
Gradu Amaierako Lana / Trabajo Fin de Grado
Medikuntza Gradua / Grado en Medicina

Bacteriófagos: Aliados contra las superbacterias. (2021-2022)

Egilea / Autor:
Neima Padrón Orozco
Zuzendaria / Director/a:
Itxaso Montánchez Alonso

Leioa, 4 abril de 2022

RESUMEN

El gran problema de salud que supone la resistencia antibiótica lleva décadas agravándose, lo que ha conducido a la búsqueda de alternativas eficaces contra las bacterias multirresistentes. Los bacteriófagos, virus que actúan como parásitos de bacterias, matando en muchos casos a su huésped, suponen una alternativa a considerar, ya que pueden usarse para combatir infecciones bacterianas, englobándose en lo que se denomina fagoterapia o terapia fágica. La fagoterapia se presenta por tanto como una opción de creciente interés en las dos últimas décadas debido a su acción bactericida.

En este trabajo de fin de grado con el fin de actualizar un tema de impacto social y contribuir a su divulgación, se abarcan a través de una revisión bibliográfica exhaustiva los aspectos más destacados de la terapia fágica.

Los fagos presentan múltiples usos más allá del empleo convencional, como su empleo sinérgico a antibióticos o la utilización de sus productos, los enzibióticos, como bactericidas *per se*. A esto se añade la ampliación de su espectro de actividad gracias a la edición genética.

Teniendo en cuenta todas sus propiedades y su perfil de seguridad se discute su papel futuro en la clínica a través de la revisión de casos clínicos y se analizan los obstáculos vigentes a los que se enfrenta.

Concluyendo, la fagoterapia es una alternativa terapéutica prometedora, avalada por datos clínicos, que necesita para acelerar su desarrollo un mayor apoyo institucional y legislaciones que regulen su uso y manufacturación.

INDICE

RESUMEN	I
INDICE	II
ABREVIATURAS	III
1. INTRODUCCIÓN	1
1.1. LA AMENAZA DE LAS SUPERBACTERIAS	1
1.2. HISTORIA: EL DESCUBRIMIENTO DE LOS BACTERIÓFAGOS .	3
1.3. BACTERIÓFAGOS: ESTRUCTURA Y REPLICACIÓN	6
2. OBJETIVOS	9
3. METODOLOGÍA	10
4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN	13
4.1. TERAPIA FÁGICA O FAGOTERAPIA	13
4.1.1. Selección de fagos terapéuticos	13
4.1.2. Fagoterapia convencional	15
4.1.2.1. Monofagoterapia	15
4.1.2.2. Cócteles de fagos	16
4.1.3. Fagos: edición genética	17
4.1.4. Sinergia: fagos y antibióticos	19
4.1.5. Enzibióticos	20
4.2. RESISTENCIA BACTERIANA A LOS FAGOS	22
4.3. LEGISLACIÓN	27
4.4. FAGOS EN LA PRÁCTICA CLÍNICA	30
4.5. FAGOTERAPIA: VENTAJAS E INCOVENIENTES	35
5. DISCUSIÓN: EL FUTURO DE LA FAGOTERAPIA	38
6. CONCLUSIONES	40
7. BIBLIOGRAFÍA	41

ABREVIATURAS

AFMPS: Agencia federal belga de medicamentos y productos sanitarios

AMR: Antimicrobial resistance (resistencia antimicrobiana)

BPF: Buenas prácticas de fabricación

Cas: Endonucleasas con un papel importante en el sistema inmune bacteriano

CRISPR: Acrónimo inglés de “Clustered Regularly Interspaced Short Palindromic Repeats” que en castellano equivaldría a secuencias palindrómicas repetitivas, cortas e interespaciadas. Son genes relacionados con el sistema inmunitario bacteriano.

EEUU: Estados Unidos de América

EDTA: Ácido etilendiaminotetraacético

ESKAPE: Acrónimo que nombra la lista de patógenos multirresistente más peligrosos elaborada por la OMS: E (*Escherichia coli*), S (*Staphylococcus aureus*), K (*Klebsiella pneumoniae*), A (*Acinetobacter baumannii*), P (*Pseudomonas aeruginosa*) y E (*Enterococcus faecalis*).

FDA: Food and Drug Administration (Agencia de medicamentos estadounidense)

IPATH: Center for Innovative Phage Applications and Therapeutics (Centro de innovación en aplicaciones y terapéutica fágica)

OMS: Organización Mundial de la Salud

UFP: Unidad formadora de placas/calvas

PMI: Producto médico en investigación

SARM: *Staphylococcus aureus* resistente a meticilina

UE: Unión europea

1. INTRODUCCIÓN

1.1. LA AMENAZA DE LAS SUPERBACTERIAS

En 1920 la Tierra estaba habitada por una población aproximada de 2 mil millones de personas (1).

Ocho años después Fleming descubriría el primer agente natural que daría lugar a la penicilina y el inicio de la edad de oro antibiótica.

Hoy, 93 años después, la población es de casi 8 mil millones de habitantes (1). La penicilina y por extensión, los antibióticos de la familia de la penicilina son parte activa en ese crecimiento exponencial. Son el antimicrobiano por excelencia y uno de los más afectados por la aparición de las ``superbacterias``. Bacterias que sobreviven a concentraciones de antibiótico que por norma general matan o inhiben el crecimiento de sus congéneres (2).

Enfermedades que antaño representaban una condena segura como la meningitis bacteriana, pasaron del 90% al 10% de mortalidad (3). Parecía que la humanidad había vencido las infecciones, pero ya el mismo Fleming al recibir el Premio Nobel de Fisiología o Medicina en 1945 advertía sobre el peligro que suponía la aparición de bacterias resistentes (4).

La automedicación, el uso de antibióticos como factores de crecimiento en la dieta de los animales, su vertido masivo al medio ambiente a través de las aguas residuales y el crecimiento vertiginoso de una sociedad cada vez más conectada han provocado el aislamiento más frecuente de bacterias resistentes a nivel global (2). Un 63% de los médicos que participaron en una encuesta sobre enfermedades infecciosas en EEUU habían tenido en la práctica clínica casos de resistencia antimicrobiana (AMR) (5).

Una carta publicada en la revista *Nature* el año 2011 reveló que los genes de resistencia que encontramos hoy, ya estaban presentes en el ADN bacteriano hace 30.000 años (6), lo que indica que la resistencia bacteriana era un problema al que estábamos abocados tarde o temprano. Sin embargo, el uso intensivo y negligente ha incrementado la presión selectiva y ha acelerado su aparición.

El empleo descuidado de los antibióticos ha convertido en unas décadas a la resistencia bacteriana en una emergencia sanitaria. Se calcula que cada año casi 700.000 personas entre EEUU y la UE sufren una infección por una bacteria resistente de las que 33.000 mueren (7). Estimándose que para 2050 sea la primera causa de muerte en el mundo con 10 millones de fallecidos al año (8).

Las beta-lactamasas suponen uno de los frentes más problemáticos en el rompecabezas de la resistencia bacteriana (9). La penicilina de Fleming dió lugar durante años a los fármacos más seguros y potentes del mercado. Actualmente se han aislado en la mayoría de regiones un 30% *Klebsiella pneumoniae* resistente a cefalosporinas de tercera generación (10) y en España en 2019 la resistencia de *Escherichia coli* a amoxicilina/penicilina era del 61,6% (7).

La aparición de estas bacterias supone la pérdida de los fármacos de primera línea y el riesgo de que el incremento del uso de los de segunda y tercera línea derive en un aumento en la resistencia a estos. A lo que se añade que los fármacos de segunda línea son más caros y presentan un mayor número de efectos adversos.

La resistencia bacteriana se asocia a enfermedad grave, hospitalización prolongada e incremento de los costes sanitarios (10). Se estima que la AMR cuesta a los sistemas sanitarios de UE/EEUU aproximadamente 1.1 billón de euros anuales (7).

Un gasto considerable que llevó a subrayar en el foro económico mundial de Davos de 2019 la importancia de combatir la veloz propagación de la resistencia bacteriana (11).

Las bacterias son organismos vivos capaces de adaptarse y sobrevivir, en cambio los antibióticos son moléculas químicas incapaces de reaccionar al medio.

En los últimos 30 años la aprobación de medicamentos por la FDA (Food Drug Administration) ha disminuido un 90% (4). Es preocupante que no hayan salido al mercado nuevos antibióticos naturales desde que se descubrió la daptomicina en 1986 (12). A lo que se suma que un antibiótico tarde en comercializarse entre 10 y 12 años (3), un tiempo demasiado extenso para sustituir a aquellos que han dejado de ser eficaces.

El problema es de tal magnitud que la OMS (Organización Mundial de la Salud) ha creado una lista, denominada ESKAPE, al ser un acrónimo de los patógenos contra los que se necesita con urgencia nuevos antibióticos (11).

Los antimicrobianos son claves en el éxito de procedimientos como los trasplantes y las prótesis (13). Los pacientes inmunodeprimidos dependen de ellos y su pérdida obliga a buscar alternativas terapéuticas que nos permitan seguir llevando a cabo la práctica clínica habitual.

Una de estas alternativas es la terapia fágica, abandonada tras el descubrimiento de los antibióticos y de nuevo bajo la lupa de occidente en las últimas décadas.

1.2. HISTORIA: EL DESCUBRIMIENTO DE LOS BACTERIÓFAGOS

Por dos siglos la humanidad creyó que más allá de las bacterias no podía haber nada. Pero que no lo pudiésemos ver no significaba que no existiese. En 1892 Dimitri Ivanosvki, un biólogo ruso, pretendiendo aislar al microorganismo causante de la enfermedad del tabaco detectó que el líquido filtrado libre de bacterias era capaz de provocar la enfermedad, nominándolo agente filtrable y asentando la base de la virología (3).

En 1896 E. Hanbery Hankin, bacteriólogo inglés, intentando cuantificar *Vibrio cholerae* en agua extraída del río Ganges, observó cómo de forma inexplicable las bacterias cultivadas en las placas se redujeron en un 90%, una extraña especie de autopurificación a la que se denominó el fenómeno Hankin sin intentar darle mayor justificación (14).

Un par de años después, a principios del siglo XX, D'Herelle, un microbiólogo franco-canadiense del Instituto Pasteur, en medio de una investigación advirtió que aparecían unos orificios transparentes en las placas de cultivo que indicaban lisis bacteriana, hecho al que no le intentó dar explicación alguna en su cruzada contra las plagas de langostas en México (15).

En 1915 F. Twort, un bacteriólogo inglés, publica en la revista Lancet su observación de los "comedores de colonias" (16). Filtró los cultivos y observó que al unir el filtrado libre de bacterias con colonias bacterianas de la misma cepa filtrada las zonas

líticas aparecían una y otra vez, empezando así sus experimentos en torno a los virus filtrables no patogénicos, los que intento cultivar y estudiar (16).

Dos años después, D'Herelle, al que el artículo de Twort le recordó los agujeros transparentes que habían aparecido en sus placas hacía un tiempo y motivado por la búsqueda de un tratamiento para frenar la epidemia de disentería que asolaba a las tropas francesas, comenzó su propia investigación. Filtró muestras fecales de pacientes en proceso de recuperación, e inoculó el filtrado resultante en los cultivos de *Shigella* spp extraída de pacientes enfermos. Observó de nuevo las áreas claras, es decir, las áreas líticas, y determinó que un virus tenía que ser el responsable de la muerte bacteriana, nombrando al nuevo microorganismo comedor de bacterias: bacteriófago (17). Publicaría sus descubrimientos el 3 de septiembre de 1917 en una revista de la academia de ciencias francesa, donde relataría diversas propiedades observadas en los recién nombrados bacteriófagos (17).

El descubrimiento de los bacteriófagos por tanto se atribuye a ambos, aunque fue D'Herelle el propulsor de su uso en seres vivos como tratamiento de las infecciones bacterianas, que suponían en la época un problema de salud de gran magnitud. Para probar la seguridad de estos nuevos agentes, se inoculó a sí mismo el preparado fágico que más tarde administraría a los pacientes con disentería con notables resultados (18), convirtiéndose en el padre de la terapia fágica.

Durante 1920-1930 se aislaron y usaron fagos a lo largo del globo como tratamiento de diversas enfermedades siendo la disentería, las infecciones cutáneas, el cólera, las infecciones oculares o el tifus algunas de ellas (19). Incluso fueron usados por el ejército alemán en la II guerra mundial.

En 1933 D'Herelle fundaría en París ``el laboratorio de los bacteriófagos`` centrado en el desarrollo y producción de estos, así como tres centros más en Kiev, Kharkov y Tbilisi, siendo puntos de referencia en la investigación fágica (20).

Grandes compañías farmacéuticas como Lilly en EEUU y Robert-Carriere en Europa comenzaron a lanzar al mercado preparados fágicos como tratamiento en humanos (20).

Parecía que la solución a las infecciones bacterianas había sido encontrada, la terapia fágica estaba en auge.

