

## **Bacteriófagos, una herramienta prometedora contra las bacterias multirresistentes.**

## **Bacteriophages, a promising tool against multi- resistant bacteria.**



TRABAJO DE FIN DE GRADO

**MANUEL MILLARES DE LA PEÑA**

Tutorizado por Eduardo Pérez Roth. Grado Biología

Julio 2020

# Índice

	Resumen .....	1
	Abstract .....	1
1.	Introducción .....	2
2.	Objetivos.....	3
3.	Metodología .....	4
4.	Resultados y discusión.....	5
4.1.	Crisis mundial de la multirresistencia bacteriana a los antibióticos. ....	5
4.2.	Biología de los bacteriófagos .....	8
4.3.	Los bacteriófagos como agentes terapéuticos .....	11
	4.3.1. Descubrimiento e historia .....	11
	4.3.2. Terapia convencional con bacteriófagos (monofágica y polifágica). ..	14
	4.3.3. Terapia combinada con bacteriófagos y antibióticos .....	14
	4.3.4. Bioingeniería con bacteriófagos .....	16
	4.3.5. Experiencia obtenida en ensayos clínicos .....	19
	4.3.6. Comparación entre terapia fágica y terapia antibiótica.....	21
5.	Conclusiones .....	24
6.	Perspectivas futuras .....	26
7.	Bibliografía .....	28

## Resumen

Las terapias con bacteriófagos se plantean como una de las alternativas más valoradas para luchar contra la multirresistencia bacteriana hacia los antibióticos. En este trabajo se desglosa la PT (terapia fágica), hacemos un recorrido histórico, analizamos los tipos de terapias así como las ventajas y desventajas de su aplicación clínica. Se han revisado investigaciones de vanguardia y ensayos clínicos. Este trabajo bibliográfico muestra que no solo la terapia fágica es posible, sino que la efectividad de la misma varía según si se aplica un solo bacteriófago (terapia monofágica) o se aplican cócteles con múltiples bacteriófagos (terapia polifágica). La terapia con bacteriófagos que ha dado los mejores resultados es aquella que se aplica conjuntamente con una terapia antibiótica regulada, de manera sinérgica. Esta estrategia no solo sería muy efectiva contra las bacterias multirresistentes que amenazan gravemente la salud pública actual, sino que evitaría el incremento en la mortalidad en un futuro provocada por la caída de la efectividad de los antibióticos. La terapia fágica puede contribuir a impedir el retorno a la “edad oscura” previa al descubrimiento del antibiótico.

**Palabras clave:** Bacteriófago, fagoterapia, terapia monofágica, terapia polifágica.

## Abstract

Bacteriophage therapies are considered as one of the most valued alternatives to fight bacterial multidrug resistance towards antibiotics. In this work, PT (phage therapy) is broken down, we take a historical tour, we analyze the types of therapies as well as the advantages and disadvantages of their clinical application. Cutting-edge research and clinical trials have been reviewed. This bibliographic work shows that phage therapy is not only possible, but that its effectiveness varies depending on whether a single bacteriophage is applied (monophage therapy) or cocktails with multiple bacteriophages (polyphage therapy) are applied. The bacteriophage therapy that has given the best results is one that is applied together with a regulated antibiotic therapy, in a synergistic way. This strategy would not only be very effective against multi-resistant bacteria that seriously threaten current public health but would prevent an increase in mortality in the future caused by the fall in the effectiveness of antibiotics. Phage therapy can help prevent a fall into the "dark ages" prior to the discovery of the antibiotic.

**Keywords:** Bacteriophage, phage therapy, monophage, polyphage

# 1. Introducción

Una amenaza esta afectando a la salud pública mundial, la aparición de las bacterias multirresistentes a los antibióticos. Estas resistencias son una cualidad propia de la adaptación evolutiva de las bacterias. La batalla contra los antibióticos en la naturaleza sucede con baja frecuencia, pero la era antibiótica en la especie humana inició un mayor contacto entre antibióticos y bacterias, generando así una aceleración de la aparición no solo de resistencias, sino de multirresistencias de forma masiva. A lo largo de las décadas, se ha desarrollado una carrera entre la humanidad y las bacterias patógenas. Esta carrera incluye el descubrimiento o creación de nuevos antibióticos contra las adaptaciones y resistencias de las bacterias. Aun con el hallazgo de nuevos antibióticos, esto solo pospuso algo que era inevitable, la aparición de cepas multirresistentes. El descubrimiento de antibióticos es cada vez mas lento y los pocos que salen pierden eficacia a mas velocidad que sus predecesores, también el mal uso de los antibióticos en todo el mundo ha acelerado en gran medida este desastre (Chanishvili, 2012, O'Neill, 2016, OMS, 2017, Andrzej Górski *et al*, 2018, Barceló, 2018).

La comunidad científica ha buscado nuevos recursos para combatir esta grave situación desde diferentes frentes: empleo de lisinas, péptidos antimicrobianos o a través de técnicas CRISPR/CAS9. Pero entre estas terapias hay una que es tan antigua como el descubrimiento de los antibióticos y lleva décadas en la sombra, la terapia con bacteriófagos, también denominada fagoterapia. (O'Neill, 2016, Ghosh, Haldar, Issa, Sarkar *et al*, 2019).

La terapia con bacteriófagos es inofensiva para seres humanos, animales y plantas, ataca única y exclusivamente a las bacterias. Al seleccionar y administrar bacteriófagos a las bacterias patógenas que se quieren eliminar, se desencadena la infección del bacteriófago a la bacteria y se multiplica en su interior hasta matarla (lisándola), liberando multitud de nuevos bacteriófagos. Los bacteriófagos seguirán infectando, multiplicándose y matando bacterias hasta que no quede ninguna al alcance. Una vez llegados a este punto, el bacteriófago entra en un estado estático, hibernando hasta que vuelve a contactar con nuevas bacterias (Madigan, Martinko, Dunlap & Clark, 2009, Briers Y *et al*, 2014, Gal Ofir & Rotem Sorek, 2018).

Los ensayos clínicos indican la posibilidad de un futuro en el que la terapia con bacteriófagos se suministre a los pacientes vía oral, intravenosa o, en casos más graves, pulverizada o administrada subcutáneamente en las zonas más afectadas del paciente. Esto incluye órganos, tejidos, torrente sanguíneo, etc. Quizá en un futuro próximo, estos cócteles sean inhalados en forma de aerosol para infecciones pulmonares o aplicados de manera cutánea para infecciones en la piel y con ello reducir drásticamente la infección (Jingmin Gu *et al*, 2012, Robert T.Schooley *et al*, 2017, Tagliaferri T.L. *et al*, 2019, Sarah Djebara *et al*, 2019, Qin Peng *et al*, 2020).

## 2. Objetivos

Este trabajo pretende presentar una visión general del estado actual en la investigación y uso de los bacteriófagos de manera terapéutica frente a las infecciones causadas por bacterias, especialmente bacterias multirresistentes a los antibióticos. Asimismo, se planteó recopilar las posibles ventajas y desventajas de la terapia fágica que se han podido constatar o se prevén y las posibles aplicaciones futuras en biotecnología. Todo ello llevando a cabo una revisión bibliográfica de artículos científicos recientes y de vanguardia.

### 3. Metodología

Para llevar a cabo la revisión bibliográfica se ha seleccionado como principal fuente de información la base de datos de acceso libre MEDLINE, utilizando como motor de búsqueda PubMed (<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/>). Las palabras clave empleadas fueron “phage therapy” y “bacteriophage”, de manera independiente y combinadas. Aquellos artículos que indicaran tanto en el título como el resumen recopilaciones generales de los bacteriófagos fueron los seleccionados, se descartaron los ensayos experimentales específicos. Un artículo fue la excepción el cual contenía un ensayo clínico con un paciente. Del término “phage therapy” se obtuvieron 4060 resultados y de “bacteriophage” 70877 resultados. Y se han consultado artículos publicados entre 2010 y 2020, la única excepción son las fuentes bibliográficas donde fueron recopilados datos históricos y datos biológicos. Se han escogido prioritariamente artículos de libre acceso o con convenio de acceso con la ULL.

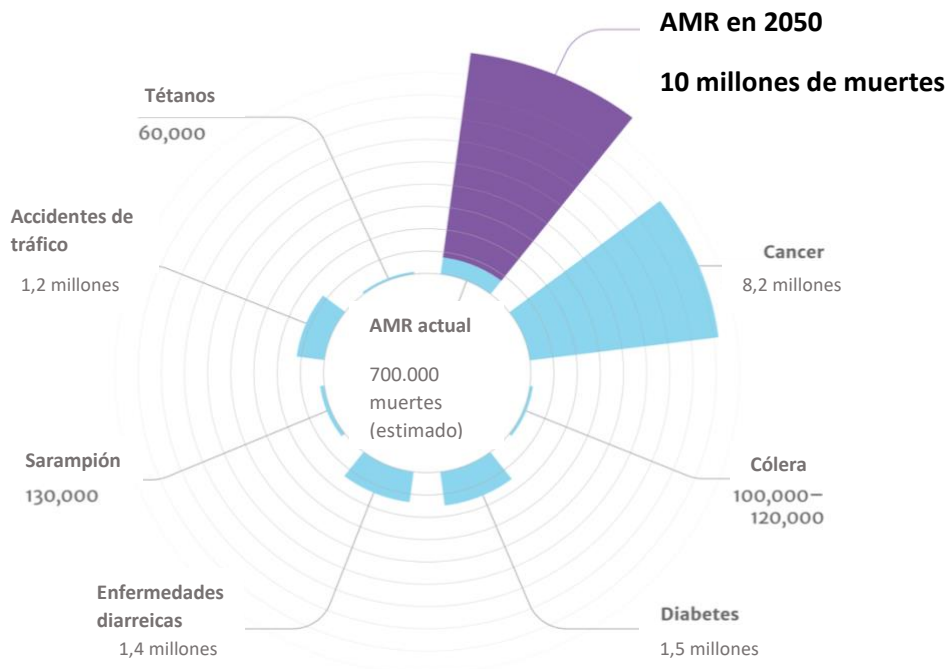
## 4. Resultados y discusión

A lo largo del proceso de investigación bibliográfica se seleccionaron 26 artículos, sin contar libros o artículos de origen externo a [PubMed](#).

