

Estudi i avaluació del paper dels bacteriòfags en la prevenció d'infeccions en agricultura i en animals de producció

Laura Arranz, Anna Cardona, Aida Yuste, Eulàlia Nogué, Esteban L. Arosemena,
M. dels Àngels Calvo-Torras

Grup de recerca en Microbiologia Aplicada i Mediambiental, Facultat de Veterinària, Universitat Autònoma de Barcelona

REBUT: 7 D'ABRIL DE 2022 · ACCEPTAT: 23 DE JUNY DE 2022

RESUM

Aquest treball fa una breu revisió bibliogràfica sobre els bacteriòfags, les seves característiques i els seus mecanismes de replicació. A partir dels estudis revisats, s'avalua la fagoteràpia, com a mesura profilàctica en l'agricultura i els animals de renda. Es comenta la legislació sobre aquesta tècnica, i es constata que a la Unió Europea (UE) no s'inclou la fagoteràpia com a mètode de tractament, raó per la qual, actualment, no és possible aplicar-la. S'aporten i s'exposen els avantatges i les dificultats derivades de l'aplicació dels bacteriòfags com a eina de prevenció i de control enfront de les infeccions d'etiologia bacteriana.

PARAULES CLAU: bacteriòfags, bacteris patògens, control, prevenció, agricultura, producció animal.

Correspondència: M. dels Àngels Calvo Torras. Grup de recerca en Microbiologia Aplicada i Mediambiental. Facultat de Veterinària. Edifici V. Travessera dels Turons, s/n. 080193 Bellaterra, Cerdanyola del Vallès. Tel.: 935 811 748 / 661 893 035. A/e: Mariangels.calvo@uab.cat.

Study and evaluation of the role of bacteriophages in the prevention of infections in agriculture and in production animals

ABSTRACT

This paper provides a brief literature review on bacteriophages, their key features and their replication mechanisms. On the basis of the reviewed studies, phage therapy is evaluated as a prophylactic measure in agriculture and for livestock. The relevant legislation is discussed and it is noted that phage therapy is not contemplated in the European Union (EU), which is why it is currently not possible to apply it. The benefits and difficulties involved in the application of bacteriophages as a tool for the prevention and control of infections of bacterial etiology are listed and discussed.

KEYWORDS: bacteriophages, pathogenic bacteria, control, prevention, agriculture, animal production.

Estudio y evaluación del papel de los bacteriófagos en la prevención de infecciones en agricultura y en animales de producción

RESUMEN

Este artículo realiza una breve revisión bibliográfica sobre los bacteriófagos, sus características y sus mecanismos de replicación. A partir de los estudios revisados, se evalúa la fagoterapia, como medida profiláctica en agricultura y animales de renta. Se comenta la legislación, y se constata que en la Unión Europea (UE) no está incluida la fagoterapia, por lo que, actualmente, no es posible aplicarla. Se aportan y se exponen las ventajas y dificultades derivadas de la aplicación de bacteriófagos como herramienta de prevención y de control frente a las infecciones de etiología bacteriana.

PALABRAS CLAVE: bacteriófagos, bacterias patógenas, control, prevención, agricultura, producción animal.

1. Introducció

L'increment de la detecció i dispersió de bacteris multiresistents als antibiòtics és un problema greu arreu del món, amb una implicació important en l'àmbit veterinari, atès que, en volum, els antibiòtics són majoritàriament consumits per animals de renda (Aarestrup, 2012). Per a evitar l'ús indiscriminat d'aquests fàrmacs, la Unió Europea (UE) en el Reglament (CE) 1831/2003, sobre els additius en l'alimentació animal (DOUE, 2003), no va autoritzar els antibiòtics, cosa que va impossibilitar que fossin usats com a promotors de creixement en l'alimentació animal.

Així doncs, és necessari buscar alternatives als antibiòtics per a evitar o reduir les infeccions i contaminacions bacterianes en la producció d'aliments destinats al consum humà o dels animals. Un dels camps de recerca que ha recobrat importància en els darrers anys és l'ús de bacteriòfags per a controlar, disminuir o eliminar la presència de bacteris patògens, és a dir, la fagoteràpia.

Els objectius d'aquest treball són donar a conèixer els bacteriòfags, les seves característiques fonamentals i els seus mecanismes de replicació, així com avaluar la fagoteràpia com a eina de prevenció i de control davant d'infeccions d'etiologia bacteriana, a partir dels estudis revisats i de la legislació vigent.

2. Bacteriòfags

Els bacteriòfags, o fags, són virus que infecten exclusivament cèl·lules bacterianes per tal de mantenir-ne el cicle biològic i poder-se replicar. Estan formats per un àcid nucleic que pot ser tant àcid desoxiribonucleic (DNA) com àcid ribonucleic (RNA) dins d'una càpsida (El-Shibiny i El-Sahhar, 2017).

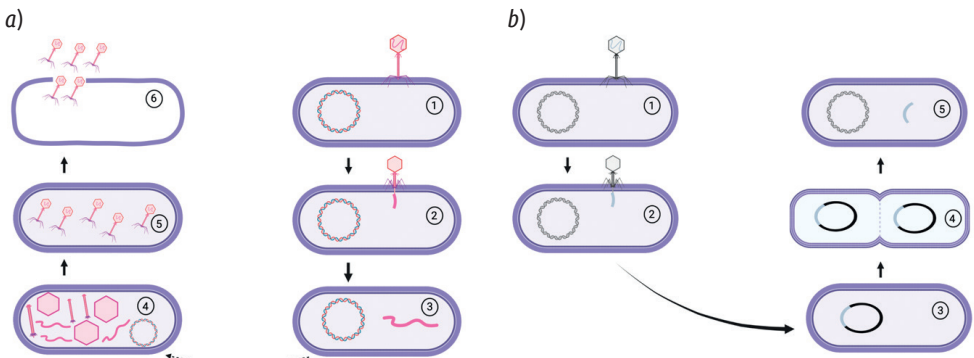
Van ser descoberts el 1915 per Twort i el 1917 per D'Herelle de manera independent, però, tot i tenir un futur prometedor com a teràpia antibacteriana, van quedar eclipsats per l'aparició dels antibiòtics uns anys més tard (Keen, 2012). Això no obstant, es van seguir investigant a països d'Europa de l'Est com Geòrgia, Polònia i Rússia i, avui en dia, en aquests països, són una pràctica implementada per a tractar infeccions bacterianes en humans. Tot i això, les investigacions que s'han dut a terme en aquests estats no estan a l'abast dels altres països, atès que no estan escrits en anglès (El-Shibiny i El-Sahhar, 2017), i els que sí que estan disponibles no són aplicables als països de l'oest degut a la manca d'assajos clínics que compleixen els estàndards requerits (Thiel, 2004).

2.1. Cicle biològic

Els bacteriòfags reconeixen receptors específics de la superfície de la cèl·lula bacteriana a la qual s'adhereixen, fet que els dona una alta especificitat d'hoste ja que aquests receptors (lipopolisacàrids, fímbries o altres proteïnes de superfície) són únics per a cada espècie o soca bacteriana (Wernicki, Nowaczek i Urban-Chmiel, 2017). Un cop el seu genoma penetra dins la cèl·lula bacteriana, hi replica els àcids nucleics i es formen els virions, que provoquen la lisi del bacteri, la qual cosa en permet l'alliberació i l'atac de noves cèl·lules hoste. Aquest cicle és conegut com a *lític* o *virulent*, el qual causa la mort del bacteri, i és el que té interès terapèutic (figura 1). Tanmateix, hi ha una altra via, la del cicle lisogènic, en què el genoma víric s'integra dins del bacterià, on es pot quedar de manera latent sense causar la lisi de la cèl·lula (El-Shibiny i El-Sahhar, 2017). Després d'un nombre variable de generacions bacterianes lisogenitzades, és a dir, amb el genoma víric integrat en el bacterià, el genoma del virus s'allibera del propi del bacteri i s'inicia el cicle lític que acabarà provocant la lisi del bacteri lisogenitzat (figura 1).

FIGURA 1

Cicles d'infecció que poden fer els bacteriòfags: cicle lític (a) i cicle lisogènic (b)



Pas 1: el fag s'uneix al bacteri (adsorció). Pas 2: el material genètic del fag entra al citoplasma bacterià (penetració). Pas 3: síntesi de proteïnes primerenques del fag que permeten l'inici del cicle reproductiu del virus i detenen el metabolisme bacterià. Pas 4: síntesi de proteïnes estructurals virals. Pas 5: assemblatge d'estructures virals. Pas 6: alliberament de la progènia viral.

