

APLICACIÓN DE BACTERIÓFAGOS EN ALIMENTOS

Rodrigo Hernández-Santiago¹; Zacarías Jiménez-Salas¹; Reyes Pla-Soler²

¹Facultad de Salud Pública y Nutrición, Universidad Autónoma de Nuevo León, (Monterrey, N.L., México); ²Facultat de Veterinària, Universitat Autònoma de Barcelona, (Barcelona, España).

E-mail: rodrigo.hernandezsn@uanl.edu.mx



Introducción

Las enfermedades transmitidas por alimentos (ETA's) son aquellas de carácter infeccioso o tóxico causadas principalmente al consumirse alimentos o bebidas contaminados; la Organización Mundial de la Salud estima que dos millones de personas mueren a causa de enfermedades diarreicas cada año. En 2004, las enfermedades diarreicas fueron la tercera mayor causa de muerte en países de ingresos bajos, donde ocasionaron el 6,9% de los fallecimientos. Son la segunda mayor causa de muerte de niños menores de cinco años, después de la neumonía. La mayoría de las personas que fallecen por enfermedades diarreicas, mueren por una grave deshidratación y pérdida de líquidos (1, 2).

Los datos del Centro Nacional de Vigilancia Epidemiológica y de Control de Enfermedades (CENAVECE) indican que en la República Mexicana, entre los problemas de salud más importantes se encuentran los padecimientos gastrointestinales; a nivel nacional las enfermedades infecciosas intestinales se ubican dentro de las primeras 10 causas de mortalidad de niños en edad escolar, en el caso del estado de Nuevo León, éste ha permanecido desde hace 5 años entre los primeros 12 lugares con casos de fiebre tifoidea y en los primeros 20, con casos de fiebre paratifoidea y otras salmonelosis (3). Se define como diarrea a la deposición por tres o más veces al día (o con una frecuencia mayor que la normal para la persona) de heces sueltas o líquidas, suele ser un síntoma de una infección del tracto digestivo, que puede estar ocasionada en su mayoría por diferentes microorganismos como son, bacterias (*Bacillus cereus*, *Salmonella sp*, *Clostridium botulinum*, *Vibrio cholera*), virus (Norwalk, Rotavirus, Hepatitis A) y parásitos (*Entamoeba histolytica*, *Cryptosporidium parvum*, *Toxoplasma gondii*) que entran al organismo a través del tracto gastrointestinal. La infección se transmite por alimentos o agua de consumo contaminados, o bien de una persona a otra como resultado de una higiene deficiente (4, 5, 6).

En las últimas décadas, se han identificado nuevos patógenos importantes que se transmiten a través de los alimentos de los cuales se destacan *Escherichia coli* O157:H7, *Campylobacter jejuni*, *Enterobacter sakazakii* y *Listeria monocytogenes* (7). Así, también se han identificado nuevos métodos de propagación de estos patógenos, los cambios en las poblaciones, en los estilos de vida de los consumidores y en las preferencias alimentarias han producido cambios en la formulación, manufactura y distribución de los mismos teniendo un impacto sobre la inocuidad de los alimentos. La industria alimentaria ha evolucionado de ser local a aquella en donde la producción y el procesamiento están ubicados en diferentes partes del país y del mundo, estos cambios, aunados a la habilidad que tienen los microorganismos para evolucionar rápidamente y adaptarse a su medio ambiente, presentan nuevos retos microbiológicos a la industria alimentaria (8).