### 4.1. Crisis mundial de la multirresistencia bacteriana a los antibióticos.

En la actualidad, casi 700.000 pacientes mueren cada año en todo el mundo debido a la resistencia antimicrobiana (AMR, del inglés *Antimicrobial Resistance*) y este número va en aumento. Se estima que esta cifra llegue a los 10 millones en 2050 (O'Neill, 2016). La crisis humanitaria tendría unas proporciones colosales. Esta lucha contra la AMR es constante y es continua la búsqueda de nuevos antibióticos. Teniendo en cuenta estos dos hechos, parece que la era de los antibióticos se encuentra en declive. Sin duda los antibióticos nos han dado una época dorada a lo largo de más de 70 años, pero lamentablemente la increíble capacidad de mutación y transferencia horizontal de resistencias en las bacterias nos fuerza a buscar también posibles nuevas vías (Ghosh, Haldar, Issa, Sarkar *et al* 2019).

## Muertes provocadas por AMR cada año



**Figura 1.** Pronóstico de las principales causas de muerte desde el presente hasta el año 2050. Imagen obtenida y modificada de O'Neill (2016)

Actualmente los patógenos que causan mayores problemas en salud pública por la multirresistencia son los siguientes (OMS, 2017):

#### **Prioridad 1: Crítica**

- *Acinetobacter baumannii*, resistente a los carbapenémicos
- *Pseudomonas aeruginosa*, resistente a los carbapenémicos
- *Enterobacteriaceae*, resistentes a los carbapenémicos, productoras de ESBL (beta-lactamasas de espectro extendido)

#### **Prioridad 2: Elevada**

- *Enterococcus faecium*, resistente a la vancomicina
- *Staphylococcus aureus*, resistente a la meticilina, con sensibilidad intermedia y resistencia a la vancomicina
- *Helicobacter pylori*, resistente a la claritromicina
- *Campylobacter spp.*, resistente a las fluoroquinolonas
- *Salmonellae*, resistente a las fluoroquinolonas
- *Neisseria gonorrhoeae*, resistente a la cefalosporina, resistente a las fluoroquinolonas

#### **Prioridad 3: Media**

- *Streptococcus pneumoniae*, sin sensibilidad a la penicilina
- *Haemophilus influenzae*, resistente a la ampicilina
- *Shigella spp.*, resistente a las fluoroquinolonas

Se destacan los primeros por ser los más urgentes en la búsqueda de nuevos antibióticos para su tratamiento. Pero la limitada inversión en I+D y la dificultad aumentada de desarrollo de nuevos antibióticos han forzado por vez primera a tener en consideración posibles nuevos tratamientos (Ghosh, Haldar, Issa, Sarkar *et al* 2019).

En la Tabla 1 se muestran las terapias que se han propuesto indicando sus respectivas ventajas y desventajas.



**Tabla 1.** Nuevas terapias para la multirresistencia bacteriana (Obtenida y modificada de Ghosh, Haldar, Issa *et al*, 2019)

<b>Estrategia</b>	<b>Ventajas sobre los antibióticos convencionales</b>	<b>Posibles desventajas</b>
<b>Terapia fágica (fagoterapia)</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Producto farmacéutico autorreplicante</li> <li>• Selectivo frente a cepas específicas de bacterias</li> <li>• Sujeto a modificaciones de ingeniería genética</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Inmunogenicidad</li> <li>• Farmacocinética</li> <li>• Liberación de endotoxinas bacterianas</li> <li>• Preparados inadecuados – fracaso para remover endotoxinas y sustancias pirogénicas</li> <li>• Desarrollo de resistencias</li> </ul>
<b>Lisinas</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Sujeto a modificaciones de ingeniería genética</li> <li>• Selectivo frente a cepas específicas de bacterias</li> <li>• No propenso a desarrollar resistencias</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Producción</li> <li>• Falta de suficiente conocimiento</li> </ul>
<b>Crispr/cas9</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Se puede ajustar para una variedad de aplicaciones antimicrobianas</li> <li>• Reversión del uso de antibióticos</li> <li>• Especificidad ante las cepas patógenas</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Producción costosa a gran escala</li> <li>• Toxicidad</li> </ul>
<b>Péptidos antimicrobianos</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• No propenso a desarrollar resistencias</li> <li>• Actividad de amplio espectro, dependiendo de la aplicación</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Producción a gran escala costoso</li> <li>• Susceptible a la proteólisis</li> </ul>
<b>Bacteriocinas</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Especificidad por cepas bacterianas</li> <li>• Resistente al calor y uv</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Producción a gran escala costoso</li> <li>• Susceptible de proteólisis</li> </ul>
<b>SMAMPS<sup>a</sup></b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Fácil de sintetizar</li> <li>• No propenso a desarrollar resistencias</li> <li>• Actividad de amplio espectro, dependiendo de la aplicación</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Toxicidad</li> <li>• Ruta de administración</li> </ul>
<b>IDR péptidos<sup>b</sup></b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Trabaja modulando el sistema inmune</li> <li>• No hay desarrollo de resistencia al no haber actividad antimicrobiana directa</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Producción a gran escala costoso</li> <li>• Susceptible a la proteólisis</li> </ul>
<b>Probióticos</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Fácil disponibilidad</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Usado mayormente en infecciones intestinales</li> </ul>
<b>Anticuerpos</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Selectivo hacia cepas específicas de bacterias</li> <li>• Sin daños a la microflora</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Alto coste de producción</li> <li>• Breve vida útil</li> </ul>

<sup>a</sup> Copias sintéticas de péptidos antimicrobianos (Synthetic mimic of antimicrobial peptides)

<sup>b</sup> Péptidos reguladores de defensa innata (Innate defense regulatory peptides)

En este trabajo nos centraremos en la **terapia con bacteriófagos**. El método que ha destacado ante la caída de la efectividad de los antibióticos la posee este depredador que a lo largo de la historia terrestre ha ido matando a miles de millones de presas todos los días pasando totalmente desapercibido, siendo el cazador más letal del planeta Tierra. Los antibióticos clásicos normalmente afectan a procesos fisiológicos de bacterias (replicación, transcripción, traducción y procesos biosintéticos entre otros) pero, el rápido crecimiento, mutación y exposición han hecho a las bacterias adaptarse y desarrollar resistencias. Sin embargo, el bacteriófago está profundamente especializado y también es capaz de mutar y evolucionar a gran velocidad contrarrestando cualquier nueva adaptación que haya adquirido la bacteria. Además, el bacteriófago, ignora cualquier otra célula que no sea su objetivo principal. Esto podría compararse a una carrera armamentística entre dos frentes en guerra. Esta guerra es librada desde hace millones de años sin que la notáramos hasta principios del siglo XX (Keen, 2012, O'Neill, 2016, Ghosh, Haldar, Issa, Sarkar *et al*, 2019).

#### 4.2. Biología de los bacteriófagos

Los bacteriófagos pertenecen al grupo de los virus y se caracterizan porque afectan exclusivamente a bacterias, los virus en general no pueden replicarse independientemente de una célula viva (célula hospedadora). Se podría comparar con una especie de parásito intracelular obligado, en el cual, llevan a cabo su ciclo biológico. Poseen su propio material genético y usan la maquinaria del genoma de la célula hospedadora para replicarse. Su clasificación en microbiología ha sido especialmente complicada debido a que no cumple todos los requisitos que se consideran básicos para clasificarse como un ser vivo. Cuando está fuera de la bacteria hospedadora es metabólicamente inerte y no realiza respiración ni biosíntesis. La definición que más podría acercarse es que son elementos genéticos con o sin cubiertas que no pueden replicarse independientemente. (Madigan, Martinko, Dunlap & Clark 2009, Gal Ofir & Rotem Sorek 2018)

Los bacteriófagos son capaces de permanecer largos periodos inactivos hasta que detectan un hospedador e inyectan su material genético. Este proceso se denomina infección (Madigan, Martinko, Dunlap & Clark 2009). Una vez ocurre este evento se explota la maquinaria metabólica de la bacteria hospedadora. El material genético del virus se une al genoma de la bacteria y esta empieza a replicarse creando los componentes de multitud de nuevos bacteriófagos que serán ensamblados. En esta fase de replicación, el bacteriófago depende en gran medida de los componentes estructurales y metabólicos de la célula hospedadora. Esta producción en masa llega a un límite en el cual la bacteria revienta y libera todos los nuevos bacteriófagos listos para infectar las bacterias mas cercanas, este proceso de infección y eliminación de la bacteria se denomina ciclo lítico.

Este ciclo se puede resumir en cinco etapas:

1. *Unión* (adsorción) del virión a una célula hospedadora susceptible.
2. *Penetración* (entrada, inyección) del virión o su ácido nucleico en la célula.
3. *Síntesis* del ácido nucleico y las proteínas del virus por el metabolismo celular redirigido por el virus.
4. *Ensamblaje* de las cápsidas, componentes y *empaquetamiento* de los genomas víricos en nuevos viriones. Este proceso en conjunto se denomina *maduración*.
5. *Liberación* de los viriones maduros de la célula.