Pas 1: el fag s'uneix al bacteri (adsorció). Pas 2: el material genètic del fag entra al citoplasma bacterià (penetració). Pas 3: formació de lisogen, inserció del material genètic del fag al cromosoma bacterià. Pas 4: multiplicació bacteriana amb el pròfag al seu genoma. Pas 5: escissió del pròfag i activació del cicle lític.

FONT: Elaboració pròpia a partir de Prada-Peñaranda *et al.* (2015).

2.2. Obtenció dels fags interessants

Per tal d'aïllar i, posteriorment, identificar i caracteritzar els bacteriòfags que afecten les espècies o soques bacterianes que interessa eliminar, es poden analitzar residus animals com les femtes, aigües residuals no tractades o efluent d'escorxadors i també productes vegetals afectats per problemes d'etiologia bacteriana. D'aquesta manera, es poden seleccionar fags lítics específics per a les espècies bacterianes presents en el tracte digestiu dels animals en funció de la seva capacitat lítica i, per tant, de la seva eficàcia (Akhtar *et al.*, 2014), així com aquells d'interès en agricultura. Aquest mètode de selecció permet que, quan aquests bacteriòfags siguin utilitzats com a teràpia, no s'introdueixi cap microorganisme nou a la cadena alimentària (Loc Carrillo *et al.*, 2005).

A partir de les mostres de femta o altres substàncies, s'indueix el creixement dels bacteris que es volen eliminar (per exemple, *Campylobacter* o *Salmonella*) i s'incuben juntament amb els bacteriòfags obtinguts de les mateixes mostres per a avaluar el creixement de les colònies bacterianes (Sevilla-Navarro *et al.*, 2018). D'aquesta manera, es trien aquells fags que tenen més facilitat per a propagar-se, que mantenen els títols constants durant un temps determinat abans de ser administrats i que presenten la màxima estabilitat als canvis de pH (Loc Carrillo *et al.*, 2005). Això no obstant, és necessari encapsular-los, atès que, per naturalesa, els bacteriòfags s'inactiven a pH àcid; per tant, no sobreviuen en un medi gàstric i poden degradar-se amb els àcids biliars i els enzims del duodè (Gigante i Atterbury, 2019).

2.3. Encapsulació

La microencapsulació permet augmentar la supervivència dels fags en un medi àcid (pH entre 2 i 7), incrementa la resistència a temperatures extremes i redueix la sensibilitat a la llum ultraviolada (Lewis i Hill, 2020).

S'ha estudiat l'encapsulació amb diferents polímers hidrofílics i hidrofòbics com agarosa, alginat, pectina, metacrilat d'àcid hialurònic, diacetat de cel·lulosa, etc. (Malik *et al.*, 2017), i també s'ha demostrat l'efectivitat de l'encapsulació amb diferents biomaterials. Diferents autors (Colom *et al.*, 2015) van assenyalar una diferència significativa entre la supervivència de bacteriòfags encapsulats en un liposoma en relació amb els no encapsulats, amb una estabilitat més gran dels primers a un pH de 2,8. Més tard, el mateix equip de recerca va comprovar que els bacteriòfags encapsulats en un alginat amb CaCO_3 tenien més eficàcia i durabilitat en relació amb els no encapsulats quan eren administrats oralment (Colom *et al.*, 2017).

Tang *et al.* (2013) també van comprovar-ho amb un alginat (en el seu cas amb proteïna sèrica) encapsulant el bacteriòfag *Felix O1*, cosa que demostra que es mantenia viable

a un pH de 2 durant dues hores, mentre que els no encapsulats s'inactivaven pocs minuts després d'entrar en contacte amb un fluid gàstric simulat.

2.4. Proteïnes derivades de bacteriòfags

Cal tenir molt presents algunes de les proteïnes dels bacteriòfags, com ara les endolisines, exolisines i depolimerases, atesa la seva possibilitat terapèutica.

Les endolisines són enzims que destrueixen la paret de peptidoglicà del bacteri. Són utilitzades pel bacteriòfag virulent per a poder alliberar els virions un cop s'ha replicat. Un dels avantatges que presenten respecte dels fags és que, de moment, no s'han detectat resistències a aquestes molècules, probablement perquè quan s'apliquen actuen de manera exògena i, per tant, eviten molts dels mecanismes de resistència bacterians. Tanmateix, degut a la naturalesa de la seva diana, tenen efecte prioritari sobre els bacteris grampositius (Carvalho *et al.*, 2017). Actualment, també s'ha demostrat l'activitat sobre bacteris gramnegatius (Gutiérrez *et al.*, 2020).

Cal considerar també les exolisines, les quals formen part de l'estructura del fag i també degraden els peptidoglicans. En condicions normals, serveixen per a facilitar l'entrada del bacteriòfag en el bacteri en la primera fase de la infecció. L'avantatge de les exolisines rau en el fet que també tenen poca probabilitat d'induir resistències microbianes i, a més, tenen estabilitat a temperatures altes (Carvalho *et al.*, 2017).

Pel que fa a les depolimerases, són proteïnes que degraden els polisacàrids de la paret bacteriana, també per a facilitar l'entrada del bacteriòfag a la cèl·lula. No obstant això, encara hi ha pocs estudis en què s'hagin utilitzat aquestes molècules *in vivo* (Carvalho *et al.*, 2017).

3. Fagoteràpia profilàctica

Tal com s'ha comentat, la fagoteràpia està adquirint importància com a possible mesura antibacteriana. Tanmateix, aquesta teràpia es pot aplicar per a obtenir un efecte curatiu però també profilàctic. En ambdós casos, la finalitat és reduir la colonització bacteriana. Concretament, l'objectiu de la teràpia preventiva és garantir la salut animal i dels vegetals abans que es vegi compromesa, i d'aquesta manera oferir un aliment segur.

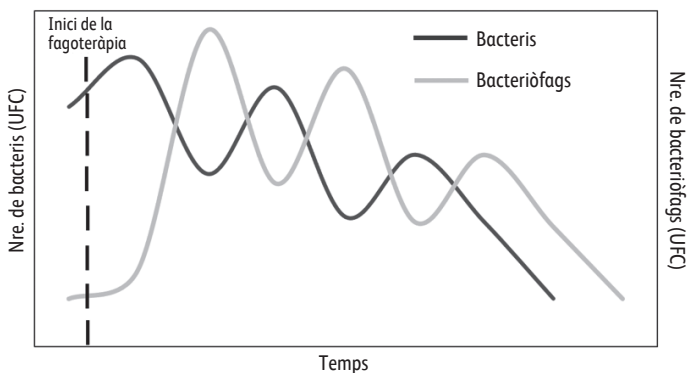
Cal destacar que l'ús dels fags per a prevenir la infecció en l'animal o vegetals vius no és l'única utilització possible per a assegurar la salubritat alimentària. Els fags també es poden utilitzar per a controlar o eliminar bacteris en la cadena alimentària, per a higienitzar les superfícies que entren en contacte amb els aliments i per a prevenir la conta-

minació dels aliments emmagatzemats (Sillankorva, Oliveira i Azeredo, 2012). Això significa que per a obtenir un aliment totalment segur és possible combinar diverses aplicacions, cosa que permet maximitzar els resultats (Newell *et al.*, 2011).

En qualsevol cas, la fagoteràpia profilàctica no substitueix la curativa. Tal com ja s'ha mencionat, els fags virulents utilitzen la maquinària del mateix bacteri per a replicar-se. Això implica que, si d'entrada no hi ha infecció, els bacteriòfags no tenen cèl·lules hoste per infectar i s'acaben inactivant sense haver causat cap efecte. Lògicament, la població de bacteriòfags fluctua en funció de la bacteriana, de manera que els bacteriòfags s'amplifiquen a partir de les cèl·lules bacterianes presents (figura 2). Conseqüentment, disminueixen les unitats formadores de colònies bacterianes (UFC) i, posteriorment, també ho fan les unitats formadores de plaques de lisi (UFP), cosa que comporta la disminució dels bacteriòfags en la mostra analitzada (Moelling, Broecker i Willy, 2018). Per aquest motiu, sembla necessari que hi hagi una infecció bacteriana en el moment de l'administració dels fags, fet que pot suggerir que la fagoteràpia curativa és més efectiva que la profilàctica.

FIGURA 2

Representació gràfica de l'oscil·lació de la població de bacteriòfags d'acord amb la de bacteris



FONT: Elaboració pròpia a partir de Moelling, Broecker i Willy (2018).

