

# REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA

## Terapia fágica como alternativa a la resistencia a antibióticos

**Paula Barco Güete**

Diplomada Universitaria de Farmacia en Facultad de Farmacia de Salamanca.

Farmacéutica Adjunta en la farmacia Fco. Javier Hernández Villarroel.

**Fecha recepción:** 19.01.2020

**Fecha aceptación:** 22.01.2021

### RESUMEN

Un virus es un microorganismo acelular que se replica en el interior de células hospedadoras y produce enfermedades, por ello, la mayoría de la población lo considera dañino, pero, ¿y si constituye una de las soluciones para otro problema que ha incrementado en la actualidad? La resistencia a antibióticos es una amenaza cada vez mayor para la salud pública, por tanto, es necesario buscar alternativas que controlen las enfermedades producidas por bacterias resistentes a múltiples fármacos (MDR). El empleo de fagos como alternativa a los antibióticos es una de ellas, veremos sus principales características, mecanismos, y los efectos que producen en su aplicación terapéutica.

Para el desarrollo del artículo, se ha realizado una revisión bibliográfica, con el fin de actualizar conocimientos de la terapia fágica como estrategia resurgida en los últimos años, a través de búsquedas en Google académico y bases de datos PubMed y Medline.

En múltiples ensayos relativos a MDR se muestra que al emplear fagos o cócteles de fagos contra dichas bacterias se consigue una reducción de la carga bacteriana y un incremento de la tasa de supervivencia en aquellos modelos que han sido tratados. Incluso se descubre una mejora en el efecto curativo al combinar fagos con antibióticos, abriéndose así un enfoque de terapia combinada útil.

La terapia fágica es una alternativa segura y eficaz a los antibióticos. Actualmente ya se conocen casos reales en los que su aplicación ha resultado exitosa, por tanto, aportan credibilidad y permiten considerarla un tratamiento óptimo contra MDR.

**Palabras clave:** virus, bacteriófagos, terapia, resistentes a los antibióticos.

### ABSTRACT

*A virus is an acellular microorganism that replicates inside host cells and produces diseases, so the majority of the population considers it harmful, but what if it is one of the solutions to another problem that has increased today? Antibiotic resistance is a growing threat to public health, therefore, it is necessary to look for alternatives that control diseases produced by multi-drug resistant bacteria (MDR). The use of phages as an alternative to antibiotics is one of them, we will see their main characteristics, mechanisms, and the effects they produce in their therapeutic application.*

*For the development of the article, a bibliographic review has been carried out, in order to update knowledge of phage therapy as a strategy resurfaced in recent years, through searches in academic Google and databases PubMed and Medline. Multiple MDR trials show that using phages or phage cocktails against these bacteria results in reduced bacterial load and increased survival rate in those models that have been treated. Even an improvement in the healing effect is discovered by combining phages with antibiotics, thus opening up a useful combination therapy approach.*

*Phage therapy is a safe and effective alternative to antibiotics. At present, there are real cases in which its application has been successful, thus providing credibility and allowing it to be considered an optimal treatment against MDR.*

**Keywords:** virus, bacteriophage, therapy, antibiotic-resistant.

### 1. INTRODUCCIÓN

La resistencia a antibióticos supone una amenaza cada vez mayor para la salud pública mundial. Sólo en 2015 las bacterias resistentes causaron 670.000 infecciones y 33.110 muertes (1.899 en España) y la OMS vaticina que serán 10 millones las personas fallecidas en 2050. Esto implica la búsqueda de alternativas para controlar enfermedades infecciosas causadas por bacterias donde el uso de antibióticos ya no es efectivo.

Un virus es un microorganismo acelular constituido por proteínas y ácidos nucleicos DNA o RNA, de cadena doble o sencilla, que es replicado en el interior de células hospedadoras y presenta dos estados diferentes: uno extracelular (virión) y otro intracelular. Los virus que infectan bacterias se llaman bacteriófagos o fagos.

Los fagos se caracterizan por su especificidad y eficacia, y los que matan bacterias patógenas podrían constituir una alternativa a los antibióticos. El 96% de los fagos conocidos pertenecen a tres familias: Myoviridae, Podoviridae y Siphoviridae, del orden de los Caudovirales. Morfológicamente son virus con cola y receptores para el reconocimiento bacteriano. En las familias Myoviridae y Siphoviridae son colas largas, contráctiles y no contráctiles, respectivamente; y en Podoviridae son colas cortas no contráctiles.

