



FACULTAD DE FARMACIA

Grado en Farmacia



Fagoterapia como alternativa a infecciones bacterianas resistentes a antibióticos

Memoria de Trabajo Fin de Grado

Sant Joan d'Alacant

Septiembre 2024

Autor: Safa Abou Taje Dyne

Modalidad: Revisión narrativa

Tutor/es: Lucrecia Acosta Soto.

Fernando Jorge Bornay Llinares

ÍNDICE

| | |
|---|----|
| RESUMEN..... | 3 |
| ABSTRACT | 4 |
| ABREVIATURAS..... | 5 |
| 1. ANTECEDENTES..... | 6 |
| 2. OBJETIVOS | 8 |
| 2.1. Objetivo general | 8 |
| 2.2. Objetivos específicos | 8 |
| 3. MATERIAL Y MÉTODOS | 8 |
| 3.1. Diseño..... | 8 |
| 3.2. Estrategia de búsqueda | 8 |
| 3.3. Criterios de selección..... | 9 |
| 3.4. Consideraciones éticas | 9 |
| 4. RESULTADOS..... | 9 |
| 4.1. Historia de los bacteriófagos y la fagoterapia | 9 |
| 4.2. Bacteriófagos..... | 11 |
| 4.2.1. Estructura del bacteriófago | 11 |
| 4.2.2. El proceso de infección | 12 |
| 4.2.2.1. Tipos de ciclos..... | 12 |
| 4.2.3. Mecanismo de acción de bacteriófagos..... | 13 |
| 4.3. Interacción fago-bacteria..... | 14 |
| 4.3.1. Adaptaciones del fago a la invasión | 14 |
| 4.3.1.1. Mecanismos de defensa de las bacterias | 15 |
| 4.3.1.2. Mutaciones espontáneas | 15 |
| 4.3.1.3. Defensas Bacterianas: CRISPR-Cas | 16 |

| | | |
|--------|---|----|
| 4.4. | Terapia convencional con bacteriófagos | 16 |
| 4.4.1. | Tratamientos monofágicos | 17 |
| 4.4.2. | Tratamientos polifágicos..... | 17 |
| 4.4.3. | Personalización y uso de cócteles de fagos en terapia | 17 |
| 4.5. | Acción combinada de fagos y antibióticos | 18 |
| 4.6. | Avances en la terapia con bacteriófagos modificados mediante bioingeniería..... | 20 |
| 4.7. | Avances clínicos en el uso de bacteriófagos. | 22 |
| 5. | DISCUSIÓN | 24 |
| 6. | CONCLUSIONES | 29 |
| 7. | BIBLIOGRAFÍA | 30 |



RESUMEN

Introducción: La creciente resistencia a los antibióticos representa una grave amenaza para la salud pública global. Los bacteriófagos, virus que atacan específicamente a las bacterias, representan una alternativa potencialmente eficaz para combatir estas infecciones resistentes.

Objetivo: Evaluar la fagoterapia como complemento a los antibióticos, analizar sus mecanismos de acción, determinar su eficacia y seguridad, e investigar combinaciones con antibióticos para superar la resistencia bacteriana.

Métodos: Revisión narrativa de la literatura utilizando las bases de datos científicas como PubMed, Google Scholar y Scielo. Así mismo, para obtener información general sobre el funcionamiento de los fagos también se han consultado páginas web y capítulos de libros.

Resultados y discusión: La fagoterapia muestra potencial para tratar infecciones por patógenos multirresistentes. Los bacteriófagos, modificables genéticamente, mejoran su eficacia y espectro de acción. La combinación con antibióticos incrementa la eficacia y previene resistencias. Desafíos incluyen la especificidad de los fagos, la respuesta inmunitaria y la necesidad de protocolos estandarizados.

Conclusiones: La fagoterapia emerge como una alternativa prometedora a los antibióticos tradicionales, especialmente en el contexto de la resistencia bacteriana. Futuras investigaciones y ensayos clínicos son necesarios para validar su seguridad y eficacia y para optimizar su uso en la práctica médica.