Sin embargo, a finales de los años 30 se empezaron a escuchar voces científicas que afirmaban que las investigaciones de D'Herelle y sus ayudantes carecían de rigor científico, debido a errores metodológicos y sobre todo a la falta de

conocimientos sobre la biología bacteriofágica, una gran incógnita en su momento (20).

No sería hasta 1939, tras el descubrimiento del microscopio electrónico, que H. Ruska, un médico-biólogo alemán, captaría en imágenes la estructura de los bacteriófagos por primera vez, estableciendo su naturaleza (**Figura 1**) (21).

Tras el descubrimiento de la penicilina y la comercialización del primer antibiótico, se abandona paulatinamente en occidente la terapia fágica, quedando su uso relegado a la Unión Soviética, donde se llevaron a cabo numerosas investigaciones que debido al idioma y al secretismo institucional no fueron compartidas con la sociedad científica internacional (20).

Quedando solo el instituto polaco Ludwick Hirszfield y el georgiano Eliava como centros de referencia en terapia fágica en Europa, fundado este último en conjunto por D'Herelle y el médico-bacteriólogo georgiano George Eliava (15).

Con el aislamiento cada vez mayor de bacterias resistentes a medicamentos, la terapia fágica ha vuelto a estar en el punto de mira de varios campos aparte de la medicina, como los de la agricultura, la veterinaria, o la industria alimentaria. En estos sectores los fagos se emplean como controladores de plagas, tratamiento de aguas residuales, tratamiento de infecciones en animales o como conservante antibacteriano en productos alimenticios (22).

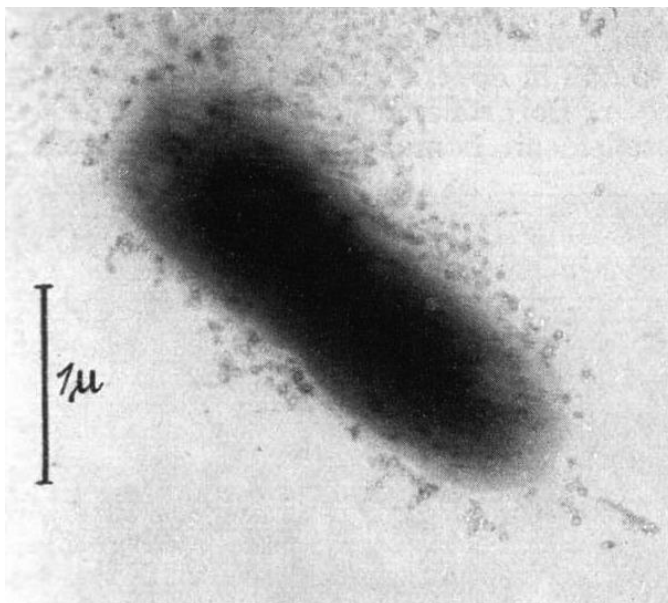


Figura 1. Colifagos delimitados alrededor de la superficie bacteriana (21). Primera visualización de bacteriófagos al microscopio electrónico.

Debido a todas sus aplicaciones, los estudios de investigación sobre fagoterapia han aumentado exponencialmente. Prueba de ello es que en los últimos años se han abierto en varios puntos del mundo nuevos institutos de terapia fágica como el IPATH en junio de 2018 en San Diego (23). En 2017 se crea un sitio web denominado directorio fágico (Phage directory), donde los investigadores pueden compartir información y se pueden solicitar fagos específicos para tratar pacientes infectados por bacterias multirresistentes en los que el tratamiento antibiótico ha fallado (24). Los ensayos clínicos se han incrementado en la última década y la investigación fágica tiene aún mucho futuro por delante.

1.3. BACTERIÓFAGOS: ESTRUCTURA Y REPLICACIÓN

Los bacteriófagos son los organismos más abundantes del planeta con una población estimada de 10^{31} (25) y un tamaño que varía entre los 20-200nm, siendo visibles sólo bajo microscopio electrónico (3). Esta abundancia permite encontrarlos en multitud de hábitats, siendo más numerosos en el medio acuático.

Al pertenecer al dominio de los virus son por definición parásitos que dependen de un huésped para asegurar su reproducción y supervivencia, aunque más que parasitismo se podría considerar una simbiosis (26).

De momento se han aislado y clasificado 6100 especies diferentes, una porción ínfima respecto al total (27) (28).

Los fagos pueden presentar diversas morfologías, sin embargo, vamos a exponer la estructura que exhiben el 96% de los fagos conocidos, pertenecientes al orden de los caudovirales (fagos con cola), del que destacan tres de sus nueve familias: Myoviridae (24%), Podoviridae (14%) y Siphoviridae (61%) (29) (30). El cuerpo de los fagos se divide principalmente en tres partes (29) como se observa en la **Figura 2**:

- Cápside o cabeza: Estructura proteica icosaédrica en cuyo interior se encuentra el material genético. El

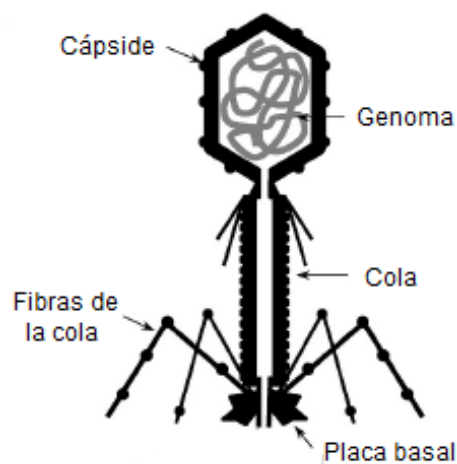


Figura 2. Representación esquemática de un bacteriófago típico (30).

genoma fágico puede constituirse de ARN o ADN mono o bicatenario, aunque la mayoría presentan ADN de doble cadena. La cápside varía en tamaño en correlación con la longitud del genoma y a su vez, puede o no, estar protegida por una envuelta lipídica (31). Uno de los 12 vértices que componen la cápside posee una estructura específica que permite el transporte del material genético a la cola y de este a la bacteria huésped (32).

- Cola: Estructura tubular formada por proteínas de características diferentes según la familia, siendo únicas para cada grupo de fagos (25), cuya función es ser un conducto por donde se desplaza eficientemente el material genético a ser introducido en el huésped. Las familias *Myoviridae* y *Siphoviridae* poseen colas largas, contráctiles y no contráctiles, respectivamente; y en *Podoviridae* son colas cortas y no contráctiles (29).
- Placa basal: Estructura proteica hexagonal, a la que se suelen unir seis elementos denominados fibras de la cola responsables de reconocer a la bacteria hospedadora (32).

Los fagos que se encuentran libres fuera de su huésped son llamados viriones. Estos viriones se desplazan de forma pasiva en el medio hasta colisionar con una bacteria hospedadora a la que puedan parasitar (33).

La unión de las fibras de la cola a proteínas u otros receptores específicos (lipopolisacáridos o ácido teicoico, por ejemplo) de la pared bacteriana se denomina adsorción (25). Una vez adherido el fago a la bacteria, este inyecta su material genético en el interior de ésta, gracias a su cola que se contrae actuando a modo de jeringa.

El genoma fágico, tras ser introducido, se integra en el ADN bacteriano y según el tipo de bacteriófago los siguientes eventos pueden divergir, dando lugar a dos procesos diferenciados: un ciclo lítico o un ciclo lisogénico como se ve en la **Figura 3** (34).

Un ciclo lítico es aquel llevado a cabo por un fago lítico o virulento. En este caso, una vez el genoma fágico se ha integrado pone a su servicio la maquinaria bacteriana con el fin de fabricar múltiples copias de sí mismo que una vez completas (26), rompen la pared bacteriana provocando la lisis celular y liberando al medio nuevos viriones, cuya cantidad puede oscilar entre 50-100 (35).

El ciclo lisogénico, por otra parte, es llevado a cabo por fagos atemperados. Este tipo de fagos son capaces de efectuar a su vez un ciclo lítico, alternando entre este y el ciclo lisogénico (31). En este ciclo vital, el genoma fágico puede quedar insertado en forma de plásmido o integrado en el ADN bacteriano de forma latente sin inducir la fabricación de viriones y la consecuente lisis bacteriana durante un tiempo determinado, denominando al fago dormido profago, hasta que un desencadenante físico o químico pone fin a la hibernación y ocasiona la lisis (30).

En la práctica clínica es importante conocer si un bacteriófago es lítico o atemperado, ya que estos últimos pueden transmitir genes de resistencia bacteriana y no suelen usarse de forma terapéutica (36).

A lo largo de los siguientes apartados se profundizará en algunos aspectos biológicos de los fagos, importantes a la hora de exponer su uso terapéutico.

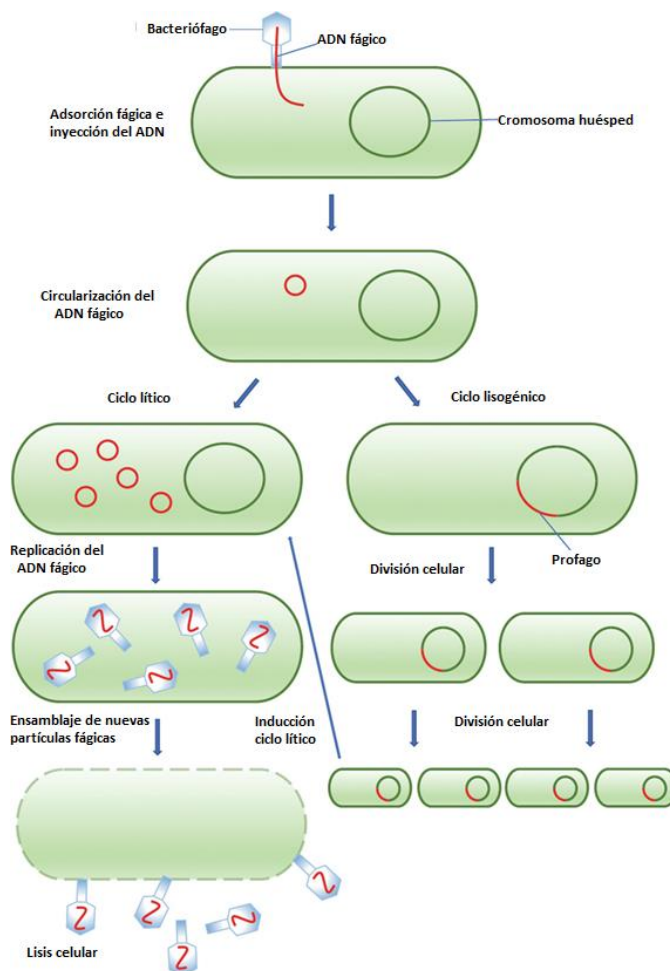


Figura 3. Representación gráfica del ciclo lítico a la izquierda y el lisogénico a la derecha. Imagen adaptada al castellano (34).

2. OBJETIVOS

Esta revisión bibliográfica ha sido desarrollada en base a tres objetivos principales:

- Realizar una revisión bibliográfica crítica sobre un tema actual y de impacto social.
- Contribuir a la divulgación científica de la terapia fágica exponiendo el tema de forma clara y comprensible.
- Actualizar en un documento los aspectos más importantes de la terapia fágica empleando principalmente artículos científicos recientes.

3. METODOLOGÍA

Con el fin de dar respuesta a los objetivos planteados, se ha llevado a cabo una revisión bibliográfica utilizando principalmente artículos científicos a través de búsquedas en la base de datos PubMed como buscador principal y en Elsevier y Google académico. La investigación se ha centrado en buscar artículos de revisión comprendidos entre 2019-2021.

Las palabras clave usadas se muestran en la tabla inferior.

Término Mesh	Traducción
Bacteriophage	Bacteriófago
Bacteriophage therapy/Phage therapy	Terapia fágica
Antimicrobial/ antibiotic resistance	Resistencia antibiótica/ antimicrobiana
Antibiotic and Phage	Fagos y antibióticos
Enzybiotics	Enzibióticos
Phage resistance	Resistencia a fagos
Phage compassionate use	Uso compasivo de fagos

- Lectura de iniciación:

Con el fin de iniciarme en el mundo de los bacteriófagos y la fagoterapia se escogieron a modo de lectura introductoria dos libros actuales versados en el tema:

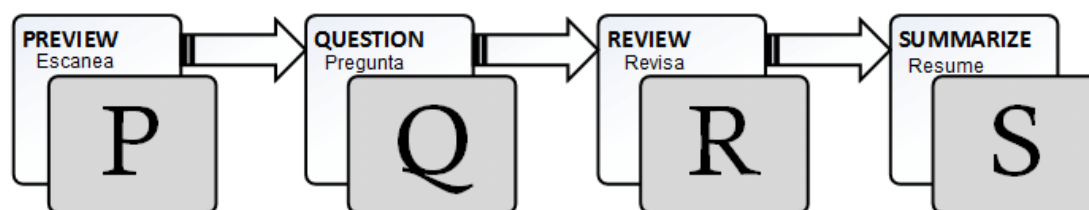
- Los bacteriófagos: Los virus que combaten infecciones (¿Que sabemos de? n°112). Lucía Fernández, Diana Gutiérrez, Ana Rodríguez y Pilar García (2020).
- Bacteriophages. Biology, Technology. Therapy. David R. Harper, Stephen T. Abendon, Benjamin H. Burrowes, Malcolm L. Mconville (2021).