(Madigan, Martinko, Dunlap & Clark 2009)

Como otros elementos genéticos al ser introducidos en el genoma, los virus pueden conferir nuevas propiedades importantes a su célula hospedadora. Estas propiedades se heredarán al dividirse la célula hospedadora, cada célula nueva heredará también el genoma vírico. Estos cambios no siempre son perjudiciales, e incluso pueden ser beneficiosos (Madigan, Martinko, Dunlap & Clark 2009, Wyres KL, *et al* 2019). Los bacteriófagos, aunque son capaces de matar células mediante un **ciclo lítico**, también pueden llevar a cabo un ciclo de vida diferente, resultante de una relación genética estable con el hospedador, denominado ruta lisogénica (Figura 1). Estos bacteriófagos reciben el nombre de **virus atemperados**, la mayoría de sus genes no se expresan y el genoma del virus, llamado **profago**, se replica junto con el cromosoma del hospedador (José R Penadés *et al*, 2015, Madigan, Martinko, Dunlap & Clark, 2009). En las células que albergan un virus atemperado, denominadas **lisógenas**, el genoma del bacteriófago se replica junto con el del hospedador y, durante la división celular pasa de una generación a la siguiente (Madigan, Martinko, Dunlap & Clark, 2009). En determinadas condiciones los **virus lisógenos** pueden revertir a la **vía lítica** y empezar a producir viriones, esto ocurre por que el represor del bacteriófago es inactivado o bien se impide su síntesis. Este proceso se denomina **inducción del profago** (José R Penadés *et al*, 2015, Madigan, Martinko, Dunlap & Clark, 2009). En algunos casos la alteración de las condiciones, especialmente por daño al ADN de la célula hospedadora, induce el estado lítico. Si el virus pierde la capacidad para salir del genoma del hospedador a causa de una mutación, este se convierte en un **virus críptico** (Madigan, Martinko, Dunlap & Clark, 2009). Estudios genómicos han demostrado que muchos genomas bacterianos contienen secuencias de ADN, que alguna vez formaron parte de un genoma vírico (Mavrich TN & Hatfull GF, 2017, Madigan, Martinko, Dunlap & Clark, 2009).

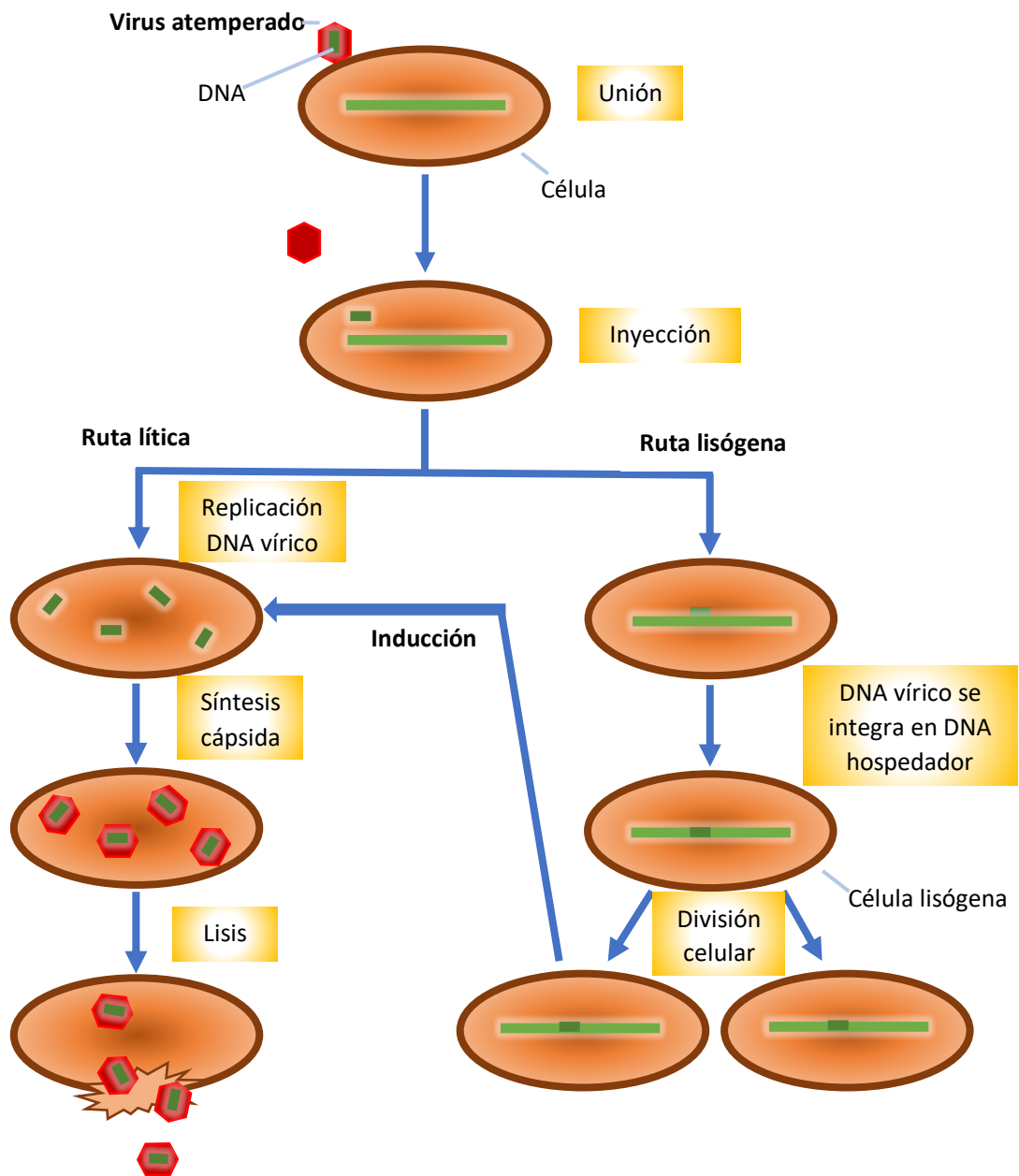


Figura 1 Rutas de infección de un bacteriófago atemperado (Elaboración propia basada en Madigan, Martinko, Dunlap & Clark, 2009)

### 4.3. Los bacteriófagos como agentes terapéuticos

#### 4.3.1. Descubrimiento e historia

Existen registros históricos antiguos, que exponían que los leprosos al bañarse en determinados ríos como parte de rituales religiosos, mostraban una mejoría destacable, que se solían atribuir a milagros divinos. Actualmente sabemos que se han sucedido afloramientos bacteriófagos en estos ríos en diferentes momentos (Keen, 2012). Uno de los primeros eventos registrados científicamente, data de 1896 en el que Ernst Hankin observa actividad antibacteriana contra *Vibrio cholera* en sus cultivos, con muestras de las aguas del río Ganges y Jumna en la India. Sugirió que una “sustancia” desconocida, era responsable de este fenómeno y de limitar la dispersión del cólera. Un hallazgo similar fue descrito más tarde (1898) por Gamaley, un microbiólogo ruso, mientras trabajaba con *Bacillus subtilis*. No fue hasta 1915 que Frederick Twort planteó la hipótesis de que un virus podría ser la causa detrás de esta actividad antibacteriana. En sus intentos de cultivar el virus *Vaccinia* en un medio con agar, observó el crecimiento de colonias de micrococcos con zonas claras. Cuando examina estas colonias bajo el microscopio, descubre agrupaciones de bacterias muertas y a partir de esto formula su hipótesis (Salmond GP & Fineran PC, 2015).

Esta investigación en el campo de los bacteriófagos es retomada por Félix d’Herelle, un microbiólogo francocanadiense, que también reconoce observar el efecto de los bacteriófagos mientras estudiaba el aspecto microbiológico, que limitaba la diseminación de una epizootia de langostas en México. Observaba también zonas claras alrededor de colonias de bacterias en medio agar, que posteriormente llamaría placas. A partir de este descubrimiento en 1919, usa bacteriófagos de forma terapéutica para tratar la disentería bajo la supervisión del profesor Víctor-Henri Hutinel, en el hospital des Enfants-Malades en París ([Fotografía 1](#)). La administración de este cultivo preparado de bacteriófagos probó su eficacia en el tratamiento de cuatro pacientes. Hay que destacar que estos hallazgos no fueron publicados hasta 1931, los cuales dieron la oportunidad a Richar Bruynoghe y Joseph Masin de registrar la primera aplicación de bacteriófagos en el tratamiento de infecciones en humanos (Salmond GP & Fineran PC, 2015). Ellos usaron bacteriófagos aplicados de manera cutánea para tratar enfermedades de estafilococos en la piel. Siguiendo estos importantes hallazgos, equipos de microbiólogos comienzan a usar bacteriófagos en aspectos terapéuticos tanto en animales como en humanos. A partir de este punto, hay un crecimiento notable en el desarrollo de terapias con bacteriófagos (El-Shibiny & El-Sahhar, 2017). Incluso D’Herelle estableció su propio laboratorio, que produjo el primer coctel comercial de bacteriófagos (Chanishvili, 2012). Algunos científicos experimentaron con bacteriófagos en varias infecciones, uno de los casos fue un estudio en 25 pacientes con fiebres tifoideas, que reportó una caída en la tasa de

mortalidad desde el 15,6% al 4,8% con el tratamiento bacteriófago y una reducción de complicaciones en la enfermedad del 43,2%. Hay estudios de tratamientos exitosos con bacteriófagos en casos de septicemia, infecciones del tracto urinario, infecciones quirúrgicas, infecciones cutáneas, peritonitis, infecciones de otorrinolaringología, además de colitis relacionado con *Shigella* y *Salmonella* (Tabla 2). Esta novedosa terapia con bacteriófagos llegó hasta los Estados Unidos, incluso renombradas compañías farmacéuticas como Eli Lilly, Abbott Labs, y E.R. Squibb, comenzaron a producir sus propios cocteles de bacteriófagos (El-Shibiny, El-Sahhar *et al*, 2017).