Virus

Los virus son pequeñas partículas infecciosas, normalmente entre 20-200 nm, consisten en un núcleo de ácido nucleico (de cadena simple o doble, de ARN o ADN) rodeado por una cubierta proteica (cápside) y en algunos casos, una cubierta de lípidos (9); existen en una gran variedad de formas que infectan a prácticamente todas las criaturas vivientes: animales, plantas, insectos y bacterias (10,11); los virus que afectan a estas últimas son conocidos también como bacteriófagos o fagos y se consideran las entidades más abundantes de la biosfera, el número total estimado es de 10^{30} a 10^{32} y en ambientes acuáticos se encuentran desde 10^4 mL⁻¹ hasta 10^8 mL⁻¹ (12). A pesar de que los fagos son virus simples a nivel estructural y genético, han resultado muy útiles para el estudio de varios fenómenos moleculares; los conocimientos alcanzados en las investigaciones realizadas con fagos constituyeron la base del desarrollo de la biología molecular y el número de la progenie liberada puede llegar hasta 200 nuevas partículas fágicas por bacterias lisadas (13, 14, 15).

El hecho de descubrir virus que pueden infectar y destruir bacterias fue recibido con optimismo para usos terapéuticos (16). Los fagos son de naturaleza diversa, dentro de sus características se pueden mencionar que éstos pueden ser más resistentes que su bacteria huésped a variaciones en el medio ambiente, son parásitos obligados intracelulares, no tienen metabolismo intrínseco y requieren la maquinaria metabólica de su célula huésped para soportar su reproducción (17), y puede subsistir en ausencia de su huésped. Los fagos más abundantes en la naturaleza pertenecen a los caudovirales que representan el 95% de todos los fagos reportados (18, 19, 20).

Interacción fago-bacteria

Los fagos tienen diferentes formas de actuar y en algunos casos se puede observar que las bacterias desarrollan distintos mecanismos de resistencia a la infección, lo cual es complicado de explicar ya que están actuando los dos microorganismos y no se sabe a ciencia cierta cuál de los dos es el que está desarrollando la resistencia por un lado y la actividad lisogénica por el otro. Los sistemas más ampliamente estudiados son aquellos de las bacterias ácido lácticas, principalmente *Lactococcus*, dada su importancia en la industria alimenticia. Sobre la base del punto de acción del sistema de resistencia en el ciclo lítico del fago, se han descrito cuatro grupos de mecanismos: interferencia adsorción del fagos, prevención de la inyección del DNA del fago, restricción /modificación e infección abortiva (Abi) (21).

Si se sigue el ciclo infectivo de un fago lítico en el tiempo midiendo la cantidad de partículas virales como unidades formadoras de placa (UFP/mL), se puede observar que después de la etapa de adsorción del fago a la superficie de la bacteria, existe una etapa en que no se detecta acumulación de partículas virales al interior de ésta, esta etapa se conoce como "eclipse" y se caracteriza por una activa síntesis de ácidos nucleicos, en esta etapa son imprescindibles las proteínas codificadas por genes tempranos del fago (22).

Los mecanismos por los que se rige el proceso de fagotipia son conocidos desde hace años, en esencia, comprende cuatro etapas que suelen repetirse en la mayor parte de los casos y que inician con la infección de la bacteria por el fago y culminan con la destrucción de las bacterias que actúan como hospedadoras. Previamente, se da la destrucción de los fagos inservibles y la amplificación de los que resultan útiles para el proceso en el interior de las bacterias (23, 24). El proceso de infección podría facilitar nuevas estrategias terapéuticas para enfermedades víricas y bacterianas, esta especificidad virulenta de los fagos ofrece perspectivas biológicas, como instrumento para identificar cepas bacterianas específicas (25, 26), así como el biocontrol o preservación de alimento (27).

Diferentes usos de fagos en el sector alimentario

La inocuidad alimentaria y del agua son una preocupación mundial y es fácil ver los efectos devastadores de la contaminación de alimentos en las noticias del mercado de casi todas las regiones, está en juego el mercado mundial ya que son cientos de millones de dólares en productos alimenticios que se están retirando y descartando debido a la contaminación, la infección humana, la enfermedad y la muerte (28).

La lucha contra los microorganismos patógenos mediante el uso de fagos se propuso poco después del descubrimiento de éstos, aproximadamente hace 90 años. Lamentablemente, con el descubrimiento de los antibióticos se redujo la investigación sobre la terapia por fagos. Hoy en día, el problema cada vez mayor es la resistencia de antibióticos por parte de las bacterias (en este caso patógenas) reavivando así el interés en la terapia de fagos, y relativamente en poco tiempo el concepto fue ampliado a la esfera de la inocuidad alimentaria (29).