Estas lecturas también forman parte de la bibliografía, siendo referenciados tres capítulos de la segunda de ellas.

- Búsqueda bibliográfica:

La búsqueda fue realizada de forma seriada en el tiempo, comenzando por una búsqueda general y profundizando en cada apartado según se avanzaba en el desarrollo del trabajo.

La búsqueda principal se realizó en PubMed el 29/10/2021 introduciendo la palabra “bacteriophage” en el motor de búsqueda. De los 73.619 artículos encontrados inicialmente quedaron 863 tras usar dos filtros (review, 2019-2021), de los que finalmente se emplearon 25 tras la lectura de los resúmenes y análisis siguiendo el sistema PQRS descrito por Peter A. Cohen en 1990.



Se excluyeron aquellos artículos relacionados exclusivamente con la industria alimentaria y/o agricultura, los que trataban sobre la biología o el uso de un tipo de bacteriófago en específico o los que se centraban en el uso de fagos en entidades clínicas específicas, alejado de su aplicación como bactericida.

Tras esta búsqueda principal se investigó de forma más exhaustiva cada apartado, siguiendo el mismo método y usando los mismos filtros con la excepción de los apartados pertenecientes a la introducción y la legislación. En la introducción el rango de búsqueda se amplió con el fin de obtener datos históricos. En el apartado sobre legislación también se eliminaron los filtros debido a la escasez de artículos, apenas seis que quedaban tras usar los criterios de inclusión (2021, review). Además, también se usaron los motores de búsqueda de la Agencia Estatal Boletín Oficial del Estado del Gobierno de España (www.boe.es) y de la página sobre legislación de la Unión Europea (<https://eur-lex.europa.eu/homepage.html>) con el fin de encontrar legislación específica sobre el tema.

Cabe destacar también 15 referencias de páginas web y una referencia a un discurso de contestación consultadas con el fin de profundizar en algunos puntos muy concretos.

Por último, una parte de los artículos referenciados en el trabajo fueron seleccionados partiendo de artículos obtenidos en la búsqueda principal.

4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

4.1. TERAPIA FÁGICA O FAGOTERAPIA

4.1.1. Selección de fagos terapéuticos

El proceso por el cuál un bacteriófago es seleccionado para convertirse en un agente terapéutico consta de varias fases y es complicado.

En primer lugar, es necesario realizar una búsqueda de bacteriófagos eficaces contra la infección que necesitamos tratar, para posteriormente proceder a su obtención y aislamiento. Esta búsqueda se lleva a cabo en diversos medios, pero generalmente se comienza por el reservorio de la bacteria huésped del bacteriófago deseado, ya sea este de origen animal o telúrico. Como ejemplo de reservorio telúrico, varios fagos han sido aislados partiendo de aguas residuales, el suelo o las alcantarillas (37), como es el caso de vB_KpnP_IME337, fago contra *Klebsiella pneumoniae* aislado en las alcantarillas de un hospital chino (37).

Otra estrategia a la hora de enfocar la búsqueda de fagos compatibles es intentar aislarlos de muestras de pacientes infectados, como es el caso de los fagos parásitos de *Staphylococcus aureus* que se pueden encontrar en muestras de piel y exudados de heridas infectadas con esta bacteria (37).

A pesar de ser los seres más abundantes del planeta, no es tan fácil aislar ciertos tipos de bacteriófagos en los hábitats esperados, un ejemplo de ello son los bacteriófagos contra *Acinetobacter baumannii* resistente a antibióticos y *Staphylococcus aureus* meticilin resistente (SARM), difíciles de hallar (37).

Posteriormente, una vez obtenidas las muestras se someten a un proceso de enriquecimiento, previo a la caracterización, con el que se aumenta su cantidad ya que generalmente en las muestras obtenidas los bacteriófagos se encuentran en bajo número (3). En este proceso los bacteriófagos obtenidos se incuban con su huésped bacteriano, usando la técnica de agar en doble capa, fomentando su replicación. La cepa bacteriana que se use no dependerá exclusivamente de la compatibilidad con el fago, aunque sea este el factor más importante, sino también de la facilidad para

cultivarla (37). Un ejemplo de ello es el cultivo de los bacteriófagos contra *Mycobacterium tuberculosis*, que en vez de esta especie se usa *Mycobacterium smegmatis* debido a su mayor velocidad de crecimiento (37).

Por último, se procede a la obtención de los bacteriófagos de interés: Pasado un tiempo de incubación se aprecian en el agar las placas de lisis que indican actividad fágica, siendo de estas zonas de dónde se obtienen los fagos (3). El bacteriófago de interés se separa de la bacteria huésped y los desechos mediante centrifugación o filtración preparándolo para su caracterización genómica y fenotípica (37).

Un bacteriófago buen candidato como agente terapéutico debe cumplir los siguientes requisitos:

- Ser exclusivamente lítico para evitar la transferencia horizontal de genes virulentos (38). Su genoma debe ser estudiado meticulosamente para detectar genes de resistencia a antibióticos, toxinas u otros genes virulentos que puedan ser transmitidos a la bacteria diana incrementando su agresividad (39). Es un proceso difícil ya que de momento solo podemos asignar a proteínas conocidas el 50% del genoma fágico (39). Aunque es preferible que el bacteriófago sea lítico, en la actualidad el genoma fágico puede ser modificado permitiendo convertir a un bacteriófago lisogénico en lítico.
- Tener un rango hospedador amplio que le permitan infectar a varias cepas bacterianas de una misma especie (25). A pesar de esto, se ha visto que los bacteriófagos con un rango hospedador estrecho también pueden tener una utilidad terapéutica ya que su especificidad permite eludir efectos adversos relacionados con la disbiosis de la microbiota (25).
- Ser virulento: El bacteriófago debe ser capaz de causar efectivamente la lisis de la bacteria diana(37). La actividad bacteriolítica del fago se puede medir cuantificando la cantidad de viriones producidos (40).

Otros elementos a tener en cuenta a la hora de seleccionar un bacteriófago como agente terapéutico son (38):

- La capacidad de atravesar y destruir biopelículas.
- Si puede usarse concomitante a un antibiótico.

- Su inmunogenicidad.
- Los receptores que emplea para entrar al huésped.
- Su vida media y su estabilidad a largo plazo (idoneidad para producción).

4.1.2. Fagoterapia convencional

Denominamos terapia fágica convencional al uso terapéutico de los fagos tal y como D'Herelle los empleo desde su descubrimiento. Este tratamiento puede adquirir diversas formulaciones según la diversidad de fagos y la especificidad del objetivo terapéutico.

Vamos a abordar primero las formulaciones según el número de bacteriófagos que las componen. Comentar que hay información dispar respecto a la superioridad de una u otra formulación, algunos estudios sugieren que la polifagoterapia es más eficaz que la monoterapia, mientras que otros no ven diferencias (41).

4.1.2.1. Monofagoterapia

Es una preparación constituida por un único fago.

Generalmente es el enfoque empleado en los ensayos *in vitro* para testar la eficacia y tolerabilidad entre otros aspectos de productos fágicos en desarrollo (42).

Este tipo de preparación exige por un lado una caracterización minuciosa de la etiología bacteriana, ya que el fago debe ser muy compatible con la cepa a combatir y por el otro, un estudio completo del bacteriófago para saber entre otras cosas cuán amplio es su rango hospedador (25,42).

Se pueden emplear fagos únicos de estrecho o amplio espectro. Un ejemplo de fago de amplio espectro es LISTEX P100, utilizado en la industria alimentaria para el control de *Listeria monocytogenes* en alimentos preparados (42).

La monoterapia tiene tres ventajas principales: Simplifica la obtención del producto terapéutico, disminuye la probabilidad de complicaciones derivadas de la respuesta

inmunológica al bacteriófago y tiene un menor impacto en la microbiota del paciente (25,42).

A su vez su desventaja principal es la frecuente aparición de resistencia bacteriana al preparado (41).

4.1.2.2. Cócteles de fagos

Es una preparación constituida por varios tipos de fagos que a su vez puede subdividirse en modificable y fija (38).

Los cócteles fágicos fijos contienen una combinación de bacteriófagos que pretende cubrir diversas cepas de una especie bacteriana o a varias especies en un mismo preparado (38). Este tipo de formulación "lista para usar" es más parecida a la de los antibióticos lo que la hace compatible con las regulaciones de producción existentes para estos y muy atractiva comercialmente tanto en EEUU como en Europa (38).

Un ejemplo de cóctel fágico fijo es Salmo FREE[®], compuesto por seis bacteriófagos frente a *Salmonella* spp. que ha demostrado su eficacia ante las infecciones por *Salmonella* spp. en las aves de corral (43).

Lo que diferencia a los cócteles fágicos modificables de los anteriores es que periódicamente se cambiarían algunos de sus componentes para ampliar el rango hospedador o con el fin de eliminar resistencias (3). Debido a esto no son compatibles con las directrices de producción actuales y menos interesantes comercialmente para las farmacéuticas (3).

Dos ejemplos de cócteles fagos modificables son Intesti Bacteriophage y Pyo Bacteriophage, producidos y usados durante años por el instituto Eliava (38,44). Pyo bacteriophage (**Figura 4**) es un cóctel de fagos dirigidos a combatir *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus* spp., *Pseudomonas*



Figura 4. Pyo Bacteriophage, envase comercializado por el instituto Eliava (44).

aeruginosa, *Proteus vulgaris*, *Proteus mirabilis* y *Escherichia coli* que terapéuticamente es efectivo como tratamiento o profilaxis de infecciones cutáneas, osteomielitis, quemaduras e infecciones oculares y auditivas (45).

Las ventajas que presenta son, por un lado ser menos proclives a la aparición de resistencia a bacteriófagos y por otro lado que muestran una mayor potencia debido a su amplio rango terapéutico ya sea porque varios fagos atacan a la misma cepa bacteriana o porque varios fagos atacan a diversas cepas de una misma especie (25).

La desventaja fundamental que presentan es que su elaboración es más compleja (38). Hay que asegurarse de que los fagos son compatibles entre ellos previo a la mezcla, es decir, que no compitan entre ellos por el mismo receptor, por este motivo, se debe contemplar en el diseño la aparición de resistencias cruzadas para que la preparación siga siendo efectiva a pesar de la presentación de estas (38).

Abordando ahora la especificidad clínica, nos queda decir que tanto la monoterapia como los cócteles fágicos modificables dan lugar a una medicina más personalizada, literalmente diseñada para el paciente (38). Este enfoque es más problemático a la hora de una aplicación global, sin embargo, ha sido usado durante décadas por el instituto Eliava en Georgia o el Ludwick Hirsztfield en Polonia (38). Así mismo la empresa estadounidense Adaptive Phage Therapeutics, fundada en 2017 persigue este enfoque comercial y en 2020 se ha unido a Laboratorios Clínica Mayo con el fin de alcanzar una comercialización global (45).

4.1.3. Fagos: edición genética

A lo largo de la historia la simplicidad del genoma fágico ha permitido numerosos avances científicos genéticos, como la demostración definitiva de que el ADN es el código binario que nos materializa (36). Así que, no es una sorpresa que su modificación mediante ingeniería genética sea una de las vías disponibles para usarlos como agentes terapéuticos.

Una de las modificaciones que se ya se lleva a cabo en la actualidad ha sido comentada anteriormente y se basa en eliminar los genes lisogénicos de un bacteriófago atemperado y convertirlo en lítico obligado (25). Es una gran opción en

aquellas infecciones bacterianas dónde los bacteriófagos líticos sean difíciles de obtener, como es el caso de *Mycobacterium abscessus* (25). Fue precisamente contra una cepa resistente a antibióticos de este patógeno, que se efectuó, en 2019, la primera aplicación exitosa de fagos modificados (39).

La edición fágica nos permite además perfeccionar a los fagos como agente terapéutico de diversas maneras:

- Expandiendo su rango hospedador cambiando la secuencia proteica de las fibras de la cola, zona encargada de reconocer a la bacteria hospedadora, o recombinando homológamente su genoma con bacteriófagos estrechamente relacionados entre sí (27,39).
- Reprogramarlos para que erradiquen biopelículas o destruyan más fácilmente la pared bacteriana introduciéndoles genes que codifiquen depolimerasas (39).
- Incrementando su virulencia haciéndolos más eficaces en su actividad lítica.

La ingeniería genética nos permite resolver muchos de los inconvenientes que presenta la terapia fágica, tal como expone a continuación en la **Tabla 1** (39).

Los fagos modificados también han sido empleados para introducir micro RNAs reguladores que silencien en la bacteria patógena la expresión de genes virulentos como la resistencia a antibióticos o incluso convirtiéndolos en portadores de genes codificadores de proteínas que aumenten la sensibilidad a antibióticos (38) con el objetivo de aumentar su acción bactericida al usarlos concomitante a antibióticos (46).

