



FACULTAD DE FARMACIA

Grado en Farmacia

TRATAMIENTO CON FAGOS PARA BACTERIAS MULTIRESISTENTES

Memoria de Trabajo Fin de Grado

Sant Joan d'Alacant

Junio 2021

Autor: Andrea Ruiz Román

Modalidad: Revisión bibliográfica

Tutor: Enrique Barraión

ÍNDICE:

RESUMEN	3
ANTECEDENTES	4
1.2 Clasificación y mecanismo de acción:	6
1.3 Resistencia antibióticos.....	8
1.4 Mecanismos de resistencia	9
1.4 Fagoterapia	11
2. MATERIALES Y MÉTODOS.....	12
2.1 Diseño:.....	12
2.2 Estrategia de búsqueda.....	12
2.3 Criterios de selección	13
2.4 Consideraciones éticas	13
3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	13
3.1 Mecanismos de resistencia y características de los fagos	16
3.2 Bacterias multirresistentes a antibióticos o MDR.....	19
3.3 Estrategias utilizadas para la revertir la resistencia mediante la fagoterapia	20
3.4 Combinación de fagos y antibióticos	24
3.5 Ventajas y desventajas de la fagoterapia.....	26
4. CONCLUSIÓN	29
5. REFERENCIAS.....	30
ANEXO 1	33
.....	33
.....	33

RESUMEN

Introducción: Uno de los grandes problemas de la actualidad es la resistencia bacteriana a los antimicrobianos actuales y las escasas alternativas para combatir dicha resistencia. Entre esas alternativas se encuentra la terapia con fagos.

Objetivos: El objetivo de este trabajo es exponer los avances de la fagoterapia frente a las bacterias resistentes.

Metodología: El trabajo se trata de una revisión sistemática que examina la evidencia científica disponible a través de la base de datos Medline (Pubmed).

Resultados y discusión: Tras realizar la búsqueda y el análisis de los artículos, se contó finalmente con 8 artículos. Existen múltiples mecanismos de resistencia de las bacterias frente a los antimicrobianos actuales, sin embargo, la fagoterapia es una alternativa prometedora frente a dicho problema.

Conclusión:

Los fagos son una alternativa prometedora frente a la resistencia bacteriana a los antimicrobianos convencionales. La combinación de los fagos y antibióticos es otra estrategia importante a tener en cuenta. A pesar de sus limitaciones, la fagoterapia muestra resultados positivos frente a los antimicrobianos

ANTECEDENTES

El primer producto antibacteriano de origen natural fue descubierto por E. Freudenreich al estudiar un pigmento azul liberado por la *Pseudomona aeruginosa*. En 1928 Alexander Fleming descubrió la penicilina (procedente de del hongo *Penicillium notatum*). Posteriormente a la penicilina, en 1935 el descubrimiento del colorante rojo de Prontosil en las infecciones por estreptococos propulsaron las sulfonamidas y por lo tanto el descubrimiento de otros antimicrobianos como los macrólidos y los aminoglucósidos. Estos dos hechos marcaron el inicio de la edad de oro del descubrimiento de antibióticos, siendo el mayor avance médico del siglo XX. Esta edad de oro alcanzó su punto máximo en 1950 y desde entonces ha habido una disminución del descubrimiento y del desarrollo de estos.

Hasta finales del siglo XX y principios del siglo XXI no se reconoció la importancia de la aparición de resistencias frente a los grupos de antibióticos. Es entonces cuando se empezó a tomar medidas para intentar frenarlas o revertirlas. ¹

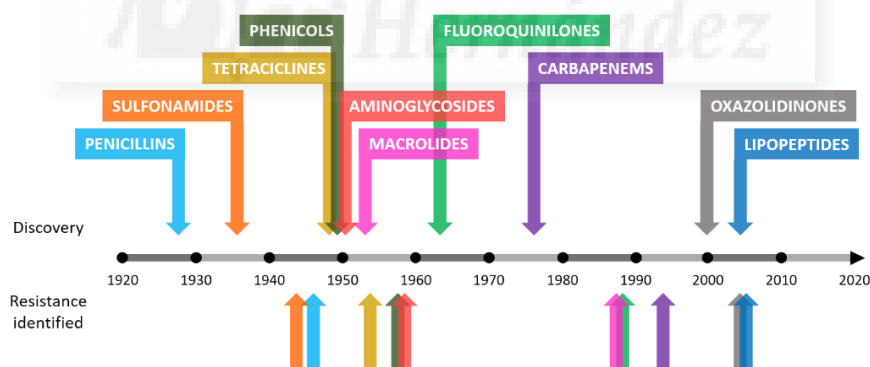


FIGURA 1: Fechas aproximadas de descubrimiento de nuevas clases de antibióticos e identificación de resistencia bacteriana. ²

Unos de los factores que han influido en la aparición de las resistencias, ha sido el uso excesivo y mal controlado de los antibióticos tanto a nivel clínico como animal. Esto es debido a que estos fármacos se han usado como promotores del crecimiento en animales desde su descubrimiento.

Sin embargo, los principales motivos por los que se desencadenan las resistencias son debido al mal uso en humanos. Como son:

- El desconocimiento o falta de confianza al no estar seguros del diagnóstico los médicos prescriben antibióticos.
- Presión por parte del paciente
- Prescripción del antibiótico de mayor espectro y más nuevo.
- Duración incorrecta del tratamiento.
- Profilaxis inadecuadas. ³

1.1 Concepto

Un antimicrobiano es una sustancia producida por un organismo vivo capaz de inducir la muerte o suprimir el crecimiento de otros microorganismos como son los virus, las bacterias y los hongos. Pueden ser naturales, semisintéticos y sintéticos. ⁴

Los antimicrobianos se pueden a su vez dividir en dos grandes grupos según su acción sobre el microorganismo. De esta manera y tomando como ejemplo aquellos antibióticos con acción sobre las bacterias hablaríamos de:

- Bactericidas: tienen una acción letal produciendo la muerte de la bacteria. Atacan la pared bacteriana e inhiben la síntesis de proteínas entre otros. (Betalactámicos, aminoglucósidos y la rifampicina)
- Bacteriostáticos: No matan al microorganismo, previenen la proliferación de estos mediante la inhibición de su crecimiento. Son las Tetraciclinas, Cloranfenicol, Macrólidos, Lincosaminas, sulfamidas y Trimetropina⁵

Esta misma agrupación se puede extrapolar a los agentes antivirales y a los antifúngicos.

1.2 Clasificación y mecanismo de acción:

Independientemente de si son bactericidas o bacteriostáticos, los antibióticos se clasifican según su mecanismo de acción en diferentes grupos:

- **Inhibidores de la formación de la pared bacteriana:**

- **Betalactámicos:** son bactericidas, de amplio espectro, con características farmacocinéticas favorables y escasos efectos adversos. Entre ellos se encuentran las penicilinas, cefalosporinas, monobactámicos y los carbapenemes. Su mecanismo de acción consiste en inhibir la última parte de la síntesis de peptidoglicano y tiene acción de las PBP (Penicillin Binding Protein), enzimas transpeptidasas y endopeptidasas a las que se unen a los betalactámicos impidiendo la formación de la pared de peptidoglucano y produciendo la muerte de la bacteria.
- **Glicopéptidos:** entre ellos se encuentra la vancomicina y teicoplanina. Se unen a las bacterias y ejercen un efecto bactericida mediante la inhibición de la síntesis y ensamblaje de la segunda etapa del peptidoglicano de la pared celular.