Palabras clave: Fagoterapia, bacteriófagos, resistencia bacteriana, terapia combinada.

ABSTRACT

Introduction: Bacterial resistance to antibiotics is a significant global public health issue. Bacteriophages, viruses that specifically target bacteria, represent a potentially effective alternative to combat these resistant infections.

Objective: To evaluate phage therapy as a complement to antibiotics, analyze its mechanisms of action, determine its efficacy and safety, and investigate combinations with antibiotics to overcome bacterial resistance.

Methods: A narrative review of the literature was conducted using the scientific databases PubMed, Google Scholar, and Scielo. Additionally, general information about phage function was obtained from websites and book chapters.

Results and Discussion: Phage therapy shows potential for treating infections caused by multidrug-resistant pathogens. Genetically modifiable bacteriophages can enhance their efficacy and spectrum of action. Combining phages with antibiotics increases efficacy and prevents resistance. Challenges include phage specificity, immune response, and the need for standardized protocols.

Conclusions: Phage therapy emerges as a promising alternative to traditional antibiotics, especially in the context of bacterial resistance. Further research and clinical trials are necessary to validate its safety and efficacy and to optimize its use in medical practice.

Keywords: Phage therapy, bacteriophages, bacterial resistance, combination therapy.

ABREVIATURAS

- **ADN:** Ácido Desoxirribonucleico
- **ARN:** Ácido Ribonucleico
- **BRED:** Recombinación de ADN Electroporado de Bacteriófagos
- **CRISPR-Cas:** Repeticiones Palindrómicas Cortas Agrupadas y Regularmente Interespaciadas - Sistema de Proteínas Asociadas a CRISPR
- **EMA:** European Medicines Agency (Agencia Europea de Medicamentos)
- **EPS:** Extracellular Polymeric Substances (Sustancias Poliméricas Extracelulares)
- **FDA:** Food and Drug Administration (Administración de Alimentos y Medicamentos)
- **LPS:** Lipopolisacáridos
- **MDR:** Multidrug Resistant (Resistente a Múltiples Medicamentos)
- **OMS:** Organización Mundial de la Salud
- **PAS:** Sinergia fago-antibiótico
- **PDR:** Pandrug Resistant (Resistente a Todos los Medicamentos)
- **SOS (Sistema SOS):** Mecanismo de defensa bacteriano que puede ser activado por dosis bajas de antibióticos, potenciando la supervivencia y resistencia bacteriana
- **XDR:** Extensively Drug Resistant (Extensamente Resistente a Medicamentos)

1. ANTECEDENTES

Durante casi un siglo, los antibióticos han sido pilares en la lucha contra las enfermedades infecciosas. Sin embargo, el uso inadecuado de estos fármacos ha acelerado la proliferación de resistencias bacterianas, convirtiéndolas en una de las principales causas de mortalidad global (1).

Estudios recientes han subrayado la magnitud de las muertes asociadas con la resistencia a los antimicrobianos, marcando la necesidad urgente de desarrollar nuevos agentes que puedan mantener el ritmo necesario para combatir las bacterias resistentes (2). Nos encontramos en un punto crítico en la historia de la medicina, donde la resistencia a los antibióticos se ha convertido en un desafío monumental para la salud pública mundial (3).

Las infecciones resistentes a los fármacos son responsables de un número significativo de muertes al año y la proyección para las próximas décadas es alarmante si no se encuentran soluciones efectivas (2).

Con el tiempo, se espera que las infecciones bacterianas multirresistentes representen una amenaza aún mayor, potencialmente superando a otras causas principales de mortalidad. En este contexto de urgencia médica, se destaca una opción terapéutica emergente: el uso de bacteriófagos, coloquialmente denominados fagos, virus que atacan específicamente a las bacterias (4).