Otros procedimientos de ingeniería genética han consistido en introducir bacteriófagos con genes codificantes por un lado de endonucleasas de restricción que degradan el ADN bacteriano o por el otro holinas modificadas que junto a proteínas activadoras letales provocan la apoptosis del patógeno (47).

No solo podemos modificar el genoma fágico sino también sus productos, tema del que hablaremos más en profundidad en el siguiente apartado (48).

Tabla 1. Se muestran los avances que aportan las técnicas de ingeniería genética a la fagoterapia, traducida al castellano adaptada de (39) .¹ Los fagómidos son plásmidos que transportan genes conocidos que no tienen la habilidad de replicarse, estos se empaquetan dentro de la cápside fágica impidiendo que puedan propagarse. ² Traducido sería sistema libre de células, consiste en obtener por ultracentrifugación los orgánulos o productos celulares necesarios para sintetizar el objetivo, en este caso bacteriófagos.

Obstáculos en la fagoterapia	Enfoque convencional	Enfoque sintético
Rango hospedador estrecho.	Emplear cócteles fágicos.	Modificación genética de los receptores fágicos.
Resistencia bacteriana a fagos.	Emplear cócteles fágicos o combinación de antibiótico-fago.	Modificación genética de los receptores fágicos. Uso de micro RNAs o del sistema CRISPR-CAS para silenciar los genes resistentes a antibióticos.
Baja estabilidad fágica en la circulación debido a la rápida eliminación por parte del sistema reticuloendotelial.	Se administran múltiples dosis.	Alteración de la estructura proteica de la cápside o someter a las partículas fágicas a pegilación.
Preocupación sobre la seguridad de los bacteriófagos debido a la falta de estandarización y la presencia de genes desconocidos.	Usar endolisinas.	Usar fagos con alta caracterización o emplear fagómidos ¹ .
Presencia de genes virulentos (toxinas, resistencia a antibióticos...) en el genoma fágico.	Usar fagos estrictamente líticos y realizar una caracterización genómica exhaustiva.	Producir fagos personalizados.
Preocupación por la seguridad debido a las impurezas (toxinas bacterianas) en la elaboración de los preparados fágicos.	Remover las toxinas	Producir fagos empleando "cell free system" ² .

4.1.4. Sinergia: fagos y antibióticos

Los antibióticos son la primera línea de tratamiento clínico y lo seguirán siendo durante muchos años, encontrar vías que reduzcan la aparición de resistencias es vital para que esto siga siendo así.

Ciertos estudios *in vitro* sugieren que el uso sinérgico de fagos y antibióticos presenta mayor acción bactericida que el empleo individual de cada uno de ellos (41).

Este sinergismo ha sido demostrado tanto en bacterias gram positivas como gram negativas (38). Asociar concentraciones subletales de ciertos antibióticos a cultivos fágicos aumenta el tamaño de las placas fágicas y su propagación (38).

Sb-1, un bacteriófago predador de *S. aureus* es capaz de erradicar *in vitro* cepas de SARM al ser combinado con vancomicina o daptomicina (43).

Un cóctel fágico compuesto por los bacteriófagos ϕ PA01 y ϕ PA02 ha demostrado *in vitro* frenar el crecimiento del patógeno *P. aeruginosa* al ser testado junto con los antibióticos ciprofloxacino y meropenem (43).

Estudios como los mencionados sugieren el potencial terapéutico de esta vía, con mucho futuro por delante.

4.1.5. Enzibióticos

La palabra enzibiótico surge de la unión de enzima y antibiótico debido a que nombra productos catalíticos fágicos con acción antibacteriana.

Fueron descritos por primera vez por F. Twort, uno de los padres de la terapia fágica (49). La investigación de las propiedades de estas enzimas ha estado en marcha desde entonces.

Diferenciamos dos tipos de enzimas fágicas según la etapa del ciclo lítico en la que actúan:

- Exopolisacáridos despolimerasas secretadas por el bacteriófago al inicio del ciclo lítico con el fin de facilitar la penetración en el huésped (49).
- Endolisinas: Son enzimas segregadas al final del ciclo lítico con el objetivo de liberar a los nuevos viriones. En realidad, las endolisinas no son las únicas que propician la salida de los fagos *de novo*. Las endolisinas son producidas simultáneamente con otro tipo de proteínas, las holinas, encargadas de realizar un agujero en la membrana interna o citoplasmática. Una vez producidas ambas se acumulan en el citosol bacteriano. Cuando las holinas alcanzan una determinada concentración en el citoplasma inician su función y dan comienzo a la lisis bacteriana permitiendo a la endolisina llegar al

peptidoglicano con el fin de lisarlo y destruir la pared celular (49,50) . Las holinas no solo perforan la membrana citoplasmática, sino que afectan a la polarización de está impactando letalmente en su integridad y función (51). En las bacterias gram negativas, debido al mayor grosor de la pared bacteriana se ha descubierto que se requiere otra enzima más, “spanin”, cómo se denomina en inglés. En las bacterias gram negativas: las holinas agujerean la membrana citoplasmática bacteriana permitiendo, al igual que en las positivas, la salida al espacio periplasmático de las endolisinas con el objetivo de degradar el peptidoglicano y tras esto interviene spanin para rematar la lisis consumiendo la membrana externa (49).

Las enzimas más investigadas y empleadas son las endolisinas, pues han demostrado que una vez purificadas conservan su actividad bactericida e incluso amplían su acción catalítica a un mayor número de huéspedes de la que poseían inicialmente (35). Hecho que ha propiciado múltiples estudios *in vitro* y ensayos clínicos.

Cuando empleamos endolisinas exógenamente no son necesarias holinas ni otras proteínas para que lleven a cabo su acción lítica (50).

Estudios *in vitro* han evidenciado que las endolisinas son agentes terapéuticos seguros, ya que no poseen genes virulentos que puedan ser transferidos, con efectos adversos menores. Así mismo, presentan menor propensión a la resistencia bacteriana que sus productores, los bacteriófagos (49).

Debido a su estructura, las endolisinas pueden ser fácilmente modificadas genéticamente. Se presentan en forma de un polipéptido, compuesto por dos dominios funcionales: Uno es el que ejerce la acción catalítica y por tanto el que se une al peptidoglicano y el otro se une a la pared celular (35).

Múltiples endolisinas han demostrado su eficacia frente a bacterias gram positivas; un ejemplo de ello es el preparado StaphitektTM desarrollado por la compañía holandesa Microos Human Health, eficaz contra *S. aureus*, patógeno para el que se han estudiado una amplia variedad de endolisinas, siendo eficaz incluso frente a algunas cepas resistentes (49). Es, además, la primera endolisina comercial en aplicarse de forma tópica sobre la piel humana. La compañía incorpora el preparado fágico, que es una solución, a una línea de cremas frente a la rosácea, el acné y el eccema (52), siendo este el único enzibiótico que ha cumplido con los requisitos

exigidos por la Unión Europea, y está autorizado como producto médico de uso en humanos (50).

En cambio, en bacterias gram negativas, la acción de las endolisinas presenta algunos obstáculos debido al mayor grosor de la pared celular, que impide la exposición del lugar de anclaje de la endolisina y, por tanto, que ésta lleve a cabo su acción (50). En estos casos se han empleado de forma adyuvante agentes químicos que permeabilizan la membrana como el EDTA facilitando a la endolisina su labor (50).

A pesar de ello, para combatir bacterias gram negativas como *A. baumannii* o *P. aeruginosa*, patógenos clasificados de alto riesgo por la OMS, existen una serie de endolisinas sintéticas, las artilisinas (49). ``Artylisin`` es una plataforma nacida de la asociación de dos compañías biotecnológicas, ``Lysando`` y ``AiCuris``, con el objetivo de producir y comercializar estas proteínas (50). La artilisina al contrario que la endolisina actúa rompiendo la pared celular desde el exterior, facilitando la desintegración de la pared celular y allanando el acceso de otras moléculas al interior de la bacteria (53).

Las endolisinas pueden, a su vez, ser usadas concomitante a antibióticos o en grupos de varias lisinas para aumentar su eficacia (50). Empleadas simultánea o secuencialmente a antibióticos han demostrado eficacia en estudios *in vitro* a la hora de eliminar biopelículas (48).

Los enzibióticos no sólo son usados en biomedicina humana, también han demostrado gran eficacia en veterinaria, agricultura y alimentación.

4.2. RESISTENCIA BACTERIANA A LOS FAGOS

Uno de los inconvenientes clásicos de la terapia fágica es la aparición de resistencias a los preparados. En este apartado abordaremos algunos de los mecanismos que han empleado y emplean bacterias y fagos para oponerse unos a otros.

Siguiendo la dinámica de la teoría evolutiva conocida como “Hipótesis de la Reina Roja”, bacterias y bacteriófagos, al igual que el resto de seres, han coevolucionado durante billones de años en condiciones constantes de gran presión adaptativa, para así poder mantener su *status quo* en el hábitat por el que compiten (50).

Desde que surgieron las primeras células procariotas, virus y bacterias han luchado por la supremacía, desarrollando la presa resistencia al depredador. Las bacterias se hacen resistentes a sus parásitos obligados a través de muchos mecanismos, que prácticamente tienen como diana cada paso del ciclo replicativo fágico: Adsorción, inyección e integración del genoma, replicación del genoma, transcripción y traducción, ensamblaje y finalmente la liberación (25). En este apartado nos centraremos en el bloqueo de las dos primeras etapas por ser éstas las más importantes:

En la adsorción destacamos los siguientes mecanismos:

- Mutación del receptor de superficie: Estas mutaciones conllevan repercusiones negativas para la bacteria más allá que únicamente bloquear el anclaje del fago, ya que la mutación puede afectar a genes adyacentes con múltiples funciones (54). Pequeñas mutaciones en los receptores, sin la infección de un bacteriófago, han demostrado ralentizar el crecimiento bacteriano, reducir la producción de biopelículas, afectar a la motilidad y disminuir la virulencia y la capacidad de contagio del patógeno (54).
- Enmascaramiento del receptor de superficie a través de la glicosilación de los receptores o mediante la formación de biopelículas (54).

Las bacterias poseen numerosas armas para impedir la entrada del genoma fágico al interior de la célula. Dos de ellas son:

- El uso de membranas celulares externas: La porción de membrana externa donde se localizan los receptores de unión a fagos, se evagina una vez el fago ha inyectado su material genético, englobándolo e impidiendo su replicación en el citoplasma bacteriano (43).
- La resistencia a la superinfección: En este caso la resistencia bacteriana viene dada irónicamente por un bacteriófago. El genoma integrado de un bacteriófago atemperado confiere a la bacteria resistencia frente a un número limitado de bacteriófagos determinado tanto por la bacteria huésped como por el fago (54).

La integración del genoma es una fase clave del ciclo replicativo fágico. Las bacterias poseen diversos mecanismos para protegerse, entre los que destacan dos

principalmente, sobresaliendo el primero de ellos, conocido como CRISPR (acrónimo inglés de "Clustered Regularly Interspaced Short Palindromic Repeats" que en castellano equivaldría a secuencias palindrómicas repetitivas, cortas e interespaciadas) o "tijera genética", cuyo descubrimiento les valió el galardón del Premio Nobel de Química en 2020 a Emmanuelle Charpentier y Jennifer A. Doudna.

- Mecanismo CRISPR-Cas: Es el comando central del sistema inmune adaptativo bacteriano, el único adaptativo conocido, un equivalente a la respuesta adaptativa de nuestro sistema inmunitario (complejo linfocito B – anticuerpo). Su finalidad es detectar el genoma vírico intruso y eliminarlo (55). Como su nombre indica, estas secuencias de ADN cortas pueden ser leídas de derecha a izquierda y viceversa, sin alterar su lectura, y se repiten a lo largo de un locus de forma discontinúa (55). Adyacente a estas secuencias CRISPR, de forma independiente se ubican otras que codifican a las endonucleasas Cas. Estas endonucleasas son el brazo efector del mecanismo, su objetivo es encontrar y fragmentar el ADN extraño, ya sea fágico o perteneciente a otros elementos genéticos móviles (55). La activación del mecanismo CRISPR-Cas se divide en tres fases (**Figura 5**):
 - Este primer paso se designa como adaptación y en él es imprescindible la integración del genoma extraño en un locus CRISPR-Cas para activar el complejo. Los fragmentos de ácidos nucleicos extraños, denominados secuencias espaciadoras, son procesados e integrados en la secuencia CRISPR. Aún se desconoce cómo se desencadena esta integración, aunque se ha visto que el sistema no se activa hasta que la densidad en la población bacteriana es alta y son más vulnerables a los fagos (55–57). La integración de la secuencia espaciadora permite a la bacteria reconocer el ADN invasor en una próxima infección, dotándola de inmunidad frente por ejemplo a un bacteriófago (55).
 - El segundo paso se denomina expresión o maduración. Tras adaptar la secuencia intrusa, suceden simultáneamente dos procesos (55):
 - Por un lado, se transcribe y traduce las secuencias codificadoras de las endonucleasas Cas.