- **Inhibidores de la síntesis proteica:**

- **Aminoglucósidos:** Se unen de forma irreversible a la subunidad 30S del ribosoma y por lo tanto bloquea la síntesis proteica de la bacteria. Son bactericidas de acción rápida.
- **Macrólidos:** El mecanismo de acción es similar al de los aminoglucósidos, sin embargo, se unen a la subunidad 50S del ARN ribosómico de forma reversible. Son bacteriostáticos, pero a altas concentraciones son bactericidas.
- **Cetólidos y las lincosamidas** tienen un mecanismo de acción similar a los macrólidos.

- Tetraciclinas: Se unen a la subunidad 30s ribosómica impidiendo el acceso de los aminoacil-t-ARNs que no pueden unirse a la proteína en crecimiento. La síntesis de proteínas por lo tanto se detiene y ocasiona la muerte de la célula.

- **Inhibidores de la duplicación del ADN:**

- Quinolonas: actúan inhibiendo la ADN girasa (enzima que cataliza el superenrollamiento del ADN cromosómico y asegura la división celular)
- Rifampicina: Inhiben la transcripción a nivel de la ARN-polimerasa, ésta se fija en la subunidad B de esta enzima e impide la formación y la del complejo que inicia la transcripción. -Metronidazol, Quinolonas y Antiviricos.

- **Inhibidores de la membrana citoplasmática:** Estos alteran la membrana citoplasmática modificando la permeabilidad y por lo tanto provocan la salida de iones de potasio, estos iones son elementos esenciales para la vida de la bacteria. Son bactericidas. En este grupo pertenecen las polimixinas, lipopéptidos y los antibióticos poliénicos.

- **Inhibidores de las vías metabólicas:**

Inhiben las vías metabólicas y por lo tanto impiden el crecimiento bacteriano, son bacteriostáticos.

- Sulfamidas: Inhiben de manera competitiva el ácido paraaminobenzoico (PABA) impidiendo la síntesis del ácido fólico bacteriano (factor para el crecimiento de microorganismos), es un análogo de los metabolitos bacterianos.

-Trimetoprima: Inhibidor de enzimas bacterianas, inhibe la enzima dihidrofolato reductasa obstruyendo la formación de ácido tetrahidrofólico, metabolito necesario para la síntesis de purinas por la bacteria.⁴⁻⁶

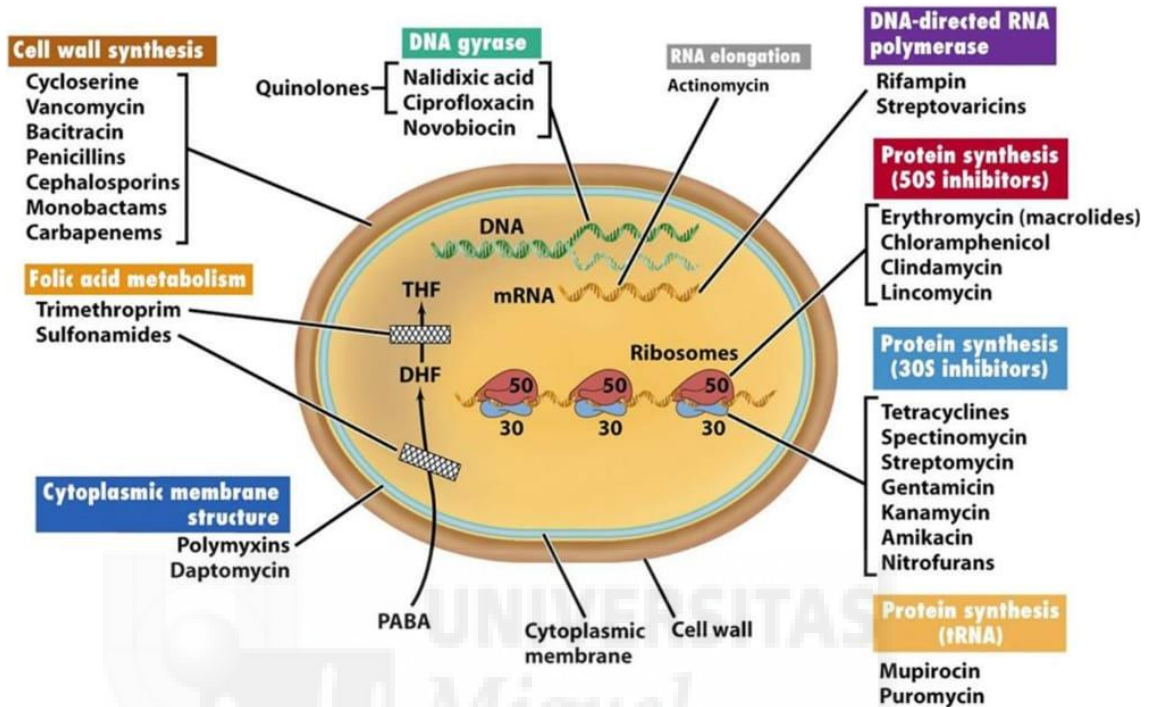


FIGURA 2 Mecanismo de acción de los antimicrobianos ⁷.

1.3 Resistencia antibióticos

Según la OMS, la resistencia a los antimicrobianos se produce cuando los microorganismos sufren cambios que hacen que los medicamentos utilizados para curar las infecciones dejen de ser eficaces. Se refiere por tanto al comportamiento de un determinado antibiótico frente a un germen.

El antibiograma se utiliza para evaluar la resistencia y sensibilidad de las bacterias a los antibióticos de uso clínico. Las pruebas de sensibilidad se basan en la difusión o bien en el cálculo de la concentración mínima inhibitoria (CMI).

Se han llevado a cabo mediante grandes farmacéuticas¹ y organizaciones gubernamentales², colegios profesionales³ y hospitales diferentes iniciativas para para poder controlar el uso de los antibióticos.⁸

1.4 Mecanismos de resistencia

Frente a los mecanismos de acción de los diferentes antibióticos las bacterias han desarrollado unos mecanismos de resistencia. A su vez, la resistencia puede ser natural o adquirida.

La resistencia natural es característica de la bacteria y es inherente a una especie en particular. La resistencia adquirida en cambio es un cambio de la composición genética de la bacteria y es el verdadero problema en la clínica.

Existen mecanismos por los cuales una bacteria se puede deshacer de la acción de una molécula antimicrobiana como son: las bombas de eflujo o excreción, modificación o inactivación del antibiótico mediante enzimas hidrolíticas, bloqueo de la penetración del antibacteriano mediante la modificación del sitio activo, alteración o disminución de la permeabilidad de la membrana celular bacteriana, sobreexpresión del sitio blanco y la formación de biofilms

Estos mecanismos resistentes pueden desarrollarse por mutaciones cromosómicas o por intercambio o adquisición de material genético con otras bacterias o mediante procesos como (Figura 3):

-Transformación: Transferencia o incorporación por una bacteria de ADN libre extracelular procedente de la lisis de otras bacterias.

-Transducción: Transferir el ADN cromosómico o plasmídico de una bacteria a otra por un bacteriófago.

¹ AMR Action Fund Antimicrobial Resistance Research

² ECDC: European Centre for Disease Prevention and Control y PRAN: Plan Nacional Resistencia Antibióticos

³ CGCOF: Consejo General de Colegios Oficiales de Farmacéuticos

-Transposición: Movimiento de una sección de ADN con genes para la resistencia a antibióticos y otros genes unidos para expresar un promotor en particular.

