



Bacteriófagos: aspectos generales y aplicaciones clínicas

Bacteriophages: general aspects and clinical applications

*Jhon Carlos Castaño Osorio**

RESUMEN

En este artículo se recopila la información publicada disponible respecto a la terapia con bacteriófagos, para así brindar al lector un documento de referencia en español para su consulta el cual incluye la definición, estructura morfológica, ciclo de vida de estos organismos, historia, alternativa a la antibiótico-resistencia, clasificación de los fagos, mecanismos de acción, implicaciones terapéuticas, ventajas y desventajas de esta terapia, así como el estado actual de la terapia con fagos. También se describen algunos ejemplos de utilización de fagos como en el control biológico de plagas en plantas e infecciones en animales, así como otras áreas de uso de los bacteriófagos, y se revisan los mecanismos de resistencia a los fagos, además del futuro de la terapia con bacteriófagos y termina con unas reflexiones finales de la fago terapia.

PALABRAS CLAVE: bacteriófagos, control biológico, resistencia bacteriana.

ABSTRACT

This article is an effort to gather publicly available information regarding therapy with bacteriophages in order to provide the reader with a reference document in Spanish for consultation, which includes the definition of bacteriophages, a description of their morphological structure, their life cycle, history, alternative use in bacterial drug resistance, classification, mechanisms of action, therapeutic implications, advantages and disadvantages of this therapy and the state of phage therapy. Some examples of the use phages are also included, such as their role in the biological control of plant pests and animal infections, among other areas. In addition, resistance mechanisms to paghes are also reviewed, together with the future of therapy with bacteriophages to conclude with some final thoughts on phage therapy.

KEYWORDS: bacteriophages, biological control, drug resistance.

* MD, Ph.D. Universidad del Quindío, Facultad Ciencias de la Salud, Grupo Inmunología Molecular (Gymol). Armenia, Colombia. Contacto: jhoncarlos@uniquindio.edu.co

Recepción: 20-01-2016. Aceptación: 03-10-2018

Cómo citar este artículo: Castaño-Osorio JC. Bacteriófagos: aspectos generales y aplicaciones clínicas. Hechos Microbiol. 2015;6(1-2):36-51.

BACTERIÓFAGOS

Los bacteriófagos, como su nombre lo indica, son virus que infectan exclusivamente a las bacterias, cuyo material genético puede ser RNA o DNA, el cual está rodeado por una envoltura proteica. Estos fagos necesitan de un huésped viable (bacteria) en cuyo interior se replican usando su maquinaria metabólica y de esta manera sintetizan su propio material genético y las proteínas de la envoltura.

Su tamaño oscila entre 20 y 200 nm, son ubicuos (están en todas partes) y los entes más abundantes de la biosfera, y se ha estimado que existen 10^{10} fagos/litro de agua de mar, lo que representa un excelente mecanismo de control de las bacterias marinas dado que destruyen una parte de esa población bacteriana.

Hay dos tipos de bacteriófagos, los líticos o virulentos, que infectan a las bacterias y las matan, y los lisogénicos o temperados, que establecen una relación simbiótica con la bacteria que ataca, que tienen un ciclo replicativo no lítico, es decir pueden convivir con ella e incluso pueden causar cambios fenotípicos en estas. Estos fagos se han aislado de muchas especies bacterianas, incluso de clamidias. La gama de hospederos, morfología, tamaño (20-2000nm) y estrategias de replicación son muy variadas.¹

El organismo humano, está acostumbrado al contacto con los fagos dado que son consumidos regularmente en los alimentos, por lo que son colonizadores habituales del intestino humano, el cual contiene aproximadamente 10^{15} bacteriófagos (el 'phageoma'), de aquí que no resulte extraño que los fagos no produzcan graves efectos inmunológicos sobre los animales. El phageoma individual varía dependiendo de la edad y salud de la persona, proporcionando así un biomarcador útil de la salud humana.^{2,3}

MORFOLOGÍA

Los bacteriófagos complejos poseen una cabeza de simetría icosaédrica que contiene el genoma, unido a ella se encuentra una estructura helicoidal denominada cola, la cual permite inyectar el genoma viral en la

bacteria hospedera. Según el tipo de fago, un disco se asocia a esta cola, al cual se encuentran unidas fibras flexibles de tipo proteico que permiten que este se fije a la superficie de la bacteria y se produzca la inyección del genoma en su citoplasma. Los fagos de la serie T par son ejemplos típicos (Fig. 1).⁴

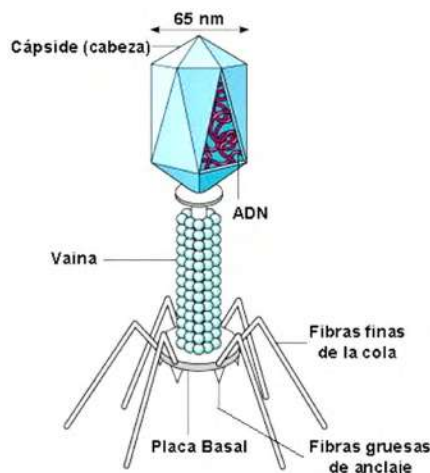


Figura 1. Aspectos estructurales de un bacteriófago T

Fuente: adaptado de Norkin.⁵

Uno de los fagos más ampliamente estudiados es el bacteriófago T4; el cual presenta una estructura en forma de renacuajo, compuesta por una cabeza, cuello y cola; los cuales median la adherencia del fago a la superficie de las células hospederas. Las fibras de las colas de los fagos, se unen específicamente a moléculas receptoras de lipo-polisacáridos presentes en el exterior de la membrana de la célula bacteriana hospedera. Esta unión desencadena una serie de cambios conformacionales de las fibras mencionadas que permiten la inyección del material genético: la funda exterior de la cola y el agujero en el centro se dilatan, y se da la contracción de la vaina del tubo a través del orificio en la base del disco, lo que permite la inserción de su genoma a través de la pared celular de la bacteria hospedera; dicho proceso está probablemente facilitado por una enzima viral (una lisozima), que facilita la incorporación de la cola del fago por la degradación de la parte exterior de la pared celular⁵ (Fig. 2).

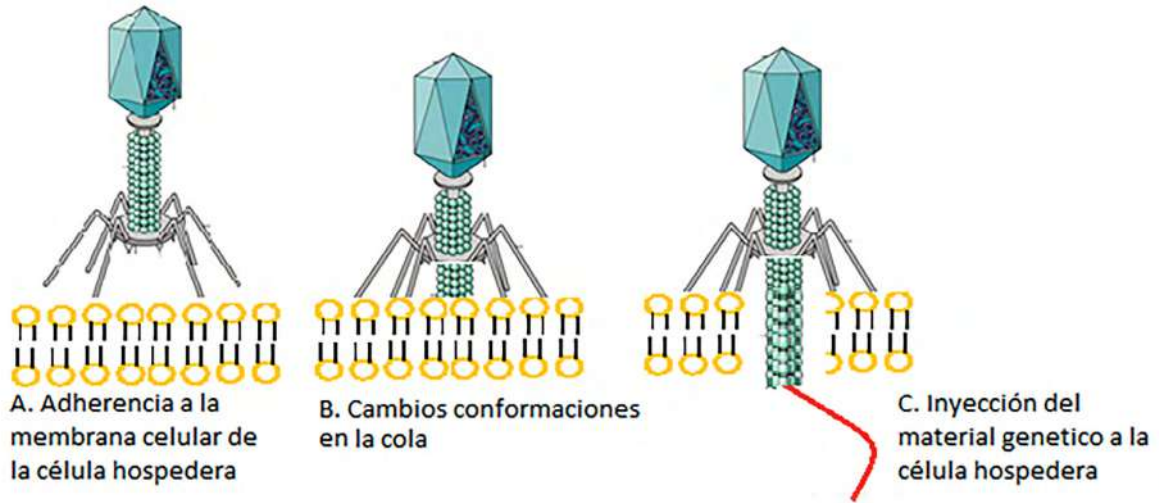


Figura 2. Fases de adherencia e inyección del material genético a la bacteria hospedera

Fuente: adaptado de Norkin.⁵

CICLO DE REPLICACIÓN

El ciclo de replicación del bacteriófago T4 es el siguiente (Fig. 3):

1. Adsorción o acoplamiento.
2. Inyección del material genético viral.
3. Replicación del material genético viral.
4. Síntesis de las envolturas proteicas.
5. Empaquetamiento del DNA dentro de la envoltura proteica y ensamblaje de la envoltura.
6. Lisis y liberación de las partículas viral.