La profilaxi és atractiva tant per al sector productiu com per al sector alimentari en general. Les malalties infeccioses solen augmentar la mortalitat i disminuir la fertilitat i els rendiments dels animals —i, en conseqüència, la quantitat de productes alimentaris obtinguts (llet, ous, vegetals...)—, cosa que es tradueix en una reducció del benefici econòmic; és interessant, per tant, prevenir aquestes patologies (Carvalho *et al.*, 2017). A més,

reduir la colonització de bacteris patògens durant la vida de l'animal, ja sigui durant el creixement o abans del sacrifici, disminueix el risc de contaminació creuada a través de les femtes en la fase de processament de l'aliment (Sillankorva, Oliveira i Azeredo, 2012).

En les diferents investigacions que s'han dut a terme, s'ha vist que l'eficiència dels fags depèn de molts factors: de la dosi, el moment i la via d'administració o d'aplicació dels virus; de si s'aplica un bacteriòfag o un conjunt (còctel); de la concentració de bacteris diana al tracte digestiu i dels seus mecanismes d'adaptació, entre d'altres (Grant, Hashem i Parveen, 2016; Wernicki, Nowaczek i Urban-Chmiel, 2017).

3.1. Bacteriòfags com a promotors del creixement

Atesa la prohibició a la UE d'emprar antibiòtics com a promotors del creixement en l'alimentació animal, s'està investigant l'aplicació dels bacteriòfags amb aquest objectiu. Kim i col·laboradors (2014) van comprovar l'eficiència d'un còctel de fags de diferents espècies de bacteris patògens entèrics administrats com a suplement dietètic per a millorar els resultats productius en porcs d'engreix, tot i que, en comparació amb altres experiments amb pitjors resultats, es creu que aquesta millora depèn d'altres factors, entre els quals la higiene de la granja, la dieta i el tipus de bacteriòfag. Yan, Hong i Kim (2012) van comparar l'efecte sobre el creixement de porcs de la suplementació amb antibiòtics i amb bacteriòfags contra *Salmonella* a la dieta, i van arribar a la conclusió que els segons podien ser una bona alternativa a partir de 0,5 g/kg de pinso.

També s'ha proposat administrar fags els primers dies de vida, en els quals no és recomanable donar antibiòtics i no és possible vacunar (Seal *et al.*, 2013). En qualsevol cas, considerem que és un camp poc estudiat i que necessita investigació addicional.

4. Control de bacteris en producció animal

4.1. Aviram

Les aus de corral són un reservori important de *Salmonella* i *Campylobacter* (Endersen *et al.*, 2014), per això se'ls ha destinat un elevat nombre d'estudis de fagoteràpia oral, ja sigui a través de sonda oral, del pinso o de l'aigua de beguda (Sillankorva, Oliveira i Azeredo, 2012), especialment en pollastres. Aquests gèneres bacterians són a Europa i als Estats Units els gèneres amb més prevalença en producció aviar i causants de brots en humans. Aquesta és una raó més de l'interès d'aplicar la teràpia fàgica en l'àmbit de la producció animal i el sector agroalimentari.

Actualment, s'administren vacunes per a controlar infeccions per *Salmonella* en gallines i pollastres, les quals redueixen efectivament la transmissió horitzontal i vertical entre individus. No obstant això, no eviten la disseminació del bacteri ni la infecció, la qual esdevé subclínica i dificulta l'erradicació dins de la granja. Així doncs, pot ser indicat afegir bacteriòfags al pinso com a additiu per a ajudar a controlar *Salmonella* juntament amb la vacunació (Lim *et al.*, 2012).

Ahmadi i col·laboradors (2016) van aïllar un bacteriòfag de *Salmonella* Enteritidis (*Salmonella enterica*, subespècie *enterica*, serovar Enteritidis) a partir de femta d'aviram i van establir en guatlls dues pautes d'administració: una amb objectiu profilàctic, en la qual es van subministrar els virus tres dies abans d'inocular els bacteris, i l'altra amb un objectiu terapèutic, en la qual els fags es van aportar just després de l'exposició al patogen. Set dies després de la infecció, la prevalença en el cec de *S. Enteritidis* en el grup preventiu va ser del 20%, mentre que en el grup terapèutic va ser del 100%, amb la qual cosa es pot concloure que l'administració preventiva era més efectiva que l'administració postinfecció. L'estudi també va mostrar que la via oral era eficaç.

També s'ha comprovat la utilitat de tractar animals infectats per a evitar la transmissió horitzontal a animals sans. Lim i col·laboradors (2012) van mostrar que en inocular *S. Enteritidis* a pollets d'un dia i fer-los conviure amb altres pollets no infectats, després d'administrar-los fags addicionats al pinso durant vint-i-un dies, la colonització intestinal del grup es reduïa. De fet, tres setmanes després del tractament, no es va detectar *Salmonella* a l'intestí en el 70% dels animals no infectats (grup que va rebre 10^9 UFP/g de bacteriòfag).

Convé destacar la importància de la dosi i el moment d'administració dels bacteriòfags. La multiplicitat d'infecció (MOI, de l'anglès *multiplicity of infection*), que indica el nombre de virions que s'han afegit per cèl·lula durant la infecció, permet calcular el nombre de partícules virals necessàries per a eliminar una cèl·lula hoste. Idealment, la MOI hauria de ser baixa per tal de reduir despeses en la producció dels fags. Tanmateix, en el cas de *Salmonella*, en què la seva concentració al tracte digestiu és baixa, hi ha menys probabilitats que els bacteriòfags localitzin la diana i, per tant, se'n necessita una dosi més alta. De vegades, quan el nombre de bacteris és molt baix, és inviable augmentar la dosi de fags perquè siguin efectius (Atterbury *et al.*, 2007).

D'altra banda, Bardina i col·laboradors (2012) van comprovar que en infectar alguns pollastres amb *Salmonella* (10^8 UFC/animal) i la resta per contacte (*seeder bird method*) i administrar per via oral un còctel de fags (10^{10} UFP/animal) dos cops al dia el quart i cinquè dia de la infecció, s'obtenia una reducció de només $0,5 \log_{10}$ dotze dies després de la infecció, ja que *Salmonella* havia colonitzat de manera eficient el tracte intestinal dels animals. En canvi, en els dos altres grups experimentals, amb animals infectats individualment amb una dosi inferior de *Salmonella* (10^5 UFC/animal), quan els bacteriòfags s'admi-

nistraven el dia abans o el mateix dia de la infecció, i es continuava el tractament dues vegades al dia durant quatre dies i una dosi diària durant la setmana següent, la reducció de *S. Typhimurium* va ser significativament superior (entre 2 i 4 \log_{10} , aproximadament, depenent del període d'estudi). Aquest experiment remarca la importància de combatre la infecció quan la concentració de bacteris és encara reduïda i que una administració continuada de bacteriòfags ajuda a mantenir aquest efecte inicial a llarg termini.

D'altra banda, s'ha valorat l'eficàcia de tractar els animals una única vegada pocs dies abans del sacrifici. En un estudi d'Atterbury i col·laboradors (2007) es va avaluar en dos assaigs l'efectivitat de bacteriòfags contra els serovars de *Salmonella enterica* Enteritidis, Typhimurium i Hadar administrats a pollastres de trenta-sis dies d'edat dos dies abans de ser infectats. En el primer assaig es va utilitzar una dosi de 10^9 UFP i en el segon de 10^{11} UFP. El segon assaig va mostrar una reducció significativa del contingut cecal per als pollastres infectats amb *S. Enteritidis* i per als infectats amb *S. Typhimurium*, mentre que en el primer assaig no es van registrar reduccions significatives per a cap dels serovars analitzats. Aquest treball mostra que el tractament profilàctic permet reduir la colonització intestinal dies abans del sacrifici dels animals.

Finalment, s'ha estudiat l'opció d'administrar els bacteriòfags mitjançant l'aigua de beguda, mètode molt utilitzat en aus de corral per altres fàrmacs. La presència d'ions de calci i magnesi beneficia la unió entre els virions i els receptors de la paret cel·lular hoste; per tant, si l'aigua és pobra en ions divalents, hi ha menys activitat dels bacteriòfags (Grant *et al.*, 2017).

Pel que fa a *Campylobacter*, diversos autors consideren que la incidència d'infeccions humanes seria trenta vegades inferior si es reduís la concentració del bacteri en la carn d'aviram en dues unitats logarítmiques, cosa que es podria aconseguir amb fagoteràpia quan les aus són a la granja (Carvalho *et al.*, 2010; Johnson *et al.*, 2008). En ser *Campylobacter* un bacteri ubiqüitari, caldria fer tractaments en diferents moments de la vida productiva dels animals per tal d'anar-lo reduint (Lewis i Hill, 2020), o bé en un sol cop abans del sacrifici, tot i que, en aquest cas, no es pararia la circulació del bacteri a la granja (Kittler *et al.*, 2013).

