientos actuales, aquellas condiciones que faciliten una rápida multiplicación fágica son las que permitirían una adecuada eliminación del patógeno (22), como ocurre en la mucosa intestinal y en la piel, mientras que en infecciones donde el fago encuentre dificultades para su multiplicación, debido a la existencia de un excesivo número de células (abscesos) o por inconvenientes físicos (al tratarse, por ejemplo, de bacterias de multiplicación intracelular), se duda de su eficacia. Datos recientes parecen indicar que los fagos son capaces de atravesar la barrera hematoencefálica incluso cuando se administran por vía nasal (30), y por tanto pueden ser

útiles para combatir las meningitis bacterianas (31). Por otra parte, la relación entre bacteria y fago constituye una interacción compleja de tipo huésped-parásito que puede condicionar el resultado de la terapia, habida cuenta de que la concentración de fagos utilizada podría venir determinada no sólo por el número de bacterias sino también por el estado fisiológico de éstas (4, 18, 32).

En conclusión, existe una consistente aportación bibliográfica y experimental que avala el continuar investigando el posible uso de los fagos y de sus productos génicos como una esperanzadora alternativa terapéutica a los tratamientos actualmente disponibles.

AGRADECIMIENTOS

Este trabajo ha sido llevado a cabo dentro de un proyecto subvencionado por la Dirección General de Investigación (Ministerio de Ciencia y Tecnología) (BMC2000-1002).

NOTA

Durante la preparación de este trabajo, el grupo del Prof. Fischetti ha utilizado una enzima lítica de un fago para la detección y tratamiento de una bacteria de tanta actualidad como *Bacillus anthracis*. Recomendamos la lectura de su artículo (Schuch, R., Nelson, D., Fischetti, V.A. *A bacteriolytic agent that detects and kills Bacillus anthracis*. Nature 2002; 418: 884-889).

Correspondencia: Rubens López, Dpto. de Microbiología Molecular, Centro de Investigaciones Biológicas, CSIC, C/ Velázquez 144, 28006 Madrid. Tlf. 91 561 1800. Fax: 91 562 7518. E-mail: ruben@cib.csic.es