- Por otro lado, la secuencia CRISPR se transcribe en una larga cadena de ARN precursora, que es procesada en secuencias maduras más cortas, denominadas ARNcr (CRISPR ARN).
- El tercer y último paso es la interferencia, solo sucede en una bacteria ya inmunizada, es decir, que ha sobrevivido a una infección fágica previa (57). El ARNcr acoplado a Cas permite a la endonucleasa reconocer la cadena complementaria, formándose un complejo ADN-ARN con el material genético foráneo, que permite su eliminación (58).

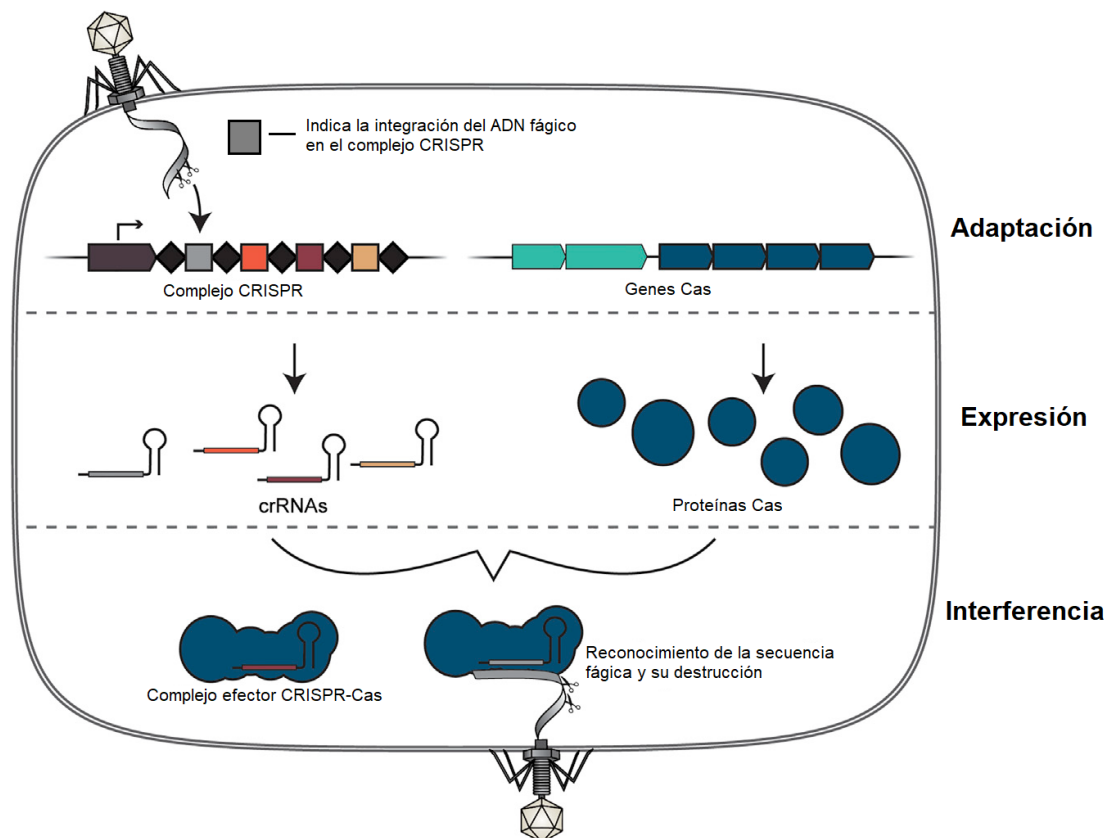


Figura 5. Resumen esquemático de las fases de activación del mecanismo CRISPR-Cas. Traducción al castellano y simplificación de la figura 1 (59)

- Sistemas de restricción-modificación: Reconocen y destruyen secuencias génicas extrañas de forma similar al mecanismo CRISPR-Cas, pero no confieren memoria y por tanto, tampoco inmunidad ante una próxima invasión (58).

Dejando de lado a la presa, como era de esperar, los bacteriófagos no se han quedado rezagados en la carrera de la coevolución y han desarrollado mecanismos evasores ante las defensas bacterianas:

- Genes anti CRISPR-Cas que codifican (54):
 - Proteínas que se unen al complejo CRISPR-Cas inutilizándolo, impidiendo que éste se una al genoma fágico y lo destruya. Las proteínas Acr, son unas de las que se han descrito realizando esta función (57).
 - Secuencias simuladoras del ADN fágico que se unen competitivamente al complejo.
 - Proteínas que silencian la expresión del complejo CRISPR-Cas.

Este tipo de genes deben buscarse durante la caracterización fágica, pues son importantes en la prevención de resistencia bacteriana.
- Modificación de sus secuencias génicas para evitar su reconocimiento y degradación, un ejemplo podría ser una mutación en una secuencia espaciadora (54,59).
- Proteger su genoma, rodeándolo de una estructura tipo núcleo, evitando que sea interceptado en el citoplasma (59).

Con una idea general de algunos de los mecanismos que ambos emplean en su batalla diaria hay que señalar que las mutaciones cromosómicas espontáneas en ambos son la mayor fuente de resistencia y sensibilización (59).

En cuanto al mecanismo CRISPR-Cas, hay que destacar que no solo es una ventaja evolutiva, ya que el sistema no distingue entre el genoma fágico y el propio genoma dando lugar en ocasiones a la muerte bacteriana, a lo que se suma la rareza de que se desarrolle resistencia bacteriana a través de CRISPR-Cas con el uso de cócteles fágicos (54).

La resistencia bacteriana a fagos ocurre con frecuencia, aunque generalmente en estadios avanzados del tratamiento (41).

Hay que puntualizar que la resistencia bacteriana a bacteriófagos ha demostrado en muchos casos ser beneficiosa, ya que provoca que el patógeno se resensibilice al antibiótico (43). Un ejemplo de ello es lo observado en una cepa de *P. aeruginosa* resistente a múltiples antibióticos, que aumentó su sensibilidad al ciprofloxacino al adquirir inmunidad frente a su fago comensal OMKO1 (60).

Destacar también el papel de la edición genética que abre un abanico de soluciones a la resistencia bacteriana a fagos (39).

En definitiva, aunque la resistencia bacteriana es un factor importante a tener en cuenta al emplear la terapia fágica, sus efectos beneficios y la edición genética permiten vislumbrar un menor impacto negativo futuro en su uso en la práctica clínica.

4.3. LEGISLACIÓN

En este capítulo abordaremos la legislación referente a la terapia fágica existente en países occidentales.

Los preparados fágicos están clasificados como productos médicos tanto en la UE como en EEUU. Cualquier producto médico previo a ser usado en la práctica clínica debe conseguir un permiso de comercialización, que solo adquirirá tras haber demostrado su eficacia y seguridad entre otros requisitos en un ensayo clínico (61).

En la actualidad ninguno de los pocos ensayos clínicos llevados a cabo en bacteriófagos ha llegado a la fase III, dato que se puede relacionar con que hasta la fecha ningún preparado fágico haya conseguido la autorización para su comercialización ni en Europa ni EEUU, realidad que dificulta la accesibilidad a esta terapia en la práctica clínica (62).

Los medicamentos fágicos (MF) pueden producirse siguiendo dos enfoques: el personalizado o el "listo para usar". Este último es el que más encaja en las regulaciones actuales (Directiva 2001/83/CE del Parlamento Europeo y del Consejo) y el más asequible de producir a gran escala, aunque conlleve un mayor riesgo de

resistencia bacteriana y por tanto pérdida de eficacia a largo plazo, y en última instancia la obligatoriedad a un reemplazo habitual del producto.

Independientemente del enfoque que se siga, el grueso de la información que obtenemos, proviene de la aplicación de la terapia fágica bajo el paraguas del uso compasivo, amparado por el artículo 37 de la declaración de Helsinki (61).

Sin el apoyo de las grandes farmacéuticas que financian la mayoría de ensayos clínicos, los estudios bacteriofágicos son llevados a cabo por pequeñas empresas o institutos de investigación a pequeña escala (61).

El uso compasivo de la terapia fágica ha sido aprobado en diferentes países destinado a aquellos pacientes que han agotado las opciones terapéuticas disponibles y que no cumplen criterios de ingreso en los ensayos clínicos en curso. Las condiciones de acceso a la terapia compasiva están reguladas por las diferentes agencias de medicamentos y varía según el país (63).

En la UE, así como en EEUU, la terapia fágica está permitida como un producto médico en investigación (PMI) definido como un preparado farmacéutico derivado de un principio activo o placebo que está siendo testado o usado en un ensayo clínico (64). Todos los PMI deben ser manufacturados y controlados de acuerdo con las directrices de las buenas prácticas de fabricación (BPF), con los requisitos y alto coste que eso conlleva, suponiendo un obstáculo para hospitales, universidades y centros de terapia fágica sin fines de lucro (64).

Una salida futura para la terapia fágica sería que fuese amparada bajo la legislación que se aplica a las terapias avanzadas como el trasplante de células hematopoyéticas. Estos productos varían su composición de un paciente a otro, al igual la terapia fágica personalizada, y comparten un proceso de producción uniforme, de ahí la importancia de unificar la manufacturación de los productos fágicos. Destacar también que las terapias avanzadas están exentas de cumplir con las BPF si son producidas en un hospital de forma no rutinaria bajo la responsabilidad de un médico e indicada para un caso especial, es decir una prescripción personalizada (64).

Por ahora la única vía de sortear las BPF en lo que se refiere a fagoterapia, en la mayoría de países, es usarla bajo el amparo del uso compasivo.

En la mayoría, pero no todos, porque un país europeo, Bélgica, ha ideado una forma de sortear el requisito de cumplir con las BPF. La agencia federal de medicamentos y

productos sanitarios (AFMPS) belga ha construido una legislación que facilita el empleo de la terapia fágica personalizada, bajo la preparación de una fórmula magistral. Esta legislación permite la introducción de elementos no autorizados en la preparación, es decir aquellos que no son reconocidos por agencias del medicamento europeas o por farmacopeas nacionales y por tanto facilita la producción de productos fágicos. Para introducir esos elementos no autorizados el requisito fundamental es que deben ser analizados en uno de los laboratorios aprobados por el Ministerio de Sanidad belga, consiguiendo una certificación que sustituye a las BPF (61).

Bélgica ha abierto la puerta a que otros países sigan su ejemplo, sin embargo, es necesaria una legislación más robusta que no será posible hasta obtener datos lo suficientemente rigurosos.

La comparación de casos clínicos y estudios de aplicación fágica bajo uso compasivo no es posible debido al uso de diferentes métodos de purificación, diversas indicaciones clínicas, variedad de dosis y métodos de administración que no permite obtener conclusiones objetivables científicamente. A esto se le suma que en algunos casos no se analiza e informa de datos importantes como el uso concomitante de antibióticos, efectos adversos o la aparición de resistencia bacteriana (62).

Otro aspecto importante en la falta de conclusiones sólidas es la no publicación y reporte de casos de terapia fágica de uso compasivo, a pesar de que en el artículo 37 de la declaración de Helsinki se especifica que en todos los casos la información debe ser registrada y divulgada para que sea de conocimiento público (63).

La legislación de la que hemos hablado, o la falta de ella en este caso es la piedra angular que abriría las puertas a la producción a gran escala de los preparados fágicos en la UE.

Y no habrá una legislación adecuada hasta que no haya más ensayos clínicos que deben cumplir con:

-Protocolos uniformes de producción que cumplan con las BPF. Permitiendo obtener productos fágicos de calidad, es decir, seguros y eficaces (65).

-Indicaciones clínicas uniformes y específicas que tengan en cuenta la vía de administración, dosis, el lugar de infección y especie bacteriana entre otros aspectos (65).

-Existencia de biobancos acreditados con extensas bibliotecas de fagos caracterizados y purificados, así como la caracterización de sus huéspedes. De este último aspecto sería importante establecer unos huéspedes no patogénicos o de escasa virulencia (posible con la ayuda de la ingeniería genética). En la última década se han creado nuevos bancos como es el caso del banco de bacteriófagos de Corea abierto en 2010. Así mismo es crucial que la información de los biobancos sea fácilmente accesible para los clínicos y que su localización permita una llegada pronta a los puntos de tratamiento (66).

-Lugares de almacenamiento que mantengan a largo plazo al fago y los preparados, así como métodos de transporte seguros.

Con las regulaciones existentes ofrecer al paciente terapia fágica conlleva un gran coste económico que recae en la mayoría de los casos en los proveedores, llegando a costar decenas de miles de dólares en países sin legislación al respecto (62).

Sin una legislación a medida, la terapia fágica seguirá siendo accesible a un porcentaje de pacientes muy inferior al que debería.

4.4. FAGOS EN LA PRÁCTICA CLÍNICA.

En este apartado se van a exponer dos casos clínicos de uso compasivo de terapia fágica contras algunos de los microorganismos de la lista ESKAPE formulada por la OMS en 2017.

- Primer caso clínico: *A. baumannii* (67)

Varón diabético de 68 años con una pancreatitis necrotizante que se complica tras la infección de un pseudoquiste pancreático por *A. baumannii* multirresistente.