Carvalho i col·laboradors (2010) van infectar pollastres amb *Campylobacter* mimetitzant a les granges comercials, és a dir, amb nivells de colonització entre 10^6 i 10^9 UFC/g de femta i absència de simptomatologia, i van administrar fags contra *C. jejuni* i *C. coli*. El títol de *Campylobacter* va disminuir 2 \log_{10} UFC/g de femta ja als dos dies d'iniciar el tractament administrat a través del pinso.

En un altre assaig fet en condicions de camp en una granja de pollastres comercials, es van formar tres grups experimentals, tots contaminats de manera natural per *Campylobacter*, i se'ls va administrar bacteriòfags als trenta-sis, trenta-dos i trenta-un dies d'edat, respectivament. Només es va aconseguir una reducció significativa de la concen-

tració de *Campylobacter* abans del sacrifici en el primer grup (superior a $3,2 \log_{10}$ UFC/g de contingut cecal), cosa que indica que la disminució de la colonització presacrifici és possible però calen unes pautes concretes perquè succeeixi (Kittler *et al.*, 2013).

Wagenaar i col·laboradors (2005) van comparar en pollastres el tractament preventiu (administrant bacteriòfags els quatre dies previs a la inoculació de *C. jejuni* i durant els sis dies següents) i el terapèutic (iniciant el tractament amb fags cinc dies després de la inoculació i aplicant-lo durant sis dies). El tractament preventiu no va evitar la colonització, però sí que la va endarrerir i disminuir, i es va establir a una unitat logarítmica per sota del grup de control (infectat i no tractat). En canvi, el grup terapèutic va experimentar una reducció de la colonització immediata de $3 \log$ UFC/g, però, en acabar el tractament, aquesta colonització va augmentar i es va situar al nivell del primer grup. Així doncs, tot i que el tractament preventiu no impedeix la contaminació ni la redueix a nivells segurs, l'administració de fags abans del sacrifici té un efecte positiu.

4.2. Porcí

La disseminació de *Salmonella* en porcs augmenta durant el transport i la retenció a l'escorxador degut a l'estrès, el qual indueix la reactivació d'infeccions antigues o facilita contagis nous a través d'instal·lacions contaminades, com el camió o les gàbies. Això comporta un perill de contaminació de les canals i, en conseqüència, d'entrada d'una quantitat més elevada de bacteris en el processament de la carn i els seus productes. Per tant, l'objectiu de la fagoteràpia preventiva en porcí haurà de ser reduir la colonització intestinal de *Salmonella* per a prevenir la contaminació creuada a l'escorxador (Saez *et al.*, 2011).

En un estudi amb dos grups (de control i tractat amb bacteriòfag) de porcs deslletats, es van inocular 2×10^{10} UFC/animal de *Salmonella* Typhimurium i 24 i 48 hores més tard se'ls van administrar per via oral 3×10^9 UFP d'un còctel de bacteriòfags. Al cap de dos dies de l'última dosi es van sacrificar tots els animals i se'n va analitzar el contingut intestinal. Es van detectar concentracions inferiors de *Salmonella* en el grup tractat que en el de control, tot i que només al recte la reducció va ser significativa. Això va permetre concloure que la fagoteràpia pot ser una bona estratègia per a reduir la presència de *Salmonella* en porcs dies abans del sacrifici (Callaway *et al.*, 2011).

D'altra banda, cal tenir en compte que a partir de l'any 2022 estarà prohibit l'ús d'òxid de zinc (ZnO) a dosis farmacològiques en el pinso de porcs a la UE. El ZnO s'administra amb l'objectiu de disminuir les diarrees postdeslletament i promoure el creixement, però ja no es permetrà usar-lo atès que comporta un perill de contaminació ambiental i de desenvolupament de resistències bacterianes (Wang *et al.*, 2019).

En conseqüència, cal buscar alternatives a aquest producte, entre les quals hi ha els bacteriòfags.

En un assaig per a testar l'efecte de bacteriòfags enfront de *Escherichia coli* enterotoxigènica administrada (10^{10} UFP) per via oral en porcs deslletats, es va inocular el bacteri quinze minuts abans que el fag administrat a dosi alta (10^{10} UFP). Es van monitorar durant sis dies, entre altres paràmetres, la duració i la severitat de la diarrea i la disseminació del bacteri en femtes. Es va concloure que, en comparació amb el grup de control (infectat però no tractat), hi va haver una variació més petita de pes entre els individus, la diarrea va ser més curta i lleu i els bacteris excretats per femtes no van desenvolupar cap resistència al bacteriòfag (Jamalludeen *et al.*, 2009).

5. Control de bacteris a l'agricultura

Els bacteriòfags es van descobrir per primera vegada en associació a bacteris patògens de plantes l'any 1924, quan Mallmann i Hemstreet (1924) van demostrar que el filtrat de col fermentada era capaç d'inhibir el creixement de *Xanthomonas campestris* pv. *campestris*, agent etiològic de la podridura de la col. Més tard, es van proposar els fags com a agents de control de malalties (Moore, 1926) i es van emprar amb èxit per a la prevenció de la podridura dels tubercles de patata causada per *Erwinia carotovora* subsp. *atroseptica* (syn. *Pectobacterium carotovorum*) (Kotila i Coons, 1925) i com a tractament de llavors per tal de reduir la incidència del marciment del blat de moro descrit per Stewart, produït per *Pantoea stewartii* (Thomas, 1935). Malgrat els primers resultats prometedors, la teràpia amb fags no va ser considerada aplicable per diversos especialistes en agricultura (Vidaver, 1976).

A partir de la dècada de 1990 es va demostrar que la teràpia amb fags és eficaç per al control d'una sèrie de malalties causades per bacteris fitopatògens. Cal destacar les causades per *Xanthomonas* spp., com la taca bacteriana del tomàquet, préssec, gerani, ceba, noguera i la cancrosi asiàtica dels cítrics (Balogh *et al.*, 2008; Civerolo i Kiel, 1969; Flaherty *et al.*, 2001; McNeil *et al.*, 2001); per *Pseudomonas* spp., com la taca bacteriana dels bolets (Munsch i Olivier, 1995); per *Erwinia* spp., com *E. amylovora*, causant del foc bacterià de la pomera i perera o d'alteracions diverses com la podridura suau bacteriana (Svircev *et al.*, 2005; Schnabel *et al.*, 2010); per *Ralstonia solanacearum*, causant del marciment bacterià del tabac (Tanaka, Negishi i Maeda, 1990), o per *Streptomyces scabies*, causant de la sarna de la patata (McKenna *et al.*, 2001). El primer bacteriòfag es va registrar als Estats Units l'any 2005; ho va fer la companyia OmniLytics Inc., Salt Lake City, UT (Registre EPA # 67986-1) i, actualment, s'hi comercialitzen bacteriòfags per al control de la taca bacteriana del tomàquet i el pebrot (*Xanthomonas* pv. *campestris vesicatoria*

i *Pseudomonas syringae*). Alguns autors han adoptat un enfocament polivalent en el qual la teràpia amb fags s'utilitza com a part d'una estratègia de gestió integrada, com, per exemple, combinada amb antibiòtics com l'estreptomicina (Borah, Jindal i Verma, 2000) o amb bactericides derivats del coure (Balogh *et al.*, 2008). Tanmateix, els antibiòtics no estan autoritzats a la UE en agricultura.

Els principals reptes de l'agricultura deriven del fet que la producció agrícola es fa en un entorn obert. En conseqüència, els fags s'apliquen en sistemes on hi ha poc control o cap dels factors ambientals, com la temperatura, la irradiació solar, els nivells d'humitat o el pH. A més, els fags han de proporcionar protecció dels teixits susceptibles, els quals, en entorns agrícoles, es troben dispersos en grans superfícies, enfront de bacteris patògens, els quals poden dispersar-se lliurement pel medi ambient. Davant aquests reptes, cal indicar que, a l'agricultura, la teràpia amb fags té més potencial en sistemes caracteritzats per entorns tancats i controlats, per variabilitat de la susceptibilitat de les plantes reduïda, per bacteris diana que constitueixen una població clonal i per bacteriòfags amb capacitat d'infectar el bacteri adient.