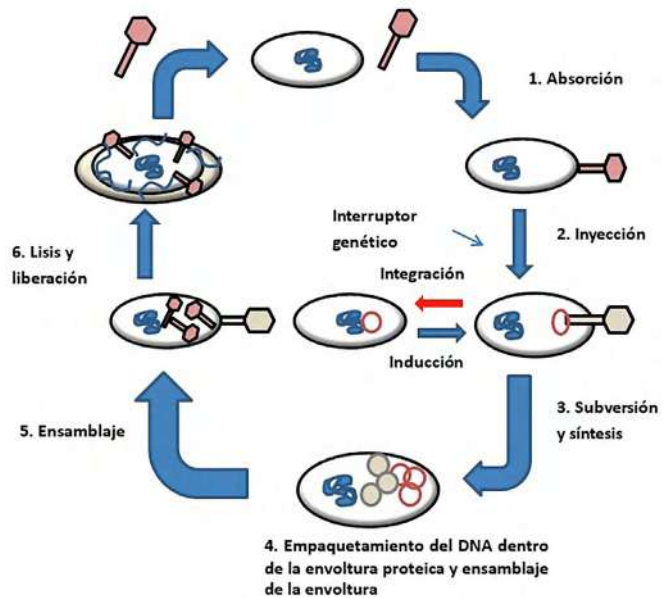


Figura 3. Ciclo de replicación del fago T4. Como se puede observar cuando se da la activación de un interruptor genético, los fagos pueden tomar dos rutas, la de integración al genoma bacteriano, estableciéndose el ciclo lisogénico; o la ruta de la inducción, estableciéndose el ciclo lítico

Fuente: adaptado de Sturino & Klaenhammer.⁶

HISTORIA

En 1913, el bacteriólogo británico Frederick Twort descubrió un agente bacteriolítico que infectaba y mataba a las bacterias, pero no fue capaz de saber qué era exactamente dicho agente. Independientemente, el microbiólogo canadiense Félix d'Herelle, anunció el 3 de septiembre de 1917 su descubrimiento de “un microorganismo invisible que antagonizaba al bacilo de la disentería”, al cual llamó *bacteriófago*.

Entre los años 20's y 30's, d'Herelle y otros investigadores, usaron inicialmente la fago terapia; Eli Lilly & Company, vendieron “Staphylo jel”, y otro fago “Jel labeled” para el tratamiento de infecciones por *Streptococcus* y por coliformes; E.R. Squibb & Sons y la división Swan-Myers de Laboratorios Abbott hicieron preparaciones de filtrados de bacteriófagos de *Staphylococcus*, y combinaciones de filtrados de bacteriófagos de *Staphylococcus* spp. y bacilos coliformes.

Con el descubrimiento de los antibióticos en 1940 en EEUU y Europa, desapareció el entusiasmo inicial de la terapia con fagos para las infecciones bacterianas; sin embargo, continuó en la Unión Soviética y permanece hoy en la República Soviética de Georgia. La terapia fágica es usada extensamente para el tratamiento de infecciones en países de la ex Unión Soviética, especialmente en unidades de cuidado intensivo pediátrico, unidades de quemados y hospitales quirúrgicos. La preparación de fagos se hacía a escala industrial, empleando a más de 1200 personas antes de la ruptura de la URSS. Toneladas de tabletas, preparaciones líquidas y sprays conteniendo mezclas cuidadosamente formuladas de fagos para la terapia y profilaxis se distribuyeron en la Unión Soviética cada año (para un grupo selecto de médicos). Los fagos, se usaron comúnmente en los hospitales, para el tratamiento tanto de infecciones primarias como las infecciones asociadas a la atención en salud, ellos jugaron un papel particularmente importante cuando se encontraron organismos resistentes a los antibióticos. Los militares fueron un fuerte soporte para la investigación y el desarrollo de la terapia fágica, pues los usaron en el tratamiento de quemaduras y en la prevención de epidemias debilitantes por bacterias gastrointestinales en las tropas.^{7,8}

La emergencia de bacterias patógenas resistentes a los antibióticos disponibles constituye un proble-

ma crítico de la medicina moderna y el incremento concomitante de los pacientes inmunodeprimidos, ha permitido el resurgimiento de la era “preantibiótica” y el desarrollo de alternativas anti-infecciosas con el apoyo de la medicina moderna y la biotecnología. De acuerdo con Ackermann *et al.*⁹ el periodo actual de la historia de los fagos (1965-a hoy) se caracteriza por la diversificación de la investigación de los fagos: descubrimiento de nuevos fagos y nuevas familias y el desarrollo de una taxonomía. Al menos 5.500 fagos se conocen actualmente, incluyendo fagos para las cianobacterias y arqueas. Los campos de investigaciones más importantes son sobre su morfología, ensamblaje, estructura tridimensional, secuenciamiento del genoma y genómica, evolución, su papel en la patogénesis bacteriana, papel de los fagos en la industria láctea, aplicaciones prácticas (como indicadores de la contaminación fecal con bacterias, en biotecnología, en aplicaciones como “phage display” y la terapia fágica); y ecología propia.⁹

Desde su descubrimiento, los bacteriófagos han contribuido enormemente a nuestra comprensión de la biología molecular, como un sistema modelo; además, han proporcionado muchas herramientas para el avance de los campos de la ingeniería genética y la sintética. La preocupación por el arsenal, cada vez menor, de antibióticos para el tratamiento de bacterias resistentes como *Mycobacterium tuberculosis*, también han dado lugar a un renacimiento en el estudio de los fagos y el desarrollo de terapias alternativas.¹⁰

CLASIFICACIÓN

Los bacteriófagos como todos los virus se clasifican de acuerdo al tipo de material genético que contienen (DNA de cadena simple —ssDNA— o doble —dsDNA—, RNA de cadena simple —ssRNA— o doble —dsRNA—). Y se han agrupado en las siguientes familias¹¹ (Fig. 4):

Corticoviridae: capsíde icosaédrica, envueltos por una cubierta lipídica, dsDNA superenrollado.

Cystoviridae: capsíde icosaédrica, envueltos por una cubierta lipídica, tres moléculas de dsRNA lineal.

Fuselloviridae: pleomórfico, envueltos por una cubierta lipídica, sin capsíde, dsDNA circular superenrollado.

Inoviridae (genus Inovirus): largos filamentos con simetría helicoidal, ssDNA circular.

Inoviridae (genus Plectrovirus): bastones cortos con simetría helicoidal, ssDNA circular.

Leviviridae: capsíde cuasi icosaédricas, una molécula de ssRNA lineal.

Lipothrixviridae: filamentos envueltos por una cubierta lipídica, dsDNA lineal.

Myoviridae, A1: cola contráctil, cabeza isométrica.

Myoviridae, A2: cola contráctil, cabeza alargada (longitud / ancho ratio = 1,3-1,8).

Myoviridae, A3: cola contráctil, cabeza alargada (longitud/ancho = 2 o más).

Plasmaviridae: pleomórfico, envueltos por una cubierta lipídica, sin cápside, dsDNA circular superenrollado.

Microviridae: capsíde icosaédrica, ssDNA circular.