**Fotografía 1:** D'Herelle en el instituto Pasteur (1919).

Fuente: **Summers, W. C.**, Félix D'Herelle and the origins of molecular biology. Yale Univ Press: New Haven, CT, 1999.

Sin embargo, este entusiasmo por la terapia con bacteriófagos disminuyó después de la aparición de sulfonamida y penicilina (antibióticos), además del informe con duras críticas hecha por Eaton y Bayne-Jones de 1934 que cuestionó la precisión y la consistencia de los protocolos de terapias con bacteriófagos (El-Shibiny, El-Sahhar *et al*, 2017). Sin contar con que la producción y distribución de antibióticos salía más rentable económicamente y a pesar de los efectos secundarios, era mucho más asumible en costo (O'Neill, 2016).

Después de este abandono, hace unas pocas décadas, países tales como Polonia, Georgia y Rusia continuaron la investigación en el campo de las terapias con bacteriófagos contra las infecciones bacterianas. Lamentablemente, la documentación de dichos estudios no suele estar disponible a escala internacional, debido al uso de otros idiomas y no el inglés (esto ha ido cambiando en 2019). Hoy en día solamente una selección específica de bacteriófagos virulentos son usados como agentes biocontroladores y considerados seguros, especialmente por no transferir genes de síntesis de toxinas o resistencia antibiótica de una bacteria hospedadora a otra (El-Shibiny, El-Sahhar *et al*, 2017, Zachary D Moye *et al*, 2018). Estos bacteriófagos se han considerado como no tóxicos y actualmente su uso se limita como aditivos en la comida, su función es antimicrobiano según agencias reguladoras (FDA 2006, El-Shibiny, El-Sahhar *et al*, 2017).

**Tabla 2.** Historia de terapias con bacteriófagos (Fracción 1919-1978). Modificada y traducida de El-Shibiny & El-Sahhar, 2017.

Referencia	Año	País	Patógeno	Enfermedad	Descripción
<b>D'herelle</b>	1919	Francia	<i>Shigella</i>	Disentería bacteriana	Tratamiento de niños que sufren disentería usando bacteriófagos aislados previamente.
<b>Brungnoghe y maisin</b>	1921	Francia	<i>Staphylococcus</i>	Carbunculosis y forunculosis	La inyección de bacteriófagos cerca de la base de los carbuncos y forúnculos en 6 pacientes provocó la reducción de hinchazón, dolor y fiebre.
<b>D'herelle</b>	1927	India	<i>Vibrio cholerae</i>	Cólera	Este estudio fue el primero en usar administración intravenosa de bacteriófagos en india.
<b>Larkum</b>	1929	EE. UU.	<i>Staphylococcus</i>	Forunculosis crónica	Tratamiento subcutáneo de 208 pacientes mostró un 78% de reducción de infecciones recurrentes.
<b>Schultz</b>	1929	EE. UU.	<i>Staphylococcus</i>	Septicemia	Exitoso tratamiento
<b>D'herelle</b>	1931	Egipto	<i>Yersinia pestis</i>	Plaga peste bubónica	En 1927, D'Herelle trató 4 casos de peste bubónica con éxito inyectándoles bacteriófagos en los bubones.
<b>Schless</b>	1932	EE. UU.	<i>Staphylococcus aureus</i>	Meningitis	Exitoso tratamiento.
<b>Macneal y frisbee</b>	1936	EE. UU.	<i>Staphylococcus</i>	Bacteriemia estafilocócica	Tratamiento relativamente exitoso en 100 pacientes.
<b>Sauvé</b>	1936	Francia	<i>Staphylococcus</i>	Infecciones quirúrgicas	Cura de abscesos usando bacteriófagos polivalentes.
<b>Mikeladze et al.</b>	1936	Georgia	<i>Salmonella typhi</i>	Fiebre tifoidea	Caída de mortalidad del 10,8% y reducción de 43,2% de complicaciones en 21 pacientes.
<b>Mikeladze et al.</b>	1936	Georgia	<i>Salmonella y shigella</i>	Colitis aguda	Todos los pacientes (43) con colitis se curaron después de recibir tratamiento usando "bacti-intesti-bacteriófagos".
<b>Tsulukidze</b>	1936	Georgia	<i>Salmonella typhi</i>	Peritonitis causada por perforaciones intestinales en fiebre tifoidea	Mortalidad reducida del 85% al 20%-35%.
<b>Macneal et al.</b>	1942	EE. UU.	<i>Staphylococcus</i>	Bacteriemia estafilocócica	Resultado muy positivo en el tratamiento de 500 pacientes.
<b>Knouf et al.</b>	1946	EE. UU.	<i>Salmonella</i>	Fiebre tifoidea	Los resultados fueron inconclusos, no obstante, los resultados positivos los animaron a continuar la investigación.
<b>Desranleau</b>	1949	Canadá	<i>Salmonella</i>	Fiebre tifoidea	Varios cocteles de bacteriófagos fueron usados en 100 pacientes. El mas exitoso obtuvo una reducción de la mortalidad del 20% al 2%.
<b>Babalova et al.</b>	1968	Rusia	<i>Salmonella y shigella</i>	Colitis aguda	Todos los pacientes (47) con colitis se curaron después de recibir tratamiento usando "bacti-intesti-bacteriófagos".
<b>Sakandelidze y meipariani</b>	1974	Rusia	<i>Proteus, staphylococcus y streptococcus</i>	Peritonitis, osteomielitis, abscesos pulmonares e infecciones de heridas posquirúrgicas.	Se administraron bacteriófagos subcutáneamente o a través de heridas quirúrgicas en 236 pacientes que presentaban resistencia a antibióticos dando una tasa de éxito del 92%.
<b>Pipiia et al.</b>	1976	Rusia	<i>Pseudomonas</i>	Neumonía por abscesos	Un complejo tratamiento a los pacientes incluyendo terapias intensivas antibacterianas, inmunoterapia, bacteriófagos, preparaciones proteicas, terapia con vitaminas y transfusiones de sangre.
<b>Litvinova et al.</b>	1978	Rusia	<i>Escherichia coli y proteus</i>	Disbiosis intestinal asociado a antibióticos	Una combinación de bacteriófagos y bifidobacterias para restaurar la microbiota intestinal en 500 infantes.

#### 4.3.2. *Terapia convencional con bacteriófagos (monofágica y polifágica).*

Dentro de las terapias clínicas que se han realizado con bacteriófagos, se han usado dos tipos de terapias dependiendo de la variedad de bacteriófagos usados, en los cocteles suministrados a pacientes con enfermedades infecciosas por bacterias patógenas, puede administrarse una dosis de un bacteriófago específico (monofágico) o un coctel de múltiples bacteriófagos (polifágico) (Patel, D.R. *et al*, 2019).

En las terapias monofágicas se seleccionaría una cepa de bacteriófago específica para la bacteria patógena. Las dosis se pueden repetir sin efectos adversos, pero es cierto que con este tipo de terapia las posibilidades de que la bacteria desarrolle resistencias son mayores (Barceló, 2018, Patel, D.R. *et al*, 2019).

En cocteles polifágicos por el contrario, se selecciona un espectro mayor de bacteriófagos, los cuales en conjunto se compensan entre ellos ante cualquier resistencia que pueda desarrollar la bacteria patógena (Barceló, 2018). Éste ha sido el ensayo clínico más habitual a principios del siglo XX en varios países, sin embargo, en la segunda mitad del siglo XX esta terapia fue más habitual en países de Europa del Este (Chanishvili, 2012).

Esta evolución antagónica entre bacteriófagos y bacterias se ha demostrado para diferentes cepas de bacteriófagos, en experimentos a largo plazo, como el bacteriófago PP01 y *E. coli* O157: H7, el bacteriófago *Phi2* y *P. fluorescens*, el bacteriófago RIM8 y la cianobacteria marina *Synechococcus* (Barceló, 2018). Esto no descarta el hecho, de que evidentemente el manejo cuidadoso y la prevención de la propagación de la resistencia a cualquier terapia, deben ser prioritarios. Obviamente los bacteriófagos atemperados y ex-atemperados deben descartarse para su uso en tratamientos, así como los bacteriófagos que codifican toxinas potenciales (Barceló, 2018). Los protocolos para el aislamiento y la purificación de bacteriófagos para uso terapéutico son simples y fácilmente disponibles (O'Neill, 2016, Robert T.Schooley *et al*, 2017). Otros experimentos demostrarían la posibilidad de que tratamientos individualizados (monofágico) y el uso de cocteles de bacteriófagos (polifágico), controlen las infecciones bacterianas múltiples o resistentes a cepas de bacteriófagos, como es el caso demostrado en infecciones de tracto urinario asociado con el catéter de *P.aeruginosa* y *Proteus mirabilis*. (Barceló, 2018).