6. Marc legal a la Unió Europea

La legislació actual a la UE, tant veterinària com humana, no regula l'ús dels bacteriòfags i cap normativa sobre medicaments o additius els inclou. D'una banda, cal remarcar la dificultat en la contextualització dels bacteriòfags dins la normativa comunitària sobre medicaments veterinaris (DOUE, 2019). En la definició de *medicament veterinari*, el reglament indica que la substància, o la combinació dels que el componen, ha de ser d'origen humà, animal, vegetal o químic, per la qual cosa hi ha falta de precisió a l'hora d'establir si els bacteriòfags es podrien considerar un medicament. De l'altra, els bacteriòfags tampoc consten en la normativa que fixa els límits de residus de les substàncies farmacològicament actives (DOUE, 2009). En els annexos I, II i III hi figuren les llistes de medicaments veterinaris per als quals s'estableixen límits màxims de residus, que no hi estan subjectes i per als quals s'han fixat límits màxims de residus provisionals, respectivament. La falta de regulació dels fags com a medicaments veterinaris fa que no figurin a les llistes esmentades, la qual cosa demostra que no estan autoritzats per a la seva administració en animals destinats al consum humà. A més, l'Agència Europea de Seguretat Alimentària (EFSA, de l'anglès *European Food Safety Authority*) (EFSA BIOHAZ Panel, 2022), a l'actualització de la llista QPS (*qualified presumption of safety*, presumpció qualificada de seguretat), fa notar que els fongs filamentosos, els bacteriòfags i altres microorganismes queden exclosos de les avaluacions QPS d'acord amb una posició taxonòmica ambigua o perquè presenten característiques potencialment perilloses per a la salut.

Pel que fa a l'ús de bacteriòfags com a additius del pinso, tampoc no estan previstos en el Reglament 1831/2003 (DOUE, 2003) sobre els additius en l'alimentació animal; perquè s'autoritzi, cal demostrar que no suposen un risc per a la salut animal, humana o el medi ambient. Sobre aquesta qüestió, l'EFSA és l'encarregada de fer l'avaluació científica de la innocuïtat dels additius. A més, cal tenir present que, per a conèixer els mecanismes d'acció i demostrar que els bacteriòfags no suposen un perill de seguretat pel fet de tenir factors de virulència o gens de resistència microbiana, se n'hauria de seqüenciar el genoma, cosa que dificultaria immensament el procés de registre (Żbikowska, Michalczuk i Dolka, 2020).

Tot i la dificultat d'adoptar la fagoteràpia clínica a la pràctica, s'ha aconseguit aplicar els fags en camps no terapèutics, com en el diagnòstic de determinats bacteris, en l'agricultura i en la indústria alimentària (Lu i Koeris, 2011). Tant és així que en alguns països (Estats Units, Canadà, Israel...) ja es comercialitzen biocides a base de fags per a eliminar certs bacteris directament en els aliments, com el ListShield® per a *Listeria monocytogenes* en productes carnis i avícoles. Aquesta ha estat la primera substància aprovada, i des de llavors se n'han seguit desenvolupant a escala mundial (Endersen *et al.*, 2014). A més, tot i les dificultats imposades per les entitats reguladores, fora de la UE ja hi ha al mercat additius per al pinso, els productes BIOTEKTOR® contra *Escherichia coli* tant en aus com en porcs, i contra *Clostridium perfringens* i *Salmonella* spp. en aus (CJBIO, 2020).

Encara que és difícil encabir els bacteriòfags dins les lleis europees actuals, la necessitat de desenvolupar nous productes antibacterians està impulsant projectes de recerca i nous productes comercials. Tot i així, cal modificar la legislació perquè permeti la utilització dels bacteriòfags, i així augmentar l'interès de la inversió i, per tant, la recerca en aquest camp (Keen, 2012).

7. Discussió: obstacles que cal superar

La falta de regulació no és l'únic obstacle per a l'aplicació dels bacteriòfags; hi ha altres impediments que dificulten el desenvolupament d'aquests productes. En primer lloc, els fags tenen un rang d'actuació limitat, ja que només afecten espècies o soques concretes. Això implica que, per a dur a terme un tractament efectiu, abans cal identificar el patògen que s'ha d'eliminar i el bacteriòfag més efectiu. Això es pot solucionar combinant el fag amb altres agents antimicrobians, també amb altres fags, amb els anomenats *còctels de bacteriòfags* (Loc-Carrillo i Abedon, 2011).

Els còctels de bacteriòfags amplien l'espectre d'activitat i augmenten el nombre d'hostes susceptibles. També redueixen la probabilitat de desenvolupar resistències bacterianes: encara que els bacteris desenvolupin resistència a un fag, els altres virus del

còctel podran mantenir l'activitat (Ly-Chatain, 2014). El problema d'aquesta tècnica és la dificultat legislativa per a la seva aprovació, ja que, en ser administrats conjuntament, s'ha de demostrar la seguretat de tots els components per separat i, també, la de la combinació (Colavecchio i Goodridge, 2018).

Si bé l'especificitat d'hoste comporta limitacions terapèutiques, aquest pot ser també un factor favorable, ja que únicament s'eliminen els bacteris diana i no es modifica la microbiota dels animals, cosa que suposa un avantatge respecte dels antibiòtics (Sevilla-Navarro *et al.*, 2018).

En el cas de fags temperats o de cicle lisogènic, cal tenir en compte que quan s'escindeixen del genoma bacterià, poden endur-se fragments de DNA. Dins d'aquest material hi pot haver gens de resistència a antibiòtics, entre altres seqüències patogèniques, que poden ser transportats a altres bacteris (Thiel, 2004). Per aquest motiu, és imprescindible que els fags seleccionats tinguin un cicle lític (Loc-Carrillo i Abedon, 2011), de manera que, encara que es traslladin fragments de DNA d'un bacteri a un altre, ambdós quedin destruïts. Una altra alternativa per a evitar la transducció és utilitzar proteïnes derivades de bacteriòfags (lisines, holines...), que no s'insereixen al genoma.

L'ús de fags pot suposar un problema quan la patogènia del bacteri es basa a produir toxines, ja que amb la seva lisi s'alliberen. Aquest inconvenient es podria solucionar utilitzant també proteïnes de fags no lítiques que causin la mort bacteriana (Wernicki, Nowaczek i Urban-Chmiel, 2017), o bé modificant els bacteriòfags mitjançant enginyeria genètica amb el mateix objectiu (Colavecchio i Goodridge, 2018).

També és possible que el bacteriòfag no arribi a la seva diana perquè el sistema immunitari de l'animal el reconeix com una substància exògena i l'elimina (Wernicki, Nowaczek i Urban-Chmiel, 2017). En aquest cas, una possible solució és l'encapsulació, per exemple, amb nanovesícules lipídiques (Choińska-Pulit *et al.*, 2015).

Una altra dificultat podria ser la producció i distribució dels fags per tal d'obtenir productes estables i purs a gran escala, ja que molta de la recerca feta sobre la fabricació d'aquests virus és a petita escala (Ali, Rafiq i Ratcliffe, 2019). Tot i això, s'estan desenvolupant models de fabricació, com el de Krysiak-Baltyn, Martin i Gras (2018), en els quals se simula la producció a escala industrial. També s'han estudiat els paràmetres fonamentals per a la fabricació òptima a gran escala, i s'ha conclòs que és necessari utilitzar un medi de cultiu ric i temperatures baixes, de l'ordre de 29 °C, ja que a temperatures més altes hi ha més creixement bacterià i, de manera proporcionalment inversa, menys propagació del virus (Warner *et al.*, 2014).

Finalment, cal destacar la possibilitat que hi hagi una mala percepció sobre els bacteriòfags per part de la ciutadania (Lewis i Hill, 2020). Tot i així, en una enquesta feta als Estats Units s'observà que hi ha potencials consumidors que no només estan d'acord a emprar bacteriòfags, sinó que estan disposats a pagar més pel producte que en contingui

si això garanteix la seguretat alimentària. Amb tot, les opinions van variar segons el nivell social i l'ètnia dels enquestats (Naanwaab *et al.*, 2014).

Cal remarcar que la majoria de propostes exposades en aquest apartat requereixen més recerca, per a la qual són imprescindibles fons econòmics. A més, tal com s'ha comentat, els processos que cal superar per a aprovar un producte són complexos i costosos (Fauconnier, 2019). Una altra qüestió és la impossibilitat de patentar els bacteriòfags. Aquest fet minva l'interès de les empreses privades a invertir en aquest camp de recerca (Thiel, 2004; Verbeken *et al.*, 2014).