-Conjugación: Intercambio del material genético entre dos bacterias.⁹

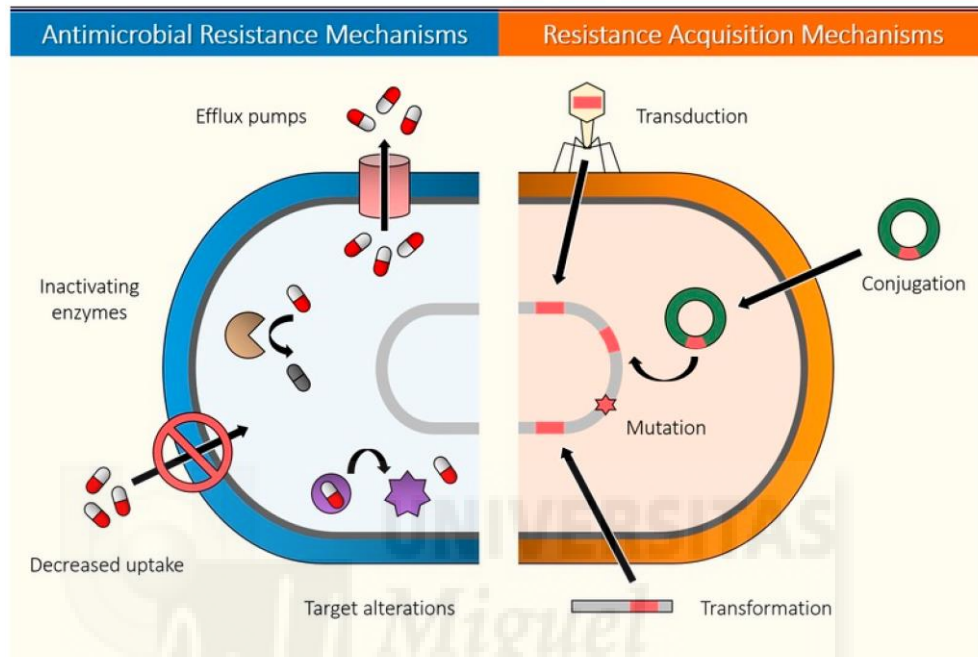


FIGURA 3: Mecanismos de resistencia a los antimicrobianos y mecanismos de adquisición en bacterias ¹⁰

Las principales bacterias que presentan mayor resistencia a los antibióticos son:

- Gram positivas: *Enterococcus sp*, *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus epidermis*, *Streptococcus pneumoniae*, *Streptococcus pyogenes*, *Streptococcus agalactiae*, *Micobacterium tuberculosis*, *Clostridium perfringes*
- Gram negativas: *Escherichia coli*, *Acitenobacer sp*, *Pseudomona aeruginosa*, *Klebsiella neumoniae*, *Neisseria gonorrhoeae*, *Haemophilus influenzae*.¹¹

1.4 Fagoterapia

Debido al incremento de la resistencia antibacteriana en las bacterias humanas se ha favorecido el estudio de terapias alternativas para combatirlo. Una de estas terapias es la fagoterapia.

La fagoterapia es una técnica antimicrobiana que actúa mediante virus. Estos virus al afectar a las bacterias se llaman bacteriófagos o fagos.

Un virus es un microorganismo constituido por ácidos nucleicos y proteínas que se replica en el interior de las células hospedadoras y presenta dos estados diferentes: extracelular e intracelular. En este caso, se trata de virus con cola y receptores para el reconocimiento bacteriano. Las familias de bacteriófagos más relevantes son: Myoviridae, Podoviridae y Siphoviridae.

El mecanismo de acción de los fagos es mediante el reconocimiento de la superficie de la célula bacteriana con alta especificidad, inyectan su ADN O ARNS y se multiplica dentro de la bacteria, para finalmente romper la célula y liberar su progenie, provocando por tanto la infección de nuevas células bacterianas (Figura 4).¹²

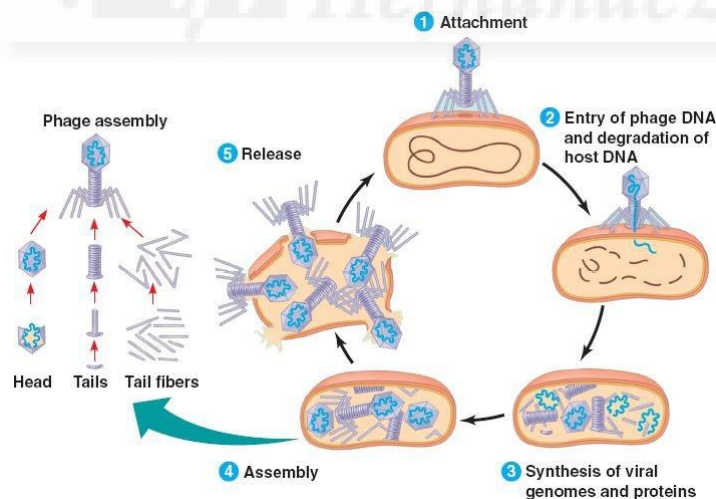


FIGURA 4: Ciclos de infección de los fagos. ¹³

OBJETIVOS:

El objetivo principal es realizar una revisión sistemática de la documentación científica disponible sobre los tratamientos en los últimos 5 años para las cepas multirresistentes a los antibióticos. Para ello se plantean los siguientes objetivos específicos:

- Seleccionar la bibliografía más relevante sobre el tema
- Identificar los principales tratamientos empleados y valorar la evidencia científica de su acción.
- Estudiar las perspectivas futuras e identificar las principales líneas de investigación actuales sobre el tema.

2. MATERIALES Y MÉTODOS

2.1 Diseño:

Se ha realizado una revisión sistemática de los artículos científicos existentes acerca de los tratamientos a las cepas multirresistentes a los antibióticos.

2.2 Estrategia de búsqueda

Una vez identificado el concepto de interés y el tema de estudio, se realizó una búsqueda bibliográfica. Para llevar a cabo esta revisión se utilizó como fuente de información científica principal la base de datos de MEDLINE (mediante PUBMED). También se consultaron algunas páginas web como El Plan Nacional frente a la Resistencia a los Antibióticos (PRAN).

Para realizar la búsqueda en primer lugar se han seleccionado unas palabras clave a través de la página web de Descriptores en Ciencias de la Salud (DeCS). Posteriormente, se delimitan los Medical Subject Heading (MeSH). Los términos de búsqueda utilizados en nuestro trabajo son: "Bacteriophages", "Drug Resistance, Bacterial" y "Anti-Bacterial Agents".

Finalmente, la ecuación de búsqueda es la siguiente: ("Bacteriophages"[Mesh]) AND ("Drug Resistance, Bacterial"[Mesh]) AND ("Anti-Bacterial Agents"[Mesh]) mediante MEDLINE, vía PubMed

2.3 Criterios de selección

Con el fin de obtener la información adecuada para la realización del trabajo se seleccionaron todos los artículos que estuvieran publicados en inglés y castellano y siendo en la población de humanos la población de estudio. Además, se incluyeron solo artículos publicados en los últimos cinco años con la finalidad de obtener los artículos más recientes. Los filtros utilizados por tanto son: "humans", "English" OR "Spanish", "5 years" y que tenga la disponibilidad de leer el resumen y a leer el texto completo.

Fueron excluidos de esta revisión, los artículos que presentaban información diferente al tema de estudio, los que estuviesen publicados en otro idioma que no fuese inglés o español, así como las publicaciones cuya población de estudio fuese diferente a la de humanos.

Por otro lado, se analizaron las referencias bibliográficas de cada uno de los artículos finalmente seleccionados con el fin de rescatar otros estudios diferentes, que contengan también información en relación con el tema, para tener la posibilidad de incluirlos en el tema

2.4 Consideraciones éticas

Este TFG ha sido aprobado por la Oficina de Investigación Responsable de la Universidad Miguel Hernández de Elche con la referencia: **TFG.GFA.EBC.ARR.201112**. (ver documento anexo)

3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Siguiendo la ecuación de búsqueda se obtuvieron un total de 460 artículos en MEDLINE. Tras aplicar los criterios de inclusión y exclusión y consultar los listados bibliográficos de los artículos se seleccionaron 105 artículos.