#### 4.3.3. *Terapia combinada con bacteriófagos y antibióticos*

En algunos ensayos con cepas de bacterias multirresistentes a antibióticos, se ha experimentado terapias con bacteriófagos específicos (terapia monofágica), con cócteles de bacteriófagos (terapia polifágica), que actúan en un espectro más amplio, con antibióticos y en última instancia con una combinación muy precisa de bacteriófago y antibióticos (Patel, D.R. *et*



al, 2019, Oechslin, F. *et al*, 2017). En este último, la combinación de bacteriófagos con ciprofloxacina mostró una actividad óptima con una alta sinergia y dio como resultado que 7 de 11 cultivos de válvulas de corazones de ratones, dieran negativo en tan solo 6 horas. Este resultado no tiene precedentes en la terapia antimicrobiana con prácticamente ningún fármaco o patógeno, especialmente con *P. aeruginosa* (Oechslin, F. *et al*, 2017). Incluso en aquellos cultivos que mostraban resistencia a estos bacteriófagos, se observan en estas bacterias, una serie de mutaciones que representaban un coste fisiológico enorme. En esta experimentación con ratones, dos daban los siguientes resultados, el primero mostraba una motilidad celular defectuosa debido a la interrupción del gen *pilT*, cuyo producto es una ATPasa que proporciona energía para la contracción del pilus, este tipo de pilus (tipo IV) también es un receptor de bacteriófagos y la contracción de este acerca los bacteriófagos a la envoltura bacteriana, en el segundo caso, el mutante tiene un lipopolisacárido (LPS) alterado, resultado de una gran deleción que abarca genes relacionados con la síntesis de LPS. Esta alteración se explica porque el LPS puede actuar como un receptor de bacteriófagos y su alteración puede aumentar su resistencia a estos (Oechslin, F. *et al*, 2017, Barceló, 2018). Teniendo en cuenta estos dos ejemplos de mutaciones, en *P. aeruginosa* tanto los pili tipo IV como el LPS modificado son factores de virulencia importantes. Por consiguiente, estas mutaciones aun dando resistencia a los bacteriófagos, también disminuyen su virulencia en animales. (Oechslin, F. *et al*, 2017).

El tratamiento combinado de bacteriófagos y antibióticos se observa que da unos resultados óptimos, con una sinergia sobresaliente. La principal ventaja de esta terapia conjunta es una mejor eliminación de las células bacterianas y una evolución reducida de resistencia a los antibióticos o a los bacteriófagos. Este tipo de interacciones combinadas entre bacteriófagos y antibióticos hacia patógenos resistentes a alguno de los dos, ofrece la posibilidad de tratamientos exitosos incluso contra las bacterias de mayor resistencia a antibióticos que existan en la actualidad. Incluso en los casos en el que las interacciones entre estos dos componentes puedan resultar negativos de manera subyacente, parece ser, que son muy breves y transitorias e incluso los bacteriófagos del mismo tratamiento, no se ven afectados por la presencia del antibiótico en etapas posteriores a las primeras inoculaciones (Barceló, 2018). Para que las terapias combinadas sean mas optimas todavía, se deberá cuidar minuciosamente las dosis y frecuencia en los que se inoculan, tanto los bacteriófagos como el antibiótico. En varios estudios con *P. aeruginosa* se observa un resultado de mayor efectividad, cuando se vigilan estos factores. En estos estudios se observaba un aumento en la velocidad en la que el bacteriófago atacaba a la bacteria (Jingmin Gu *et al*, 2012, Tagliaferri T.L. *et al*, 2019).

Por ahora, todos los estudios en la interacción entre bacteriófago y bacteria, muestran que la bacteria al desarrollar nuevas resistencias hacia bacteriófagos lo hace a costa de aumentar su

vulnerabilidad a ciertos antibióticos (Tagliaferri T.L. *et al*, 2019). Esta idea aumenta enormemente el interés de mayor investigación en terapias clínicas con aplicaciones simultáneas de bacteriófagos y antibióticos en la mayoría de los casos. Además, hay que añadir que otro aspecto positivo de los bacteriófagos es que, una vez establecidos localmente, si nada se lo impide, se multiplican *in situ* y no requiere inoculaciones adicionales (Oechslin, F. *et al*, 2017).

Incluso para obtener aun si cabe un mejor resultado, se valora como un paso más avanzado en estas terapias combinadas, el uso de bacteriófagos modificados genéticamente según el caso y el antibiótico. De todas maneras, aun siendo posible, hay una barrera importante ha tener en cuenta, que es la reticencia pública del uso de OGM (organismos modificados genéticamente) directamente en humanos. Aún así, se podrán obtener resultados óptimos con bacteriófagos salvajes (seleccionados previamente). (O'Neill, 2016, Andrzej Górski *et al*, 2018).

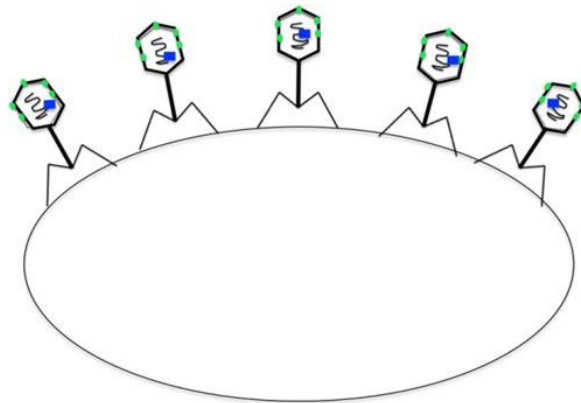
#### 4.3.4. Bioingeniería con bacteriófagos

Al tener la posibilidad de manipular con ingeniería genética diversas cepas de bacteriófagos, los resultados pueden ser profundamente interesantes de cara a futuros tratamientos de infecciones bacterianas (Qin Peng *et al*, 2020). Hay que destacar la función que se podría aplicar, para contrarrestar los biofilms bacterianos que impiden la actividad antibiótica sobre las bacterias. Uno de los ejemplos más interesantes y con revisión detallada, es el caso de Lu *et al* (Lu *et al*, 2007), que diseñaron bacteriófagos que producen enzimas que degradan el biofilm bacteriano de infecciones de *E.coli* (Lu *et al*, 2007). Como resultado, tras el tratamiento con estos bacteriófagos diseñados, se lisaron tanto las biopelículas, como las bacterias que estaban incrustadas dentro de las biopelículas. En otros casos, los bacteriófagos fueron diseñados para sobreexpresar *lexA3*, que reprime el sistema de reparación del ADN bacteriano SOS. La población de bacteria *E.coli* que fue tratada con los bacteriófagos que sobreexpresaba dicho gen, se volvió más sensible a la ofloxacina (Lu *et al*, 2007).

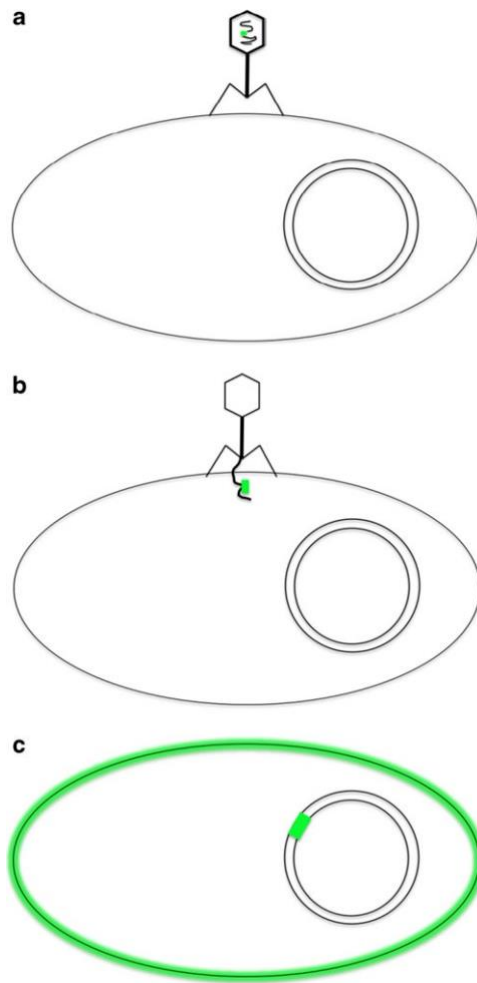
Se han hecho modificaciones genéticas en bacteriófagos, para convertirlos en transportadores de ácidos nucleicos, hacia una bacteria hospedadora específica. Al unirse con la bacteria objetivo, estos bacteriófagos fluorescentes recubren la superficie de la bacteria y con ello facilita la localización de poblaciones de una cepa bacteriana específica (Figura 2). Se plantea el uso de estos bacteriófagos también como detectores de patógenos en bancos de comida y depósitos de agua, incluso en cualquier medio de un centro clínico que permita usar estos bacteriófagos modificados genéticamente. Actualmente existen “tintes” comerciales para este propósito. Esto nos da numerosos métodos para manipular el genoma del bacteriófago y así preparar el gen informador que queramos usar o sea de nuestro interés. Estos tintes preparados, después de un proceso de muchos pasos, consiguen teñir las secuencias de interés del genoma del bacteriófago objetivo y lo hará susceptible a que emita fluorescencia y se detecte en un

microscopio de epifluorescencia o en citometría de flujo (Figura 3). Por lo general, esta señal emisora de luz, abarca los habituales genes informadores colorimétricos ( $\beta$ -galactosidasa, lacZ), fluorescentes (GFP y sus variantes), bioluminiscentes (luciferasa bacteriana (lux) y luciferasa de luciérnaga (luc)). Sin embargo, puede darse un falso positivo en estos bacteriófagos señalizadores, debido a que se hayan unido de manera no específica y estén adheridos a un hospedador que resulte bastante diferente a la cepa objetivo. Como estrategia para minimizar estos falsos positivos, se usan tintes que se puedan ver incluso antes de que el bacteriófago se una a su presa objetivo, esto es importante ya que cuando ocurre una unión con un hospedador diferente, la emisión de fluorescencia es siempre más débil que con su hospedador específico o libre. Esto nos daría un rango de fluorescencia que nos ayudaría a clasificar si hay falsos positivos que puedan alterar el resultado. Por otra parte, los tintes adecuados para este tipo de pruebas no deben alterar la capacidad de unión del bacteriófago, ni alterar el genoma de la bacteria una vez inyectado este material genético, o incluso que no pueda alterar la capacidad de salida del bacteriófago de la célula hospedadora. Estas técnicas nos permiten también obtener unos mejores resultados de observación y clasificación (Figura 4)

