

# Tratamiento con bacteriófagos como una alternativa antimicrobiana potencial

**Elsa T. Pimienta-Rodríguez**

Grupo de Biotecnología, Centro de Estudios de Investigaciones y Evaluaciones Biológicas, Instituto de Farmacia y Alimentos, Universidad de La Habana. Avenida 23 No. 21425 entre calles 214 y 222, La Coronela, La Lisa, Código Postal 13 600, La Habana, Cuba. epimienta@infomed.sld.cu

Recibido: 15 de septiembre de 2012.

Aceptado: 24 de noviembre de 2012.

Palabras clave: bacteriófagos, terapia con fagos, antibióticos, resistencia a antibióticos.

Key words: bacteriophage, phage therapy, antibiotics, antibiotic resistance.

Los bacteriófagos (fagos) son las entidades vivientes que más abundan en el planeta y los enemigos naturales de las bacterias. El aislamiento del primer fago fue reportado por Felix d'Herelle y Edward Twort, quienes informaron paralelamente el hallazgo de entidades filtrables capaces de destruir a las bacterias.<sup>1,2</sup> En 1917, Felix d'Herelle utilizó satisfactoriamente una preparación de fagos para tratar la disentería bacteriana en humanos.<sup>2</sup>

La comercialización exitosa de fagos terapéuticos para tratar infecciones bacterianas en humanos comenzó en la década del 40 del siglo pasado en Francia por d'Herelle y en los Estados Unidos por la compañía farmacéutica Eli Lilly. Siguiendo este éxito, varias compañías en los Estados Unidos, Alemania y Francia produjeron grandes cantidades de preparaciones de lisados de fagos.<sup>3,4</sup> La terapia con fagos floreció en la antigua Unión Soviética (URSS) donde estos permanecieron como una terapia estándar del sistema de salud; aun cuando el uso de los antibióticos estaba en su esplendor en el oeste. En ese estado, las preparaciones de fagos se usaron en la terapia, profilaxis o el diagnóstico de infecciones bacterianas como disentería, diarreas, fiebre tifoidea, infecciones sépticas-purulentas relacionadas con quemaduras, inflamación de órganos y heridas.<sup>5</sup>

A pesar de las propiedades de los fagos líticos, estos no se utilizan comúnmente en la profilaxis o terapia antimicrobiana a nivel internacional y su eficacia es aún objeto de controversia. Muchos factores han contribuido a esta situación; entre ellos: la identificación incorrecta de los agentes etiológicos, pureza insuficiente de las preparaciones de fagos, carencia de conocimientos sobre la heterogeneidad (fagos líticos vs lisogénicos) y su modo de acción, fallo en el establecimiento de evidencias científicas sobre la eficacia clínica del tratamiento con fagos, pobre estabilidad, entre otros. Estos factores, unidos a que los antibióticos de amplio espectro pueden actuar eficientemente en ausencia del diagnóstico confirmado del agente patógeno, condujeron a la disminución del interés en el uso de los fagos terapéuticos.<sup>5,6</sup>

En este comentario especializado se describen brevemente las principales aplicaciones iniciales de los fagos terapéuticos y se revisa la literatura reciente, enfatizando en la

investigación realizada en los países del oeste de Europa y los resultados de los principales ensayos clínicos realizados hasta la fecha.

## **ESTADO ACTUAL DE LA TERAPIA ANTIMICROBIANA CONTRA BACTERIAS MULTIRRESISTENTES**

De acuerdo con informes recientes de la Organización Mundial de la Salud, en EE. UU. mueren anualmente aproximadamente 14 000 personas por infecciones resistentes a los medicamentos. Internacionalmente el 60 % de las infecciones reportadas son resistentes a los agentes antimicrobianos.<sup>5-7</sup> En América Latina, las cepas bacterianas más peligrosas han sido denominadas ESKAPE: *Enterococcus faecalis*, *Staphylococcus aureus*, *Klebsiella*, *Acinetobacter baumannii*, *Pseudomonas aeruginosa* y *Escherichia coli*.<sup>5,7</sup>