Se examinó cada uno de los estudios y se descartaron 96, teniendo como resultado final 9 artículos como se muestra en el siguiente diagrama de flujo

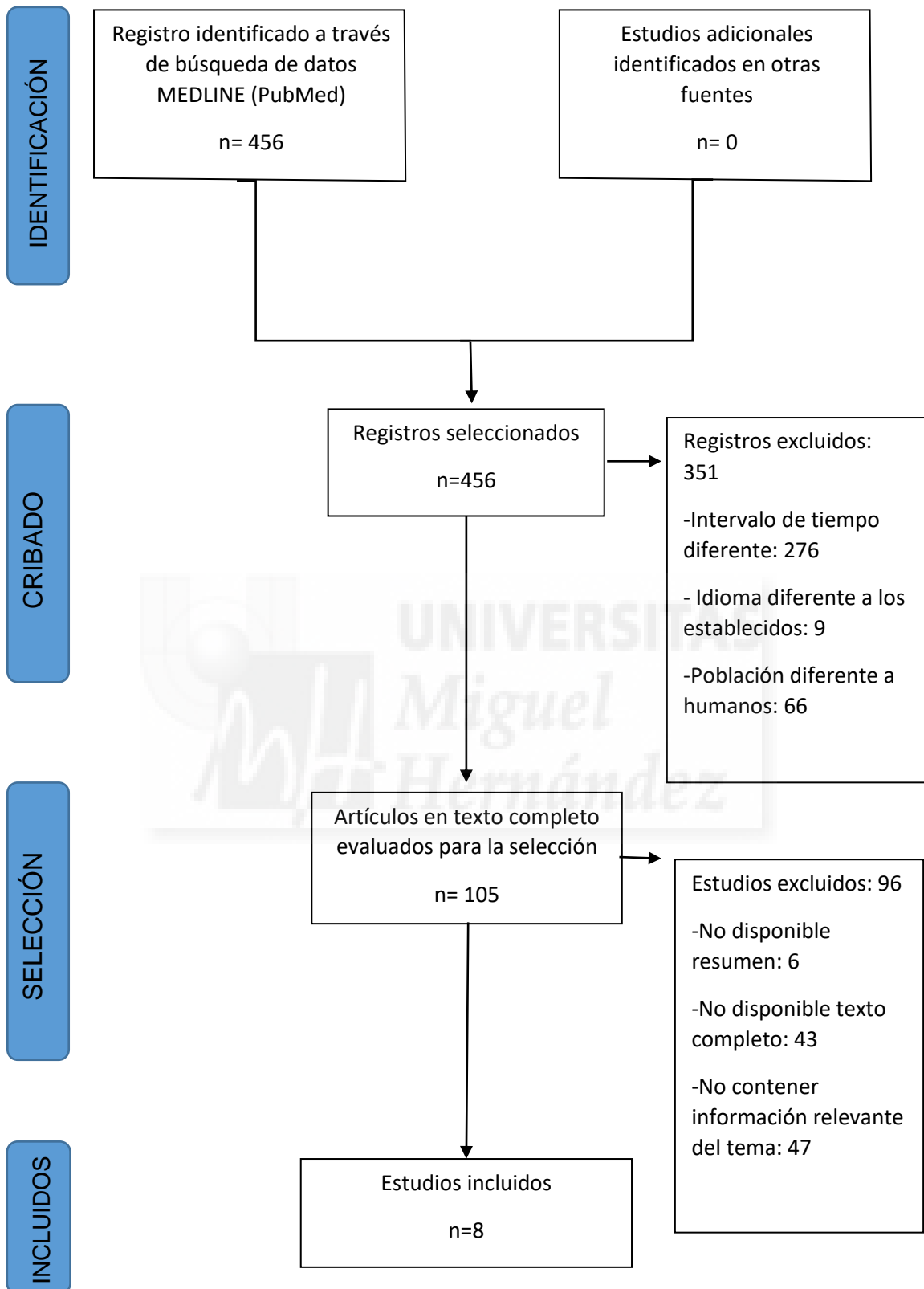


Figura 5: Identificación y selección de estudios

Título	Autor	Año	Diseño	Resultado
Resistance Development to Bacteriophages Occurring during Bacteriophage Therapy	Frank Oechslin	2018	Revisión	Variantes resistentes a los fagos 80% medio intestinal y en el 50% en los modelos de sepsis, variantes resistentes en humanos, mutaciones, mutaciones animales confieren resistencia
The disparate effects of bacteriophages on antibiotic-resistant bacteria	Clara Torres Barceló	2018	Revisión	Las ventajas específicas de la terapia con fagos frente a los antibacterianos frente a la resistencia bacteriana
Fagoterapia ¿Una alternativa a la antibioticoterapia?	Jordi Reina et al	2018	Revisión	Las ventajas y desventajas de los fagos frente a los antimicrobianos.
Defeating Antibiotic-Resistant Bacteria: Exploring Alternative Therapies for a Post-Antibiotic Era	Chih-Hung Wang et al	2020	Revisión	Las diferentes alternativas terapéuticas para combatir a microorganismos multirresistentes.
Phage-Derived Antibacterial: Harnessing the Simplicity, Plasticity, and Diversity of Phages	Bi-O Kim et al	2019	Revisión	Las diferentes utilidades de los fagos y los enfoques principales para las aplicaciones de ellos.
Fitness-Trade-Offs Resulting from Bacteriophage Resistance Potentiate Synergistic Antibacterial Strategies	Mihnea R Mangalea et al	2020	Revisión	Mecanismos de resistencia de las bacterias frente a los fagos.
Ameliorating the antimicrobial resistance crisis: phage therapy	Dibya Saha et al	2019	Revisión	Ensayos clínicos que demuestran los beneficios de la terapia con fagos
What's Old Is New Again: Bacteriophage Therapy in the 21st Century	Saima Aslam et al	2019	Comentario	Características de la terapia con fagos para las infecciones a múltiples fármacos y sus desafíos en cuanto al diseño y ejecución de los ensayos clínicos para evaluar su eficacia.

La resistencia a los antimicrobianos es un importante problema de salud pública a nivel mundial, según los datos publicados por la Comisión Europea y el Centro Europeo para la Prevención y el Control de Enfermedades (ECDC) las infecciones por bacterias resistentes a los antibióticos causaron 33.000 muertes en 2015 en Europa. Por ello, se desarrollan nuevas estrategias terapéuticas además de los antimicrobianos ya existentes. Entre estas estrategias se encuentran los bacteriófagos. En 2015 se celebró una reunión por la Agencia Europea del Medicamento (EMA) para tratar el papel de la fagoterapia en el tratamiento de las bacterias multirresistentes.

3.1 Mecanismos de resistencia y características de los fagos

Las bacterias son capaces de resistir los ataques de fagos a través de múltiples mecanismos, entre ellos se encuentran las mutaciones espontáneas, los sistemas de modificación de restricción e inmunidad adaptativa a través del sistema CRISPR-Cas.¹⁴

En primer lugar, las mutaciones pueden formarse de manera espontánea o mediante la transferencia horizontal entre las células de la distinta o misma especie. Los genes de resistencia a antibióticos (ARG) en los cromosomas bacterianos o en los plásmidos pueden movilizarse por los fagos durante su ciclo de infección, este mecanismo es la transducción y consiste en transferir el material genético entre organismos. Existen dos tipos de transducción:

- **Generalizada**: Los fagos transfieren cualquier parte del cromosoma bacteriano. Durante la lisis inducida por fagos, el cromosoma bacteriano se fragmenta, una pieza se encapsula y forma una partícula traductora. Estos fagos no contienen los genes, solo la cápside tiene origen viral. A pesar de ello, la partícula transductora inyecta los genes bacterianos en la célula receptora y mediante recombinación se puede incorporar en la célula del huésped. Para ellos los receptores de la célula deben de ser reconocidos por el fago y parte de la célula debe ser homologada para que se lleve a cabo la recombinación.