En 2004 se reportó un estudio realizado en diversos estados de México (Coahuila, Durango, Estado de México, Jalisco, Morelos, Oaxaca, Puebla y Querétaro) donde se fagotipificó *Salmonella* sp proveniente de carne de pollo de engorda, gallinas progenitoras, reproductoras, de postura comercial, productoras y huevo (30).

Entre los avances en el uso de fagos se puede mencionar el desarrollo de nuevos fagos con potencial lítico específicos contra bacterias patógenas que se requiere como agente para la descontaminación de productos alimenticios y la sanitización del ambiente de fabricación, esto se puede lograr cuando se obtiene una cantidad efectiva de al menos un fago o en forma de coctel (31).

Una característica de los fagos que se ha aprovechado son las enzimas de polimerasa de polisacárido que se segrega durante la inserción del fago-bacteria. Las enzimas degradan la cápsula bacteriana y permite que los

fagos se unan a los receptores de la membrana externa (32). Esta característica ha atraído el interés por su aplicación para el control de la formación de biofilm, añadiendo fagos a las superficies de trabajo en las que se manipulan alimentos, es un campo emergente conocido como biología sintética que pretende diseñar y construir sistemas biomoleculares utilizando fagos contra microorganismos patógenos (33, 34), de la misma forma, en algunos alimentos se podría eliminar un patógeno por simple competencia. La gran ventaja de un sistema de estas características viene dado por la alta especificidad de los fagos hacia bacterias específicas (35).

Las recientes investigaciones donde se han utilizando fagos se centran en el tratamiento de variedades entéricas de *Salmonella* y de infecciones respiratorias en ganado y aves de corral, además, algunas publicaciones recientes han demostrado la incursión de bacteriófagos que se utilizan en productos alimenticios (36, 37, 38). Se ha utilizado bacteriófagos en forma de coctel que podían reducir la incidencia de *Salmonella* en productos a base de carne de pollos (canal y piel) (39), en semillas germinadas, dulce de frutas cortadas (40) y pavos procesados, por ejemplo, en la piel de pollo la reducción de *Salmonella* se debió al incremento en el número de fagos por agente patógeno utilizando una multiplicidad de infección (MI) de 100 a 1000 (41, 42, 43 44), esta terapia fágica también se ha utilizado para curar enfermedades infecciosas como en el caso de aves infectadas evitando la colonización de *Salmonella*, así como su utilización en el tratamiento de aguas residuales (45, 46, 47).

Recientemente, los fagos se han empleado para combatir microorganismos de importancia en alimentos como *Listeria monocytogenes* y *Enterobacter sakazakii* (48, 49), así como también se analizan las bacterias patógenas resistentes a diferentes antibióticos y no solamente al ámbito alimenticio, incluyendo pero no limitado, a los productos alimenticios donde se incluyen las zonas donde hay preparación de productos alimenticios, los implantes quirúrgicos, metálico, plástico, azulejos, porcelana, o superficies de vidrio, dispositivos médicos y los instrumentos, y la piel. Estos métodos se utilizan también contra las bacterias patógenas, en particular resistentes a múltiples medicamentos, por ejemplo, son adecuados para luchar contra las cepas de *Staphylococcus* tales como *Staphylococcus aureus* y *epidermidis* (50).

La terapia fágica se ha utilizado en el pasado para tratar enfermedades infecciosas, esto especialmente en Europa Oriental donde se han conseguido grandes avances, como la aplicación en el tratamiento de aguas residuales (bioremediación) (51). En la terapia fágica, las preparaciones estarán basadas con diferentes concentraciones llamadas multiplicidad de infección que es el cociente entre las bacterias muertas contra las bacterias vivas después del tratamiento; los fagos se pueden utilizar en combinación con otros agentes antibacterianos, complementándose a los antibióticos, para esto se han preparado los concentrados de fagos que deben reproducir en medios apropiados para las bacterias huésped específica (52, 53).