A pesar de esta problemática, el número de nuevos antibióticos disponibles en el mercado ha disminuido en la última década.<sup>7,8</sup> No es un secreto que las grandes compañías farmacéuticas han perdido el interés en la búsqueda de nuevos antibióticos. Se estima que menos de diez compañías en EE. UU. y Europa mantienen programas activos de investigación-desarrollo (I + D) para agentes antimicrobianos.<sup>7-9</sup> Este hecho está relacionado con que se estima que se ha descubierto la mayoría de los blancos terapéuticos que permiten una toxicidad selectiva de los compuestos y por otra parte, las nuevas metodologías, como la exploración de los genomas microbianos y los métodos de búsqueda de elevado tamizaje, no han cumplido las expectativas iniciales.<sup>8</sup> En este escenario, también ha influido la existencia de muchos antibióticos genéricos en el mercado, que tienen grados variables de efectividad y que son utilizados como terapia de primera línea por muchas autoridades sanitarias. Además, la duración de un tratamiento con agentes antimicrobianos es limitada, lo cual es menos ventajoso económicamente que la producción de medicamentos para el tratamiento de enfermedades cardiovasculares, neurológicas, músculo-esqueléticas o el cáncer.<sup>6</sup> Finalmente, las normas establecidas por las agencias reguladoras también han influido en esta situación, como es el caso de la Administración de Alimentos y Medicamentos en EE. UU. (FDA), que ha insistido en la necesidad de realizar ensayos clínicos con placebo en pacientes con infecciones bacterianas severas, lo cual ha frenado la realización de estudios clínicos fase II y III.<sup>10</sup>

Actualmente, se estima que aproximadamente el 70 % de las bacterias que causan infecciones en hospitales son resistentes, al menos a uno de los antibióticos de primera línea. Algunas bacterias son resistentes a todos los antibióticos aprobados y son únicamente tratadas con medicamentos experimentales y potencialmente tóxicos. Por lo antes expuesto, los científicos y médicos están reevaluando retrospectivamente la problemática para encontrar un tratamiento efectivo en la terapia con fagos.<sup>5,6</sup>

## **DESARROLLO DE TERAPIAS CON BACTERIOFAGOS EN HUMANOS**

El uso y producción de fagos para la terapia y profilaxis en humanos continuó a pequeña escala, aun después del advenimiento y propagación de los antibióticos en el oeste de Europa y los EE. UU.<sup>11</sup> El Instituto Pasteur de Francia produjo preparaciones de fagos contra *Pseudomonas*, *Staphylococcus*, *E. coli* y *Serratia* hasta 1974. Estos fagos fueron usados principalmente contra infecciones de la piel, septicemia, osteomielitis, infecciones por heridas, del tracto urinario, el oído medio y de los senos nasales.<sup>11,12</sup> En los EE. UU., los lisados de fagos estafilocócicos (LFE) fueron usados en la preparación de vacunas humanas y veterinarias. Los ensayos clínicos fueron completados en 1959 y los LFE fueron licenciados para su uso en humanos y administrados por vía intranasal, tópica, oral, subcutánea e intravenosa.<sup>12</sup> La eficacia de

la terapia con fagos fue demostrada en ensayos clínicos, en los cuales 607 pacientes, que no respondían a tratamientos convencionales, fueron tratados satisfactoriamente con fagos. Además, no se reportaron efectos secundarios. Desafortunadamente, debido a presiones reguladoras, la producción de LFE para la terapia en humanos fue suspendida en los años 90 y actualmente solo se comercializan los LFE con aplicaciones veterinarias.<sup>10</sup>