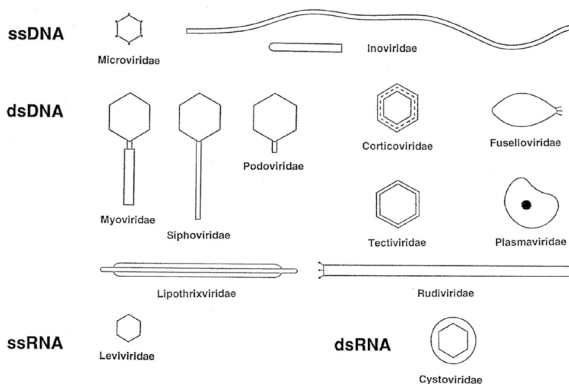


Figura 4. Familias de bacteriófagos

Fuente: tomado de Ackerman.¹²

MECANISMOS DE ACCIÓN

Los bacteriófagos (fagos) como ya se mencionó son virus que infectan bacterias.⁴ Son específicos, es decir que cada uno reconoce un receptor diferente que le permite adherirse a estas; tienen tropismo únicamente por bacterias, no pueden unirse ni infectar células eucariotas. Los bacteriófagos utilizados en la terapia fágica, se replican usando el ciclo lítico, es decir, el

bacteriófago primero se adhiere a un receptor específico en la célula bacteriana, y a continuación, inyecta su DNA o RNA en la bacteria mediante la liberación de una lisozima del fago a través de su cola, la cual degrada una porción de la pared celular, esto permite que la vaina de la cola entre en contacto y empiece su introducción a través de la membrana bacteriana, mientras el ácido nucleico es liberado y entonces empieza la biosíntesis del ácido nucleico viral por parte de la bacteria hospedera. Igualmente, el DNA de la bacteria hospedera es degradado y se detiene la síntesis de proteínas bacterianas, gracias a que el DNA o RNA del fago toma el control de la célula bacteriana, utilizando los nucleótidos y enzimas de replicación de la bacteria, para replicar su genoma. Después de esto, el fago utiliza la maquinaria de la célula para producir las proteínas virales, que sucede exactamente de la misma manera como si la célula bacteriana estuviera haciendo sus propias proteínas, pero solo el RNA viral se transcribe ahora, y no el de la bacteria. El genoma del fago y la cápside del virus se ensamblan, las lisozimas sintetizadas dentro de la célula bacteriana rompen la pared y permite la liberación de los nuevos virus. La célula bacteriana muere, mientras que los virus recién producidos pueden infectar otras células.^{13,14}

IMPLICACIONES TERAPÉUTICAS

Dada la creciente crisis de la resistencia a los antibióticos, se crea la necesidad de realizar un esfuerzo coordinado por parte del sector de la salud pública para evaluar el potencial de la terapia con fagos como un complemento de los antibióticos.¹⁵ Actualmente, las aplicaciones de los bacteriófagos, presentan una gran diversidad que van desde su uso terapéutico para enfermedades infecciosas como vectores de genes para enfermedades de diversa índole como las enfermedades neurodegenerativas (utilizándolos como componentes estructurales para el empaquetamiento del material genético de los cósmidos), así como biomarcadores del estado de salud/enfermedad y a su vez utilizados como reporteros de la diversidad microbiana y el control de la microbiota intestinal, entre otros (Fig 5).²

El intestino humano contiene aproximadamente^{10,15} bacteriófagos los cuales son tan diversos como la microbiota presente en el intestino, dado que estos microorganismos hacen parte de los mecanismos que mantienen la homeostasis bacteriana en este órgano gracias a su especificidad por cada una de las especies bacterianas residentes en el tracto gastrointestinal. Los bacteriófagos, por muchos años, se han utilizado para el tratamiento de infecciones bacterianas, pero recientemente se ha aprobado su uso para disminuir la carga bacteriana en la cadena alimenticia. El “phagenoma”

individual varía dependiendo de la edad, y estado de salud de la persona, por lo que su análisis se constituye en un biomarcador útil del estado de salud y se puede pensar en la posible intervención de la microbiota intestinal por medio de la terapia con fagos (Fig. 5-7).^{2,3}

La búsqueda de alternativas para el tratamiento de bacterias multiresistentes a muchos de los antibióticos utilizados en la actualidad ha hecho resurgir el interés en la fago terapia como estrategia para el control de patógenos (Fig. 5).

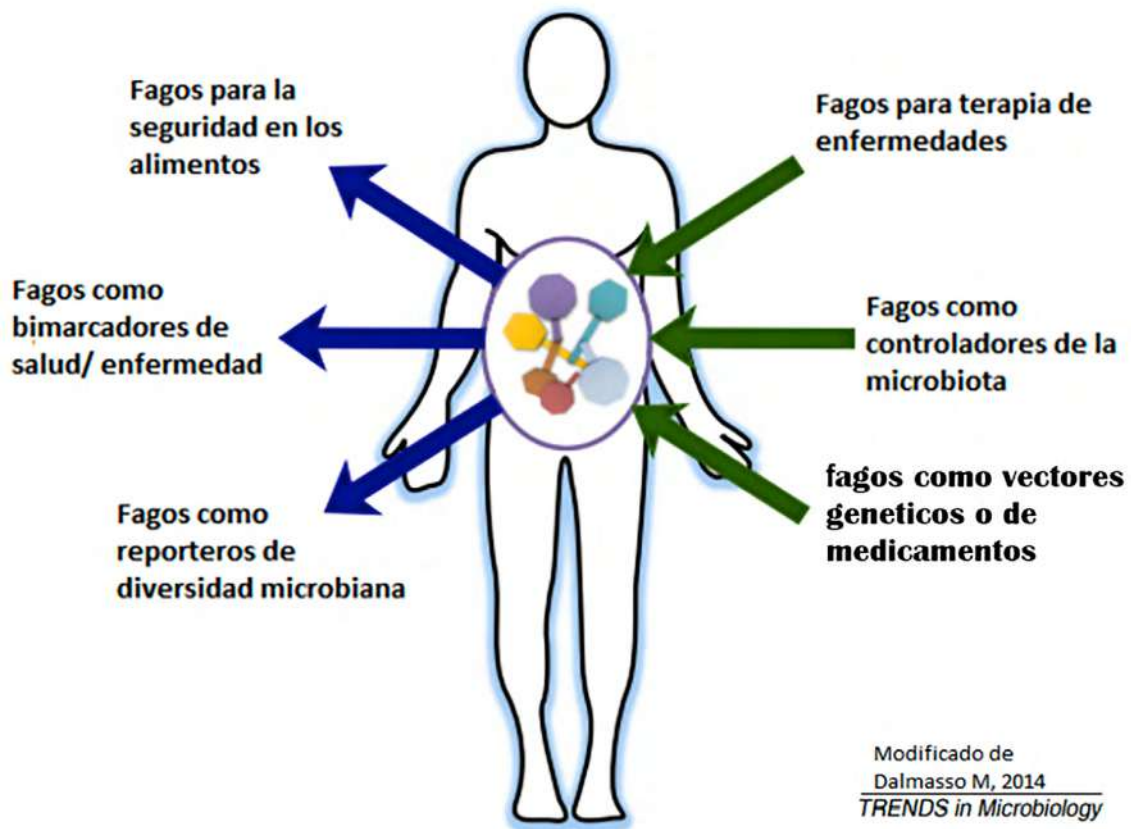


Figura 5. Aplicaciones potenciales de los bacteriófagos en la salud humana

Fuente: modificado de Dalmasso et al.²

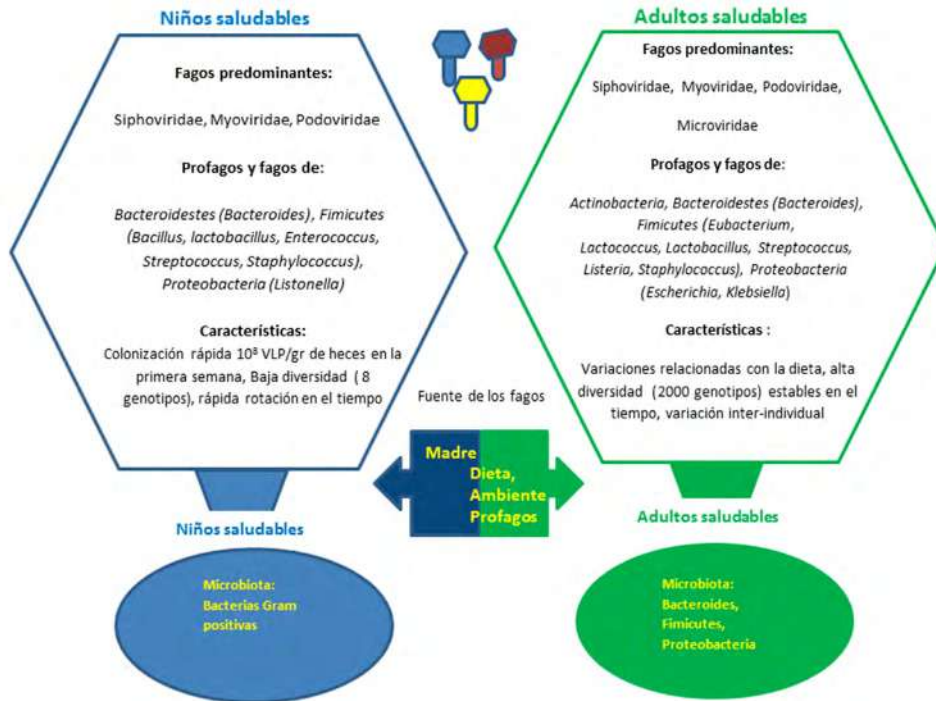


Figura 6. Relación entre los fagos y la microbiota en niños (izquierda) y adultos (derecha) saludables