La historia de la terapia fágica se divide en cuatro períodos<sup>1</sup>:

1. Su descubrimiento se remonta a 1913 cuando el microbiólogo inglés Frederick Twort descubrió un agente bacteriolítico que infectaba y mataba bacterias, pero no supo definirlo. En 1917 fue el microbiólogo canadiense Félix d'Herelle quien anunció el descubrimiento de "un invisible antagonista microbiano del bacilo de la disentería", y afirmó que se trataba de un virus que denominó "bacteriófago".
2. Tras años de experimentos con resultados prometedores, se descubrieron características que dificultaban el uso terapéutico de los fagos, como su baja estabilidad, su neutralización por anticuerpos y su rápida eliminación por el sistema fagocítico mononuclear (MPS, conjunto de células derivadas de macrófagos y monocitos).
3. En la década de los 40, el descubrimiento de antibióticos y su uso generalizado en la segunda guerra mundial, junto con los problemas antes mencionados, relegó al olvido el uso clínico de los fagos en el mundo capitalista occidental. Sin embargo, los países del antiguo bloque soviético (Rusia, Georgia y Polonia) continuaron utilizándolos como tratamiento médico, destacando como centros de la época el Instituto Estatal de Vacunas y Sueros en Tbilisi (Georgia), y el Instituto Hirsfeld de Inmunología y Terapia Experimental (HIET) en Varsovia (Polonia).
4. Ante los recientes vaticinios de la OMS, se ha recuperado en la medicina occidental el interés por los fagos como alternativa a los antibióticos. Esto ha venido propiciado por el aumento en la frecuencia de infecciones bacterianas resistentes a múltiples fármacos y el extenso conocimiento actual sobre la biología de estos virus.

Tras el descubrimiento de la penicilina por Alexander Fleming en 1928 y el uso generalizado de antibióticos en la década de 1940, Fleming advirtió que el uso indebido de estos medicamentos podría dar lugar a bacterias resistentes a los mismos (Fleming, 1945)<sup>2</sup>. Los antibióticos fueron el origen del declive del uso de los fagos, y ahora son la principal causa de su resurgimiento.

El objetivo de este TFG es la revisión del uso terapéutico de los fagos como alternativa al actual problema de la multi-resistencia bacteriana a los antibióticos convencionales.

## 2. MATERIALES Y MÉTODOS

Con el fin de dar respuesta al objetivo planteado, se ha llevado a cabo una revisión bibliográfica utilizando artículos

**Tabla 1.** Conjunto de descriptores DeCS (Descriptores en Ciencias de la Salud)/MeSH (Medical Subject Headings) utilizados en la revisión bibliográfica.

| DeCS              | MeSHTerms             |
|-------------------|-----------------------|
| Bacteriófago      | Bacteriophages        |
| Terapia biológica | Biological Therapy    |
| Bacteria          | Bacteria              |
| Antibacterianos   | Anti-Bacterial Agents |

científicos a través de búsquedas en Google académico, y bases de datos PubMed y MedLine, empleando palabras clave como "phage", "therapy", "antibiotic-resistant", y los descriptores reflejados en la Tabla 1; o revistas como Nature Reviews Microbiology y otras de Springer Nature disponibles electrónicamente.

Para seleccionar los artículos incluidos en la revisión, se han usado los siguientes filtros:

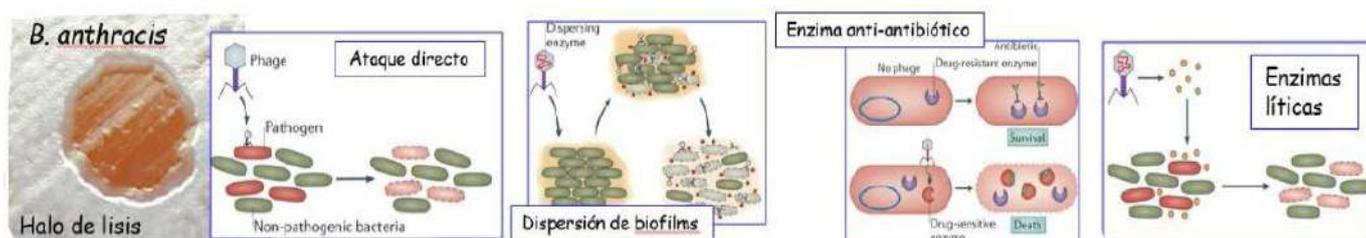
- Publicaciones de los últimos 5 años, generalmente.
- Referentes a fagos y a enfermedades causadas por bacterias resistentes a múltiples fármacos.
- En lengua inglesa y/o española.
- Todo tipo de estudios (revisiones, retrospectivos, prospectivos, comparativos, etc).