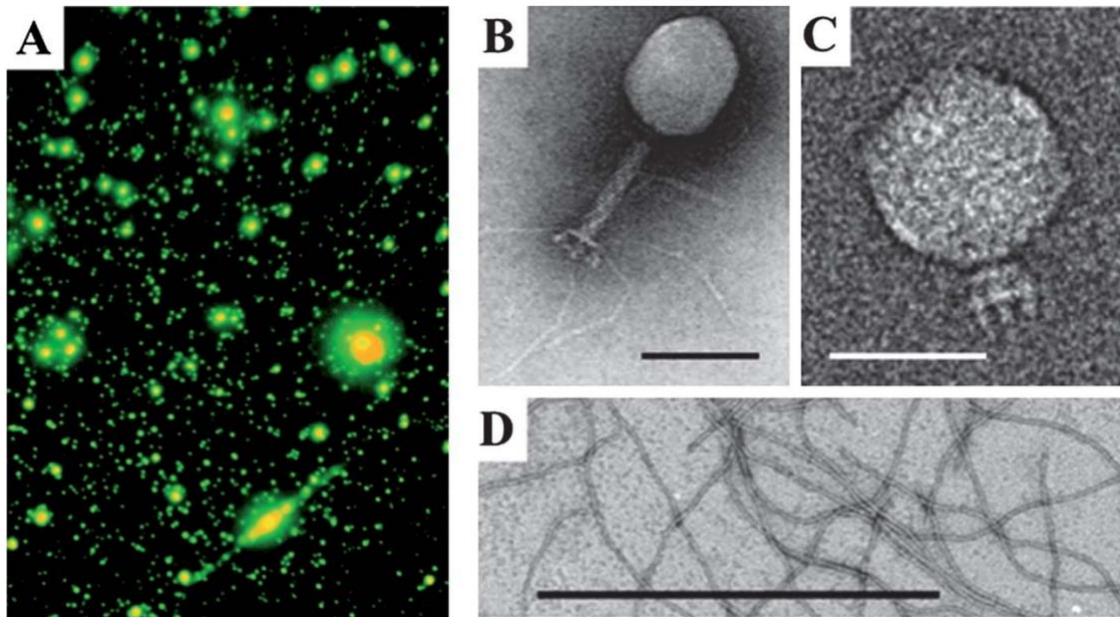
(Lu *et al*, 2007, Tagliaferri T.L. *et al*, 2019, Smartt, A.E. *et al*, 2012, Singh A. *et al*, 2012).



**Figura 2** Esquema fluorescencia de ac. nucleicos de bacteriófagos o de algún otro componente estructural. Esto puede dar una señalización clara al microscopio para identificar el huésped específico de este bacteriófago (Smartt, A.E. *et al*, 2012).



**Figura 3** Genes reporteros colorimétricos, fluorescentes o bioluminiscentes transportados por bacteriófagos. (a) llevado a la bacteria hospedadora específica (b), en donde esta se expresa y hace adquirir a la célula hospedadora una señal detectable (c) (Smartt, A.E. *et al*, 2012).



**Figura 4** Abundancia de fagos y diversidad morfológica. (A) Imagen de fluorescencia (SYBR teñida de verde) de partículas de bacteriófagos (puntos pequeños), células procariotas (puntos medios) y células protistas/diatomeas (dos objetos grandes) en una muestra de agua oceánica. Los paneles (B) a (D) son micrografías electrónicas de diferentes partículas de fago. (B) el bacteriófago de *Escherichia coli* T4 con sus fibras distintivas de la cola; (C) *Salmonella enterica serovar Typhimurium* P22. Tiene una cola corta no contráctil con púas; (D) partículas filamentosas de fago de *E. coli*. Estas partículas de fago no tienen cabezas ni colas y se unen a sus receptores por las puntas de los filamentos.

Obtenido y modificado de Singh A. *et al* (2012)

#### 4.3.5. Experiencia obtenida en ensayos clínicos. Caso clínico *A. baumannii*.

(Robert T.Schooley *et al*, 2017)

Uno de los casos más citados, es el del tratamiento terapéutico personalizado con bacteriófagos a un paciente diabético de 68 años, con pancreatitis necrotizante que se complicó por una infección de *A.baumannii*. Aún recibiendo tratamiento con una amplia gama de antibióticos en repetidas ocasiones y con los drenajes percutáneos de un pseudoquiste pancreático, el paciente fue empeorando cada vez más a lo largo de 4 meses. A petición de familiares y médicos, dos laboratorios identificaron nueve bacteriófagos diferentes, con actividad lítica para muestras aisladas de *A.baumannii* del paciente. Estos bacteriófagos fueron administrándose vía intravenosa a la cavidad del absceso y el paciente, mostró una recuperación progresiva hasta la completa eliminación de la infección y volvió a estar completamente sano.

La selección de los 9 bacteriófagos fue a través de un proceso de recolección de fuentes ambientales por la Dirección de Investigación y Defensa Biológica (BDRD) del Centro de Investigación Médica Naval (NMRC), a partir de un subconjunto seleccionado de 98

bacteriófagos específicos para *A. baumannii* de un total de 200 bacteriófagos. De los ensayos previos en laboratorio con las muestras tomadas, se observaba que de manera individual, algunos reducían el crecimiento del patógeno hasta 6h, mientras otros de manera conjunta mostraban un amplio rango de hospedadores sensibles. Esto nos indica la increíble variedad de bacteriófagos que pueden aparecer en una muestra reducida. Se demostró que un coctel seleccionado de estos bacteriófagos fue más efectivo que usándolos por separado.

El pronóstico del paciente ya era grave cuando la terapia fue iniciada con el coctel de bacteriófagos. Se administraron por catéteres percutáneos que drenaban la cavidad del pseudoquiste, la cavidad biliar y una tercera cavidad intraabdominal. Durante este proceso, el paciente no respondía a estímulos externos y mostraba insuficiencia renal. Durante las siguientes 36 horas, se mantuvo estable, pero en estado comatoso. Visto el estado del paciente, se administró una nueva dosis adicional de un nuevo coctel de bacteriófagos y esto se repetiría a intervalos cada vez mas frecuentes, durante los siguientes dos días. Acabó despertando abruptamente de su coma y pudo hablar con sus familiares por primera vez en semanas. Durante este proceso, se descubrió en cultivos nuevos que *A.baumannii* se había vuelto susceptible a la minociclina y se añadió este antibiótico durante los siguientes 4 días. Durante las siguientes 3 semanas, continuó su tratamiento, siendo ajustado de manera muy precisa a cada paso. El estado mental continuó mejorando y recuperaba por completo la lucidez. Fue desconectado del respirador y su función renal mejoró gradualmente. La terapia con bacteriófagos fue continua durante 8 semanas adicionales y durante ese tiempo, siguió mostrando mejoría clínica. Fue dado de alta en el día 245 de ingreso y al día siguiente regreso a su trabajo.

Hay que destacar, que el trabajo sinérgico con los laboratorios fue continuo e intenso, ya que se vigilaba con mucho detalle todas las muestras que iban llegando, si mostraban nuevas resistencias contra el anterior coctel de bacteriófagos, se preparaba uno nuevo con una selección diferente. El desarrollo farmacocinético es muy interesante, pero no lo trataremos en este trabajo de investigación bibliográfica.

Las observaciones en microscopio electrónico de transmisión de los bacteriófagos de los cocteles muestran una cola corta con una estructura en la cabeza bien definida. Los 7 bacteriófagos finales seleccionados, pertenecen a la familia *Myoviridae*, mientras que los restantes pertenecen a la familia *Povoviridae* (Figura 4).

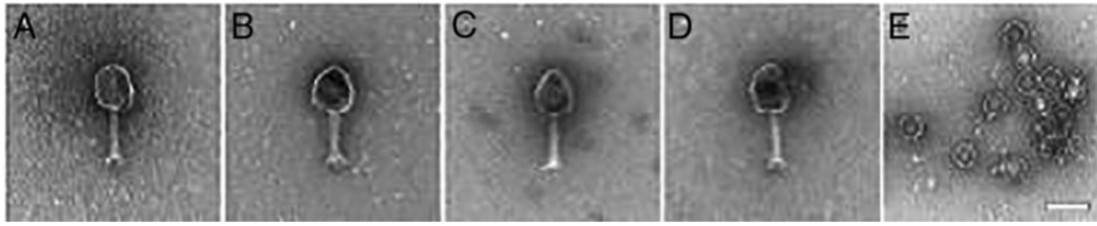


Figura 4. Micrografías electrónicas de transmisión de bacteriófagos específicos de *A. baumannii* (Robert T.Schooley et al, 2017)

#### 4.3.6. Comparación entre terapia fágica y terapia antibiótica

Hemos comprobado lo que hace la terapia fágica y sus variantes (monofágica, polifágica), inclusive la combinada con antibióticos. Las diferencias más notables de estas nuevas terapias con la terapia antibiótica de manera exclusiva son las siguientes:

##### **Terapia antibiótica.**

##### Ventajas:

Los antibióticos suelen afectar a un amplio espectro de bacterias y afectan de tal forma que puede detener el desarrollo (bacteriostático) o provocar una parada en su ciclo de vida, provocando la muerte de las bacterias sensibles al antibiótico en cuestión.