Los productos comerciales para terapia fágica se distribuyen en diferentes presentaciones. Los fagos se pueden distribuir liofilizados y se disuelven antes de la administración por vía intravenosa en un soporte adecuado como por ejemplo una solución acuosa o tampón o suspenderse en cualquier líquido adecuado, coloidal, o de la matriz de polímeros para crear bactericidas; el principio activo se puede administrar de una manera conveniente, como por inyección (subcutánea, intravenosa, administración, etc.) por vía oral, pulmonar (por ejemplo, aerosoles o por otros dispositivos a los pulmones), spray nasal, intramuscular, intraperitoneal intrahecal, intravítrea, vaginal, rectal, la punción lumbar, y la aplicación directa. Dependiendo de la vía de administración, el principio activo puede estar recubierto de un material que preserve la sustancia de la acción de enzimas, ácidos y otras condiciones naturales que pueden inactivar la sustancia (por ejemplo, comprimidos recubiertos entéricos o pastillas) (54).

Además existe la posibilidad de incorporar los fagos en forma de aerosol específicamente aprobados para ser administrados en aerosol a los pulmones por inhalación. Los tipos y concentraciones de los propulsores en el dispositivo se deben de ajustar en función del tipo de los fagos. También en forma de pomadas o recubrimientos para usos medicinales, tales como el tratamiento de infecciones, apósito o implantes quirúrgicos, y como desinfectante de amplio espectro para la piel o enjuagues bucales, batas desinfectante, también se puede utilizar para la limpieza de instrumentos médicos, en pre-operatorio batas quirúrgicas, etc. (55)

En los últimos años, las empresas dedicadas a la biotecnología comenzaron a desarrollar productos utilizando fagos específicos para eliminar las bacterias que causan ETA's; en primer lugar, en septiembre de 2006, la Administración de drogas y alimentos de los Estados Unidos de Norteamérica (FDA), incluye a los fagos en la categoría de "aditivos alimentarios", para reducir la presencia de la bacteria *Listeria monocytogenes*; la empresa Intralytix, Inc. sostiene que su "coctel" de seis diferentes fagos reduce la probabilidad del desarrollo de estas bacterias patógenas y el Departamento de Agricultura (USDA) aprobó posteriormente un producto a base de

fagos de la compañía OmniLytics Company diseñado para ser rociado con la finalidad de reducir la presencia de *E. coli*(56).

Un producto llamado AGRIPHAGE se aplica actualmente a una amplia gama de cultivos para combatir bacterias específicas con notable éxito; el tratamiento de las plantas desde la fase de semilla hasta su desarrollo da como resultado una gran variedad de cultivos importantes en el área agroindustrial, que van desde tomates, pimientos, lechuga, repollo, y melones, a cultivos tales como fresas, manzanas, peras, e incluso cítricos y plantas ornamentales. Esta tecnología hace posible el tratamiento de prácticamente todos los tipos de cultivos agrícolas, en cada región geográfica y diversidad de climas. Las expectativas de ventas de este tipo de productos elaborados a partir de la utilización de la biotecnología agrícola en los E.U. de \$ 2,9 millones en 2006 y seguirá aumentando un 6,3 por ciento por año. La empresa OmniLytics ha tenido una posición importante en este mercado dada la experiencia y tecnología que la han distinguido como una empresa mundial en la fabricación de soluciones de fagos en el campo agrícola (57).

Conclusiones

Por lo descrito anteriormente, se puede apreciar el amplio potencial del uso de fagos en diferentes campos. En la biotecnología, los bacteriófagos se pueden emplear como indicadores de contaminación fecal en agua y suelos así como en la fagotipificación o identificación de bacterias; recientemente se utilizan como biocontrol en alimentos, aplicándose a una diversidad de productos frescos, fruta, carnes diversas y jugos; también se utilizan en el tratamiento de aguas residuales (bio-remediación); los fagos virulentos se pueden utilizar como agentes de control biológico contra microorganismos patógenos en seres humanos, animales y plantas, llegándose inclusive a pensar muy recientemente en retomar el tema de la fagoterapia aplicada a los seres humanos.