## 3. RESULTADOS

### Mecanismos y características de los fagos

Estos agentes antibacterianos poseen diversos mecanismos de acción: ataque directo, enzimas líticas, enzimas dispersantes, y enzima anti-antibiótico (Figura 1).

El ciclo de vida de un fago (Figura 2) puede ser lítico (CL) o lisogénico (CLSG), aunque únicamente los fagos líticos producen la eliminación eficaz de las bacterias. El CL se divide en cinco fases y el CLSG en cuatro: primero se produce la adsorción de fagos a la célula huésped mediante la unión a receptores específicos de la superficie bacteriana (1). Posteriormente, el fago inyecta el material genético en la bacteria mediante la contracción de la cola y la formación de un agujero en la pared celular (2). En el citoplasma, los genes fágicos se incorporan al DNA bacteriano, denominándose profago (3 en CLSG), permitiendo que la bacteria sobreviva (4 en CLSG), aunque puede perder la capacidad de producir biofilms; o se expresan y



**Figura 1.** Mecanismos de acción de los fagos. En la foto de la izquierda se ve un halo de lisis en un cesped de la bacteria *Bacillus anthracis* causado por un fago.

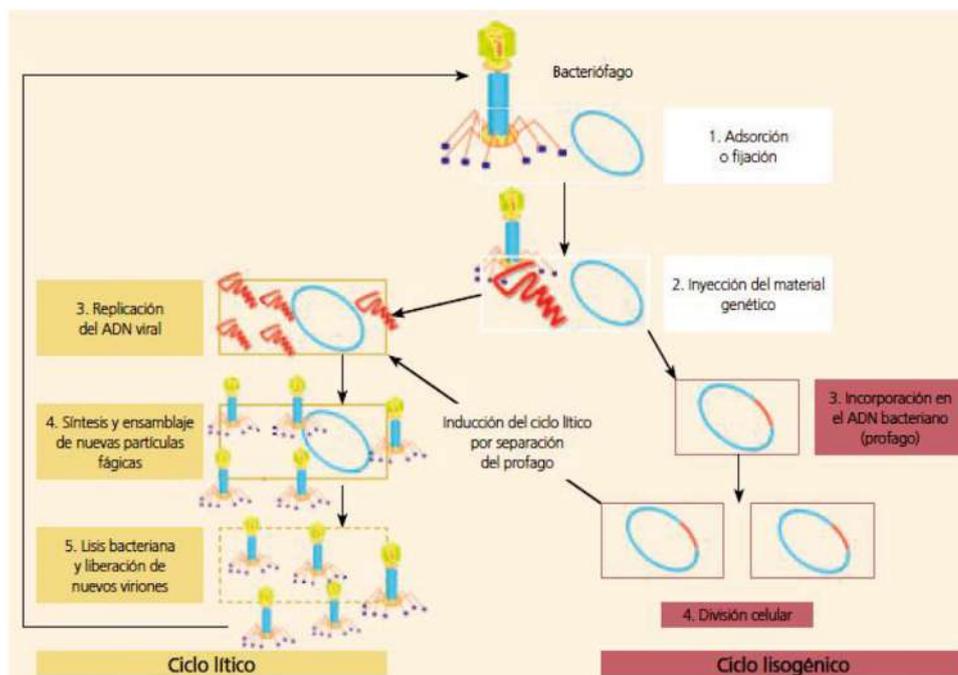


Figura 2. Esquema del ciclo de vida de un fago.