En contraste, la terapia con fagos comenzó y fue extensivamente utilizada en la URSS, después de la Segunda Guerra Mundial, y se mantiene actualmente en Rusia. Las preparaciones de fagos fueron ampliamente utilizadas en dermatología, estomatología, otorrinolaringología, oftalmología, ginecología, pediatría, cirugía, gastroenterología, urología y neumología.<sup>13</sup> Uno de los institutos más conocidos por estudiar y producir preparaciones de fagos terapéuticos fue el Instituto Tibilisi en la República de Georgia, fundado en 1923 por Georgi Eliava y Felix d'Herelle. Desde su fundación hasta los años 90, el instituto suplió a toda la URSS con preparaciones de fagos terapéuticos.<sup>10</sup> Este Instituto ha producido fagos para el tratamiento y profilaxis de infecciones sépticas-purulentas e intestinales. Las preparaciones de fagos han sido aplicadas por vía oral (líquidas o tabletas), local (en tampones, enjuagues y cremas), rectal, aerosol, por nebulizador y endovenosa.<sup>5</sup>

En sus inicios, varios factores afectaron la aprobación internacional de los virus bacterianos para el tratamiento de infecciones, entre ellos: el desconocimiento sobre la diversidad, modo de acción y naturaleza heterogénea de los fagos (ciclo lítico y lisogénico), pureza insuficiente de sus preparaciones, la no obtención de títulos apropiados, pobre estabilidad y viabilidad de las preparaciones de fagos. También influyó la falta de herramientas apropiadas para la rápida identificación de los patógenos bacterianos y la no neutralización del pH gástrico para la administración oral de las preparaciones de fagos.<sup>5</sup>

Posteriormente, las preparaciones de fagos fueron sometidas a ensayos clínicos y se publicaron artículos sobre sus resultados.<sup>13-22</sup> Sin embargo, los estándares soviéticos de los ensayos clínicos no cumplían con las regulaciones internacionales vigentes. La mayoría de los reportes fallaron en el establecimiento de evidencias científicas sobre la eficacia clínica del tratamiento con fagos, ya que fueron generalmente realizados sin controles de placebo. Además, la literatura soviética (fundamentalmente difundida en ruso y georgiano) no estuvo frecuentemente disponible para el resto del mundo. Recientemente, algunos de los antiguos resultados soviéticos sobre los ensayos clínicos de la terapia con fagos en adultos e infantes fueron publicados en una monografía en idioma inglés.<sup>13</sup> El análisis de los datos mostró la efectividad de los fagos contra sepsis estafilocócica, infección séptica de los pulmones (abscesos agudos y crónicos, neumonía crónica y bronquitis crónica) y osteomielitis. Los resultados de estos estudios también revelaron que el tratamiento combinado de fagos y antibióticos fue más efectivo que la monoterapia.<sup>5</sup>

Actualmente, la composición de las preparaciones de fagos son bastante similares en Rusia. Estas preparaciones son mezclas polivalentes de fagos anti-disentería, anti-*Salmonella*, anti-*coli-proteus*, anti-estafilococos, anti-*Pseudomonas aeruginosa*, anti-*Klebsiella pneumoniae* y anti-estreptococos para aumentar su espectro lítico.<sup>23</sup> La aplicación de las preparaciones polivalentes de fagos han dado buenos resultados y son reconocidas en las regulaciones de los servicios sanitarios rusos.<sup>23</sup>

Es importante destacar que actualmente en Rusia los especialistas que trabajan con fagos terapéuticos no publican casi sus resultados en revistas científicas indexadas, en comparación con el flujo de publicaciones del oeste y solo se pueden encontrar sus resultados en internet. Por ejemplo, un grupo de doctores no identificados señalaron

sobre el tratamiento de infecciones urológicas ("Medicinskaya kartoteka" No. 6,1998, <http://medi.ru/doc/6280613.htm>): "la terapia con fagos ha sido usada fundamentalmente para el tratamiento de enfermedades urológicas inflamatorias e infecciosas crónicas: cistitis, pielonefritis, prostatitis, uretritis y en algunos casos de situaciones sépticas purulentas agudas en un total de 46 pacientes".