Resumen

El riesgo para adquirir una enfermedad de transmisión alimenticia (ETA) se presenta cuando los alimentos son alterados y contaminados por bacterias patógenas; tal evento ocurre por contaminación cruzada a través de la materia prima, el proceso o el trabajador. La lucha contra microorganismos patógenos mediante el uso de bacteriófagos se propuso hace casi 100 años, sin embargo, sólo hasta años recientes recibe la importancia adecuada debido al surgimiento de bacterias resistentes a antibióticos. En la actualidad, diversas compañías biotecnológicas se dedican a la manufactura de productos a base de fagos para combatir las ETA's. Este campo de investigación y desarrollo tiene un gran potencial en las áreas del biocontrol de alimentos y en la fagoterapia en humanos.

Palabras clave: bacteriófagos, fagoterapia, biocontrol de alimentos

Abstract

The risk of getting a foodborne disease (FBD) occurs when food is altered and contaminated by pathogenic bacteria; such cross-contamination event occurs through the raw materials, process, or the worker. The fight against pathogenic microorganisms through the use of bacteriophages was proposed nearly 100 years ago, however, only until recent years receives proper consideration because of the emergence of bacteria resistant to antibiotics. Currently, several biotech companies engaged in the manufacture of phage-based products to combat FBD. This field of research and development has a great potential in the areas of food biocontrol and phagotherapy in humans.

Keywords: bacteriophages, phagotherapy, food biocontrol

Referencias

1. CDC 2005. Food borne illness. Center for disease control and prevention. Safer healthier people. Disponible en [Surveillance for Food borne Disease Outbreaks \(http://www.cdc.gov/eppo/mmwr/preview/mmwrhtml/ss4901a1.htm\)](http://www.cdc.gov/eppo/mmwr/preview/mmwrhtml/ss4901a1.htm), Preliminary Food Net Data on the Incidence of Food borne Illnesses

2. Organización Mundial de la Salud. 2009. Enfermedades diarreicas. Nota descriptiva N°330, Agosto de 2009. Disponible en <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs330/es/>