Después de 108 días de no respuesta a tratamiento antibiótico se inicia la terapia fágica tras autorización de la FDA bajo la legislación de producto médico en investigación (PMI).

El día 109 se inicia la administración del cóctel ϕ PC a través de catéteres percutáneos en tres localizaciones: el pseudoquiste, vesícula biliar y cavidad intraabdominal. Este cóctel se mantendría durante las 18 semanas posteriores.

Destacar que, durante la instauración del tratamiento, el paciente desarrolló un fallo renal agudo.

Treinta y seis horas después de la aparición del fallo renal agudo el paciente se encontraba estable dentro de la gravedad, aún comatoso e intubado, con progresivo empeoramiento de su función renal y hepática. Estos datos indicaban que la infección por *A. baumannii* estaba diseminada. Por ello dos semanas después, se añadió un nuevo cóctel (ϕ IV), administrado vía intravenosa, que fue bien tolerado por el paciente y que se suministraría durante 16 semanas.

Dos días después de la adición del cóctel ϕ IV, el estado del paciente mejoró considerablemente, despertó del coma y empezó comunicación con su familia. En ese momento también se aisló una cepa de *A. baumannii* sensible a minociclina, sumándose este antibiótico al tratamiento.

A los ocho días de administrar de forma conjunta los cócteles (ϕ PC e ϕ IV) se aisló una cepa bacteriana resistente (TP3) a ambos, lo que obligó a la modificación del cóctel ϕ IV al añadir un nuevo bacteriófago, creándose un cóctel nuevo, el ϕ IVB, que se inicia el día 221 y se mantiene durante las dos siguientes semanas. A pesar de que ϕ IV ya no era tan eficaz, se administraron ambos cócteles simultáneamente, ya que ϕ IV mantenía el crecimiento bacteriano bajo control.

En las tres semanas siguientes, el estado de conciencia del paciente mejoró, al igual que su función renal. En definitiva, una mejoría del estado general que permitió su extubación.

La terapia se continuó por una semana más tras estas tres semanas con una mejoría continúa hasta el día 245, momento en el que se retiran los accesos intravenosos, así como los catéteres percutáneos y se le da el alta.

La dosis terapéutica usada fue de 5×10^9 UFP. Destacar que esta dosis disminuía considerablemente al ser suspendida en plasma con respecto a salino por lo que se abre la posibilidad de que el plasma inactive a los fagos.

Comentario:

En este artículo se describe el uso compasivo de terapia fágica en un paciente sin opciones terapéuticas disponibles a causa de la resistencia antibiótica. Desde el inicio se emplea el enfoque de la fagoterapia personalizada por dos razones principales: el

estado crítico del paciente y el rango hospedador estrecho de los fagos de *A. baumannii*.

El rango hospedador estrecho impide la existencia de un preparado fágico "listo para usar" frente a *A. baumannii* multirresistente y teniendo en cuenta la rápida aparición de resistencia bacteriana a los cócteles administrados, usar un preparado "listo para usar" hubiese conducido a su modificación.

El caso ha evidenciado la necesidad de monitorización microbiológica continua, analizando muestras del paciente con el fin de observar la variación de la población bacteriana y la actuación de la fagoterapia.

En este caso la aparición de resistencia bacteriana a fagoterapia tuvo como consecuencia la resensibilización al antibiótico y aunque el cóctel dejó de ser eficaz, seguía controlando el crecimiento bacteriano posibilitando una sinergia entre fagos y antibiótico.

La introducción del antibiótico al cuarto día del inicio de la terapia fágica no ha permitido ver la evolución de la enfermedad con el uso exclusivo de fagoterapia, pero sí que hay que destacar que en los cuatro días de uso único la mejoría del paciente fue notable.

La terapia fue bien tolerada y no se puede asociar la aparición de insuficiencia renal aguda a la terapia fágica dado el estado del paciente, lo que concuerda con el perfil de seguridad general, testado en una amplia variedad de casos clínicos, en los que las complicaciones eran mayoritariamente leves.

En conclusión, en este paciente, crítico y sin opciones terapéuticas, la fagoterapia era posiblemente su única opción. Dado los beneficios, la tolerabilidad y la evolución favorable vista, en casos parecidos al suyo debería plantearse la fagoterapia no sólo como última línea sino como adyuvante a la terapia antibiótica como prevención a un deterioro clínico mayor que podría ser evitable.

- Segundo caso clínico: *P. aeruginosa* (68)

Varón de 43 años diagnosticado de fibrosis quística tratado con antibioterapia IV desde la infancia por infecciones respiratorias recurrentes. Este paciente consulta al instituto Eliava en Georgia para disminuir su uso de antibioterapia y a largo plazo reemplazarla por terapia fágica.

El paciente inició con la terapia el 7 de enero de 2017, tras realizarle análisis microbiológicos con el fin de obtener la bacteria o bacterias diana. Los análisis demostraron que *P. aeruginosa* era el patógeno a combatir y que era sensible a los productos bacteriofágicos "listos para usar" disponibles. Se inició administrando Pyo Bacteriophage concomitante a Intesti Bacteriophage, producidos por el instituto Eliava, ambos una vez al día durante 20 días, 8 ml por vía oral y 2 ml extra vía nebulización.

Durante estos 20 días, el paciente toleró bien la terapia y no mostró complicaciones, por lo que se le dan instrucciones para que continúe con la terapia en su domicilio. Durante 1 año debe administrarse todos los días nebulizaciones de ambos cócteles (Pyo Bacteriophage e Intesti Bacteriophage) y cada 3 meses añadir durante 20 días la toma oral de ambos cócteles una vez al día.

Durante los siguientes años se controló la respuesta a través de los análisis de muestras de esputo y se observó por un lado que *P. aeruginosa* siempre estuvo presente, y por otro que el patógeno se iba haciendo progresivamente resistente a ambos preparados.

Por ello en 2019 el paciente inició tratamiento personalizado administrado vía nebulizador una vez al día durante ciclos de 20 días seguidos por dos semanas de descanso. A esto se le sumó la toma oral regularmente de Pyo Bacteriophage e Intesti Bacteriophage, a pesar de no ser tan efectivos. Al final de 2019, las cepas encontradas de *P. aeruginosa* volvieron a ser sensibles a los dos preparados, aunque no está claro si este hecho se debió a causas coevolutivas o a una interacción con antibiótico ya que en esa época el paciente tuvo una reagudización que requirió antibioterapia.

En los siguientes análisis microbiológicos el patógeno siguió presente pero la carga bacteriana disminuyó considerablemente, hecho que empezó a observarse tras la introducción de la terapia fágica personalizada.

Para 2020 el paciente había conseguido su objetivo: reemplazar la antibioterapia por terapia fágica.

Comentario:

En este caso clínico se presenta a un paciente cuya patología de base obliga a un uso casi crónico de antibioterapia. Los antibióticos, aunque son seguros y mayormente

presentan complicaciones leves, no están exentos de complicaciones graves y a largo plazo afectan a la microbiota y presentan resistencias.

En este paciente se expone un largo recorrido hasta conseguir el objetivo de disminuir la antibioterapia a cambio de uso crónico terapia fágica. En esos tres años el paciente no presentó complicaciones y se vio que a largo plazo el tratamiento disminuyó la carga bacteriana pudiendo sustituir finalmente la antibioterapia por la terapia bacteriofágica.

Es importante resaltar que en este caso se optó inicialmente por usar dos productos "listos para usar" a los que la población bacteriana patógena desarrolló resistencia, obligando a la introducción de un tratamiento personalizado. A largo plazo no se sabe si debido exclusivamente al uso de fagos, el patógeno volvía a ser sensible a los preparados "listos para usar" que no dejaron de emplearse en ningún momento, aunque de forma más espaciada.

Al interpretar los datos de este caso hay que tener presente que este caso ha sido expuesto por un instituto privado que obtiene ganancias de la terapia fágica.

La fagoterapia es una opción terapéutica que debería estar presente en pacientes con ciclos de antibióticos muy seguidos o incluso con tratamientos crónicos debido a inmunodeficiencias u otras enfermedades que provocan infecciones persistentes. Se debería estudiar si su uso concomitante a antibióticos permitiría la reducción de la dosis o/y la de las pautas de administración. E incluso si en estos pacientes el uso de fagoterapia disminuye la frecuencia de las infecciones bacterianas graves lo que pondría sobre la mesa la posibilidad de un tratamiento profiláctico de base.

Son cuestiones importantes a la hora de integrar la terapia fágica en la clínica diaria y para responderlas se necesitan más ensayos clínicos que las aborden.

4.5. FAGOTERAPIA: VENTAJAS E INCOVENIENTES

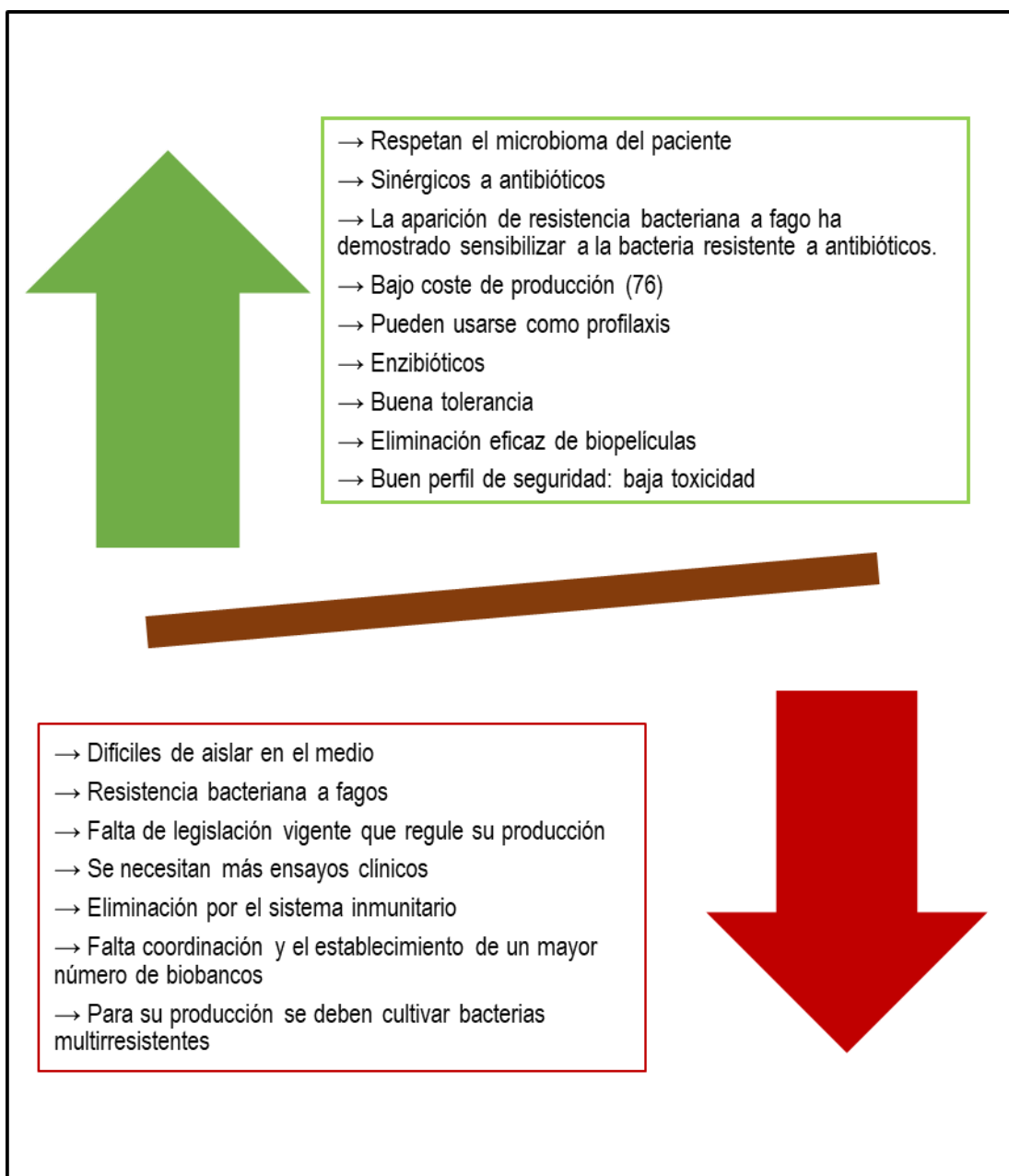


Figura 6. Diagrama resumen de las ventajas y desventajas principales de la terapia fágica.

En este diagrama de ventajas e inconvenientes se pretende resumir visualmente los rasgos fuertes y débiles de la terapia fágica que hemos ido tratando a lo largo de este documento.

En los siguientes puntos incidiremos en los aspectos que no han sido tratados en profundidad en capítulos anteriores.