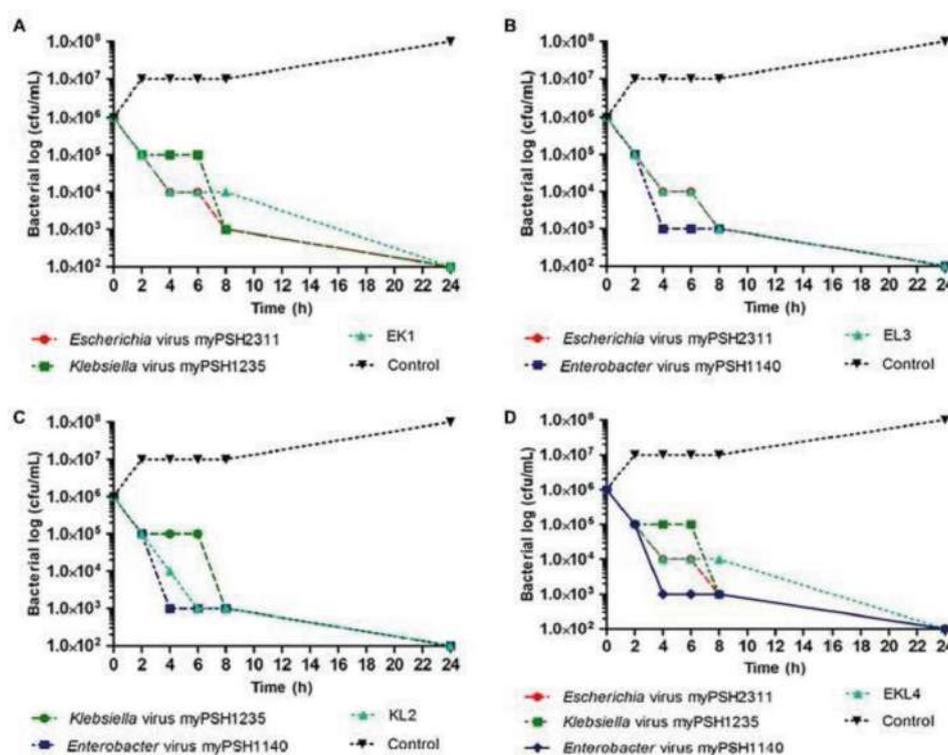
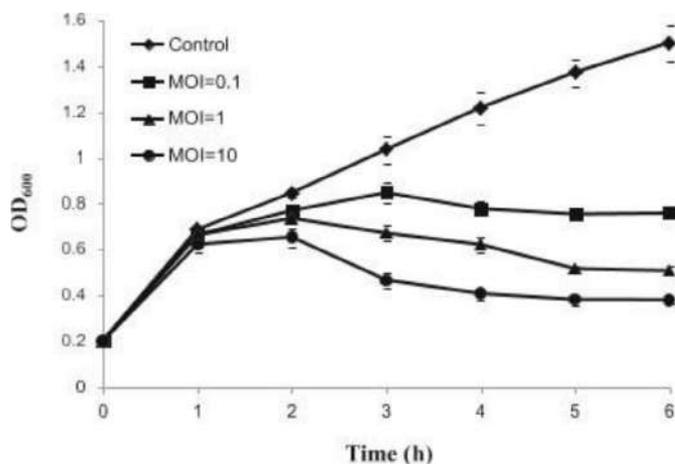


Figura 3. Combinaciones de fagos que forman los cócteles, y su actividad in vitro. A) Actividad myPSH2311 de Escherichia y myPSH1235 de Klebsiella, y su combinación (EK1); B) Actividad myPSH1235 de Klebsiella y myPSH1140 de Enterobacter, y su combinación (KL2); C) Actividad myPSH2311 de Escherichia y myPSH1140 de Enterobacter, y su combinación (EL3); D) Actividad myPSH2311 de Escherichia, myPSH1235 de Klebsiella, myPSH1140 de Enterobacter, y su combinación (EKL4).

la bacteria los replica originando varias copias del genoma vírico (3 en CL). Las proteínas estructurales de los nuevos viriones se ensamblan formando partículas fágicas (4 en CL), y finalmente tiene lugar la degradación de la pared bacteriana por acción de proteínas del fago (5 en CL), lo que ocasiona la lisis y liberación de la progenie viral<sup>3</sup>. La mayoría de fagos utiliza dos grupos de proteínas: holinas y endolisinas, que forman sistemas holin-lisina, causantes de la lisis. Las

enzimas líticas de los fagos también destruyen la pared bacteriana desde el interior, facilitando la liberación de la descendencia fágica<sup>4</sup>.