El tratamiento con fagos terapéuticos sigue en uso en países como Polonia. El estudio más completo de la terapia con fagos fue liderado por el profesor S. Slopek.<sup>23</sup> La eficiencia antibacteriana de la terapia con fagos fue bien documentada en estos estudios, en los que se obtuvieron resultados satisfactorios como consecuencia de una cuidadosa selección de los fagos para cada patógeno aislado. Entre los años 1981-1986, se aplicó esta terapia en 550 casos de infecciones bacterianas purulentas. Se obtuvieron resultados positivos en 508 casos (92,4 %). En 38 casos (6,9 %) se observó una mejoría notable y solo en cuatro casos (0,7 %) el tratamiento con fagos fue inefectivo.<sup>23</sup>

La eficacia de la terapia combinada de fagos y antibióticos contra infecciones *in vivo* ha sido documentada por ensayos *in vitro*.<sup>23</sup> Se ha demostrado que los fagos toman ventaja de la alteración de la pared celular bacteriana —tratada con antibióticos— para incrementar su propia producción y además acelerar la lisis de las células infestadas; permitiendo a los fagos diseminarse más rápidamente.<sup>24</sup>

Recientemente, se ha llamado a la comunidad internacional al establecimiento de bancos de fagos para apoyar esta terapia y para la investigación básica. En el Congreso de Microbios o Virus de Paris en 2010, la Colección Alemana de Microorganismos (DSMZ) anunció su disposición para coleccionar fagos con propósitos terapéuticos.<sup>23</sup> El intercambio de especies de fagos entre las diferentes instituciones ayudará significativamente, ya que podrán elaborarse cocteles de fagos con un mayor espectro lítico y desacelerarse la búsqueda de nuevos fagos en la naturaleza.

Es importante enfatizar que la terapia con fagos, hasta el momento, debe ser solo considerada como una *demonstración de posibilidades*. A favor de la aplicación de los fagos en la práctica clínica se destaca su inocuidad a los humanos, fundamentalmente cuando son aplicados por vía tópica. La evaluación del efecto toxicológico de un fago no es equivalente a los estudios realizados para los antibióticos, ya que estos últimos poseen estructuras químicas complejas que frecuentemente pueden causar eventos adversos no deseados en los pacientes. Los fagos son componentes naturales que están distribuidos ampliamente en la naturaleza. Muchos estudios han demostrado la ausencia de toxicidad de los fagos después de su consumo oral y aplicación en las heridas infestadas. Esto sugiere realizar los estudios disponibles actualmente para la caracterización de los fagos potencialmente terapéuticos: microscopía electrónica, análisis de ADN por restricción y secuenciación de sus genomas con las respectivas anotaciones y comparaciones con las bases de datos. De esta forma, se buscarían evidencias de posibles elementos que promuevan su toxicidad, eventos de transferencia horizontal de genes u otros estudios filogenéticos. Hasta el momento, se han secuenciado más de 500 genomas de fagos, pero las funciones de los productos génicos se desconocen para la mitad de los posibles marcos abiertos de lecturas.<sup>25</sup>

Muy pocos estudios fase I se han realizado y publicado<sup>26-29</sup>, mientras que otros no se han publicado. En 2009, un ensayo clínico fase I, aprobado por la FDA fue reportado sobre la evaluación de un coctel de fagos que contenía ocho monófagos, entre ellos, contra: *S. aureus*, *P. aeruginosa* y *E. coli*. Este coctel fue desarrollado para tratar pacientes con úlceras venosas infestadas en los pies. Los resultados de este ensayo mostraron que la preparación de fagos fue segura.<sup>28</sup> También en 2009, la compañía británica *Biocontrol Limited* reportó un ensayo clínico I/II a doble ciegas controlado para la otitis crónica causada por *P. aeruginosa*. En contraste con el tratamiento con