- **Especializada:** Se transfieren únicamente algunas partes. Esta transducción se lleva a cabo mediante la inserción de los genomas del fago en una región concreta del cromosoma del huésped.

Este proceso de transferencia horizontal, podría ser la responsable de aportar determinantes de patogenicidad y factores de virulencia, determinando la formación o aparición de nuevas bacterias patógenas o mucho más resistentes. Para ello habría que elegir fagos sin capacidad de transmisión genética o modificarlos previamente para eliminar este proceso natural.

La transmisión de ARG por fagos está demostrado en bacterias como son la *Salmonella*, *Clostridium*, *Streptococcus*, *Staphylococcus* y *Bacillus*.

En un estudio se mostró que un producto humano liberado por células faríngeas desencadena la inducción y la transducción generalizada de fagos endógenos de *S.pyrogenes*. Esta transducción *in vivo* de los genes bacterianos incluyó uno que codificaba la bomba de eflujo y por lo tanto confería resistencia a los antibióticos macrólidos. Este hallazgo es importante dado que es un patógeno humano estricto y los fagos pueden propagar los genes de resistencia¹⁵.

En cuanto a las mutaciones espontáneas son los principales mecanismos de resistencia a los fagos, además, impulsan la coevolución fago-bacteriana. Las modificaciones espontáneas confieren resistencia a los fagos ya que modifican la estructura de los componentes de la superficie bacteriana, la cual actúa como receptora del fago y determina su especificidad. Aun así, las bacterias resistentes a los fagos pueden volverse menos virulentas en caso de mutaciones en factores de virulencia de superficie como en los lipopolisacáridos (LPS)¹⁴. Los polisacáridos, son polímeros extracelulares producidos por la bacteria que abundan como receptores asociados a la pared celular del huésped, estos proporcionan beneficios estructurales y funcionales a la célula bacteriana ¹⁶ Así pues, tanto los polisacáridos, como las proteínas integrales, los factores de virulencia, los antígenos y los transportadores de nutrientes son una de las principales líneas de defensa de las bacterias contra la infección de los fagos.

Es decir, la superficie de la célula bacteriana está repleta de moléculas receptoras para la posible infección y adsorción de los fagos, ya que estos no son móviles y dependen de interacciones, de su rango y especialidad con las células del huésped.

Entre otros de los sistemas de defensa bacterianos frente a la infección por fagos, se encuentran las proteínas CRISPR-Cas y los sistemas de modificación de restricción que protege a las bacterias del ADN invasivo extraño. Existen también sistemas de infección por aborto para facilitar la destrucción de las células bacterianas infectadas para así reducir la carga de los fagos dentro de la población. Estos mecanismos de resistencia suelen ser efectivos, pero no del todo infalibles y pueden combatirse mediante la dosis infecciosa del fago y las mutaciones en el rango del hospedador que permiten a los fagos alterar la inmunidad bacteriana una vez sus genomas están dentro de las células. Con ello se permite a los fagos superar la inmunidad bacteriana una vez dentro de las células. Los mecanismos que bloquean la adsorción inicial de fagos a la célula y prohíben la infección se seleccionan durante la evolución de la resistencia bacteriana, a pesar de los defectos de aptitud que dan lugar a desventajas competitivas bacterianas.

Otro problema en cuanto a combatir a las bacterias resistentes es la formación de biofilms, ya que su resistencia es extrema frente a los antimicrobianos. Esto es debido a que al estar protegidas de las defensas del huésped acaban convirtiéndose en enfermedades crónicas. Los fagos son capaces de penetrar estos biofilms lo que supone una ventaja a la hora de acabar con la resistencia ocasionado por ellos. Además, se pueden suplementar con antibióticos convencionales para mayor efectividad.¹⁷

En ausencia de terapia contra las bacterias se puede llegar a una situación en la que las defensas del hospedador no son capaces de combatirlas y desencadenar la muerte del paciente. En cambio, la combinación de la propia defensa del huésped y la terapia con fagos conduce al crecimiento bacteriano negativo y por lo tanto no se alcanzarían densidades que podrían ser letales.

Existen pocos ensayos clínicos sobre la terapia de fagos y su resistencia, entre ellos podemos destacar:

-Międzybrodzki et al en su estudio observó cómo en el 40% de los pacientes con un resultado positivo, se erradicó del 20% de los patógenos utilizando la monoterapia de fagos. La aparición de resistencia durante la terapia de fagos también se documentó en un estudio sobre la infección cutánea crónica por *S. aureus*, demostrando como con el tratamiento de dos productos antiestafilococicos mejoró los síntomas de un paciente, a su vez se observó resistencia de fagos al empleo de una combinación de ellos después de tres meses de tratamiento por lo que llevó a un cambio de combinación.¹⁵

- Otros estudios europeos en Polonia y la Unión Soviética, Slopek et al. Estos autores administraron preparaciones de fagos en pacientes con infecciones superficiales causadas por *Staphylococcus*, *Escherichia*, *Proteus* y *Pseudomonas*. En este estudio se demostró una curación del 92,4%. En otro estudio en paciente con cáncer y bacteriemia la administración oral de fagos tres veces al día permitió la curación cuando el tratamiento antibiótico en cambio había fallado. En el texto no se recoge información acerca de los virus usados. A pesar de no ser un estudio aleatorizado ni un ensayo clínico controlado, pero consideraban que era una curación cercana al 85% y por lo tanto una terapia eficaz.¹⁷

3.2 Bacterias multirresistentes a antibióticos o MDR

Entre las bacterias resistentes a antimicrobianos están los patógenos “ESKAPE” incluidos entre ellos *Enterococcus faecium*, *Staphylococcus aureus*, *Klebsiella pneumoniae*, *Acinetobacter baumannii*, *Pseudomonas aeruginosa* y las especies de *Enterobacter*, que son las principales causantes de los ingresos hospitalarios. Estas bacterias escapan eficazmente de los efectos de los fármacos bacterianos y son por lo tanto una causa de coste hospitalario ¹⁸. En Europa mueren aproximadamente 400.000 personas por las bacterias MDR en 2007 y provocó millones de euros en costes hospitalarios.¹⁹

Las bacterias MDR se etiquetan por su resistencia a más de un agente antimicrobiano según las pruebas de susceptibilidad *in vitro*. Los pacientes que son infectados por estas bacterias y se les administra una terapia antimicrobiana tardía la posibilidad de obtener un tratamiento clínico adecuado es menor independientemente del paciente y de la especie. ¹⁸

Por todo ello, los bacteriófagos líticos se han estudiado para ser agentes antimicrobianos contra las bacterias MDR. y se han realizado diferentes estudios para comprobar su eficacia:

En el estudio de Kuipers et al. Se intentó erradicar la colonización por *Klebsiella pneumoniae* productora de carbapenemasas. Este microorganismo estaba asociado a infecciones en el tracto urinario recurrentemente en un paciente con urostomía permanente. Al utilizar una combinación personalizada de fagos se observó una completa eliminación de la bacteria hasta un año después de la administración del tratamiento ²⁰ (Figura 6)



Figura 6: Actividad lítica de bacteriófagos anti-*Klebsiella pneumoniae* en el agar de doble capa. ²¹

3.3 Estrategias utilizadas para la revertir la resistencia mediante la fagoterapia

Para combatir la resistencia de las bacterias se propusieron entre otros dos modelos de terapia con fagos. Por un lado, se encuentran los cócteles de fagos y en segundo lugar, adaptar los fagos de manera individual a las características de cada pacientes, es decir una terapia de fagos personalizada.