Las bacterias se protegen del ataque vírico mediante estrategias de defensa clasificadas en sistema inmune innato (toxina-antitoxina/infección abortiva) y adaptativo (sistema CRISPR-Cas)<sup>5</sup>. El primer mecanismo innato toxi-



**Figura 4.** Actividad lítica del fago Bφ-R2096 sobre *Acinetobacter baumannii*.

na-antitoxina consiste en inhibir la traducción del mRNA de la toxina [ej. ribonucleasa tipo III (ToxN) que destruye células infectadas por el fago] o inhibir directamente la proteína tóxica que, como resultado, impide la inhibición del crecimiento de la bacteria infectada. Para superar la defensa bacteriana y proseguir con su replicación, el fago utiliza dos estrategias: i) secuestrar la toxina y agregar a su propio genoma el gen que la codifica; o ii) producir una molécula (pseudo-ToxI), que mimetiza y neutraliza la antitoxina ToxI (ncRNA que se une a ToxN), y tras ello, las células bacterianas infectadas se autodestruyen, evitando que la infección se propague a otras células. Para conseguirlo, las bacterias utilizan un sistema denominado CBASS donde proteínas HORMA detectan la infección y estimulan una segunda proteína para activar una endonucleasa que destruye el genoma bacteriano y evita la replicación del fago<sup>6,7</sup>. Finalmente, el sistema CRISPR-Cas “Clustered Regularly Interspaced Short Palindromic Repeats” confiere inmunidad adaptativa a las bacterias, ya que captura los extremos libres del DNA cuando es inyectado por los fagos, deteniendo la infección posterior antes de que comience el CL. Se compone de dos partes: varias secuencias de DNA espaciadoras procedentes del fago, alternadas con secuencias repetidas (array CRISPR), y proteínas con actividad endonucleasa (Cas)<sup>8</sup>. El fago puede evitar esta inmunidad mediante activación de la replicación de su DNA (mecanismo denominado “protein priming”) o incorporando proteínas anti-CRISPR.

El empleo de fagos como alternativa a los antibióticos, empieza a ser una realidad en la búsqueda de terapias novedosas y eficaces contra las bacterias resistentes a múltiples fármacos (MDR).

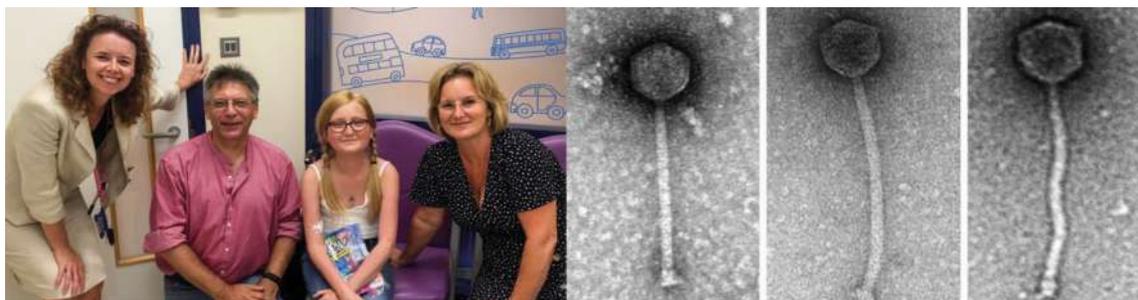
## Bacterias multirresistentes a antibióticos o MDR

La fagoterapia actualmente está ganando atención en clínica, porque las infecciones causadas por MDR son difíciles de tratar usando los antibióticos disponibles. De todas ellas, las más relevantes son: *Klebsiella pneumoniae*, *Staphylococcus aureus*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Acinetobacter baumannii*, *Mycobacterium* spp. y *Escherichia coli*, por lo que ahondaré en ensayos, todos ellos muy recientes, que demuestran que los fagos son una alternativa segura y eficaz a los antibióticos.