8. Conclusions

En els últims anys, ha incrementat l'interès per la fagoteràpia com a alternativa als antibiòtics, fet que obre noves portes a ser utilitzada en veterinària com a eina profilàctica en els animals de renda i a l'agricultura, en el control de plagues d'origen bacterià. El nombre creixent d'estudis sobre aquest tema indica que, tot i no evitar completament les infeccions, la fagoteràpia profilàctica sí que n'endarrereix l'aparició o en disminueix la càrrega bacteriana, fet que permet garantir la seguretat del producte alimentari, sobretot si s'aplica poc abans del sacrifici dels animals.

Tot i això, les lleis actuals a la UE no preveuen l'aplicació de bacteriòfags ni com a medicaments veterinaris ni com a additius, motiu pel qual caldria fer-ne una reforma. A més, hi ha una sèrie d'obstacles relacionats amb aquesta teràpia, com l'alliberació d'endotoxines bacterianes o la inactivació dels fags pel sistema immunitari, que requereixen més recerca.

Bibliografia

- AARESTRUP, F. (2012). «Get pigs off antibiotics». *Nature* [en línia], 486 (7404), p. 465-466. <<https://doi.org/10.1038/486465a>>.
- AHMADI, M.; AMIR KARIMI TORSHIZI, M.; RAHIMI, S.; DENNEHY, J. J. (2016). «Prophylactic bacteriophage administration more effective than post-infection administration in reducing *Salmonella* enterica serovar enteritidis shedding in Quail». *Frontiers in Microbiology* [en línia], 7 (agost), p. 1-10. <<https://doi.org/10.3389/fmicb.2016.01253>>.
- AKHTAR, M.; VIAZIS, S.; DIEZ-GONZALEZ, F. (2014). «Isolation, identification and characterization of lytic, wide host range bacteriophages from waste effluents against *Salmonella* Enterica serovars». *Food Control* [en línia], 38 (1), p. 67-74. <<https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2013.09.064>>.

- ALI, J.; RAFIQ, Q.; RATCLIFFE, E. (2019). «A scaled-down model for the translation of bacteriophage culture to manufacturing scale». *Biotechnology and Bioengineering* [en línia], 116 (5), p. 972-984. <<https://doi.org/10.1002/bit.26911>>.
- ATTERBURY, R. J.; BERGEN, M. A. P. van; ORTIZ, F.; LOVELL, M. A.; HARRIS, J. A.; BOER, A. de; WAGENAAR, J. A.; ALLEN, V. M.; BARROW, P. A. (2007). «Bacteriophage therapy to reduce *Salmonella* colonization of broiler chickens». *Applied and Environmental Microbiology* [en línia], 73 (14), p. 4543-4549. <<https://doi.org/10.1128/AEM.00049-07>>.
- BALOGH, B.; CANTEROS, B. I.; STALL, R. E.; JONES, J. B. (2008). «Control of citrus canker and citrus bacterial spot with bacteriophages». *Plant Disease*, 92 (7), p. 1048-1052.
- BARDINA, C.; SPRICIGO, D. A.; CORTÉS, P.; LLAGOSTERA, M. (2012). «Significance of the bacteriophage treatment schedule in reducing *Salmonella* colonization of poultry». *Applied and Environmental Microbiology* [en línia], 78 (18), p. 6600-6607. <<https://doi.org/10.1128/AEM.01257-12>>.
- BORAH, P. K.; JINDAL, J. K.; VERMA, J. P. (2000). «Integrated management of bacterial leaf spot of mungbean with bacteriophages of Xav and chemicals». *Journal of Mycology and Plant Pathology*, 30 (1), p. 19-21.
- CALLAWAY, T. R.; EDRINGTON, T. S.; BRABBAN, A.; KUTTER, B.; KARRIKER, L.; STAHL, C.; WAGSTROM, E.; ANDERSON, R.; POOLE, T. L.; GENOVESE, K.; KRUEGER, N.; HARVEY, R.; NISBET, D. J. (2011). «Evaluation of phage treatment as a strategy to reduce *Salmonella* populations in growing swine». *Foodborne Pathogens and Disease* [en línia], 8 (2), p. 261-266. <<https://doi.org/10.1089/fpd.2010.0671>>.
- CARVALHO, C.; COSTA, A. R.; SILVA, F.; OLIVEIRA, A. (2017). «Bacteriophages and their derivatives for the treatment and control of food-producing animal infections». *Critical Reviews in Microbiology* [en línia], 43 (5), p. 583-601. <<https://doi.org/10.1080/1040841X.2016.1271309>>.
- CARVALHO, C. M.; GANNON, B. W.; HALFHIDE, D. E.; SANTOS, S. B.; HAYES, C. M.; ROE, J. M.; AZEREDO, J. (2010). «The in vivo efficacy of two administration routes of a phage cocktail to reduce numbers of *Campylobacter coli* and *Campylobacter jejuni* in chickens». *BMC Microbiology* [en línia], 10. <<https://doi.org/10.1186/1471-2180-10-232>>.
- CHEILJEDANG RESEARCH INSTITUTE OF BIOTECHNOLOGY (CJBIO) (2020). «Biotector®» [en línia]. <<https://www.cjbio.net/en/products/biotector.do>>. [Consulta: juny 2022].
- CHOIŃSKA-PULIT, A.; MITUŁA, P.; ŚLIWKA, P.; ŁABA, W.; SKARADZIŃSKA, A. (2015). «Bacteriophage encapsulation: Trends and potential applications». *Trends in Food Science and Technology* [en línia], 45 (2), p. 212-221. <<https://doi.org/10.1016/j.tifs.2015.07.001>>.
- CIVEROLO, E. L.; KIEL, H. L. (1969). «Inhibition of bacterial spot of peach foliage by *Xanthomonas pruni* bacteriophage». *Phytopathology*, 59, p. 1966-1967.

- COLAVECCHIO, A.; GOODRIDGE, L. D. (2018). «Phage therapy approaches to reducing pathogen persistence and transmission in animal production environments: opportunities and challenges». A: THAKUR, S.; KNIEL, K. E. (ed.). *Preharvest Food Safety* [en línia], cap. 16, p. 289-308. American Society for Microbiology. <<https://onlinelibrary.wiley.com/doi/book/10.1128/9781555819644>>.
- COLOM, J.; CANO-SARABIA, M.; OTERO, J.; ARÍÑEZ-SORIANO, J.; CORTÉS, P.; MASPOCH, D.; LLAGOSTERA, M. (2017). «Microencapsulation with alginate/CaCO₃: A strategy for improved phage therapy». *Scientific Reports* [en línia], 7 (desembre 2016), p. 1-10. <<https://doi.org/10.1038/srep41441>>.
- COLOM, J.; CANO-SARABIA, M.; OTERO, J.; CORTÉS, P.; MASPOCH, D.; LLAGOSTERA, M. (2015). «Liposome-encapsulated bacteriophages for enhanced oral phage therapy against *Salmonella* spp». *Applied and Environmental Microbiology* [en línia], 81 (14), p. 4841-4849. <<https://doi.org/10.1128/AEM.00812-15>>.
- DOUE = UNIÓ EUROPEA (2003). «Reglament (UE) 1831/2003 del Parlament Europeu i del Consell, de 22 de setembre de 2003, sobre els additius en l'alimentació animal». *Diari Oficial de la Unió Europea*, L268, p. 29-43.
- (2009). «Reglament (CE) 470/2009 del Parlament Europeu i del Consell, de 6 de maig de 2009, pel qual s'estableixen procediments comunitaris per a la fixació dels límits de residus de les substàncies farmacològicament actives als aliments d'origen animal, deroga el Reglament (CEE) núm. 2377/90 del Consell i es modifiquen la Directiva 2001/82/CE del Parlament Europeu i del Consell i el Reglament (CE) núm. 726/2004 del Parlament Europeu i del Consell». *Diari Oficial de la Unió Europea*, L152, p. 11-22.
- (2019). «Reglament (UE) 2019/6 del Parlament Europeu i del Consell, d'11 de desembre de 2018, sobre medicaments veterinaris i pel qual es deroga la Directiva 2001/82/CE». *Diari Oficial de la Unió Europea*, L4, p. 43-167.
- EL-SHIBINY, A.; EL-SAHHAR, S. (2017). «Bacteriophages: The possible solution to treat infections caused by pathogenic bacteria». *Canadian Journal of Microbiology* [en línia], 63 (11), p. 865-879. <<https://doi.org/10.1139/cjm-2017-0030>>.
- ENDERSEN, L.; O'MAHONY, J.; HILL, C.; ROSS, R. P.; MCAULIFFE, O.; COFFEY, A. (2014). «Phage therapy in the food industry». *Annual Review of Food Science and Technology* [en línia], 5 (1), p. 327-349. <<https://doi.org/10.1146/annurev-food-030713-092415>>.
- EUROPEAN FOOD SAFETY AUTHORITY PANEL ON BIOLOGICAL HAZARDS (EFSA BIOHAZ PANEL) (KOUTSOUMANIS, K. [et al.]) (2022). «Statement on the update of the list of QPS-recommended biological agents intentionally added to food or feed as notified to EFSA 15: Suitability of taxonomic units notified to EFSA until September 2021». *EFSA Journal* 2022 [en línia], 20 (1), 7045, 40 p. <<https://doi.org/10.2903/j.efsa.2022.7045>>.