Fuente: tomado y adaptado de Dalmaso et al.²

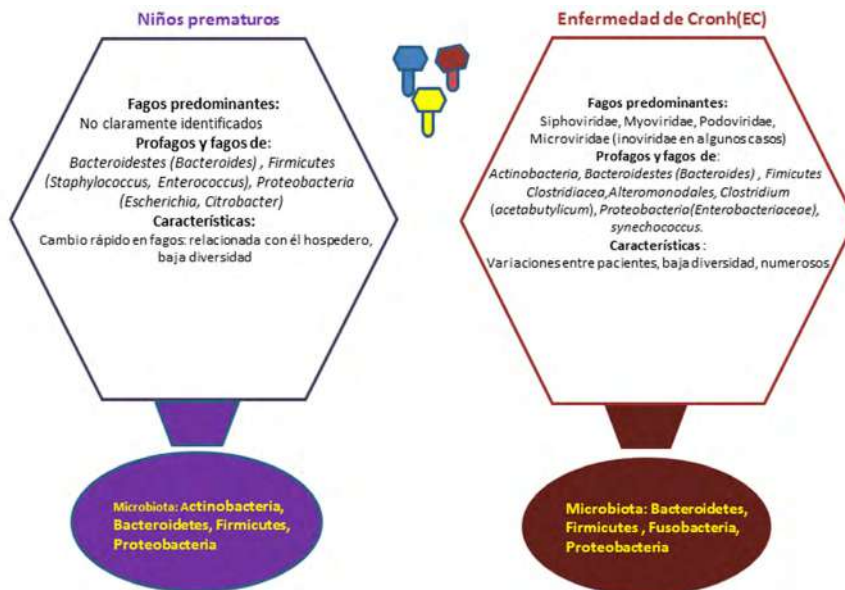


Figura 7. Relación entre los fagos y la microbiota en niños prematuros (izquierda) y pacientes con enfermedad de Cronh (EC) (derecha)

Fuente: tomado y adaptado de Dalmaso et al.²

Entre las potenciales ventajas del uso de fagos respecto a los antibióticos pueden citarse:¹⁶

- La alta especificidad de infección.
- Un mecanismo de acción totalmente diferente al de los antibióticos, lo que hace a los fagos efectivos incluso frente a bacterias resistentes a múltiples antibióticos.
- Una farmacocinética tal que la dosis inicial de fagos se incrementa exponencialmente al alcanzar el foco de la infección.
- La habilidad de los fagos de mutar como respuesta ante la aparición de bacterias resistentes a la infección.

Kittler *et al.*¹⁷ plantean que, considerando estas características biológicas, la aplicación de fagos como herramienta natural es un enfoque futuro realista, para mejorar la salud humana y animal, así como para reducir la carga de fármacos en el medio ambiente a largo plazo y en beneficio de las generaciones futuras. Los fagos se deben utilizar en lugar de los medicamentos antimicrobianos, siempre que sea posible.

DESVENTAJAS

Una de las principales desventajas de los fagos fue descrita por Subirats *et al.*¹⁸ quienes mediante un análisis metagenómico encontraron la presencia de genes de resistencia a los antibióticos en bacteriófagos aislados de aguas residuales de un hospital en Girona, España; hallazgos que corroboran el papel de los bacteriófagos como reservorios de genes de resistencia y así poner de relieve la necesidad de incluirlos en futuros estudios sobre la aparición y propagación de la resistencia a los antibióticos en el medio ambiente.

ESTADO ACTUAL DE LA TERAPIA CON FAGOS:

Actualmente se dispone de medios adecuados para conseguir preparaciones de fagos altamente purificadas, y los países occidentales han comenzado a mirar con cierto interés el empleo de los fagos en la terapia clínica y en el tratamiento de los alimentos para evitar las infecciones bacterianas transmitidas por estos.¹⁹ Así, cabe citar su uso para el control de la bacteria *Escherichia coli* 0157, asociada con la producción de colitis hemorrágicas; además se han usado fagos en ensayos animales infectados con *Enterococcus* alta-

mente resistentes a la vancomicina, el antibiótico que representa el último recurso en infecciones asociadas a la atención en salud. También se han utilizado con éxito en la prevención de infecciones por *Pseudomonas* en quemados. Los fagos en estos casos se administraron tópicamente o por vía oral previo tratamiento de los pacientes con antiácidos y gelatina para así proteger a los fagos de la acidez gástrica. Se ha verificado que los fagos usados por esta vía llegan al torrente sanguíneo, lo que podría tener implicaciones en el reconocimiento de estos por el sistema inmunológico del hospedero.^{20,21}

La terapia fágica, es decir, el uso de bacteriófagos para combatir infecciones, se ha aplicado satisfactoriamente como una alternativa a los antibióticos en numerosos países de la antigua Unión Soviética, cuyos médicos disponen de una experiencia clínica de más de 80 años en el uso de estos.²² En sus centros de investigación se siguen produciendo en la actualidad preparaciones fágicas para el tratamiento de diversas enfermedades.⁷

Ghang *et al.*²³ en Japón aislaron dos tipos de bacteriófagos específicos para *Pseudeomonas plecoglossicida*, el agente bacteriano causal de la ascitis hemorrágica en cultivos de peces ayu (*Plecoglossus altivelis*), uno de los bacteriófagos se clasificó como miembro de la familia *Myoviridae* y el otro de la familia *Podoviridae*. En los peces que se alimentaron con comida impregnada con los fagos, se observó como resultado la protección contra la infección experimental con *Pseudeomonas plecoglossicida*, las bacterias rápidamente desaparecían de las células renales de los peces alimentados con comida mezclada con fagos y retados con estas bacterias, efecto que no se observó en los peces que no recibieron los fagos en el alimento. Adicionalmente, se observó un menor crecimiento bacteriano en las aguas tratadas con los fagos. Estos resultados sugieren la posibilidad de utilizar estos fagos en el control de la enfermedad causada por *Pseudeomonas plecoglossicida*.²³ Ronda *et al.*²⁴ en 2003 reportaron los efectos protectores de los fagos PLgY y PLgW frente a la infección por *Lactococcus garvieae* en peces jóvenes infectados experimentalmente con esta bacteria. Se observó una supervivencia del 100% de los peces inoculados con los fagos. En los peces tratados con fagos por vía peritoneal, incluso varias horas después de la infección con *L. garvieae*, se constató un efecto protector. Asimismo, se observaron resultados positivos

cuando se utilizó la vía oral para suministrar los fagos mediante alimentos impregnados con los mismos, siendo detectados estos fagos en el bazo e intestino de los peces después de 48 horas.²⁴