- La terapia de **fagos en cócteles** se trata de combinar diferentes y múltiples fagos para así mejorar la efectividad tras aumentar el número de patógenos potenciales objetivo y ampliar el rango del hospedador. A su

vez, es una estrategia para revertir la resistencia ya que se espera que con dicha combinación, la resistencia disminuya dado que se dirigen a diferentes receptores de la superficie bacteriana.

Mediante la recolección del patógeno aislado del paciente se puede llegar a la producción de **fagos personalizados**, ya sean únicos o en cócteles. En contra de esta estrategia estaría el coste, ya que al ser un tratamiento personalizado y no poder aprovecharlo para distintos pacientes aumentaría el valor de éste, sin embargo, contiene una ventaja ya que puede combatir la aparición de las resistencias de manera más eficaz además de otorgar una mayor flexibilidad en lo que se refiere al espectro del fago. ¹⁵

Se ha comprobado por medio de diferentes autores como al mezclar diferentes fagos frente a la bacteria *Clostridium difficile* previene la formación de biofilms mencionados anteriormente, así como también en *Proteus mirabilis*, también formadora de estos en las infecciones del catéter urinario ¹⁷

Por otro lado, en 2006, se aprobó un ensayo clínico de fase I por la FDA, en donde participaban 42 pacientes con úlceras cutáneas. Este ensayo pretendía evaluar la seguridad de combinaciones ocho fagos (Tabla 1) para lisis a *Staphylococcus aureus*, *P. aeruginosa* y *E. coli*. Los resultados obtenidos fueron positivos tanto en la eficacia terapéutica como en la seguridad. ¹⁷

Administración	Condición	Fase	Resultado
Bacteriofago WPP-201	Úlceras venosas en las piernas	I	No se encontró problemas en la seguridad del tratamiento
Cóctel de fago T4	Diarrea	I/II	Los fagos orales mostraron un tránsito intestinal seguro en los niños, sin embargo, no se mostró

			mejora en cuanto a la diarrea, debido probablemente a la poca cobertura de fagos.
Cóctel de fago <i>E.coli</i>	Infección por heridas	I/II en curso	Aún no se han publicado resultados
Terapia tópica anti- <i>Staphylococcus</i> bacteriofago Lysin CF-301	Infecciones estafilococas de pie diabético, infecciones del torrente sanguíneo por <i>S. aureus</i> .	En curso	Aún no se han publicado resultados
VAPGH P128	Colonización nasal <i>S.aureus</i> en úlcera venosa	I/II completado	Aún no se han publicado resultados

Tabla 1: bacteriófagos y proteínas derivadas de fagos aprobadas en los ensayos clínicos. ¹⁷

Aún así, se han documentado casos como el de Zhvania et al. Donde en una infección cutánea crónica por *S.aureus* se utilizaba un tratamiento con dos productos anti estafilocócitos y mejoró los síntomas de pacientes a partir de los siete días (Tabla 2). Sin embargo, se obtuvo resistencia de fagos al cóctel después de tres meses de tratamiento y se tuvo que cambiar por un cóctel alternativo. ¹⁴

Preparación fago	Composición
Bacteria pyo	Lisados de fago de <i>Streptococcus</i> , <i>Staphylococcus spp</i> , <i>E.Coli</i> , <i>Pseudomona aeruginosa</i> y <i>Proteus spp</i>
Estafilococo bacteriofago	Lisados de fago de <i>Straphylococcus spp</i>
Bacteria de fersis	Lisados de fago <i>Staphylococcus spp</i> , <i>Streptococcus spp</i> .

Tabla 2: preparaciones de fagos utilizados en el tratamiento. ¹⁴

En cuanto a la terapia individualizada, se informó en un paciente con *A. baumannii* diseminada resistente a múltiples fármacos. Se administró vía parenteral, fagos personalizados (Figura 7), estos se seleccionaron mediante pruebas in vitro de pases seriados y se observó resistencia a dos de los cócteles. Por lo tanto, se preparó un tercer cóctel utilizando los aislados resistentes que luego se administró al paciente y se observó un resultado positivo de la infección. El fenotipo resistente a los fagos surgió al tiempo se asocia a mayor susceptibilidad a los antibióticos cuando se administró simultáneamente los fagos y los antibióticos. ¹⁴

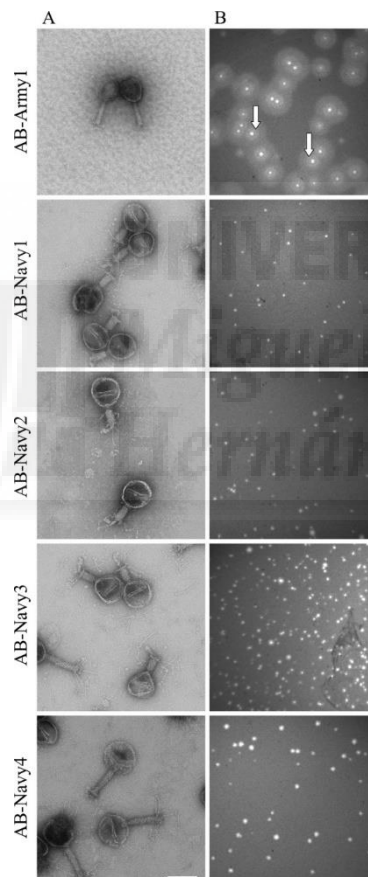


Figura 7: Fagos utilizados; (A) Micrografías electrónicas de AB-Army1 y AB-Navy1–4. Barra de escala, 100 nm. (B) Morfologías de placa de AB-Army1 y cada uno de los fagos AB-Navy1-4 en placas de agar superior AB5075 y AB5075P LB, respectivamente.²²

Otro caso de terapia personalizada con fagos exitosa es en un paciente de trasplante de pulmón, por infección de *P aeruginosa* resistente a fármacos. Se administró al paciente diferentes cócteles por vía intravenosa o inhalación. La

susceptibilidad de las bacterias al fago se controló durante el tratamiento. Conforme iban surgiendo resistencias se administraban nuevos cócteles de fagos. ¹⁴

Por lo tanto, mediante la terapia con fagos en humano, se aprecia la aparición de resistencia y es un caso grave asociado a un fracaso de la terapia si no se logra controlar adecuadamente. En los casos estudiados se monitoreó la resistencia y se observó adaptación de la composición de los fagos administrados.

Por todo ello, los tratamientos individualizados y el uso de cócteles de fagos podrían ser una solución para las infecciones bacterianas polimicrobianas o resistentes a fagos y se ha demostrado en varios casos ya mencionados anteriormente además de en infecciones del tracto urinario asociada a otras bacterias como son *P. aeruginosa* y *Proteus mirabilis*. Los fagos naturales tienen una capacidad evolutiva que en el laboratorio antes de la administración se puede guiar para obtener una mejora de infectividad, ampliar la gama de los huéspedes o promover capacidades deseadas.

3.4 Combinación de fagos y antibióticos

Debido al interés surgido hacia las terapias con fagos para las infecciones bacterianas se plantea también una combinación de estos con antimicrobianos, es decir, un ataque sinérgico sobre las bacterias diana que impida la evolución de la resistencia debido a sus limitaciones de la aptitud física. ¹⁶

Se explica de la siguiente forma: Durante la infección, mediante la colonización y las presiones del hospedador se impulsa a la producción del factor de virulencia de las bacterias, en cambio, la presión del depredador (en este caso el fago) puede producir una disminución del factor de virulencia, lo que produciría una compensación a la resistencia.