Ventajas:

- Buen perfil de seguridad, baja toxicidad y buena tolerancia: en general, en la mayoría de casos clínicos en humanos, el tratamiento fue bien tolerado, con aparición mayoritariamente de complicaciones leves (dolor abdominal, náuseas, diarrea...). Las complicaciones graves descritas, en muchas ocasiones no se podían relacionar de forma causal con la terapia fágica, atribuyéndose principalmente a la situación clínica de los pacientes. No debemos olvidar que con el fin de obtener un buen perfil de seguridad se debe ser cuidadoso en la purificación del preparado, controlando los niveles de endotoxina, así como de otros agentes tóxicos bacterianos, pues podrían derivar en un shock tóxico, mortal para el paciente (69).
- Respetan el microbioma del paciente: los estudios indican que los fagos atacan al patógeno diana sin alterar a la población bacteriana nativa, evitando así la disbiosis. Este hecho posiblemente sea derivado de su estrecho rango terapéutico, que los hace específicos, incluso a cepas concretas, lo que convierte a este hecho en una ventaja a pesar de las dificultades en su selección (25).

Inconvenientes:

- Eliminación por el sistema inmunitario: se ha observado tanto en estudios *in vitro* como *in vivo* que el sistema inmunitario produce anticuerpos específicos contra los fagos, inactivándolos (18). Como vimos en el primer caso clínico expuesto en el capítulo anterior, tras la administración intravenosa del cóctel fágico la concentración del preparado disminuía en mayor proporción que al diluirlo en suero salino (67). Se necesitan más estudios para llegar a una conclusión definitiva pero el incremento de la dosis y la frecuencia de administración amortiguan la inactivación (41). En este punto tampoco se

debe olvidar el papel de la edición genética, capaz de proporcionar mayor estabilidad y resistencia al preparado en plasma (**Tabla 1**) (39).

- Resistencia bacteriana a fagos: la resistencia bacteriana ha sido tratada con un apartado propio, pero hay que incidir en qué su aparición se debe monitorizar en todos los pacientes y se debe informar lo más detalladamente posible. La ingeniería genética puede que tenga una solución más eficaz que la empleada convencionalmente, pero mientras tanto es un factor importante a la hora de emplear preparados fágicos (39). No está incluida exclusivamente en desventajas, ya que en muchas ocasiones produce la resensibilización a antibiótico, una utilidad que nos permite volver a la primera línea de tratamiento, lo que a su vez le concede su puesto como una ventaja (43).
- Obliga a cultivar bacterias multirresistentes: la terapia fágica se emplea como tratamiento de infecciones provocadas por bacterias multirresistentes. Con el fin de producir estos preparados es necesario la multiplicación de patógenos clasificados como de alto riesgo, con los peligros que ello supone, fundamentalmente la transmisión de genes virulentos como los de resistencia a antibiótico. En estos laboratorios se deben extremar las precauciones de seguridad y caracterizar exhaustivamente al huésped. La edición genética de la bacteria previa incubación con el fago ayudaría a disminuir considerablemente los riesgos.

5. DISCUSIÓN: EL FUTURO DE LA FAGOTERAPIA

La resistencia a antibióticos es una amenaza real que en España mata aproximadamente a 4000 personas al año, cifra que cuadruplica los accidentes de tráfico (70).

Las instituciones se han centrado en concienciar a la población mediante programas que promuevan un correcto empleo de antibióticos tanto en animales como en humanos.

La ministra de sanidad, Carolina Darias, afirmó que seguirán trabajando contra la resistencia antibiótica, a la que denominó “pandemia silenciosa”, a través del Plan Nacional frente a la Resistencia a los Antibióticos (PRAN). Sin embargo, como ha demostrado la pandemia provocada por el SARS-CoV-2, hay que adelantarse a los hechos y establecer planes de contingencia para evitar el desastre (70).

La resistencia antibiótica puede que sea silenciosa para la sociedad, pero en absoluto es sigilosa o muda. Prueba de ello, es el impacto de las biopelículas en el medio sanitario o en la industria alimentaria (71). Las biopelículas a grandes rasgos son comunidades bacterianas que han creado un entorno que las protege frente a posibles agresiones, es decir han fabricado un fuerte con el fin de que sea prácticamente inexpugnable. Las bacterias embebidas en biopelículas son capaces de resistir una concentración de antibiótico 1000 veces mayor que las bacterias planctónicas, las que viajan libres en el medio (39). Hecho que supone un gran problema de salud ya que la mayoría de infecciones bacterianas crónicas están causadas por biopelículas, el 65% según el Center of Disease Control y el 80% según National Institutes of Health (47).

Ante estos datos, un plan de contingencia consistiría en buscar alternativas terapéuticas o simbióticas a los antibióticos, y, en este punto, la fagoterapia representa una mina a la que aún le quedan kilómetros por excavar.

Los fagos, bactericidas naturales, pueden constituir por sí mismos preparados terapéuticos, posibilitan el uso de sus productos, los enzibióticos, o pueden emplearse como adyuvantes a antibióticos (47). Múltiples estudios *in vitro* e *in vivo* evidencian su seguridad y potencial (72).

Los enzibióticos, sus productos estrella, son capaces de lisar bacterias tras ser purificados en laboratorios (35). Suponen un recurso terapéutico con múltiples ventajas, Staphefekt™ la primera endolisina comercial, es un ejemplo de lo que la terapia puede ofrecer (49).

El abanico de opciones es muy amplio, extendiéndose aún más con la intervención de la ingeniería genética.

La ingeniería genética es, sin duda, una nueva arma terapéutica que potencia el futuro de la fagoterapia y que ya está siendo explotada comercialmente por compañías como LocusBioscience o ArmataPharmaceutics (38). Ésta última está colaborando con Merck, la farmacéutica alemana, en el desarrollo de un nuevo fago sintético del que aún no han revelado más información (73).

No es un sueño creer que tal y como ahora tomamos probióticos, lo haremos con preparados fágicos en el futuro.

En países como Georgia se comercializan preparados fágicos de uso humano como Pyo phage o Intesti phage (44). Con el impulso adecuado, fundamentado en un marco legal y financiación a la investigación, también sería posible en occidente.

En 2019 Microeos, fabricante de Staphefekt™, obtuvo una sentencia favorable del Tribunal de Justicia Europeo tras demandar a la Comisión Europea alegando su obstrucción en la comercialización de productos fágicos como Listex™, clasificado como seguro por la FDA. La sentencia permite a la industria alimentaria usar productos fágicos en ausencia de legislación y evidencia la necesidad de un marco legal para una terapia necesaria en el control de las infecciones bacterianas (74).

Son precisas redes nacionales e internacionales que impulsen la terapia fágica, como es el caso de FAGOMA en España, para que ésta siga desarrollándose en los años venideros y pueda ser accesible a clínicos y pacientes.

Con este enfoque en mente la OMS junto a la Federación Internacional de Fabricantes y Asociaciones Farmacéuticas, a la que pertenecen grandes compañías como Bayer o Pfizer, han creado el fondo de acción contra las AMR, que este año ha seleccionado a Adaptive Phage Therapeutics como uno de sus beneficiarios (75).

En la lucha contra la enfermedad se deben usar todos los recursos posibles, lo que nos obliga a descubrir todo el potencial de la terapia fágica.

6. CONCLUSIONES

Los resultados expuestos en la siguiente revisión nos permiten dilucidar las siguientes conclusiones:

- La seguridad y capacidad terapéutica de la fagoterapia convencional ha sido constatada en múltiples estudios *in vitro* e *in vivo*.
- Los enzibióticos, debido a sus ventajas, tienen un prometedor futuro como bactericidas en la práctica clínica y otros ámbitos: ausencia de genes virulentos, estructura fácilmente modificable genéticamente y menor propensión a la aparición de resistencia bacteriana.
- La edición genética representa una herramienta potente en el desarrollo de la fagoterapia, clave para paliar o solucionar los inconvenientes clásicos de la terapia fágica.
- El uso simultáneo de fagos (o sus productos) y antibiótico ha demostrado ser sinérgico, incrementando la acción bactericida y disminuyendo la aparición de resistencia a antibiótico.
- La importancia de la resistencia bacteriana a fagos, no sólo como una variable que debe ser siempre monitorizada en pro de la eficacia de la terapia, sino también como ventaja terapéutica al volver sensible a antibiótico a patógenos previamente resistentes.
- La necesidad de una legislación estatal e internacional que regulé el uso, la fabricación y la comercialización de los productos fágicos, y que facilite el acceso a la terapia.
- La investigación de la terapia fágica precisa de un mayor apoyo institucional con el fin de acelerar su desarrollo y descubrir todas sus capacidades.

7. BIBLIOGRAFÍA

1. Unescoetxea. Crecimiento de la población mundial hasta el año 2050 [Internet]. Unescoetxea. [citado 3 de noviembre de 2021]. Disponible en: https://www.unescoetxea.org/ext/futuros/es/theme_c/mod13/uncom13t01s02.htm
2. Alós J-I. Resistencia bacteriana a los antibióticos: una crisis global. *Enfermedades Infecc Microbiol Clínica*. diciembre de 2015;33(10):692-9.
3. Fernández L, Gutiérrez D, Rodríguez P, García P. Los bacteriófagos: qué son y dónde están. En: *los bacteriófagos: Los virus que combaten infecciones*. Madrid: CSIC; 2020.
4. Kortright KE, Chan BK, Koff JL, Turner PE. Phage Therapy: A Renewed Approach to Combat Antibiotic-Resistant Bacteria. *Cell Host Microbe*. febrero de 2019;25(2):219-32.
5. Hersh AL, Newland JG, Beekmann SE, Polgreen PM, Gilbert DN. Unmet Medical Need in Infectious Diseases. *Clin Infect Dis*. 1 de junio de 2012;54(11):1677-8.
6. D'Costa VM, King CE, Kalan L, Morar M, Sung WWL, Schwarz C, et al. Antibiotic resistance is ancient. *Nature*. septiembre de 2011;477(7365):457-61.
7. European Centre for Disease Prevention and Control (ECDC). Antimicrobial resistance in the EU/EEA (EARS-Net) - Annual Epidemiological Report for 2019 [Internet]. Stockholm: European Centre for Disease Prevention and Control (ECDC); 2020 nov. Disponible en: <https://www.ecdc.europa.eu/en/publications-data/surveillance-antimicrobial-resistance-europe-2019>
8. O'Neill J. Antimicrobial Resistance: Tackling a crisis for the health and wealth of nations [Internet]. 2014. Disponible en: https://amr-review.org/sites/default/files/AMR%20Review%20Paper%20-%20Tackling%20a%20crisis%20for%20the%20health%20and%20wealth%20of%20nations_1.pdf
9. Watkins RR, Bonomo RA. Overview. *Infect Dis Clin North Am*. diciembre de 2020;34(4):649-58.
10. Calbo E, Boix-Palop L, Garau J. Clinical and economic impact of bacterial resistance: an approach to infection control and antimicrobial stewardship solutions. *Curr Opin Infect Dis*. diciembre de 2020;33(6):458-63.

11. Huemer M, Mairpady Shambat S, Brugger SD, Zinkernagel AS. Antibiotic resistance and persistence—Implications for human health and treatment perspectives. *EMBO Rep* [Internet]. 3 de diciembre de 2020 [citado 25 de marzo de 2022];21(12). Disponible en: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.15252/embr.202051034>
12. Durand GA, Raoult D, Dubourg G. Antibiotic discovery: history, methods and perspectives. *Int J Antimicrob Agents*. abril de 2019;53(4):371-82.
13. Subramaniam G, Girish M. Antibiotic Resistance — A Cause for Reemergence of Infections. *Indian J Pediatr*. noviembre de 2020;87(11):937-44.
14. Hankin M. Les microbes des rivières de l'Inde. *Ann Inst Pasteur (Paris)*. 1896;(10):175-6.
15. Chanishvili N. Phage Therapy—History from Twort and d'Herelle Through Soviet Experience to Current Approaches. En: *Advances in Virus Research* [Internet]. Elsevier; 2012 [citado 25 de marzo de 2022]. p. 3-40. Disponible en: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/B9780123944382000013>
16. Twort FW. An investigation on the nature of ultra-microscopic viruses. *The Lancet*. diciembre de 1915;186(4814):1241-3.
17. D'Herelle. On an invisible microbe antagonistic toward dysenteric bacilli: brief note by Mr. F. D'Herelle, presented by Mr. Roux. *Res Microbiol*. septiembre de 2007;158(7):553-4.
18. Cisek AA, Dąbrowska I, Gregorczyk KP, Wyżewski Z. Phage Therapy in Bacterial Infections Treatment: One Hundred Years After the Discovery of Bacteriophages. *Curr Microbiol*. febrero de 2017;74(2):277-83.
19. Dublanchet A, Fruciano E. Brève histoire de la phagothérapie. *Médecine Mal Infect*. agosto de 2008;38(8):415-20.
20. Fruciano DE, Bourne S. Phage as an Antimicrobial Agent: D'herelle's Heretical Theories and Their Role in the Decline of Phage Prophylaxis in the West. *Can J Infect Dis Med Microbiol*. 2007;18(1):19-26.
21. Ackermann H-W, Ruska H. Visualization of bacteriophage lysis in the hypermicroscope. *Naturwissenschaften*1940; 28: 45–6. *Bacteriophage*. julio de 2011;1(4):183-5.
22. Lin RC, Sacher JC, Ceysens P-J, Zheng J, Khalid A, Iredell JR. Phage Biobank: Present Challenges and Future Perspectives. *Curr Opin Biotechnol*. abril de 2021;68:221-30.
23. Center for Innovative Phage Applications and Therapeutics (IPATH). Who we are [Internet]. UC San Diego School of Medicine. 2018. Disponible en: <https://medschool.ucsd.edu/som/medicine/divisions/idgph/research/center-innovative-phage-applications-and-therapeutics/Pages/default.aspx>