antibióticos, que requiere la administración de grandes cantidades en el curso del tratamiento, la terapia con fagos requirió solamente una dosis simple de 600 000 fagos (2,4 ng). Un resultado positivo fue reportado en el que se mostraron bajas concentraciones de *P. aeruginosa* en los oídos y mejoría de las condiciones clínicas.<sup>29</sup> Hasta el momento, este ha sido el único ensayo de eficacia controlado para la terapia con fagos. Otros experimentos han sugerido que el tiempo de vida media de los fagos en el torrente sanguíneo no es suficientemente largo, pero se han encontrado mutantes del fago lambda que han persistido por más tiempo.<sup>25</sup> Todos estos ensayos, junto con otros estudios no tan bien reportados, indican que la terapia con fagos es una alternativa prometedora para el tratamiento de infecciones causadas por bacterias resistentes a los antibióticos. De acuerdo con el Servicio Nacional de Salud de Estados Unidos ([www.clinicaltrials.gov](http://www.clinicaltrials.gov)), se están preparando tres nuevos ensayos clínicos con fagos terapéuticos, en los cuales dos de ellos se encuentran en la fase de reclutamiento de pacientes.

En los últimos años, se ha hecho énfasis en el cuidado que debe prestarse a la utilización de los fagos en otro tipo de aplicaciones, por ejemplo, como antisépticos en la producción de alimentos; ya que el empleo desmedido de los fagos puede acelerar la emergencia de cepas bacterianas resistentes a múltiples fagos y ello afectaría la utilización de esta herramienta en la lucha contra las enfermedades infecciosas.

Sin lugar a dudas, los fagos presentan varias ventajas como alternativa o complemento a los antibióticos en la terapia de infecciones bacterianas. Dentro de ellas se destaca su seguridad ecológica (son inofensivos a los humanos, a las plantas y a los animales) debido a su gran especificidad por el receptor bacteriano. En los últimos años han surgido nuevas herramientas diagnósticas más robustas y que han facilitado la identificación de los patógenos bacterianos con mayor rapidez y precisión que en los inicios de la terapia con fagos. Entre otras ventajas, se encuentran que los fagos pueden ser seleccionados y manipulados por ingeniería genética hasta obtener un espectro cerrado sobre un blanco bacteriano particular, no se describen efectos secundarios a los multi-componentes de sus preparaciones y su producción es relativamente simple y barata.

El desafío principal para la expansión del uso de los fagos será la realización de ensayos clínicos a gran escala, de acuerdo con la FDA y las regulaciones de la Agencia de Medicina Europea (EMA). Estos procedimientos generalmente son muy caros y toman mucho tiempo, pero dado el contexto actual de resistencia de los patógenos bacterianos reemergentes o nuevas especies multirresistentes a los antibióticos, urge que la comunidad científica reúna esfuerzos en la realización de los ensayos correspondientes.

## **CONCLUSIONES**

La utilización terapéutica de los fagos es promisoria dada las potencialidades que ofrece la terapia combinada de preparaciones de fagos y antibióticos, en comparación con la monoterapia. Sin lugar a dudas, el desafío principal para el uso seguro de los fagos será la realización de ensayos clínicos a gran escala, de acuerdo con las entidades reguladoras más rigurosas. Para ello será necesario la implementación de nuevas regulaciones para evaluar la efectividad terapéutica de los fagos, las cuales deben ser diferentes a los estándares establecidos para los antibióticos.