Su producción y preparación es muy económica (en comparación con otras terapias) y es accesible para fabricar en masa y distribuir de manera global (aunque esto último no se suele cumplir con países en vías de desarrollo).

(Briers Y *et al*, 2014, Patel, D.R. *et al*, 2019, Oechslin, F. *et al*, 2017, Galtier *et al*, 2016, Ghosh, Haldar, Issa, Sarkar *et al*, 2019)

##### Desventajas:

Entre sus desventajas, el más notable es que, según la vía de administración en casos clínicos, no solo afecta al patógeno objetivo, sino que puede dañar significativamente a la flora bacteriana del cuerpo humano.

Puede generar también distintos tipos de reacciones alérgicas o de rechazo, aparte que dependiendo del genoma del paciente, este puede tener una farmacocinética muy distinta para una misma dosis de antibiótico, una dosis elevada puede ser mortal y una dosis demasiado débil puede ser ineficaz y generar resistencias en el patógeno, por lo que dependiendo del paciente, la

dosis recomendada puede no ser la misma. El metabolismo de cada paciente procesa la dosis de manera distinta, puede desencadenar una sobredosis en su sistema circulatorio o eliminar la mayor parte dejando una dosis muy baja en el organismo, haciendo que el efecto del antibiótico sea perjudicial seleccionando bacterias resistentes (Madigan, Martinko, Dunlap & Clark, 2009, Galtier *et al*, 2016, O'Neill, 2016, Ghosh, Haldar, Issa, Sarkar *et al*, 2019).

Ante el desarrollo de multirresistencias por parte de las bacterias, una de las formas de adaptar los antibióticos fue creando nuevas versiones sintéticas, pero esto hoy en día esta perdiendo efectividad. El desarrollo de nuevos antibióticos es lento y las resistencias se generan rápidamente, tal es el extremo, que un antibiótico sintético nuevo puede perder la utilidad contra las cepas multirresistentes en muy poco tiempo (O'Neill, 2016, Andrzej Górski *et al*, 2018).

### **Terapia fágica:**

#### **Ventajas:**

Los bacteriófagos, por otra parte, tienen un proceso natural de adaptación contra las resistencias que desarrollen las bacterias hacia ellos, por lo que su potencial a largo plazo es muy notable (Briers Y *et al*, 2014, Galtier *et al*, 2016, Oechslin, F. *et al*, 2017, Ghosh, Haldar, Issa, Sarkar *et al*, 2019, Patel, D.R. *et al*, 2019).

Son increíblemente específicos y no alteran o dañan el resto de la flora bacteriana. Según las fuentes consultadas, no se han observado reacciones alérgicas del cuerpo humano a los bacteriófagos (aun así, no se descarta esta posibilidad), aunque si es bastante común que el sistema inmune los elimine del organismo reduciendo su efectividad, por lo que requeriría de nuevas dosis intravenosas, directamente pulverizadas sobre zonas afectadas o administrada de manera subcutánea. Por lo que se podría afirmar que apenas hay efectos secundarios en terapias repetidas con bacteriófagos (Andrzej Górski *et al*, 2018, Barceló, 2018).

Hay que destacar que, aunque algunas cepas de bacteriófagos naturales cubran un enorme espectro de acción, estos pueden ser modificados genéticamente, no solo para ser mas efectivos o tener mejores sinergias, sino que también pueden ser localizadores/marcadores de cepas bacterianas o ejercer una actividad mensajera. Todo esto requiere aun más desarrollo e investigación, pero los resultados vistos estos últimos años son especialmente prometedores (Abby E.Smartt *et al*, 2012, Tagliaferri T.L. *et al*, 2019).

#### **Desventajas:**

Entre sus desventajas más observadas es el caso de los bacteriófagos atemperados ya que estos pueden generar una transmisión horizontal de genes de resistencia entre las diferentes



bacterias hospedadoras (José R Penadés *et al*, 2015, Andrzej Górski *et al*, 2018, Barceló, 2018, Tagliaferri T.L. *et al*, 2019, Wyres KL *et al*, 2019).

En los casos en el que el bacteriófago tenga efecto lítico, se puede dar un efecto no deseado, las enterotoxinas, que podrían liberarse de las bacterias al completar su ciclo lítico. Esto supondría un agravamiento importante del estado de salud del paciente al sufrir una intoxicación (José R Penadés *et al*, 2015, Barceló, 2018, Ghosh, Haldar, Issa, Sarkar *et al*, 2019).

Pero lejos de retirar la terapia antibiótica del medio clínico, los estudios reafirman que a pesar de que actualmente hay una brecha de conocimiento pendiente de abordar con respecto a los mecanismos de interacción entre bacteriófagos y antibiótico, las combinaciones entre terapias siguen estudiándose y dando resultados alentadores. Esto sugiere que la experimentación continua con combinaciones sinérgicas entre bacteriófagos y antibióticos, dará en el futuro unas medidas robustas y definitivas contra cualquier bacteria multirresistente (Oechslin, F. *et al*, 2017, Andrzej Górski *et al*, 2018, Sarah Djebara *et al*, 2019, Tagliaferri T.L. *et al*, 2019, Qin Peng *et al*, 2020).

## 5. Conclusiones

- 1) La investigación sobre bacteriófagos en aplicaciones clínicas ha tenido un alto interés en la comunidad científica ante la aparición de bacterias multirresistentes. La cantidad de artículos, tanto de revisiones como ensayos clínicos que han aparecido estos últimos años, son cada vez más numerosos y frecuentes.
- 2) Las bacterias sacrifican su resistencia a los antibióticos para resistir a los bacteriófagos y viceversa, por lo que su efectividad va cambiando. Ya que, al contrario que los antibióticos, los bacteriófagos salvajes se adaptan y superan las resistencias de las bacterias. Es una carrera constante.
- 3) Los bacteriófagos al ser específicos, no dañan ninguna otra célula del paciente, incluyendo la flora bacteriana natural del cuerpo humano.
- 4) El único riesgo de una baja dosis de bacteriófagos es que no sea suficientemente efectiva para eliminar a la bacteria patógena y las dosis repetitivas o mayores, no generan efectos perjudiciales para el paciente.
- 5) Los bacteriófagos poseen potenciales usos no solamente para tratar pacientes, sino también para ser empleados en ambientes clínicos, reservas de comida y agua, así como en la detección y marcaje de bacterias.
- 6) Los bacteriófagos atemperados pueden contribuir en la transmisión de genes de resistencia a los antibióticos entre bacterias, por ello se hace un proceso de selección de los bacteriófagos, descartando los atemperados.
- 7) Un riesgo destacable es que el ciclo lítico libere enterotoxinas que contienen las bacterias al matarlas, generando que su contenido se descargue masivamente, resultando en una intoxicación grave o mortal para el paciente infectado.

## Conclusions

- 1) Research on bacteriophages in clinical applications has a high interest in the scientific community due to the appearance of multi-resistant bacteria. The number of articles, both reviews and clinical trials that have appeared in recent years, are increasingly numerous and frequent.
- 2) Bacteria sacrifice their resistance to antibiotics to resist bacteriophages and vice versa, so their effectiveness changes. Since, unlike antibiotics, wild bacteriophages adapt and overcome the resistance of bacteria. It is a constant race.
- 3) Bacteriophages, being specific, do not harm any other cells of the patient, including the natural bacterial flora of the human body.
- 4) The only risk of a low dose of bacteriophages is that it is not effective enough to eliminate the pathogenic bacteria and repetitive or higher doses do not generate harmful effects for the patient.
- 5) Bacteriophages have potential uses not only to treat patients, but also to be used in clinical settings, food and water reserves, as well as in the detection and labeling of bacteria.
- 6) The tempered bacteriophages can contribute in the transmission of antibiotic resistance genes between bacteria, therefore a selection process of the bacteriophages is carried out, discarding the temperate ones.
- 7) A notable risk is that the lytic cycle releases enterotoxins that the bacteria contain by killing them, causing their contents to be massively discharged, resulting in serious or fatal poisoning for the infected patient.

## 6. *Perspectivas futuras*

Por suerte en la actualidad la fagoterapia está abandonando sus dudosas asociaciones con la medicina alternativa pseudocientífica. Activado por la creciente amenaza de la vuelta a la edad oscura previa al antibiótico, hay un cambio importante en la visión de la fagoterapia y una actitud más abierta de los centros gubernamentales y científicos. Las revisiones y artículos sobre fagoterapias aparecen cada vez con mas frecuencia y todo esto, genera también una mejor comprensión de las reglas éticas, legales y administrativas relevantes para la terapia experimental, que actualmente permite el tratamiento para pacientes a los que les han fallado todas las opciones clínicas disponibles. No es de extrañar que en estos ultimo años, en algunos casos especiales, los médicos han derivado o contactan a sus pacientes con centros que trabajan estas terapias en Polonia o Georgia. Esto no quita que actualmente se necesite una divulgación amplia y mejorada, especialmente en los profesionales médicos, ya que muchos desconocen por completo la existencia de estas terapias y mucho menos sus resultados clínicos experimentales. Incluso en casos mas extremos, desconocen la existencia de bacteriófagos a pesar de que son 10 veces mas frecuentes en el microbioma que las bacterias.

(Lin *et al*, 2017, Andrzej *et al*, 2018, McCallin *et al*, 2019).