24. Zheng J, Sacher J. About us [Internet]. Phage directory. 2017. Disponible en: <https://phage.directory/about>
25. Luong T, Salabarria A-C, Roach DR. Phage Therapy in the Resistance Era: Where do we stand and where are we going? *Clin Ther.* septiembre de 2020;42(9):1659-80.
26. Secor PR, Dandekar AA. More than Simple Parasites: the Sociobiology of Bacteriophages and Their Bacterial Hosts. Garsin DA, editor. *mBio.* 28 de abril de 2020;11(2):e00041-20.
27. Hanlon GW. Bacteriophages: an appraisal of their role in the treatment of bacterial infections. *Int J Antimicrob Agents.* agosto de 2007;30(2):118-28.
28. Ackermann H-W, Prangishvili D. Prokaryote viruses studied by electron microscopy. *Arch Virol.* octubre de 2012;157(10):1843-9.
29. Barco Güete P. Terapia fágica como alternativa a la resistencia a antibióticos. *Npunto.* IV(35):142-6.
30. Kwiatek M, Parasion S, Nakonieczna A. Therapeutic bacteriophages as a rescue treatment for drug-resistant infections – an *in vivo* studies overview. *J Appl Microbiol.* abril de 2020;128(4):985-1002.
31. João J, Lampreia J, Prazeres DMF, Azevedo AM. Manufacturing of bacteriophages for therapeutic applications. *Biotechnol Adv.* julio de 2021;49:107758.
32. Yap ML, Rossmann MG. Structure and function of bacteriophage T4. *Future Microbiol.* diciembre de 2014;9(12):1319-27.
33. Dennehy JJ, Abedon ST. Adsorption: Phage Acquisition of Bacteria. En: Harper DR, Abedon ST, Burrowes BH, McConville ML, editores. *Bacteriophages* [Internet]. Cham: Springer International Publishing; 2021 [citado 25 de marzo de 2022]. p. 93-117. Disponible en: http://link.springer.com/10.1007/978-3-319-41986-2_2
34. Łoś J, Zielińska S, Krajewska A, Michalina Z, Małachowska A, Kwaśnicka K, et al. Temperate Phages, Prophages, and Lysogeny. En: Harper DR, Abedon ST, Burrowes BH, McConville ML, editores. *Bacteriophages* [Internet]. Cham: Springer International Publishing; 2021 [citado 26 de marzo de 2022]. p. 119-50. Disponible en: http://link.springer.com/10.1007/978-3-319-41986-2_3
35. Segundo A N, Hernández B E, López V O, Torres A. Los bacteriófagos como una alternativa en el tratamiento de enfermedades infecciosas Bacterianas (Fagoterapia). *Revista Mexicana de Ciencias Farmacéuticas.* 2010;41(3):17-26.
36. Harper DR. Introduction to Bacteriophages. En: Harper DR, Abedon ST, Burrowes BH, McConville ML, editores. *Bacteriophages* [Internet]. Cham:

- Springer International Publishing; 2021 [citado 26 de marzo de 2022]. p. 3-16.
Disponible en: http://link.springer.com/10.1007/978-3-319-41986-2_48
37. Düzgüneş N, Sessevmez M, Yildirim M. Bacteriophage Therapy of Bacterial Infections: The Rediscovered Frontier. *Pharmaceuticals*. 5 de enero de 2021;14(1):34.
 38. Nikolich MP, Filippov AA. Bacteriophage Therapy: Developments and Directions. *Antibiotics*. 24 de marzo de 2020;9(3):135.
 39. Azam AH, Tan X-E, Veerananarayanan S, Kiga K, Cui L. Bacteriophage Technology and Modern Medicine. *Antibiotics*. 18 de agosto de 2021;10(8):999.
 40. Danis-Włodarczyk K, Dąbrowska K, Abedon ST. Phage Therapy: The Pharmacology of Antibacterial Viruses. *Curr Issues Mol Biol*. 2021;81-164.
 41. Górski A, Międzybrodzki R, Weber-Dąbrowska B, Fortuna W, Letkiewicz S, Rogóż P, et al. Phage Therapy: Combating Infections with Potential for Evolving from Merely a Treatment for Complications to Targeting Diseases. *Front Microbiol* [Internet]. 26 de septiembre de 2016 [citado 26 de marzo de 2022];7. Disponible en: <http://journal.frontiersin.org/Article/10.3389/fmicb.2016.01515/abstract>
 42. Chan BK, Abedon ST, Loc-Carrillo C. Phage cocktails and the future of phage therapy. *Future Microbiol*. junio de 2013;8(6):769-83.
 43. Kaur G, Agarwal R, Sharma RK. Bacteriophage Therapy for Critical and High-Priority Antibiotic-Resistant Bacteria and Phage Cocktail-Antibiotic Formulation Perspective. *Food Environ Virol*. diciembre de 2021;13(4):433-46.
 44. products/pyo-bacteriophage/ [Internet]. pha.ge. [citado 26 de marzo de 2022]. Disponible en: <https://pha.ge/products/pyo-bacteriophage/?lang=en>
 45. About APT – Adaptive Phage Therapeutics [Internet]. [citado 26 de marzo de 2022]. Disponible en: <https://www.aphage.com/about/>
 46. Reina J, Reina N. [Phage therapy, an alternative to antibiotic therapy?]. *Rev Espanola Quimioter Publicacion Of Soc Espanola Quimioter*. abril de 2018;31(2):101-4.
 47. Fathima B, Archer AC. Bacteriophage therapy: recent developments and applications of a renaissance weapon. *Res Microbiol*. septiembre de 2021;172(6):103863.
 48. Azeredo J, García P, Drulis-Kawa Z. Targeting biofilms using phages and their enzymes. *Curr Opin Biotechnol*. abril de 2021;68:251-61.
 49. Abdelrahman F, Easwaran M, Daramola OI, Ragab S, Lynch S, Oduselu TJ, et al. Phage-Encoded Endolysins. *Antibiotics*. 28 de enero de 2021;10(2):124.

50. Murray E, Draper LA, Ross RP, Hill C. The Advantages and Challenges of Using Endolysins in a Clinical Setting. *Viruses*. 15 de abril de 2021;13(4):680.
51. Ramón Martínez Pacheco. Los enzibióticos como agentes terapéuticos antibacterianos y antifúngicos: discurso de contestación [Internet]. Academia de farmacia de Galicia; 2010. Disponible en: https://academiadefarmaciadegalicia.gal/wp-content/uploads/docs/DiscursoIngreso_gonzalez_villa.pdf
52. Staphitekt™ by Microeos [Internet]. [citado 26 de marzo de 2022]. Disponible en: <https://www.staphitekt.com/en/>
53. Artilysin® - Overview - LYSANDO AG [Internet]. [citado 26 de marzo de 2022]. Disponible en: <https://www.lysando.com/overview.html>
54. Vaitekenas A, Tai AS, Ramsay JP, Stick SM, Kicic A. Pseudomonas aeruginosa Resistance to Bacteriophages and Its Prevention by Strategic Therapeutic Cocktail Formulation. *Antibiotics*. 2 de febrero de 2021;10(2):145.
55. Hille F, Richter H, Wong SP, Bratovič M, Ressel S, Charpentier E. The Biology of CRISPR-Cas: Backward and Forward. *Cell*. marzo de 2018;172(6):1239-59.
56. Markulin D. CRISPR-Cas in Escherichia coli: regulation by H-NS, LeuO and temperature. *Period Biol*. 30 de diciembre de 2020;121-122(3-4):155-60.
57. Li Y, Bondy-Denomy J. Anti-CRISPRs go viral: The infection biology of CRISPR-Cas inhibitors. *Cell Host Microbe*. mayo de 2021;29(5):704-14.
58. María Fernanda Lammoglia-Cobo, Ricardo Lozano-Reyes, César Daniel García-Sandoval, Cynthia Michelle Avilez-Bahena, Violeta Trejo-Reveles, Rodrigo Balam Muñoz-Soto, et al. La revolución en ingeniería genética: sistema CRISPR/Cas. agosto de 2016;5(2):116-28.
59. Watson BNJ, Steens JA, Staals RHJ, Westra ER, van Houte S. Coevolution between bacterial CRISPR-Cas systems and their bacteriophages. *Cell Host Microbe*. mayo de 2021;29(5):715-25.
60. Chan BK, Siström M, Wertz JE, Kortright KE, Narayan D, Turner PE. Phage selection restores antibiotic sensitivity in MDR Pseudomonas aeruginosa. *Sci Rep*. julio de 2016;6(1):26717.
61. Pirnay J-P, Verbeken G, Ceysens P-J, Huys I, De Vos D, Ameloot C, et al. The Magistral Phage. *Viruses*. 6 de febrero de 2018;10(2):64.
62. McCallin S. Compassionate phage therapy [Internet]. Phage Directory. [citado 26 de marzo de 2022]. Disponible en: <https://phage.directory/capsid/compassionate-phage-therapy>
63. McCallin, Sacher, Zheng, Chan. Current State of Compassionate Phage Therapy. *Viruses*. 12 de abril de 2019;11(4):343.

64. Fauconnier A. Phage Therapy Regulation: From Night to Dawn. *Viruses*. 17 de abril de 2019;11(4):352.
65. Malik DJ. Approaches for manufacture, formulation, targeted delivery and controlled release of phage-based therapeutics. *Curr Opin Biotechnol*. abril de 2021;68:262-71.
66. Moelling K, Broecker F, Willy C. A Wake-Up Call: We Need Phage Therapy Now. *Viruses*. 5 de diciembre de 2018;10(12):688.
67. Schooley RT, Biswas B, Gill JJ, Hernandez-Morales A, Lancaster J, Lessor L, et al. Development and Use of Personalized Bacteriophage-Based Therapeutic Cocktails To Treat a Patient with a Disseminated Resistant *Acinetobacter baumannii* Infection. *Antimicrob Agents Chemother*. octubre de 2017;61(10):e00954-17.
68. Zaldastanishvili E, Leshkasheli L, Dadiani M, Nadareishvili L, Askilashvili L, Kvatadze N, et al. Phage Therapy Experience at the Eliava Phage Therapy Center: Three Cases of Bacterial Persistence. *Viruses*. 23 de septiembre de 2021;13(10):1901.
69. Liu D, Van Belleghem JD, de Vries CR, Burgener E, Chen Q, Manasherob R, et al. The Safety and Toxicity of Phage Therapy: A Review of Animal and Clinical Studies. *Viruses*. 29 de junio de 2021;13(7):1268.
70. España mantiene el pulso frente a la pandemia silenciosa: la resistencia a los antibióticos [Internet]. Agencia Española de Medicamentos y Productos Sanitarios. 2021 [citado 26 de marzo de 2022]. Disponible en: <https://www.aemps.gob.es/informa/notasinformativas/laaemps/2020-laaemps/espana-mantiene-el-pulso-frente-a-la-pandemia-silenciosa-la-resistencia-a-los-antibioticos/>
71. Tian F, Li J, Nazir A, Tong Y. Bacteriophage – A Promising Alternative Measure for Bacterial Biofilm Control. *Infect Drug Resist*. enero de 2021;Volume 14:205-17.
72. La fagoterapia como alternativa a los antibióticos | Centro de Investigaciones Biológicas Margarita Salas - CIB Margarita Salas [Internet]. [citado 27 de marzo de 2022]. Disponible en: <https://www.cib.csic.es/es/news/otros/la-fagoterapia-como-alternativa-los-antibioticos>
73. Pipeline Overview [Internet]. Armata Pharmaceuticals. [citado 26 de marzo de 2022]. Disponible en: <https://www.armatapharma.com/pipeline/pipeline-overview/>
74. European Court of Justice paves the way for natural phages against *Listeria* – PhageGuard [Internet]. [citado 26 de marzo de 2022]. Disponible en: <https://phageguard.com/european-court-phages/>

75. Armstrong A. Big Pharma-backed \$1B AMR Action Fund picks 1st antimicrobial biotech investments [Internet]. Fierce Biotech. 2022 [citado 10 de abril de 2022]. Disponible en: <https://www.fiercebiotech.com/biotech/big-pharma-backed-1b-amr-action-fund-picks-first-biotechs-address-address-drug-resistant>
76. Figueiredo CM, Malvezzi Karwowski MS, da Silva Ramos RCP, de Oliveira NS, Peña LC, Carneiro E, et al. Bacteriophages as tools for biofilm biocontrol in different fields. *Biofouling*. 3 de julio de 2021;37(6):689-709.