Representando una esperanza renovada para enfrentar la crisis de la resistencia a los antimicrobianos, la terapia fágica se posiciona como una alternativa viable para infecciones causadas por patógenos multirresistentes. Esta terapia se perfila como un complemento prometedor o incluso como un sustituto potencial de los tratamientos convencionales, ofreciendo una nueva perspectiva en la lucha contra las infecciones resistentes. Los desafíos inherentes a la implementación de la terapia fágica, así como la necesidad de investigación clínica rigurosa para validar su seguridad y eficacia en la medicina moderna, son fundamentales. A medida que avanzamos en el desarrollo de protocolos estandarizados para ensayos clínicos, se hace más evidente el

potencial de los fagos en la práctica clínica, lo que podría ser un factor decisivo en la batalla contra la resistencia antimicrobiana(5)(6).

Así mismo, la OMS ha enfatizado la importancia de desarrollar nuevos medicamentos antimicrobianos frente a un catálogo de patógenos prioritarios, entre los cuales las bacterias Gram positivas como *Staphylococcus aureus* resistente a meticilina y *Enterococcus faecium* resistente a vancomicina son especialmente preocupantes. La terapia fágica se ofrece como una solución innovadora para enfrentar estos retos sanitarios globales (7).

Este análisis incluirá la revisión de la efectividad de los fagos en eliminar bacterias patógenas, su perfil de seguridad en aplicaciones clínicas, y la viabilidad de su uso en términos de costos y aceptación clínica. La fagoterapia podría ofrecer un recurso valioso y eficiente en el combate contra la creciente resistencia a los antimicrobianos.



2. OBJETIVOS

2.1. Objetivo general

El objetivo de este estudio es realizar una revisión narrativa para evaluarla información científica existente sobre la fagoterapia como alternativa o complemento a los antibióticos convencionales, enfocándose en su eficacia, seguridad y aplicabilidad para tratar infecciones bacterianas resistentes.

2.2. Objetivos específicos

2.2.1 Analizar los mecanismos de acción de los bacteriófagos y su interacción con bacterias patógenas.

2.2.2 Determinar la eficacia y seguridad de la fagoterapia en el tratamiento de infecciones bacterianas.

2.2.3 Investigar las combinaciones de fagoterapia con antibióticos y su potencial para superar la resistencia bacteriana.

3. MATERIAL Y MÉTODOS

3.1. Diseño

Se ha realizado una revisión narrativa, empleando información científica existente para recopilar y analizar información relevante sobre la fagoterapia en el tratamiento de cepas bacterianas resistentes a múltiples antibióticos.

3.2. Estrategia de búsqueda

Para realizar esta revisión narrativa se emplearon diversas bases de datos: PubMed como principal fuente, complementada con Scielo y Google Scholar para asegurar una cobertura exhaustiva de la literatura.

La estrategia de búsqueda involucró el uso de la ecuación de búsqueda (((("Bacteriophages"[Mesh]) AND ("Drug Resistance, Microbial"[Mesh] OR "Drug Resistance, Bacterial"[Mesh])))).

Así mismo, para recopilar información general sobre el funcionamiento de los fagos también se han consultado páginas web y capítulos de libros.

3.3. Criterios de selección

Criterios de inclusión: Se ha recopilado la información científica relevante publicada en los últimos diez años, que estuviese principalmente relacionada con estudios en humanos. Así mismo el idioma de búsqueda fue en inglés y castellano. Se recopiló información accesible en texto completo.

Criterios de exclusión: No se tuvo en cuenta la información científica encontrada publicada anterior a 10 años atrás, o si no estaba enfocada específicamente en fagoterapia. Así mismo se descartaron estudios en otros idiomas diferentes al inglés o castellano y sin acceso libre.

3.4. Consideraciones éticas

Este TFG ha sido aprobado por la Oficina de Investigación Responsable de la Universidad Miguel Hernández de Elche (UMH) con el código: TFG.GFA.LAS.BCS.240412.

4. RESULTADOS

4.1. Historia de los bacteriófagos y la fagoterapia

La historia de la fagoterapia y el descubrimiento de los bacteriófagos es un fascinante episodio en la ciencia médica que se extiende desde finales del siglo XIX hasta principios del XX, marcado por descubrimientos pioneros y controversias significativas (8).