De igual manera, Wang *et al.*²⁵ observaron que la inoculación de ratones con altas dosis del bacteriófago ØA392 no producían efectos adversos y estos fagos protegieron a los animales de la infección por *Pseudomonas aeruginosa* resistente al imipenem (IMPR-Pa), y sugieren que la terapia con fagos puede ser potencialmente utilizada como una terapia independiente para pacientes con infecciones por IMPR-Pa.²⁵ Capparelli *et al.*²⁶ en 2007 reportaron el uso efectivo del bacteriófago M^{sa} contra *Staphylococcus aureus*, incluyendo cepas metilino resistentes, en ratones, logrando la eliminación completa de estas bacterias. García *et al.*²⁷ encontraron una eficacia antimicrobiana de los fagos Φ H5 y Φ A72 en leche contaminada con *Staphylococcus aureus* a la que se añadió una mezcla de ambos fagos. En ausencia de fagos, la bacteria patógena se multiplicó en la leche alcanzando más de 10⁸ células/ml tras ocho horas de incubación. Sin embargo, en presencia de los fagos Φ H5 y Φ A72, el patógeno desaparece tras dos horas de incubación.²⁷ Goldman *et al.*²⁸ lograron la inhibición de la formación de biopelículas bacterianas en membranas de ultrafiltración utilizando bacteriófagos específicos. Janež *et al.*²⁹ reportaron el uso de bacteriófagos para el control de *Campylobacter* spp. tanto a nivel del campo como en los alimentos procesados, pero aún se requiere caracterizar mejor los fagos y la realización de experimentos *in vivo* necesarias para llevar de la teoría a la práctica esta posibilidad. Akhtar *et al.*³⁰ aislaron una serie de bacteriófagos líticos contra serovariedades de *Salmonella entérica* a partir de muestras de estiércol de los cerdos, las deyecciones ganaderas y aguas residuales para utilizarlos en el control de una amplia variedad de *Salmonellas* en diferentes matrices. Shivshetty *et al.* en el 2014, reportaron el uso de bacteriófagos para el tratamiento de *P. Aeruginosa* multiresistente, observando que una dosis única intraperitoneal en ratones con 3x10⁹ UFP/ml de fagos GNCP, mostró una protección eficiente frente a la bacteriemia, tanto en ratones diabéticos (90%) como en no diabéticos (100%) y fue más efectivo que múltiples dosis de imipenem. Estos resultados ratifican la eficacia de la terapia de fagos contra las infecciones por *P. aeruginosa*, especialmente en casos de hospederos inmunodeficientes.²⁰

UN EJEMPLO DE UTILIZACIÓN DE FAGOS EN EL CONTROL BIOLÓGICO DE PLAGAS EN PLANTAS E INFECCIÓN EN ANIMALES

Trabajos realizados por Fujiwara *et al.*³¹ sobre el control de *Ralstonia solanacearum* la cual fue tratada con tres fagos líticos: φRSA1, φRSB1 y φRSL1, reportan que el uso de φRSA1 y φRSB1, ya sean solos o en combinación con los otros fagos, se tradujo en un rápido descenso en la densidad de la célula huésped bacteriana. Las células de *Ralstonia solanacearum* infectadas solamente con el fago φRSL1, se mantuvieron a una densidad celular más baja (1/3 comparado con el control) durante un largo período. El pretratamiento de las plántulas de tomate con el fago φRSL1 limitó drásticamente el crecimiento y diseminación de *Ralstonia solanacearum* en las raíces inoculadas con esta bacteria. Todas las plantas de tomate tratadas con el fago φRSL1 no mostraron síntomas de marchitamiento durante el período experimental, mientras que todas las plantas no tratadas se habían marchitado a los 18 días después de la infección. El fago φRSL1 ha demostrado ser relativamente estable en el suelo, especialmente a altas temperaturas (37 a 50 °C). Partículas activas de φRSL1 fueron recuperadas de las raíces de las plantas tratadas y del suelo después de 4 meses de la inoculación.³¹

Lee *et al.*³² observaron que cuando se incluyó en la dieta una combinación de bacteriófagos específicos contra *Escherichia coli* (k88, k99 y f41) y *Clostridium perfringens* tipos A y C obtenidos de una compañía comercial de alimentos (CTCBIO Inc., Seoul, Republic of Korea), se dio una reducción en las poblaciones de *Clostridium* spp. y coliformes totales, así como un aumento de *Lactobacillus fecal* en las heces de los lechones lactantes; sin embargo, durante el periodo del estudio no hubo un efecto positivo en el tamaño de los animales.

Hoang *et al.*³³ en Japón, reportaron una buena efectividad, evidenciada por la disminución de varios logaritmos en el número de unidades formadoras de colonias, cuando usaron el cóctel de fagos PBL66 - CL1 y PBL116-CS6 para el control de *E. coli* productoras de beta-lactamasa de espectro extendido (ESBL) aisladas de carnes crudas de pollo.

OTRAS ÁREAS DE USO

Los fagos a nivel experimental han contribuido con el avance de la biología molecular y han impulsado múltiples desarrollos biotecnológicos, como su utilización en la nanotecnología. Además, son una herramienta para enfrentar el problema de la emergencia de bacterias resistentes a los antibióticos.³⁴

Desde 2006, la Agencia de Alimentos y Medicamentos de los Estados Unidos (en inglés, Food and Drug Administration —FDA) y el Departamento de Agricultura de los Estados Unidos (en inglés, United States Department of Agriculture —USDA) han aprobado varios productos con bacteriófagos. Intralytix introdujo LMP-102, también llamado ListShield como aditivo alimentario dirigido a la eliminación de *Listeria monocytogenes*. LMP-102 fue aprobado para el tratamiento de productos de aves de corral y carnes. En ese mismo año, la FDA aprobó LISTEX de la compañía MICREOS que es un preparado de bacteriófagos para eliminar la bacteria *L. monocytogenes*, del queso. En julio de 2007, el mismo bacteriófago fue aprobado para su uso en todos los productos alimenticios. En 2011 el USDA confirmó LISTEX como seguro. La investigación en el campo

de la seguridad alimentaria está en marcha para determinar si los fagos líticos son una opción viable para el control de otros patógenos transmitidos por los alimentos en varios productos alimenticios.¹⁶

Las agencias gubernamentales en Occidente desde hace varios años acuden a Georgia y la ex Unión Soviética en busca de ayuda en la explotación de los fagos para contrarrestar armas biológicas y toxinas, como el ántrax y el botulismo. Otros usos incluyen la aplicación por pulverización en la horticultura para la protección de la descomposición y la propagación de la enfermedad bacteriana de plantas y productos vegetales procedentes, así como su uso para aumentar la seguridad microbiológica en el procesamiento de alimentos a nivel industrial³⁵ (Fig. 8). Otras aplicaciones para los bacteriófagos incluyen su uso como biocidas para superficies ambientales, por ejemplo, en hospitales; y como tratamientos preventivos para catéteres y dispositivos médicos antes de su uso en el ámbito clínico. La tecnología de fagos que se aplicarán a las superficies secas, por ejemplo, uniformes, cortinas, o incluso suturas de cirugía;³⁶ como se puede observar en la tabla 1 existen actualmente varias compañías dedicadas a la investigación y comercialización de fagos para diferentes aplicaciones.³⁷

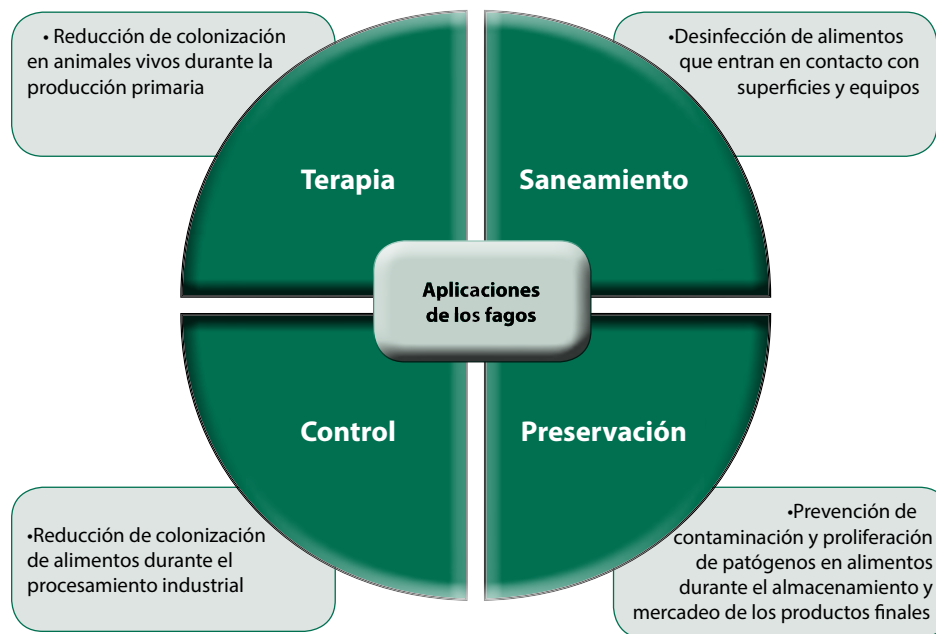


Figura 8. Posibles aplicaciones de los fagos para incrementar la seguridad de los alimentos a lo largo de la cadena alimenticia