Además, los fagos son capaces de utilizar moléculas que se encuentran en la superficie bacteriana las cuales son la defensa contra los antibióticos a través

del flujo de salida, la absorción de nutrientes en entornos donde los hospedadores con recursos limitados o en el mantenimiento general de la pared celular. Esta asociación entre las moléculas receptoras a los fagos y la respuesta bacteriana a los antibióticos es una consideración importante para la terapia de fagos.

Por lo tanto, la terapia de combinación entre antimicrobianos y fagos es una opción terapéutica innovadora para las bacterias resistentes.

Aun así, existen dudas, ya que en algunas ocasiones se utilizan dosis subletales de antibióticos que puede aumentar la ineffectividad de los fagos, siendo independiente de la resistencia a los antibióticos característica de cada bacteria. Esto es debido a que se encargan de aumentar el número de virus producidos y a su vez disminuye la densidad bacteriana de manera sinérgica.¹⁵

Sin embargo, se ha demostrado que el mecanismo causante de la sinergia fago-antibiótico se asocia al desencadenamiento del alargamiento celular por los antibióticos y esto beneficia a la replicación del fago y a la unión externa a la bacteria por un aumento de la superficie celular. Además, los fagos y los antibióticos tienen compensaciones evolutivas entre los mecanismos de resistencia. Se ha comprobado que la combinación puede ser beneficiosa para muchas bacterias resistentes como la *P. aureginosa* y la *S. aureus*. Los fagos por lo tanto podrían prolongar la vida de los antibióticos agotados por su falta de efectividad y la aplicación de ambos también podría hacer más fácil el camino hacia el tratamiento únicamente de fagos.

Una de las características de los fagos, es que debido a su genoma es fácil realizar alteraciones mediante ingeniería genética. Es decir, al modificarlos y utilizarlos junto con antimicrobianos se incrementa la actividad bactericida de estos y permite la disminución de resistencias a ciertos antimicrobianos.¹⁷

Esta combinación es beneficiosa en gran parte debido a que la mayoría de la resistencia a los antimicrobianos son causadas por característica de las bacterias, como pueden ser:

- Permeabilidad al fármaco

-Su extrusión a través de bombas de salida, ya que su despliegue en la membrana puede ser inducido por la presencia de antibióticos.

En las bombas de eflujo, los fagos utilizan las regiones expuestas en la superficie de la membrana como receptores, por lo tanto, se dirigen a las bacterias que expresan mayor número de estos. La idea detrás de esta estrategia es imponer la presión de selección sobre una población heterogénea de bacterias donde las células positivas de la bomba de eflujo de múltiples fármacos son lisadas por el fago y evitando la resistencia a los antibióticos. Así pues, al utilizar el antimicrobiano posteriormente se puede eliminar los restantes. Esta estrategia se ha demostrado con la *P. aureginosa* resistente a múltiples fármacos²³

Las bacterias, además, tienen un sistema SOS, cuando ocurre un daño del ADN causado por antimicrobianos, lo que le otorga resistencia. La combinación de bacteriófagos y antimicrobianos se ha demostrado que produce una mayor eliminación de los patógenos. Algunos antibióticos al inhibir la división celular inducen la respuesta SOS de la bacteria, y por lo tanto aumenta la biomasa y la capacidad biosintética de las células, esto puede producir filamentación, que se asocia a una mayor producción de fagos y por lo tanto una mayor efectividad.²³

3.5 Ventajas y desventajas de la fagoterapia.

Los estudios revisados destacan la importancia de buscar una alternativa a los antimicrobianos existentes y a alternativas como la fagoterapia, sin embargo, los autores reflejan varias ventajas frente a las terapias convencionales actuales pero algunas desventajas y retos que supone esta nueva estrategia para combatir la resistencia.

- Desventajas:

- En la fagoterapia se necesita establecer la etiología de las bacterias causante de la infección de manera rápida, ya que los fagos son extremadamente específicos. Aun así, con la combinación de fagos podría resolverse dicho problema.

-La seguridad; los fagos son capaces de transferir el ADN de una bacteria a otra, por lo que durante este proceso se podría también transferir factores de virulencia o determinantes de patogenicidad, formando nuevas resistencias. También en este caso, se podrían emplear alternativas para modificar los fagos de manera que no tuviesen capacidad de transmitir genéticamente.

- Otra de las limitaciones de los fagos es que pueden ser reconocidos por el sistema inmunitario, al igual que cualquier otro virus, y por lo tanto el organismo puede eliminarlos disminuyendo su eficacia. Sin embargo, para este tipo de anticuerpo que crea el sistema inmune se han desarrollado tres posibles soluciones como son: Utilizar una nueva combinación de fagos, incrementar la dosis o administrar dosis más frecuentes para dificultar la respuesta inmune. Hasta aquí todas las mencionadas son del ¹⁷

- El tamaño de los fagos, en comparación con otras partículas es grande (20-200nm) y por lo tanto los fagos con unas dimensiones más grandes son más fácilmente reconocidos por lo que dejan de ser efectivos. ¹⁹

-Escaso interés por parte de la industria farmacéutica, apenas existen preparaciones comerciales de fagos en Europa o EEUU para uso humano. ¹⁷

-Las autoridades sanitarias mundiales no han reconocido que la fagoterapia beneficie a los pacientes y por lo tanto no se han elaborado guías de producción, calidad y seguridad. Aunque pueden regularse siguiendo las directrices de las vacunas víricas atenuadas, son biológicamente distintos a otras preparaciones farmacéuticas. Ya que además existen preparados aprobados por la FDA de fagos, estos son utilizados en la industria alimentaria para eliminar bacterias enteropatógenas.¹⁷

-Después del tratamiento con fagos existe una rápida resistencia de los patógenos a estos. ¹⁸

- Ventajas

- Los antibacterianos producen una modificación del microbiota intestinal que en ocasiones es un problema grave, en cambio con el uso de la fagoterapia este efecto es evitable. Es importante destacar que el cóctel de fagos no dejó un

impacto detectable en la composición del microbiota intestinal normal en comparación con el tratamiento con ampicilina, que alteró significativamente el microbiota intestinal ¹⁸

-Al poder combinar fagos con antibióticos pueden aumentar su eficacia.

- Una gran ventaja frente a los antibacterianos, es su cinética de destrucción rápida y capacidad de autorreplicarse en el sitio de infección.¹⁴

-A pesar de la mayor duración de la fagoterapia, se ha demostrado que su coste es inferior al de los antibióticos, por ello supondrían un ahorro en la sanidad.¹⁷

Además, los fagos se consideran antibióticos de la naturaleza y también pueden ser beneficiosos para otros usos, como desinfectante quirúrgico y hospitalario, pero aún no se han explotado por completo ¹⁸

-Eliminan específicamente a las especies o cepas objetivo además de tener mayor eficacia, se localizan el sitio de infección y son solo eficaces hasta que la bacteria diana desaparece, por lo que no produce ninguna otra alteración.

-Los fagos son biológicos con poca toxicidad o efectos secundarios ya que están compuestos por ADN y proteínas por lo tanto garantiza el desarrollo y la producción rentable.

- Los fagos, tienen un espacio para el diseño y rediseño mayor que los antimicrobianos, o que permite una continua mejora en los productos biológicos.

4. CONCLUSIÓN

Tras la realización de esta revisión bibliográfica se han podido establecer, de acuerdo con los objetivos fijados las siguientes conclusiones:

-La terapia con fagos es una alternativa para combatir la resistencia bacteriana que cada vez es un problema de salud más grave.

-Pese a los múltiples mecanismos de resistencia de las bacterias los fagos son capaces de combatirlos mediante diferentes estrategias.

-La combinación de fagos con antimicrobianos es otra alternativa prometedora.