- FAUCONNIER, A. (2019). «Phage therapy regulation: From night to dawn». *Viruses* [en línia], 11 (4). <<https://doi.org/10.3390/v11040352>>.
- FLAHERTY, J. E.; HARBAUGH, B. K.; JONES, J. B.; SOMODI, G. C.; JACKSON, L. E. (2001) «H-mutant bacteriophages as a potential biocontrol of bacterial blight of geranium». *Hortscience*, 36 (1), p. 98-100.
- GIGANTE, A.; ATTERBURY, R. J. (2019). «Veterinary use of bacteriophage therapy in intensively-reared livestock». *Virology Journal* [en línia], 16 (1), p. 1-9. <<https://doi.org/10.1186/s12985-019-1260-3>>.
- GRANT, A.; HASHEM, F.; PARVEEN, S. (2016). «Salmonella and Campylobacter: Antimicrobial resistance and bacteriophage control in poultry». *Food Microbiology* [en línia], 53, p. 104-109. <<https://doi.org/10.1016/j.fm.2015.09.008>>.
- GRANT, A.; PARVEEN, S.; SCHWARZ, J.; HASHEM, F.; VIMINI, B. (2017). «Reduction of Salmonella in ground chicken using a bacteriophage». *Poultry Science* [en línia], 96 (8), p. 2845-2852. <<https://doi.org/10.3382/ps/pex062>>.
- GUTIÉRREZ, D.; FERNÁNDEZ, L.; RODRÍGUEZ, A.; GARCÍA, P. (2020). «Bacteriòfagos y endolinas en la industria alimentaria». *Arbor* [en línia], vol. 196, núm. 795, p. a544. <<https://doi.org/10.3989/arbor.2020.795n1008>>.
- JAMALLUDEEN, N.; JOHNSON, R. P.; SHEWEN, P. E.; GYLES, C. L. (2009). «Evaluation of bacteriophages for prevention and treatment of diarrhea due to experimental enterotoxigenic *Escherichia coli* O149 infection of pigs». *Veterinary Microbiology* [en línia], 136 (1-2), p. 135-141. <<https://doi.org/10.1016/j.vetmic.2008.10.021>>.
- JOHNSON, R. P.; GYLES, C. L.; HUFF, W. E.; OJHA, S.; HUFF, G. R.; RATH, N. C.; DONOGHUE, A. M. (2008). «Bacteriophages for prophylaxis and therapy in cattle, poultry and pigs». *Animal Health Research Reviews / Conference of Research Workers in Animal Diseases* [en línia], 9 (2), p. 201-215. <<https://doi.org/10.1017/S1466252308001576>>.
- KEEN, E. C. (2012). «Phage therapy: Concept to cure». *Frontiers in Microbiology* [en línia], 3 (juliol), p. 1-3. <<https://doi.org/10.3389/fmicb.2012.00238>>.
- KIM, K. H.; INGALE, S. L.; KIM, J. S.; LEE, S. H.; LEE, J. H.; KWON, I. K.; CHAE, B. J. (2014). «Bacteriophage and probiotics both enhance the performance of growing pigs but bacteriophage are more effective». *Animal Feed Science and Technology* [en línia], 196, p. 88-95. <<https://doi.org/10.1016/j.anifeedsci.2014.06.012>>.
- KITTLER, S.; FISCHER, S.; ABDULMAWJOOD, A.; GLÜNDER, G.; KLEINA, G. (2013). «Effect of bacteriophage application on *Campylobacter jejuni* loads in commercial broiler flocks». *Applied and Environmental Microbiology* [en línia], 79 (23), p. 7525-7533. <<https://doi.org/10.1128/AEM.02703-13>>.
- KOTILA, J. E.; COONS, G. H. (1925). «Investigations on the blackleg disease of potatoes». *Technical Bulletin - Michigan Agricultural Experiment Station* [Michigan, East Lansing], 67, p. 3-29.

- KRYSIAK-BALTYN, K.; MARTIN, G. J. O.; GRAS, S. L. (2018). «Computational modelling of large scale phage production using a two-stage batch process». *Pharmaceuticals* [en línia], 11 (2), p. 1-14. <<https://doi.org/10.3390/ph11020031>>.
- LEWIS, R.; HILL, C. (2020). «Overcoming barriers to phage application in food and feed». *Current Opinion in Biotechnology* [en línia], 61, p. 38-44. <<https://doi.org/10.1016/j.copbio.2019.09.018>>.
- LIM, T. H.; KIM, M. S.; LEE, D. H.; LEE, Y. N.; PARK, J. K.; YOUN, H. N.; LEE, H. J.; YANG, S. Y.; CHO, Y. W.; LEE, J. B.; PARK, S. Y.; CHOI, I. S.; SONG, C. S. (2012). «Use of bacteriophage for biological control of *Salmonella* Enteritidis infection in chicken». *Research in Veterinary Science* [en línia], 93 (3), p. 1173-1178. <<https://doi.org/10.1016/j.rvsc.2012.06.004>>.
- LOC-CARRILLO, C.; ABEDON, S. T. (2011). «Pros and cons of phage therapy». *Bacteriophage* [en línia], 1 (2), p. 111-114. <<https://doi.org/10.4161/bact.1.2.14590>>.
- LOC CARRILLO, C.; ATTERBURY, R. J.; EL-SHIBINY, A.; CONNERTON, P. L.; DILLON, E.; SCOTT, A.; CONNERTON, I. F. (2005). «Bacteriophage therapy to reduce *Campylobacter jejuni* colonization of broiler chickens». *Applied and Environmental Microbiology* [en línia], 71 (11), p. 6554-6563. <<https://doi.org/10.1128/AEM.71.11.6554-6563.2005>>.
- LU, T. K.; KOERIS, M. S. (2011). «The next generation of bacteriophage therapy». *Current Opinion in Microbiology* [en línia], 14 (5), p. 524-531. <<https://doi.org/10.1016/j.mib.2011.07.028>>.
- LY-CHATAIN, M. H. (2014). «The factors affecting effectiveness of treatment in phages therapy». *Frontiers in Microbiology* [en línia], 5 (febrer), p. 1-7. <<https://doi.org/10.3389/fmicb.2014.00051>>.
- MALIK, D. J.; SOKOLOV, I. J.; VINNER, G. K.; MANCUSO, F.; CINQUERRUI, S.; VLADISAVLJEVIC, G. T.; CLOKIE, M. R. J.; GARTON, N. J.; STAPLEY, A. G. F.; KIRPICHNIKOVA, A. (2017). «Formulation, stabilisation and encapsulation of bacteriophage for phage therapy». *Advances in Colloid and Interface Science* [en línia] [Elsevier], vol. 249, p. 100-133. <<https://doi.org/10.1016/j.cis.2017.05.014>>.
- MALLMANN, W. L.; HEMSTREET, C. (1924). «Isolation of an inhibitory substance from plants». *Journal of Agricultural Research*, 28, p. 599-602.
- MCKENNA, F.; EL-TARABILY, K. A.; HARDY, G. E. S. T.; DELL, B. (2001). «Novel *in vivo* use of a polyvalent *Streptomyces* phage to disinfest *Streptomyces scabies* infected seed potatoes». *Plant Pathology*, 50 (6), p. 666-675.
- MCNEIL, D. L.; ROMERO, S.; KANDULA, J.; STARK, C.; STEWART, A.; LARSEN, S. (2001). «Bacteriophages: A potential biocontrol agent against walnut blight (*Xanthomonas campestris* pv. *juglandis*)». *New Zealand Plant Protection*, 54, p. 220-224.
- MOELLING, K.; BROECKER, F.; WILLY, C. (2018). «A wake-up call: We need phage therapy now». *Viruses* [en línia], 10 (12), p. 1-14. <<https://doi.org/10.3390/v10120688>>.