Fuente: tomado de Sillankorva *et al.*³⁵

Tabla 1. Selección de compañías productoras de fagos terapéuticos **Compañía (localización)**

	Enfoque	Web	Año de Fundación
Biophage Pharma (Montreal, Canada)	Cáncer, infecciones/ modulación de la inflamación e inmunidad. <i>E.coli</i> así como <i>Salmonella typhimurium</i> en el ganado y carne de canales	http://www.biophage.com/	1995
Enzobiotics/New horizons diagnostics (Columbia, MD, USA)	Enzima Lysin derivada de fagos como agente diagnóstico y terapia tópica	http://www.nhdiag.com/	2003
Exponential biotherapies (Port Washington, NY, USA)	Estudio clínico fase 1 de Fagos contra bacterias resistentes a Vancomicina (VRE) y contra <i>Staphylococcus</i> metilino resistente (MRSA) y biodefensa	http://www.expobio.com/	1994
GangaGen (Bangalore, India, San Francisco, CA, USA; Ottawa, Canada)	Fagos no líticos para uso en terapia humana; aplicaciones en agricultura/medio ambiente	http://www.gangagen.com/	2000
Hexal Gentech (Holzkirschem, Alemania)	Fagos como paquetes para entregar plásmidos letales a bacterias blanco	http://www.hexal-gentech.com/	1998
Intralix (Balminore, MA, USA)	Fagos para el ambiente, procesamiento de alimentos y aplicaciones médicas	http://www.intralix.com/	1998
MicroStealth Technologies (Cambridge, MA, USA)	Fagos como vehículos de péptidos antimicrobianos	N/A	2002
Phage Biotech (Tel Aviv, Israel)	Tecnología de bacteriófagos líticos para aplicaciones clínicas, veterinarias, agrícolas, industriales y ecológicas	http://www.phage-biotech.com/	2001
Phage Therapeutic (Bothell, WA, USA)	Fagos contra bacterias humanas resistentes a antibióticos	N/A	1997
PhagoGen (Las Vegas, NV, USA; Previamente Regma Bio technologies of London)	Fagos terapéuticos que liberan proteínas letales	http://www.phagegen.com/	2000
PhageTech (Montreal, Canada)	Fago genómica para el descubrimiento de nuevos blancos para el desarrollo de pequeñas moléculas de antibióticos	http://www.phagetech.com/	1997
Phage-Therapy (Tbilisi, Georgia)	Provee soporte logístico para pacientes que buscan terapia con fagos en la república de Georgia	http://www.phage-therapy.com/	2000
Phico Therapeutics (Cambridge, UK)	Fagos para liberar proteínas letales	http://www.phicotherapeutics.co.uk/	2000

Fuente: tomado y adaptado de Thiel.³⁷

RESISTENCIA A LOS FAGOS

Al infectar células bacterianas, los fagos se enfrentan a una serie de mecanismos antivirales que han desarrollado las bacterias mediante su evolución, contando con varios mecanismos para evitar, eludir o perturbar los mecanismos de infección de los bacteriófagos, con el fin de prosperar en la mayoría de los ambientes. Cada uno de los pasos del ciclo de vida de los bacteriófagos puede ser blanco de un mecanismo antifágico³⁸ (Fig. 3). Los mecanismos de resistencia bacteriana a los bacteriófagos incluyen la resistencia o inhibición de la adsorción, que resulta en una reducción de la in-

teracción entre el fago y la bacteria, que son descritos como “restricción” donde la bacteria sobrevive y el fago muere; y las infecciones abortivas (como el sistema REX descrito en *E. coli*), donde tanto el fago como la bacteria mueren. Dentro de los mecanismos de resistencia a la adsorción se incluye: pérdida de receptores moleculares del fago en el hospedero, así como la generación de barreras físicas que ocultan la molécula receptora (ejemplo: cápsula) (Fig. 9). Los mecanismos de restricción incluyen: bloqueo de la captación del genoma del fago (Fig. 10), superinfección inmune, modificaciones de la restricción y CRISPR (clustered regularly interspaced short palindromic repeat), todos

los cuales funcionan después de la adsorción del fago, pero antes de terminar la toma por parte del fago del metabolismo de la célula hospedera; sin embargo, los fagos también tienen mecanismos para evadir estos sistemas de protección bacteriana.^{39,40}

Como estrategia de control de la resistencia, está la facilidad de alternar fagos o usar un cóctel de fagos para eludir la aparición de resistencias de la bacteria hospedera frente a un determinado fago. Esta

condición implica disponer de una variedad de fagos que puedan ser usados para una determinada bacteria. Se trata de una circunstancia factible de superar, que da cuenta de la gran abundancia de fagos en el medio, aunque la misma requiere de tiempo y recursos económicos y tecnológicos para la identificación, aislamiento, selección y caracterización del fago, así mismo para disponer de este como un producto final para uso terapéutico.

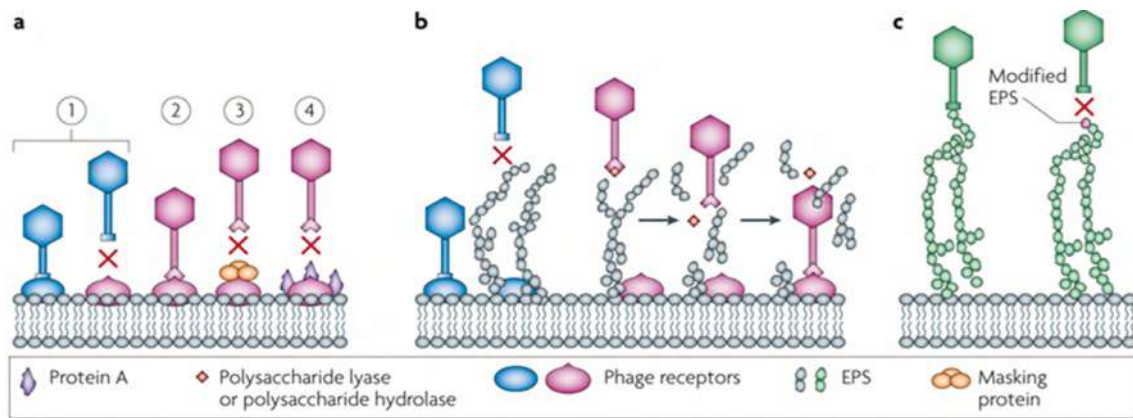


Figura 9. Diferentes estrategias usadas por la bacteria para bloquear la absorción del fago: a) Escape de la infección por fagos en la etapa de adsorción. La adsorción del fago a la superficie celular bacteriana se produce a través del reconocimiento de un receptor de fago en la superficie. Las bacterias pueden hacerse resistentes a los fagos mediante la modificación de estos receptores de la superficie celular (paso 1); Los fagos pueden adaptarse a reconocer estos nuevos receptores (paso 2). Las bacterias también pueden producir proteínas que enmascaran el receptor del fago (paso 3). *Staphylococcus aureus* produce la proteína A, lo que reduce la adsorción de fagos (paso 4). b) La adsorción de fagos también puede ser bloqueado por la producción de exopolisacáridos (EPS), pero los fagos superan la capa de EPS mediante la producción de una liasa del polisacárido o una hidrolasa de polisacárido para escindir EPS. c) Los fagos también han evolucionado para reconocer específicamente polisacáridos tales como el antígeno O y el antígeno K

Fuente: tomado de Labrie et al.³⁸

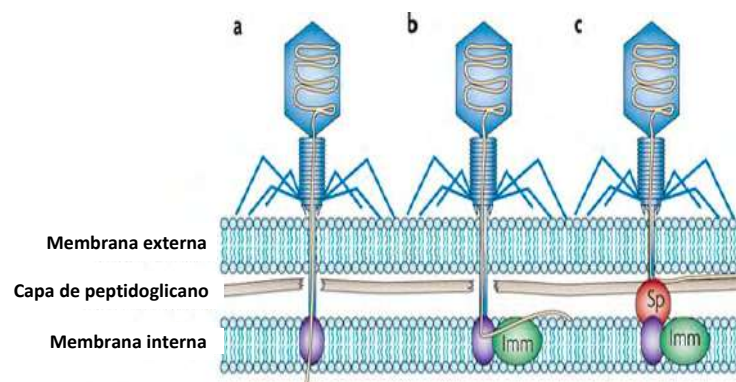


Figura 10. Bloqueo de la entrada del DNA del fago dentro de la célula bacteriana. a) Infección normal del fago T4 de una célula de *Escherichia coli*. La capa de peptidoglicano se degrada, y una proteína de la membrana interior está implicado en la translocación del DNA en el citoplasma. b) el fago T4 codifica la proteína Imm, que bloquea la translocación de DNA del fago en el citoplasma, impidiendo así la infección por otros fagos T-similares. c) La proteína SP, también codificada por el fago T4, bloquea la degradación del peptidoglicano, atrapando el DNA entre la capa de peptidoglicano y la membrana externa.