El uso generalizado de antibióticos ha supuesto la aparición de cepas de *K. pneumoniae* resistentes a carbapenem y productoras de β-lactamasas de espectro extendido. En 2019, se publicaron unos trabajos que describen ensayos con terapia fágica frente a dos de esas cepas de *K. pneumoniae*: en el primero<sup>9</sup> se evaluaron los efectos terapéuticos del fago lítico VTCCBPA43 (BPA43) en un modelo de ratón neumónico por vía intranasal, observándose que BPA43 produjo placas de lisis transparentes y circulares de 2-3 mm en *K. pneumoniae* MTCC109. En el segundo<sup>10</sup>, se prepararon cócteles de tres fagos (myPSH2311 de *Escherichia*, myPSH1235 de *Klebsiella* y myPSH1140 de *Enterobacter*) contra sendas bacterias resistentes a meropenem y colistina (Figura 3), obteniéndose una reducción en la carga bacteriana desde  $10^6$  a  $< 10^5$  UFC/ml en 2 h, hasta llegar a cero en 24 h. El fago myPSH2311 de *Escherichia* presentó actividad lítica contra el 73% de los aislados de *E. coli* y el fago myPSH1235 de *Klebsiella* contra el 52%. Por tanto, el fago BPA43 posee potencial terapéutico en el tratamiento de la bronconeumonía inducida por *K. pneumoniae* MDR; y los resultados del cóctel de fagos permiten considerarlos como terapia fágica efectiva.

En un trabajo de 2020, se aplica el fago lítico AB-SA01 sobre aislados clínicos de *S. aureus* meticilina resistentes (MRSA)<sup>11</sup>. En este ensayo, se administraron fagos intravenosos, en 50-100 ml de NaCl 0,9% durante 10-30 min dos veces al día durante 14 días, en 13 pacientes con infecciones severas de MRSA. Los fagos se aplicaron a una concentración de  $10^9$  unidades formadoras de placa (pfu) por ampolla de 1 ml. Las mediciones de cinética bacteriana y fagos en sangre sugieren que esta dosis aplicada 12 h puede ser una base racional para otros estudios que validen la eficacia de AB-SA01 frente a MRSA.

La terapia fágica contra *P. aeruginosa* se valora en un trabajo que utiliza fagos en infecciones por la cepa MDR *P. aeruginosa* PAO1 en un modelo de pez cebrá con fibrosis quística<sup>12</sup>. Se inyectaron 2 nl del cóctel de fagos, que con-



**Figura 5.** Isabelle Holdaway (segunda persona empezando por la derecha) y el cóctel de tres fagos anti *M. abscessus* GD01.

tenía aproximadamente 300-500 pfu/embrión de pez, en el saco vitelino de embriones infectados con PAO1, y se observó una reducción muy significativa en términos de letalidad embrionaria. El efecto curativo mejoró al combinar fagos y antibióticos, abriéndose un enfoque de terapia combinada útil que podría reducir en presencia de fagos las dosis de antibióticos y su tiempo de administración.

Si planteamos el uso de bacteriófagos contra infecciones por *A. baumannii*, consideramos dos artículos cuyos ensayos dan resultados efectivos y seguros: en el primero<sup>13</sup> se utilizó un cóctel de dos fagos (PBAB08 y PBAB25) que infectan cepas MDR de *A. baumannii* en un modelo de ratón con infección nasal. Los resultados mostraron que los ratones tratados presentaban una tasa de supervivencia 2,3 veces mayor que los no tratados, además de una reducción de 1/100 de bacterias en el pulmón; por tanto, el uso de cócteles es una opción potencial en intervenciones terapéuticas contra infecciones por *A. baumannii* in vivo. En el segundo estudio<sup>14</sup>, se utilizó el fago B $\phi$ -R2096 con actividad lítica sobre cepas resistentes a carbapenem, se caracterizó in vitro e in silico, y se evaluó la eficacia in vivo sobre la polilla de la cera *Galleria mellonella* y un modelo de ratón con neumonía aguda. Los resultados demostraron un aumento en la tasa de supervivencia de 0 a 50% en 24 h para las larvas de *G. mellonella*, y de 30 a 100% en los ratones. Aunque se trata de un fago recientemente conocido, tiene gran poder lítico (Figura 4) y es una opción de terapia fágica viable.

Finalmente, el éxito de la terapia fágica ya es una realidad, gracias a un ensayo muy reciente de la Universidad de Pittsburgh (USA), con una paciente de 15 años con fibrosis quística e infección diseminada por una cepa MDR *Mycobacterium abscessus* GD0115. Tras un doble trasplante de pulmón, Isabelle Holdaway fue tratada contra la cepa GD01 con un cóctel de fagos Muddy, ZoeJ y BPs, los tres de *Mycobacterium*, aplicados a una concentración de 10<sup>9</sup> pfu (Figura 5). Los resultados son, de momento, satisfactorios.