- MOORE, E. S. (1926). «D'Herelle's bacteriophage in relation to plant parasites». *South African Journal of Science*, 23, p. 306.
- MUNSCH, P.; OLIVIER, J. M. (1995). «Biocontrol of bacterial blotch of the cultivated mushroom with lytic phages: Some practical considerations». A: ELLIOTT, T. J. (ed.). *Science and cultivation of edible fungi, Proceedings of the 14th International Congress*. Rotterdam, Països Baixos: A. A. Balkema, vol. II, p. 595-602.
- NAANWAAB, C.; YEBOAH, O.-A.; OFORI KYEI, F.; SULAKVELIDZE, A.; GOKTEPE, I. (2014). «Evaluation of consumers' perception and willingness to pay for bacteriophage treated fresh produce». *Bacteriophage* [en línia], 4 (4), p. e979662. <<https://doi.org/10.4161/21597081.2014.979662>>.
- NEWELL, D. G.; ELVERS, K. T.; DOPFER, D.; HANSSON, I.; JONES, P.; JAMES, S.; GITTINS, J.; STERN, N. J.; DAVIES, R.; CONNERTON, I.; PEARSON, D.; SALVAT, G. S.; ALLEN, V. M. (2011). «Biosecurity-based interventions and strategies to reduce *Campylobacter* spp. on poultry farms». *Applied and Environmental Microbiology* [en línia], 77 (24), p. 8605-8614. <<https://doi.org/10.1128/AEM.01090-10>>.
- PRADA-PENARANDA, C.; HOLGUÍN-MORENO, A. V.; GONZÁLEZ-BARRIOS, A. F.; VIVES-FLÓREZ, M. J. (2015). «Fagoterapia, alternativa para el control de las infecciones bacterianas. Perspectivas en Colombia». *Universitas Scientiarum* [en línia], 20 (1), p. 43-59. <doi: 10.11144/Javeriana.SC20-1.faci>.
- RAVENSDALE, M.; BLOM, T. J.; GRACIA-GARZA, J. A.; SVIRCEV, A. M.; SMITH, R. J. (2007). «Bacteriophages and the control of *Erwinia carotovora* subsp. *carotovora*». *Canadian Phytopathological Society*, 29, p. 121-130.
- SAEZ, A. C.; ZHANG, J.; ROSTAGNO, M. H.; EBNER, P. D. (2011). «Direct feeding of microencapsulated bacteriophages to reduce *Salmonella* colonization in pigs». *Foodborne Pathogens and Disease* [en línia], 8 (12), p. 1269-1274. <<https://doi.org/10.1089/fpd.2011.0905>>.
- SCHNABEL, E. L.; FERNANDO, W. G. D.; MEYER, M. P.; JONES, A. I. (2010). «Bacteriophage of *Erwinia amylovora* and their potential for biocontrol». A: *Proceedings of the 8th International Workshop on Fire Phage Therapy for Plant Disease Control Current Pharmaceutical Biotechnology*, vol. 11, núm. 1.
- SEAL, B. S.; LILLEHOJ, H. S.; DONOVAN, D. M.; GAY, C. G. (2013). «Alternatives to antibiotics: A symposium on the challenges and solutions for animal production». *Animal Health Research Reviews / Conference of Research Workers in Animal Diseases* [en línia], 14 (1), p. 78-87. <<https://doi.org/10.1017/S1466252313000030>>.
- SEVILLA-NAVARRO, S.; MARÍN, C.; CORTÉS, V.; GARCÍA, C.; VEGA, S.; CATALÁ-GREGORI, P. (2018). «Autophage as a control measure for *Salmonella* in laying hens». *Poultry Science* [en línia], 97 (12), p. 4367-4373. <<https://doi.org/10.3382/ps/pey294>>.
- SILLANKORVA, S. M.; OLIVEIRA, H.; AZEREDO, J. (2012). «Bacteriophages and their role in

- food safety». *International Journal of Microbiology* [en línia], 2012. <<https://doi.org/10.1155/2012/863945>>.
- SVIRCEV, A. M.; LEHMAN, S. M.; KIM, W. S.; BARSZCZ, E.; SCHNEIDER, K. E.; CASTLE, A. J. (2005). «Control of the fire blight pathogen with bacteriophages». A: ZELLER, W.; ULLRICH, C. (ed.). *Proceedings of the 1st International Symposium on Biological Control of Bacterial Plant Diseases*. Berlín: Die Deutsche Bibliothek - CIPEinheitsaufnahme, p. 259-261.
- TANAKA, H.; NEGISHI, H.; MAEDA, H. (1990). «Control of tobacco bacterial wilt by an avirulent strain OF *Pseudomonas solanacearum* M4S and its bacteriophage». *Annals of the Phytopathological Society of Japan*, 56, p. 243-246.
- TANG, Z.; HUANG, X.; BAXI, S.; CHAMBERS, J. R.; SABOUR, P. M.; WANG, Q. (2013). «Whey protein improves survival and release characteristics of bacteriophage Felix O1 encapsulated in alginate microspheres». *Food Research International* [en línia], 52 (2), p. 460-466. <<https://doi.org/10.1016/j.foodres.2012.12.037>>.
- THIEL, K. (2004). «Old dogma, new tricks - 21st Century phage therapy». *Nature Biotechnology* [en línia], 22 (1), p. 31-36. <<https://doi.org/10.1038/nbt0104-31>>.
- THOMAS, R. C. (1935). «A bacteriophage in relation to Stewart's disease of corn». *Phytopathology*, 25, p. 371-372.
- VERBEKEN, G.; PIRNAY, J. P.; LAVIGNE, R.; JENNES, S.; VOS, D. de; CASTEELS, M.; HUYS, I. (2014). «Call for a dedicated European legal framework for bacteriophage therapy». *Archivum Immunologiae et Therapiae Experimentalis* [en línia], 62 (2), p. 117-129. <<https://doi.org/10.1007/s00005-014-0269-y>>.
- VIDAVER, A. K. (1976). «Prospects for control of phytopathogenic bacteria by bacteriophage and bacteriocins». *Ann. Rev. Phytopathol.*, 14, p. 451-465.
- WAGENAAR, J. A.; BERGEN, M. A. P. V.; MUELLER, M. A.; WASSENAAR, T. M.; CARLTON, R. M. (2005). «Phage therapy reduces *Campylobacter jejuni* colonization in broilers». *Veterinary Microbiology* [en línia], 109 (3-4), p. 275-283. <<https://doi.org/10.1016/j.vetmic.2005.06.002>>.
- WANG, W.; NOTEN, N. van; DEGROOTE, J.; ROMEO, A.; VERMEIR, P.; MICHIELS, J. (2019). «Effect of zinc oxide sources and dosages on gut microbiota and integrity of weaned piglets». *Journal of Animal Physiology and Animal Nutrition* [en línia], 103 (1), p. 231-241. <<https://doi.org/10.1111/jpn.12999>>.
- WARNER, C. M.; BARKER, N.; LEE, S. W.; PERKINS, E. J. (2014). «M13 bacteriophage production for large-scale applications». *Bioprocess and Biosystems Engineering* [en línia], 37 (10), p. 2067-2072. <<https://doi.org/10.1007/s00449-014-1184-7>>.
- WERNICKI, A.; NOWACZEK, A.; URBAN-CHMIEL, R. (2017). «Bacteriophage therapy to combat bacterial infections in poultry». *Virology Journal* [en línia], 14 (1), p. 1-13. <<https://doi.org/10.1186/s12985-017-0849-7>>.

- WONG, C. L.; SIEO, C. C.; TAN, W. S.; ABDULLAH, N.; HAIR-BEJO, M.; ABU, J.; HO, Y. W. (2014). «Evaluation of a lytic bacteriophage, Φ st1, for biocontrol of *Salmonella* enterica serovar Typhimurium in chickens». *International Journal of Food Microbiology* [en línia], vol. 172, p. 92-101. <<https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2013.11.034>>.
- YAN, L.; HONG, S. M.; KIM, I. H. (2012). «Effect of bacteriophage supplementation on the growth performance, nutrient digestibility, blood characteristics, and fecal microbial shedding in growing pigs». *Asian-Australasian Journal of Animal Sciences* [en línia], 25 (10), p. 1451-1456. <<https://doi.org/10.5713/ajas.2012.12253>>.
- ŻBIKOWSKA, K.; MICHALCZUK, M.; DOLKA, B. (2020). «The use of bacteriophages in the poultry industry». *Animals* [en línia], 10 (5). <<https://doi.org/10.3390/ani10050872>>.