Fuente: tomado de Labrie et al.³⁸

FUTURO DE LA TERAPIA CON BACTERIÓFAGOS

El estudio de los fagos y de algunos de los productos por ellos codificados, se presenta como un área de investigación prometedora en los próximos años a la hora de desarrollar nuevos mecanismos de antibióticos que son tan necesarios a causa de la creciente resistencia de las bacterias frente a los antibióticos clásicos.

LAS ENZIMAS LÍTICAS FÁGICAS CONOCIDAS TAMBIÉN COMO ENZIBIÓTICOS

Los **enzibióticos** son una interesante alternativa al uso de fagos intactos para combatir a las bacterias patógenas, y se centra en el empleo de algunos productos fágicos, en concreto las enzimas líticas codificadas por el genoma de los fagos. Las enzimas líticas de los fagos se utilizan para destruir la pared bacteriana desde el interior de la célula infectada y así facilitar la liberación de la descendencia fágica (Fig. 1). Estas enzimas reciben diferentes denominaciones de acuerdo con el enlace químico que destruyen en la pared del huésped. De esta manera, se habla de lisozimas, amidasas, glucosaminidasas, endopeptidasas y transglucosidasas. El grupo de Vicent Fischetti de la Universidad Rockefeller ha empleado recientemente tales enzimas para prevenir y eliminar microorganismos patógenos de ratones colonizados por estreptococos del grupo A y neumococo.^{41,42} Yoong *et al.*⁴³ reportaron que la enzima lítica de bacteriófago PlyV12, aislada del bacteriófago enterococcal Φ 1 de la familia Myoviridae, que infecta la cepa V12 de *E. faecalis* mostró efectividad para destruir tanto *Enterococcus faecalis* y *Enterococcus faecium* (incluyendo cepas resistentes a vancomicina), así como a otros patógenos humanos como *S. pyogenes* y *streptococcus* del grupo B, C, E, y G, con un efecto mínimo contra bacterias comensales (a excepción de *Streptococcus gordonii*). Estos hallazgos sugieren un espectro de aplicación amplio de esta lisina como agente terapéutico específico contra múltiples patógenos responsables de infecciones serias.⁴³

REFLEXIONES FINALES

Una de las ventajas que tienen los fagos frente a los antibióticos es su extraordinaria especificidad, únicamente van a eliminar los patógenos de los cuales se han aislado, dejando intacta el resto de la microbiota del individuo. El mantenimiento de esta microbiota es muy importante pues disminuye el riesgo de infecciones producidas por microorganismos oportunistas. Otra de las ventajas es el hecho de que los fagos se repliquen solamente en presencia de la bacteria patógena, por lo que cualquier incremento en los niveles del patógeno supondría la replicación inmediata del fago y, consecuentemente, la inhibición de la proliferación de la bacteria patógena.

Entre las ventajas que reporta la terapia fágica sobre la antibiótica cabe destacar (Tabla 2):

- a) La alta especificidad de los fagos para un determinado hospedero que se quiera combatir evitando de esa manera la eliminación de la microbiota que puede resultar beneficiosa para los organismos.
- b) La facilidad de alternar fagos o usar un cóctel de fagos para eludir la aparición de resistencias de la bacteria hospedera frente a un determinado fago. Esta condición implica disponer de una variedad de fagos que puedan ser usados para una determinada bacteria. Se trata de una circunstancia fácil de superar teniendo en cuenta la gran abundancia de fagos en el medio marino, si bien existe la limitación dado que no existe un universo ilimitado de fagos.
- c) La baja respuesta inmunogénica que inducen los fagos en muchos de los hospederos analizados hasta el momento, en particular en el caso de los peces en los que se ha usado la fago terapia de forma experimental para el tratamiento de infecciones bacterianas sistémicas, suministrándolos en el alimento.

Finalmente, como podemos observar, la terapia con bacteriófagos es un campo prometedor, pero desafiante dentro de la terapia antimicrobiana que tiene que superar una serie de obstáculos técnicos y legislativos para lograr su aprobación dentro del uso clínico en la medicina occidental.⁴⁴

Tabla 2. ventajas y desventajas de la terapia antibiótica y la terapia fágica

Bacteriófagos	Antibióticos	Comentarios
Muy específicos (usualmente afectan solo la especie bacteriana blanco), por lo que no se presenta la disbiosis ni las infecciones secundarias	Los antibióticos atacan tanto los microorganismos patógenos como la microbiota, afectando el balance microbiano en el paciente, lo que puede originar infecciones secundarias	La alta especificidad puede ser considerada como una desventaja de los fagos, porque la bacteria causante de la enfermedad debe ser identificada antes de que la fago terapia apropiada sea iniciada, mientras que los antibióticos al ser inespecíficos y de amplio espectro, tienen una mayor probabilidad de ser eficaces cuando la identidad del agente etiológico no se ha determinado.
Replicación en el sitio de la infección y están disponibles donde más se necesita	Ellos son metabolizados y eliminados por el cuerpo y no se concentran necesariamente en el sitio de la infección	El crecimiento exponencial de los fagos en el sitio de infección puede requerir menos frecuencia de administración de fagos para lograr los efectos terapéuticos
No se han descrito efectos secundarios serios	Se han reportado múltiples efectos secundarios, incluidos desórdenes intestinales, alergias e infecciones secundarias (ejemplos: infecciones por hongos)	Se han reportado unos pocos efectos secundarios menores para fagos terapéuticos, lo cual pudo deberse a la liberación de endotoxinas de las bacterias lisadas in vivo por los fagos. Estos efectos también se pueden observar cuando se utilizan antibióticos
Las bacterias resistentes a los fagos siguen siendo susceptibles a otros fagos que tienen un rango similar	La resistencia a los antibióticos no está limitada a la bacteria específica	Debido a su más amplio espectro de actividad, los antibióticos seleccionan muchas especies bacterianas resistentes, no sólo las mutantes resistentes de las bacterias específicas
Selección de nuevos fagos (por ejemplo, contra las bacterias resistentes a los fagos) es un proceso relativamente rápido que con frecuencia se puede lograr en días o semanas, aunque los estudios preclínicos y clínicos llevan unos cuantos años, incluso décadas para poder estar disponibles para su suministro	Desarrollo de nuevos antibióticos (ejemplo: antibióticos contra bacterias resistentes) es un proceso que consume tiempo y puede llevar varios años	Desde el punto de vista evolutivo, en la naturaleza es posible disponer de fagos activos contra cada bacteria resistente a los antibióticos obtenidos mediante los mecanismos de selección natural, pero igualmente puede ocurrir la selección natural de bacterias resistentes a los fagos

AGRADECIMIENTOS

A las magister Alejandra María Giraldo y María Mercedes González por sus observaciones y correcciones gramaticales.