3. Secretaria de Salud. Centro Nacional de Vigilancia Epidemiológica y de Control de Enfermedades (CENAVENCE) 2009. Boletín Semanal. Anuales Históricos 2001 - 2009. y semana 40 de 2009. Disponible en: <http://www.dgepi.salud.gob.mx/boletin/boletin.htm>
4. Marcus R, F. Rabatsky-Ehr, J. Mohle-Boetani, M. Farley, C. Medus, B. Shiferaw, M. Carter, S. Zansky, S. Kennedy, T. Van Gilder y J. L. Hadler. 2004. Dramatic decrease in the Incidence of *Salmonella* serotype Enteritidis Infections in 5 food net sites: 1996–1999. Centers for Disease Control and Prevention's National Center for Infectious Diseases. 38(3):135–141.
5. Brooks GF, JN Butel, NL Ornston, E. Jawetz J. Melnick y E. Adelberg 1992. Microbiología Médica. Ed. El Manual Moderno. S.A. de C.V. México D.F.
6. Fernández. E. 2008. Microbiología e inocuidad de los alimentos. Universidad Autónoma de Querétaro. 2ª edición. México. Cap. 14: 250-294.
7. Greenberg, AE, LS Clesceri y AD Eaton. 1992. Standard methods for the examination of water and wastewater. 18 th Edición. ISBN 0-87553-207-1
8. DeWaal, CS y K. Barlow 2004. Outbreak alert! Closing the gaps in our federal food safety net. Center for Science in the Public Interest (CSPI). Disponible en www.cspinet.org/new/pdf/outbreakalert2004.pdf
9. Bamford, D. H., y L. Mindich. (1984). Characterization of the DNA-protein complex at the termini of the bacteriophage PRD1 genome. *J. Virol.* 50:309-315.
10. Withey, S. E. Cartmell, L. M. Avery y T. Stephenson. 2005. Bacteriophages – potential for application in wastewater treatment processes. *Science of the Total Environment.* 339: 1-18.
11. Orlova, E. 2009. How viruses infect bacteria? *The EMBO Journal.* 28:797–798.
12. McLaughlin, M. R., M. F. Balaa, J. Sims y R. King. 2006. Isolation of *Salmonella* bacteriophages from swine effluent lagoons. *J. of Environmental Quality.* 35 (2):522-528.
13. Santiago, N. 2004. Los bacteriófagos en la biología molecular pasada y actual en Revolución combinatoria. Fernández, J. R. Puchades y Vispo N. S. *Elfos Scientiae.* Cuba. pp: 41-55
14. Withey, *et al.* 2005. *Op. cit.*
15. Orlova, E. 2009. *Op. cit.*
16. Cerril, C., B. Biswas, R. Carlton, N. Jensen, J. Creed, S. Zullo y S. Adhya. 1996. Long-circulating bacteriophage as antibacterial agents. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA,* Vol. 93:3188–3192
17. Madigan, M., J. Martinko, J. Parker y Brock. 2006. Biología de los microorganismos. 10ª Edición. Editorial Pearson Prentice Hall. Capítulo 9. Pp. 231-260.
18. ISO 1995. Calidad del agua. Detección y recuento de bacteriófagos. Recuento de bacteriófagos. Parte 1: Enumeración de los bacteriófagos F-específicos del RNA Código PNE-EN ISO 10705-1.
19. Orlova, E. 2009. *Op. cit.*
20. Ackermann H-W. 2006. Classification of bacteriophages. En: *The Bacteriophages, Calendar R* (ed) 2nd ed, pp 8–16. New York, NY: Oxford University Press.
21. Coffey A. y R. P. Ross. 2002. Bacteriophage-resistance systems in dairy starter strains: molecular analysis to application. *Antonie Van Leeuwenhoek.* 82 (1-4):303-321.

22. Dinsmore P.K., y T. R. Klaenhammer. 1995. Bacteriophage resistance in *Lactococcus*. *Mol. Biotechnol.* 4 (3):297-314.
23. Breeuwer, P., C. Boissin-Delaporte, H. Joosten y A. Lardeau. 2003. Isolated phages and their use as disinfectant in food or for sanitation factory environment. Patente Europea EP 1533 369 A1.
24. Sulakvelize, A., M. Glenn, Z. Alavidze, G. Pasternack y T. Brown. 2004. Method and device for sanitizations using bacteriophages. United Status Patente US 6699701B1.
25. Welkos, S., M. Schreiber y H. Baer. 1974. Identification of *Salmonella* with the O-1 bacteriophage. *Appl Microbiol.* 28:618-622.
26. Muniesa, M., A. Blanch, F. Lucena y J. Jofre. 2005. Bacteriophages may bias outcome of bacterial enrichment cultures. *Appl Environ Microbiol* 71 (8):4269–4275.
27. McLaughlin, *et al.* 2006. *Op. cit.*
28. Atterbury, R., P. Connerton, C. H. Dodd, C. Rees y I. Connerton. 2003. Application of host-specific bacteriophages to the surface of chicken skin leads to a reduction in recovery of *Campylobacter jejuni*. *Appl Environ Microbiol* 69 (10): 6302–6306.
29. Hagens, S. y M.J. Loessner. 2007. Application of bacteriophages for detection and control of foodborne pathogens. *Appl. Microbiol Biotechnol.* 76 (3):513-519.
30. Mancera, A., J.Vázquez, y A. Heneidi, 2004. Fagotipificación de aislamientos de *Salmonella enteritidis* obtenidos de aves en México, Técnica Pecuaria en México. Instituto Nacional de Investigaciones Forestales, Agrícolas y Pecuarias, México. 42(2):287-294.
31. Breeuwer, P., C. Boissin-Delaporte, H. Joosten y A. Lardeau. 2003. Isolated phages and their use as disinfectant in food or for sanitation factory environment. Patente Europea EP 1533 369 A1.
32. Hughes K. A., I. W. Sutherland y M. V. Jones. 1998. Biofilm susceptibility to bacteriophage attack: the role of phage-borne polysaccharide depolymerase. *Microbiology* (144): 3039-3047.
33. Withey, *et al.* 2005. *Op. cit.*
34. Dougherty, E. 2007. Team builds viruses to combat harmful 'biofilm' A big step forward for synthetic biology. Massachusetts institute of technology. Disponible en <http://web.mit.edu/newsoffice/2007/biofilm-0706.html>
35. Breeuwer, *et al.* 2003. *Op cit.*
36. Greer, G. 2005. Bacteriophages control of foodborne bacteria. *Journal of Food Protection* 68(5):1102-1111.
37. Nelly, M., Mcgeer, A., Willey, B. M. 2002. Antibacterial therapy for multi-drug resistant bacteria. Patente US2002/0001590.
38. Bielke, L. R., Higgins, S. E., Donoghue, A. M., Donoghue, D. J., Hargis, B. M. y Tellez, G. 2007. Use of wide-host-range bacteriophages to reduce *Salmonella* on poultry products. *International Journal of Poultry Science.* 6 (10): 754-757.
39. Goode, D., V. M. Allen, A. Barrow. 2003. Reduction of experimental *Salmonella* and *Campylobacter* contamination of chicken skin by application of lytic bacteriophages. *Appl Environm Microbiol.* 69 (8):5032–5036.