BIBLIOGRAFÍA

- D'Hérelle, F. *Sur un microbe invisible antagoniste des bacilles dysentériques*. Compt Rend Acad Sci (Paris) 1917; 165: 373-375.
- Twort, F.W. *An investigation on the nature of ultramicroscopic viruses*. Lancet 1915; ii: 1241-1243.
- Hankin, M.E. *L'action bactéricide des eaux de la Jumna et du Gange sur la microbe du choléra*. Ann Inst Pasteur 1896; 10: 511-523.
- Payne, R.J.H., Jansen, V.A.A. *Understanding bacteriophage therapy as a density-dependent kinetic process*. J Theor Biol 2001; 208: 37-48.
- Sulakvelidze, A., Alavidze, Z., Morris Jr., J.G. *Bacteriophage therapy*. Antimicrob Agents Chemother 2001; 45: 649-659.
- Sulakvelidze, A., Morris, J.G. *Bacteriophages as therapeutic agents*. Ann Med 2001; 33: 507-509.
- Summers, W.C. *Bacteriophage therapy*. Annu Rev Microbiol 2001; 55: 437-451.
- Duckworth, D.H., Gulig, P.A. *Bacteriophages: Potential treatment for bacterial infections*. BioDrugs 2002; 16: 57-62.
- Meselson, M., Stahl, F.W. *Replication of DNA in Escherichia coli*. Proc Natl Acad Sci USA 1958; 44: 671-676.
- Avery, O.T., McLeod, C.M., McCarty, M. *Studies on the chemical nature of the substance inducing transformation of pneumococcal types. Induction of transformation by a deoxyribonucleic acid fraction isolated from pneumococcus type III*. J Exp Med 1944; 79: 137-158.
- Cairns, J., Stent, G., Watson, J. *Phage and origins of molecular biology*. Cold Spring Harbor Lab. Press, CSH, Long Island, New York, 1966.
- Eaton, M.D., Bayne-Jones, S. *Bacteriophage therapy. Review of the principles and results of the use of bacteriophage in the treatment of infections*. J Am Med Assoc 1934; 103: 1769-1776, 1847-1853, 1934-1939.
- Krueger, A.P., Scribner, E.J. *Bacteriophage therapy: II. The bacteriophage. Its nature and its therapeutic use*. J Am Med Assoc 1941; 116: 2160-2167, 269-2277.
- Luria, S.E., Delbrück, M., Anderson, T.F. *Electron microscope studies of bacterial viruses*. J Bacteriol 1943; 46: 57-77.
- Geier, M.R., Frigg, M.E., Merrill, C.R. *Fate of bacteriophage lambda in non-immune germ-free mice*. Nature 1973; 246: 221-222.
- Smith, H.W., Huggins, M.B. *Successful treatment of experimental Escherichia coli infections in mice using phage: Its general superiority over antibiotics*. J Gen Microbiol 1982; 128: 307-318.
- Smith, H.W., Huggins, M.B., Shaw, K.M. *The control of experimental Escherichia coli diarrhoea in calves by means of bacteriophage*. J Gen Microbiol 1987; 133: 1111-1126.
- Levin, B.R., Bull, J.J. *Phage therapy revisited: The population biology of a bacterial infection and its treatment with bacteriophage and antibiotics*. Am Naturalist 1996; 147: 881-898.
- Slopek, S., Weber-Dabrowska, B., Dabrowski, M., Kucharewicz-Krukowska, A. *Results of bacteriophage treatment of suppurative bacterial infections in the years 1981-1986*. Arch Immunol Ther Exp (Warsz) 1987; 35: 569-583.
- Carlton, R.M. *Phage therapy: Past history and future prospects*. Arch Immunol Ther Exp (Warsz) 1999; 47: 267-274.
- Merrill, C.R., Biswas, B., Carlton, R. y cols. *Long-circulating bacteriophage as antibacterial agents*. Proc Natl Acad Sci USA 1996; 93: 3188-3192.
- Barrow, P.A., Soothill, J.S. *Bacteriophage therapy and prophylaxis: Rediscovery and renewed assessment of potential*. Trends Microbiol 1997; 5: 268-271.
- Kucharewicz-Krukowska, A., Slopek, S. *Immunogenic effect of bacteriophage in patients subjected to phage therapy*. Arch Immunol Ther Exp (Warsz) 1987; 5: 553-561.
- Kudva, I.T., Jelacic, S., Tarr, P.I., Youderian, P., Hovde, C.J. *Biocontrol of Escherichia coli O157 with O157-specific bacteriophages*. Appl Environ Microbiol 1999; 65: 3767-3773.
- Biswas, B., Adhya, S., Washart, P. y cols. *Bacteriophage therapy rescues mice bacteremic from a clinical isolate of vancomycin-resistant Enterococcus faecium*. Infect Immun 2002; 70: 204-210.
- Düring, K., Porsch, P., Fladung, M., Lörz, H. *Transgenic potato plants resistant to the phytopathogenic bacterium Erwinia carotovora*. Plant J 1993; 3: 587-598.
- Nelson, D., Loomis, L., Fischetti, V.A. *Prevention and elimination of upper respiratory colonization of mice by group A streptococci by using a bacteriophage lytic enzyme*. Proc Natl Acad Sci USA 2001; 98: 4107-4112.
- Loeffler, J.M., Nelson, D., Fischetti, V.A. *Rapid killing of Streptococcus pneumoniae with a bacteriophage cell wall hydrolase*. Science 2001; 294: 2170-2172.
- Sheehan, M.M., García, J.L., López, R., García, P. *The lytic enzyme of the pneumococcal phage Dp-1: A chimeric lysin of intergeneric origin*. Mol Microbiol 1997; 25: 717-725.

30. Frenkel, D., Solomon, B. *Filamentous phage as vector-mediated antibody delivery to the brain*. Proc Natl Acad Sci USA 2002; 99: 5675-5679.
31. Strój, L., Weber-Dabrowska, B., Partyka, K., Mulczyk, M., Wójcik, M. *Successful treatment with bacteriophage in purulent cerebrospinal meningitis in a newborn*. Neurol Neurochir Pol 1999; 33: 693-698.
32. Kasman, L.M., Kasman, A., Westwater, C., Dolan, J., Schmidt, M.G., Norris, J.S. *Overcoming the phage replication threshold: A mathematical model with implications for phage therapy*. J Virol 2002; 76: 5557-5564.
33. García, P., Martín, A.C., López, R. *Bacteriophages of Streptococcus pneumoniae: A molecular approach*. Microb Drug Resist 1997; 3: 165-176.