## **REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS**

1. D'Herelle F. Sur un microbe invisible antagoniste des bacteries dysenteriques. C. R. Acad. Sci. 1917; 165:373-375.

2. Twort FW. An investigation on the nature of ultra-microscopic viruses. *Lancet*. 1915; 2:1241-1243.
3. Bruynogue R, Maisin J. Essais de therapeutique au motern du bacteriophage. *C R Soc Biol*. 1921; 85:1120-1.
4. Straub ME, Appelbaum M. Studies of commercial bacteriophage products. *J Am Med Assoc*. 1932; 100:110-113.
5. Kutateladze M, Adamia R. Bacteriophages as potential new therapeutics to replace or supplement antibiotics. *Trends in Biotechnology*. 2010; 28:591-595.
6. Moellering C. Discovering new antimicrobial agents. *International Journal of Antimicrobial Agents*. 2011; 37:2-9.
7. Boucher HW, Talbot GH, Bradley JS, Edwards JE, Gilbert D, Rice LB, *et al*. Bad bugs, no drugs: no ESKAPE! An update from the Infectious Diseases Society of America. *Clin Infect Dis*. 2009; 48:1-12.
8. Infectious Diseases Society of America. The 10x20 initiative: pursuing a global commitment to develop 10 new antibacterial drugs by 2020. *Clin Infect Dis*. 2010; 50:1081-3.
9. Fox JL. The business of developing antibacterials. *Nat Biotechnol*. 2006; 24:1521-8.
10. Shifting goalposts in antibiotic approval. *Lancet Infect Dis*. 2006; 6:751.
11. Gill J, Hayman P. Phage choice, isolation and preparation for phage therapy. *Curr Pharm Biotechnol*. 2012; 11:2-14.
12. Salmon GG, Symonds M. Staphage lysate therapy in chronic staphylococcal infections. *J Med Soc N J*. 1963; 60:188-193.
13. Chanishvili N. A Literature Review of the Practical Application of Bacteriophages Research. Eliava Institute of Bacteriophages. *Microbiology and Virology*. 2009.
14. Chanishvili N, Chanishvili T, Tediashvili M, Barrow PA. Phages and their application against drug-resistant bacteria. *Journal of Chemical Technology and Biotechnology*. 2001; 76:689-699.
15. Chanishvili N, Sharp R. Bacteriophage therapy: experience from the Eliava Institute, Georgia. *Aust. Microbiol*. 2008; 20:96-101
16. Kutateladze M, Adamia R. Phage therapy experience at the Eliava Institute. *Med. Malad. Infect*. 2008; 38:426-430.
17. Kutter E, Sulakvelidze. *Bacteriophages: Biology and Applications*, CRC Press. 2005.
18. Sulakvelidze A, Alavidze Z, Morris JG Jr. Bacteriophage therapy, minireview. *Antimicrob. Agents Chemother*. 2001; 45:649-659.
19. Chanishvili N. A literature review of the practical application of bacteriophages research. Eliava Institute of Bacteriophages, *Microbiology and Virology*, Tbilisi, Georgia. 2009.
20. Shevyakova OL. Effect of phages on the antibiotic-resistant bacteria *Dysenteriae flexneri*. *Antibiotics*. 1956; (N6):40-42.
21. Summers WC. *The hope of phage therapy. Felix d'Herelle and the origins of molecular biology*. New Haven, CT: Yale University Press; 1999. 108-24.
22. Courchesne NM, Parisien A, Lan CQ. Production and application of bacteriophage and bacteriophage-encoded lysins. *Recent Pat Biotechnol*. 2009; 3:37-45.
23. Krylov VN. Use of live phages for therapy on a background of coevolution of bacteria and phages. *International Research Journal of Microbiology*. 2011; 2 (9):315-332.

24. Comeau A, Tetart F, Trojet S. Phage-Antibiotic Synergy (PAS): b-lactam and quinolone antibiotics stimulate virulent phage growth. PLoS One. 2007; 2:e799.
25. Sulakvelidze A. The challenges of bacteriophage therapy. European Industrial Pharmacy. 2011; 14 (10):14-18.
26. Bruttin A, Brüssow H. Human volunteers receiving *Escherichia coli* phage T4 orally: a safety test of phage therapy. Antimicrob. Agents Chemother. 2005; 49:2874-2878.
27. Merabishvili M, Pirnay JP, Verbeken G. Quality-controlled small-scale production of a well-defined bacteriophage cocktail for use in human clinical trials. PLoS ONE. 2009; 4, e4944.
28. Rhoads DD, Wolcott RD, Kuskowski MA, Wolcott BM, Ward LS, Sulakvelidze A. Bacteriophage therapy of venous leg ulcers in humans: results of a phase I safety trial. J Wound Care. 2009; 18:237-243.
29. Wright A, Hawkins CH, Anggård EE, Harper DR. A controlled clinical trial of a therapeutic bacteriophage preparation in chronic otitis due to antibiotic-resistant *Pseudomonas aeruginosa*; a preliminary report of efficacy. Clin Otolaryngol. 2009; 34:349-57.