40. Higgins, J. P., S. E Higgins, K. L Guenther, W. Huff, A. M. Donoghue, D. J. Donoghue y B. M. Hargis, 2005. Use of a specific bacteriophage treatment to reduce *Salmonella* in poultry products. *Poultry Science*, 84(7):1141-1145
41. Atterbury, *et al.* 2003. *Op. cit.*
42. Strauch, E., J. A. Hammerl, y S. Hertwig, 2007. Bacteriophages: New tools for safer food?. *Journal of Consumer Protection and Food Safety*. 2:138–143
43. Wagner, *et al* 2002. *Op. cit.*
44. McLaughlin, *et al* 2006. *Op. cit.*
45. McLaughlin, M. R. y J. Brooks. 2008. EPA worst case water microcosms for testing phage biocontrol of *Salmonella*. USDA-ARS. *J. of Environmental Quality*. 37:266–271
46. Borie, C., I. Albala, P. Sanchez, M. L. Sanchez, S. Ramirez, C. Navarro, M. A. Morales, J. Retmales y J. Roberson. 2008. Bacteriophage treatment reduces *Salmonella* colonization of infected chicken. *Avian diseases*. 52:64-67.
47. Sulakvelidze, A., S. Sozhamamnan, y G. Pasterneck, 2008. Novel *Salmonella* bacteriophage and uses thereof. Patente de Estados Unidos US20080118468A1.
48. Rodríguez Jerez, J.J. 2006. Virus como aditivos, alimentarios. Disponible en: <http://www.consumaseguridad.com/web/es/investigacion/2006/10/04/25221.php>
49. FDA 2007. Extends GRAS Approval Listex to All Food Products. Disponible en: <http://www.bio-medicine.org/medicine-news/FDA-Extends-GRAS-Approval-Listex-to-All-Food-Products-23867-1/>
50. Nelly, *et al.* 2002. *Op.cit.*
51. McLaughlin y Brooks. 2008. *Op. cit.*
52. Hagens y Loessner. 2007. *Op. cit.*
53. Nelly, *et al.* 2002. *Op.cit.*
54. Strauch, *et al.* 2007. *Op.cit.*
55. Nelly, *et al.* 2002. *Op.cit.*
56. Strauch, *et al.* 2007. *Op.cit.*
57. Nelly, *et al.* 2002. *Op.cit.*