5. REFERENCIAS

1. Sierra Benítez EM, León Pérez MQ. Terapia antibacteriana: origen y evolución en el tiempo. *Rev Médica Electrónica*. 2019;41(5):1300–8.
2. Álvarez-Martínez FJ, Rodríguez JC, Borrás-Rocher F, Barrajon-Catalán E, Micol V. The antimicrobial capacity of *Cistus salviifolius* and *Punica granatum* plant extracts against clinical pathogens is related to their polyphenolic composition. *Sci Rep [Internet]*. 2021;11(1):1–12. Available from: <https://doi.org/10.1038/s41598-020-80003-y>
3. Gonzáles Mendoza J, Maguiña Vargas C, Gonzáles Ponce F de M. La resistencia a los antibióticos: un problema muy serio. *Acta Medica Peru*. 2019;36(2):145–51.
4. Bado I, Cordeiro N, García V, Robino L, Seija V. Principales Grupos Antibióticos. *Inst Hig [Internet]*. 2015;1. Available from: <http://higiene1.higiene.edu.uy/DByV/Principales grupos de antibi%F3ticos.pdf>
5. Roca FP y J José. Acción de los antibióticos. *Rev la oficina Farm*. 2004;23:116–24.
6. Arco JDEL. Farmacia Abierta Antibióticos : situación actual. *Farm Prof [Internet]*. 2016;28(5):29–33. Available from: <https://www.elsevier.es/es-revista-farmacia-profesional-3-articulo-antibioticos-situacion-actual-X0213932414516605>
7. Kumar PS, Duraipandiyan V, Ignacimuthu S. Antibióticos Antibióticos de origen. *Kaohsiung J Med Sci [Internet]*. 2014;30(9):435–46. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.kjms.2014.05.006>
8. Carrera JM. Conceptos generales. *Ecografía en diagnóstico Prenat*. 2008;7(1):169–72.
9. Valdés MÁ S. La resistencia microbiana en el contexto actual y la

importancia del conocimiento y aplicación en la política antimicrobiana. *Rev Habanera Ciencias Medicas*. 2017;16(3):402–19.

10. Álvarez-Martínez FJ, Barraón-Catalán E, Micol V. Tackling antibiotic resistance with compounds of natural origin: A comprehensive review. *Biomedicines*. 2020;8(10):1–30.
11. Calderón G, Aguilar L. Infectología Resistencia Antimicrobiana : Microorganismos Más Resistentes Y Antibióticos. *Rev médica Costa Rica y Centroamérica LXXIII*. 2016;(621):757–63.
12. Catalina PP, Angela-Victoria HM, Andrés-Fernando GB, Martha-Josefina VF. Fagoterapia, alternativa para el control de las infecciones bacterianas. *Perspectivas en Colombia. Univ Sci*. 2015;20(1):43–60.
13. Jorquera D, Galarce N, Borie C. El desafío de controlar las enfermedades transmitidas por alimentos: Bacteriófagos como una nueva herramienta biotecnológica. *Rev Chil Infectol*. 2015;32(6):678–88.
14. Oechslin F. Resistance development to bacteriophages occurring during bacteriophage therapy. *Viruses*. 2018;10(7).
15. Torres-Barceló C. The disparate effects of bacteriophages on antibiotic-resistant bacteria. *Emerg Microbes Infect*. 2018;7(1).
16. Mangalea MR, Duerkop BA. Fitness Trade-Offs Resulting from Bacteriophage Resistance. *Am Soc Microbiol*. 2020;(June):1–15.
17. Criscuolo E, Spadini S. Phage therapy: An alternative to antibiotics. *Biocommunication of Phages*. 2020;31(2):335–46.
18. Wang CH, Hsieh YH, Powers ZM, Kao CY. Defeating antibiotic-resistant bacteria: Exploring alternative therapies for a post-antibiotic era. *Int J Mol Sci*. 2020;21(3):1–18.
19. Kim B o., Kim ES, Yoo YJ, Bae HW, Chung IY, Cho YH. Phage-derived antibacterials: Harnessing the simplicity, plasticity, and diversity of phages. *Viruses*. 2019;11(3).

20. Aslam S, Schooley RT. *crossm*. 2019;(December):2019–21.
21. Kuipers S, Ruth MM, Mientjes M, de Sévaux RGL, van Ingen J. A Dutch case report of successful treatment of chronic relapsing urinary tract infection with bacteriophages in a renal transplant patient. *Antimicrob Agents Chemother*. 2020;64(1):1–5.
22. Regeimbal JM, Jacobs AC, Corey BW, Henry MS, Thompson MG, Pavlicek RL, et al. Personalized therapeutic cocktail of wild environmental phages rescues mice from acinetobacter baumannii wound infections. *Antimicrob Agents Chemother*. 2016;60(10):5806–16.
23. Saha D, Mukherjee R. Ameliorating the antimicrobial resistance crisis: phage therapy. *IUBMB Life*. 2019;71(7):781–90.



ANEXO 1



INFORME DE EVALUACIÓN DE INVESTIGACIÓN RESPONSABLE DE 1. TFG (Trabajo Fin de Grado)

Elche, a 13 de noviembre del 2020

Nombre del tutor/a	Enrique Barrajón Catalán
Nombre del alumno/a	Andrea Ruiz Román
Tipo de actividad	1. Revisión bibliográfica (no incluye revisión de historias clínicas ni ninguna fuente con datos personales)
Título del 1. TFG (Trabajo Fin de Grado)	Cepas resistentes a antibióticos en los últimos 5 años
Código/s GIS estancias	
Evaluación Riesgos Laborales	No procede
Evaluación Ética	No procede
Registro provisional	201112185831
Código de Investigación Responsable	TFG.GFA.EBC.ARR.201112
Caducidad	2 años

Se considera que el presente proyecto carece de riesgos laborales significativos para las personas que participan en el mismo, ya sean de la UMH o de otras organizaciones.

La necesidad de evaluación ética del trabajo titulado: 1. TFG (Trabajo Fin de Grado) ha sido realizada de manera automática en base a la información aportada en el formulario online: "TFG/TFM: Solicitud Código de Investigación Responsable (COIR)", habiéndose determinado que no requiere someterse a dicha evaluación. Dicha información se adjunta en el presente informe. Es importante destacar que si la información aportada en dicho formulario no es correcta este informe no tiene validez.

Por todo lo anterior, se **autoriza** la realización de la presente actividad.

Atentamente,

Alberto Pastor Campos
Secretario del CEII
Vicerrectorado de Investigación

Domingo L. Orozco Beltrán
Presidente del CEII
Vicerrectorado de Investigación

Información adicional:

- En caso de que la presente actividad se desarrolle total o parcialmente en otras instituciones es responsabilidad del investigador principal solicitar cuantas autorizaciones sean pertinentes, de manera que se garantice, al menos, que los responsables de las mismas están informados.
- Le recordamos que durante la realización de este trabajo debe cumplir con las exigencias en materia de prevención de riesgos laborales. En concreto: las recogidas en el plan de prevención de la UMH y en las planificaciones preventivas de las unidades en las que se integra la investigación. Igualmente, debe promover la realización de reconocimientos médicos periódicos entre su personal; cumplir con los procedimientos sobre coordinación de actividades empresariales en el caso de que trabaje en el centro de trabajo de otra empresa o que personal de otra empresa se desplace a las instalaciones de la UMH; y atender a las obligaciones formativas del personal en materia de

prevención de riesgos laborales. Le indicamos que tiene a su disposición al Servicio de Prevención de la UMH para asesorarle en esta materia.

La información descriptiva básica del presente trabajo será incorporada al repositorio público de Trabajos fin de Grado y Trabajos Fin de Máster autorizados por la Oficina de Investigación Responsable de la Universidad Miguel Hernández en el curso académico 2020/2021. También se puede acceder a través de <https://oir.umh.es/tfg-tfm/>