#### 4. DISCUSIÓN

Estos ensayos nos dan una idea de que la terapia fágica está en proceso de considerarse un tratamiento óptimo contra bacterias resistentes a antibióticos. Actualmente ya se conocen casos en los que su aplicación ha resultado exitosa y nos aportan credibilidad en esta vieja estrategia resurgida en los últimos años.

Cada vez hay más evidencias para creer que es posible frenar la MDR. El conocimiento que hoy tenemos de los fagos, de sus ciclos líticos y lisogénicos, de la manipulación de sus genomas, del desarrollo de modelos animales adecuados, de su administración y posología, y de las respuestas clínicas de los hospedadores a estos tratamientos, incrementa sin duda nuestra confianza. Es el momento de apostar por el uso de fagos en terapia clínica, la vida de muchos pacientes depende de ello.

#### BIBLIOGRAFÍA

1. Cisek AA, Dąbrowska I, Gregorczyk KP, Wyżewski Z. Phage therapy in bacterial infections treatment: one

hundred years after the discovery of bacteriophages. *Curr Microbiol* 2017; 74: 277-283.

2. Kortright KE, Chan BK, Koff JL, Turner PE. Phage therapy: a renewed approach to combat antibiotic-resistant bacteria. *Cell Host Microbe* 2019; 25: 219-232.
3. García Suárez P. Terapia fágica en animales de granja. *Albéitar* 2009; 131: 16-17.
4. García E, López R. Los bacteriófagos y sus productos génicos como agentes antimicrobianos. *Rev Esp Quimioterap* 2002; 15: 306-312.
5. Fineran PC. Resistance is not futile: bacterial 'innate' and CRISPR-Cas 'adaptive' immune systems. *Microbiol* 2019; 165: 834-841.
6. Qiaozhen Y, Lau RK, Mathews IT, Birkholz EA, Watrous JD, Azimi CS et al. HORMA domain proteins and a Trip13-like ATPase regulate bacterial cGAS-like enzymes to mediate bacteriophage immunity. *Mol Cell* 2020; 77: 709-722.
7. Lau RK, Qiaozhen Y, Birkholz EA, Berg KR, Patel L, Mathews IT et al. Structure and mechanism of a cyclic trinucleotide-activated bacterial endonuclease mediating bacteriophage immunity. *Mol Cell* 2020; 77: 723-733.
8. Starling S. Phage injection establishes CRISPR immunity. *Nat Rev Microbiol* 2017; 15: 255.
9. Anand T, Virmani N, Kumar S, Mohanty AK, Pavulraj S, Bera BC et al. Phage therapy for treatment of virulent *Klebsiella pneumoniae* infection in mouse model. *J Glob Antimicrob Resist* 2019; 21: 34-41.
10. Manohar P, Tamhankar AJ, Lundborg CS, Nachimuthu R. Therapeutic characterization and efficacy of bacteriophage cocktails infecting *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae* and *Enterobacter* species. *Microbiol* 2019; 10: 574.
11. Fabijan AP, Lin RCY, Ho J, Maddocks S, Ben Zakour NL, Iredell JR et al. Safety and tolerability of bacteriophage therapy in severe *Staphylococcus aureus* infection. *Nat Microbiol* 2020; 10: 1038.
12. Cafora M, Deflorian G, Forti F, Ferrari L, Binelli G, Briani F et al. Phage therapy against *Pseudomonas aeruginosa* infections in a cystic fibrosis zebrafish model. *Sci Rep* 2019; 9: 1527.
13. Cha K, Oh HK, Jang JY, Jo Y, Kim WK, Ha GU et al. Characterization of two novel bacteriophages infecting multidrug-resistant (MDR) *Acinetobacter baumannii* and evaluation of their therapeutic efficacy in vivo. *Microbiol* 2018; 10: 9: 696.
14. Jeon J, Jong-Hwan P, Yong D. Efficacy of bacteriophage treatment against carbapenem-resistant *Acinetobacter baumannii* in *Galleria mellonella* larvae and a mouse model of a cute pneumonia. *BMC Microbiol* 2019; 19: 70.
15. Dedrick RM, Guerrero-Bustamante CA, Garlena RA, Russell DA, Gilmour KC, Soothill J et al. Engineered bacteriophages for treatment of a patient with a disseminated drug-resistant *Mycobacterium abscessus*. *Nat Med* 2019; 25: 730-733.