Cada vez más pacientes que padecen de infecciones crónicas no tratables y multirresistentes descubren esta información y consiguen no solo contactar con los centros que trabajan con bacteriófagos, sino también presionar a sus médicos para que se establezca una comunicación y estudie esta posibilidad. Se han dado casos en los últimos años de pacientes que se trasladan a los países con estos centros y están incluso dispuestos a asumir si pueden, los costos totales del tratamiento, el viaje y alojamiento. Este aumento del “turismo médico” ha crecido seguramente debido a las campañas nacionales contra el uso inapropiado de antibióticos.

(Lin *et al*, 2017, Andrzej *et al*, 2018, MacCallin *et al*, 2019)

Para pasar desde el nivel experimental hasta la aplicación segura en medicina, la fagoterapia necesita la participación también de una industria nueva que este dedicada de manera exclusiva a este propósito. A través de unos protocolos y controles muy específicos de seguridad y calidad en la producción en masa de bacteriófagos. Si bien es cierto, que cada vez más empresas farmacéuticas, están invirtiendo en este nuevo campo de investigación, como una estrategia para dominar el futuro mercado que genere esta nueva terapia, son unas pocas empresas y generalmente están dedicándose al desarrollo, en cooperación con institutos de investigación, academias y laboratorios estatales. Sin embargo, es distinto en el sector de alimentos, desinfección, cosmética y veterinaria, donde los bacteriófagos (también los productos de estos, lisinas) ya han llegado a los consumidores. La FDA de EE. UU. Aprobó una pequeña cantidad

de productos para estos mercados, y hay muchas solicitudes pendientes de aprobación. En el año 2018 Phage Technology Center estuvo presente en la feria internacional de tecnología de alimentos Anuga FoodTec (Colonia, Alemania, marzo de 2018), presentando sus preparados de bacteriófagos contra *Salmonella* y *E.coli* para aplicaciones alimentarias. Esto demuestra que habrá un primer crecimiento importante en el sector de alimentación. En EE. UU las estrategias nacionales, suelen centrarse en campañas para el uso apropiado de antibióticos y búsqueda de nuevas terapias. Entre estas terapias se suele mencionar el desarrollo de vacunas, mejoras en el diagnóstico o intervenciones novedosas. De manera muy excepcional, se llega a nombrar brevemente la palabra bacteriófagos, fagoterapia o productos de bacteriófagos.

(Lin *et al*, 2017, Andrzej *et al*, 2018, MacCallin *et al*, 2019).

El panorama muestra que, si bien es cierto que en el pasado se investigaba el uso exclusivo de la terapia con bacteriófagos de manera monofágica o multifágica, las investigaciones recientes están dando a la terapia combinada de bacteriófagos y antibióticos una mayor importancia, indicando que será la tendencia principal en el futuro. La amenaza de la pérdida de la edad dorada del antibiótico no solo ha dado el resurgimiento de los bacteriófagos en el mundo científico, sino que también ha dado una posible sinergia entre ellos que cambiará el curso de la historia de los antibióticos para siempre.

## 7. Bibliografía

- Smartt, A. E., Xu, T., Jegier, P., Carswell, J. J., Blount, S. A., Sayler, G. S., & Ripp, S. (2012). Pathogen detection using engineered bacteriophages. *Analytical and bioanalytical chemistry*, **402**(10), 3127–3146.
- Górski, A., Międzybrodzki, R., Łobocka, M., Głowacka-Rutkowska, A., Bednarek, A. *et al.* (2018). Phage Therapy: What Have We Learned?. *Viruses*, **10**(6), 288.
- Torres-Barceló C. (2018). The disparate effects of bacteriophages on antibiotic-resistant bacteria. *Emerging microbes & infections*, **7**(1), 168.
- Briers, Y., Walmagh, M., Grymonprez, B., Biebl, M., Pirnay *et al* (2014). Art-175 is a highly efficient antibacterial against multidrug-resistant strains and persists of *Pseudomonas aeruginosa*. *Antimicrobial agents and chemotherapy*, **58**(7), 3774–3784.
- Chanishvili, N. (2012). Phage therapy--history from Twort and d'Herelle through Soviet experience to current approaches. *Advances in virus research*, **83**, 3–40.
- D'Herelle, F., Summers, W. S. (1999). Félix D'Herelle and the Origins of Molecular Biology. Yale University Press. New Haven, Connecticut.
- Djebara, S., Maussen, C., De Vos, D., Merabishvili, M., Damanet, B. *et al* (2019). Processing Phage Therapy Requests in a Brussels Military Hospital: Lessons Identified. *Viruses*, **11**(3), 265.
- El-Shibiny, A. & El-Sahhar, S. (2017). Bacteriophages: the possible solution to treat infections caused by pathogenic bacteria. *Canadian Journal of Microbiology*, **63**(11), 865-879.
- Ofir, G., & Sorek, R. (2018). Contemporary Phage Biology: From Classic Models to New Insights. *Cell*, **172**(6), 1260-1270.
- Galtier, M., De Sordi, L., Maura, D., Arachchi, H., Volant, S. *et al* (2016). Bacteriophages to reduce gut carriage of antibiotic resistant uropathogens with low impact on microbiota composition. *Environmental microbiology*, **18**(7), 2237-2245.
- Ghosh C, Sarkar P, Issa R & Haldar J. (2019). Alternatives to conventional antibiotics in the era of antimicrobial resistance. *Trends in Microbiology*, **27**(4), 323-338.
- Gu J, Liu X, Li Y, Han W, Lei L *et al.* A method for generation phage cocktail with great therapeutic potential. *PLoS One*. 2012;**7**(3):e31698.
- Keen E. C. (2012). Felix d'Herelle and Our Microbial Future. *Future Microbiology*, **7**(12), 1337-1339.
- Lin, D. M. (2017). Phage therapy: An alternative to antibiotics in the age of multi-drug resistance. *World journal of gastrointestinal pharmacology and therapeutics*, **8**(3), 162–173.
- Lu, T. K., & Collins, J. J. (2007). Dispersing biofilms with engineered enzymatic bacteriophage. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, **104**(27), 11197-11202.
- Madigan, M. M., Martinko, J. M., Dunlap, P. V., Clark, D. P. (2009). Brock. *Biología de los microorganismos* (12° ed.). Pearson.
- Mavrich, T. N., & Hatfull, G. F. (2017). Bacteriophage evolution differs by host, lifestyle and genome. *Nature microbiology*, **2**, 17112.

- McCallin, S., Sacher, J. C., Zheng, J., & Chan, B. K.** (2019). Current State of Compassionate Phage Therapy. *Viruses*, **11**(4), 343.
- Moye, Z. D., Woolston, J., & Sulakvelidze, A.** (2018). Bacteriophage Applications for Food Production and Processing. *Viruses*, **10**(4), 205.
- Oechslin, F., Piccardi, P., Mancini, S., Gabard, J., Moreillon, P., Entenza, J. M., Resch, G., & Que, Y. A.** (2017). Synergistic Interaction Between Phage Therapy and Antibiotics Clears *Pseudomonas Aeruginosa* Infection in Endocarditis and Reduces Virulence. *The Journal of infectious diseases*, **215**(5), 703–712.
- OMS.** (2017). Centro de prensa OMS. Obtenido de <https://www.who.int/es/news-room/detail/27-02-2017-who-publishes-list-of-bacteria-for-which-new-antibiotics-are-urgently-needed>
- O'Neill, J.** (2016). Tackling drug-resistant infections globally: Final report and recommendations. *Review on Antimicrobial Resistance* (HM Government). Obtenido de [https://amr-review.org/sites/default/files/160518\\_Final%20paper\\_with%20cover.pdf](https://amr-review.org/sites/default/files/160518_Final%20paper_with%20cover.pdf)
- Penadés, J. R., Chen, J., Quiles-Puchalt, N., Carpena, N., & Novick, R. P.** (2015). Bacteriophage-mediated spread of bacterial virulence genes. Current opinion in microbiology, **23**, 171–178.
- Peng, Q., Fang, M., Liu, X., Zhang, C., Liu, Y. et al** (2020). Isolation and Characterization of a Novel Phage for Controlling Multidrug-Resistant *Klebsiella pneumoniae*. *Microorganisms*, **8**(4), 542.
- Patel, D. R., Bhartiya, S. K., Kumar, R., Shukla, V. K., & Nath, G.** (2019). Use of Customized Bacteriophages in the Treatment of Chronic Nonhealing Wounds: A Prospective Study. *The international journal of lower extremity wounds*, **1534734619881076**. Advance online publication.
- Salmond, G. P., & Fineran, P. C.** (2015). A century of the phage: past, present and future. *Nature reviews. Microbiology*, **13**(12), 777–786.
- Schooley, R. T., Biswas, B., Gill, J. J., Hernandez-Morales, A., Lancaster, J. et al** (2017). Development and Use of Personalized Bacteriophage-Based Therapeutic Cocktails To Treat a Patient with a Disseminated Resistant *Acinetobacter baumannii* Infection. *Antimicrobial agents and chemotherapy*, **61**(10), e00954-17.
- Singh A, Arutyunov D, Szymanski CM, Evoy S.** (2012). Bacteriophage based probes for pathogen detection. *Analyst*, **137**(15),3405-3421.
- Tagliaferri, T. L., Jansen, M., & Horz, H. P.** (2019). Fighting Pathogenic Bacteria on Two Fronts: Phages and Antibiotics as Combined Strategy. *Frontiers in cellular and infection microbiology*, **9**(22).
- Wyres, K. L., Wick, R. R., Judd, L. M., Froumine, R., Tokolyi, A et al** (2019). Distinct evolutionary dynamics of horizontal gene transfer in drug resistant and virulent clones of *Klebsiella pneumoniae*. *PLoS genetics*, **15**(4), e1008114.