REFERENCIAS

- Collier L.** Virología humana. 3ª ed. Korea: McGraw-Hill Interamericana; 2008.
- Dalmaso M, Hill C, Ross RP.** Exploiting gut bacteriophages for human health. *Trends Microbiol.* 2014;22:399-405.
- Manrique P, Bolduc B, Walk ST, van der Oost J, de Vos WM, Young MJ.** Healthy human gut phageome. *Proc Natl Acad Sci.* 2016;113(37):10400-5.
- Avendaño LF, Ferrés M, Spencer M.** *Virología Clínica.* Santiago de Chile: Mediterraneo; 2011.
- Norkin LC.** *Virology molecular biology and pathogenesis.* Washington: AMS Press; 2010.
- Sturino JM, Laenhammer KT.** Engineered bacteriophage-defence systems in bioprocessing. *Nat Rev Microbiol.* 2006;4(5):395-4004.
- Kutateladze M, Adamia.** Phage therapy experience at the Eliava Institute. *Medicine et Maladies Infectieuses.* 2008;38:426-430.
- Carlton RM.** Phage therapy: past history and future prospects. *Arch Immunol Ther Exp.* 1999;47(5):267-74.
- Ackermann HW.** History of Virology: Bacteriophages. In: *Encyclopedia of Virology.* 3ª ed. Amsterdam: Elsevier; 2008. p. 442-50.

10. **Citorik RJ, Mimee M, Lu TK.** Bacteriophage-based synthetic biology for the study of infectious diseases. *Curr Opin Microbiol.* 2014;2:59-69.
11. **Villalba AJ, Martos CM, García MJ.** Bacteriófagos y la terapia fágica. [s. l.]: [20--]; 2012.
12. **Ackermann HW.** Frequency of morphological phage descriptions in the year. *Br Rev Arch Virol.* 2001;146:843-57.
13. **Tortora, G, Funke B, Case C.** Microbiology: An Introduction. San Francisco: Pearson Education; 2010.
14. **McClean T.** Bacteriophages as a New Drug. Bacteriophages as a New Drug. [Internet]. [Consultado 2015 oct 20] Disponible en: <http://healingseekers.com/wp-content/themes/healin>.
15. **Brüssow H.** What is needed for phage therapy to become a reality in Western medicine? *Virology.* 2012;434:138-42.
16. **Dini C.** Aislamiento y caracterización molecular de bacteriófagos de bacterias enteropatógenas para bio-control de enfermedades transmitidas por alimentos (ETA). [Tesis Doctoral Ciencias Exactas]. Argentina: Universidad Nacional de la Plata; 2011.
17. **Kittler S, Wittmann J, Mengden L, Klein G, Rohde C, Lehnherr H.** The use of bacteriophages as One-Health approach to reduce multidrug-resistant bacteria. *Sustain Chem Pharm.* 2016;5:80-83.
18. **Subirats J, Sánchez-Melsió AM, Borrego C, Balcázar JL, Simonet P.** Metagenomic analysis reveals that bacteriophages are reservoirs of antibiotic resistance genes. *Int J Antimicrob Agents.* 2016;48(2):163-7.
19. **Klumpp J, Loessner M.** New research on bacteriophages and food safety. *Adv Microb Food Saf.* 2013;1:321-39.
20. **Shivshetty N, Hosamani R, Ahmed L, Oli AK, Sannaullah S, Sharanbassappa S, et al.** Experimental Protection of Diabetic Mice against Lethal *P. aeruginosa* Infection by Bacteriophage. *Biomed Res Int.* 2014;2014:ID 793242.
21. **Cooper IR.** A review of current methods using bacteriophages in live animals, food and animal products intended for human consumption. *J Microbiol Methods.* 2016;130:38-47.
22. **Marvin DA, Symmons MF, Straus SK.** Structure and assembly of filamentous bacteriophages. *Prog Biophys Mol Biol.* 2014;114:80-122.
23. **Ghang S, Shimamura I, Fukunaga M, Mori K, Nakai T.** Isolation of bacteriophages specific to fish pathogen, *Pseudomonas plecoglossicida*, as a candidate for disease control. *Appl Environ Microbiol.* 2006;66(4):1416-22.
24. **Ronda C, Vázquez M, López R.** Los bacteriófagos como herramienta para combatir infecciones en Acuicultura. *Rev Aquat.* 2003;18:3-10.
25. **Wang J, Hu B, Xu M, Yan Q, Liu S, Zhu X, et al.** Use of bacteriophage in the treatment of experimental animal bacteremia from imipenem-resistant *Pseudomonas aeruginosa*. *Int J Mol Med.* 2006;17:3009-17.
26. **Capparelli R, Parlato M, Borriello G, Salvatore P ID.** Experimental phage therapy against *Staphylococcus aureus* in mice. *Antimicrob Agents Chemother.* 2007;51:2765-73.
27. **García-Suarez P, Martínez-Fernández B, Rodríguez-González A.** Nuevas alternativas en el tratamiento de la mamitis en el ganado vacuno. *Tecnol Agropecu.* 2008;5:55-8.
28. **Goldman G, Starosvetsky J, Armon R.** Inhibition of biofilm formation on UF membrane by use of specific bacteriophages. *J Memb Sci.* 2009;342:145-52.
29. **Janež N, Loc-Carrillo C.** Use of phages to control *Campylobacter* spp. *J Microbiol Methods.* *J Microbiol Methods.* 2013;95(1):68-75.
30. **Akhtar M, Viazis S, Díez-González F.** Isolation, identification and characterization of lytic, wide host range bacteriophages from waste effluents against *Salmonella enterica* serovars. *Food Control.* 2014;38:67-74.
31. **Fujiwara A, Fujisawa M, Hamasaki R, Kawasaki T, Fujie M, Yamada T.** Biocontrol of *Ralstonia solanacearum* by Treatment with Lytic Bacteriophages. *Appl Environ Microbiol.* 2011;77(12):4155-2.
32. **Lee SH, Hosseindoust AR, Kim JS, Choi YH, Lee JH, Kwon IK, et al.** Bacteriophages as a promising anti-pathogenic option in creep-feed for suckling piglets: Targeted to control *Clostridium* spp. and coliforms faecal shedding. *Livest Sci.* 2016;191:161-4.
33. **Duc Hoang M, Son Hoang M, Ken-Ichi H, Miyamoto T.** Isolation and bio-control of Extended Spectrum Beta-Lactamase (ESBL)-producing *Escherichia coli* contamination in raw chicken meat by using lytic bacteriophages. *LWT-Food Sci Technol.* 2016;71:339-346.
34. **Petty NK, Evans TJ, Fineran PC, Salmond GPC.** Biotechnological exploitation of bacteriophage research. *Trends Biotechnol.* 2007;25:7-15.
35. **Sillankorva SM, Oliveira H, Azeredo J.** Bacteriophages and Their Role in Food Safety. *Int J Microbiol.* 2012;1-13.
36. **Larco J, Egas P, Villavicencio F, Ushiña L, Trueba G.** Bacteriófago como alternativa a los antimicrobianos. [Internet] [Consultado 2015 oct 20]. Disponible en: <http://bacteriasactuaciencia.blogspot.com/>
37. **Thiel K.** Old dogma, new tricks —21st Century phage therapy. *Nat Biotechnol.* 2004;22:31-6.
38. **Labrie SJ, Samson JE, Moineau S.** Mechanisms, Bacteriophage resistance. *Nat Rev Microbiol.* 2010;8:317-27.
39. **Sanders ME.** Phage resistance in lactic acid bacteria. *Biochimie.* 1988;70(3):411-22.

- 40. Hyman P, Abedon ST.** Bacteriophage host range and bacterial resistance. *Adv Appl Microbiol.* 2010;70:217-48.
- 41. Loeffler JM, Djurkovic S, Fischetti VA.** Phage lytic enzyme Cpl-1 as a novel antimicrobial for pneumococcal bacteremia. *Infect Immun.* 2003;71:6199-2004.
- 42. Nelson D, Loomis L, Fischetti VA.** Prevention and elimination of upper respiratory colonization of mice by group A streptococci by using a bacteriophage lytic enzyme. *Proc Natl Acad Sci.* 2001; 98:4107-12.
- 43. Yoong P, Schuch R, Nelson D, Fischetti VA.** Identification of a Broadly Active Phage Lytic Enzyme with Lethal Activity against Antibiotic-Resistant *Enterococcus faecalis* and *Enterococcus faecium*. *J Bacteriol.* 2004; 186(14):4808-12.
- 44. Lu TK, Koeris MS.** The next generation of bacteriophage therapy. *Curr Opin Microbiol.* 2011; 14(5):524-31.