Los orígenes de la investigación en bacteriófagos pueden rastrearse hasta 1896 cuando el químico británico Ernest Hankin reportó una actividad antibacteriana notable en las aguas de los ríos Ganges y Junna en India, sugiriendo que una "sustancia" desconocida podría estar limitando la propagación del cólera (4)(9)(10). Esta observación, aunque inicialmente no atribuida a los bacteriófagos, sentó las bases para futuras investigaciones sobre agentes antibacterianos naturales (11).

El papel de los bacteriófagos comenzó a clarificarse con los trabajos de Frederick Twort en 1915 y más decisivamente con Félix d'Herelle en 1917 (11)(12). D'Herelle, observando placas de cultivo de bacterias, notó zonas claras que indicaban la destrucción de las bacterias y dedujo que estos efectos eran causados por un agente filtrable, que él denominó "bacteriófago", estableciendo así el concepto de estos virus como entidades biológicas capaces de infectar y destruir bacterias específicas (4)(12).

La propuesta de usar bacteriófagos para tratar infecciones bacterianas ganó terreno rápidamente, y d'Herelle fue uno de los pioneros en explorar su uso terapéutico. En 1919, aplicó fagos para tratar la disentería en el Hospital de Enfants-Malades en París, observando mejoras significativas en los pacientes tratados (13). Este éxito inicial inspiró otros estudios y aplicaciones clínicas de fagos durante las décadas de 1920 y 1930, aunque los resultados variaban y el método era a menudo objeto de escepticismo y controversia (14).

A pesar del entusiasmo inicial, el surgimiento de los antibióticos, especialmente las sulfonamidas y más tarde la penicilina, en la década de 1930 y 1940 desplazó en gran medida el interés por la fagoterapia en los países occidentales. Los antibióticos ofrecían una solución más amplia y menos complicada para las infecciones bacterianas, lo que llevó a un abandono casi total de la fagoterapia en estas regiones (14).

Sin embargo, el interés por los fagos nunca desapareció completamente. En la antigua Unión Soviética y en algunos otros lugares, la investigación y el uso de fagos continuaron, aunque a menudo sin la visibilidad o el impacto de los estudios de antibióticos (15).

Más recientemente, la creciente crisis de resistencia a los antibióticos ha revivido el interés en la fagoterapia como una posible alternativa o complemento a los tratamientos antibióticos tradicionales, dando lugar a una nueva ola de investigación y aplicaciones clínicas (5)(6). Este resurgimiento es parte de un movimiento más amplio dentro de la microbiología que busca soluciones biológicas a problemas biológicos, un enfoque que fue visionariamente promovido por d'Herelle mucho antes de que se convirtiera en una dirección científica dominante. Hoy en día, los avances en genómica y

biología molecular están proporcionando las herramientas necesarias para explorar y explotar el potencial terapéutico de los bacteriófagos, ofreciendo esperanza para nuevas estrategias contra las infecciones bacterianas resistentes a los medicamentos (6).

4.2. Bacteriófagos

Un bacteriófago, comúnmente llamado fago, es un tipo de virus que se caracteriza por infectar y replicarse exclusivamente dentro de las células bacterianas. Al igual que otros virus, los bacteriófagos presentan una amplia diversidad en cuanto a su estructura y material genético. Los genomas de los fagos pueden ser de ADN o ARN y varían en tamaño desde unos pocos genes hasta varios cientos (16)(17).

Estos organismos son parásitos intracelulares obligados, lo que significa que dependen completamente de la maquinaria biosintética de la bacteria hospedadora para su replicación y supervivencia (18).

4.2.1. Estructura del bacteriófago

La estructura típica de un fago consiste en una cápside proteica, que puede ser icosaédrica, filamentosa o con una característica forma cabeza-cola. Esta última parece ser exclusiva de los fagos y sus parientes cercanos, distinguiéndolos de los virus que infectan células eucariotas (17). La cabeza almacena el material genético, mientras que la cola, presente en muchos fagos de la familia Caudovirales, no es para la motilidad, sino que es crucial para la infección de bacterias tanto Gram-positivas como Gram-negativas (18).

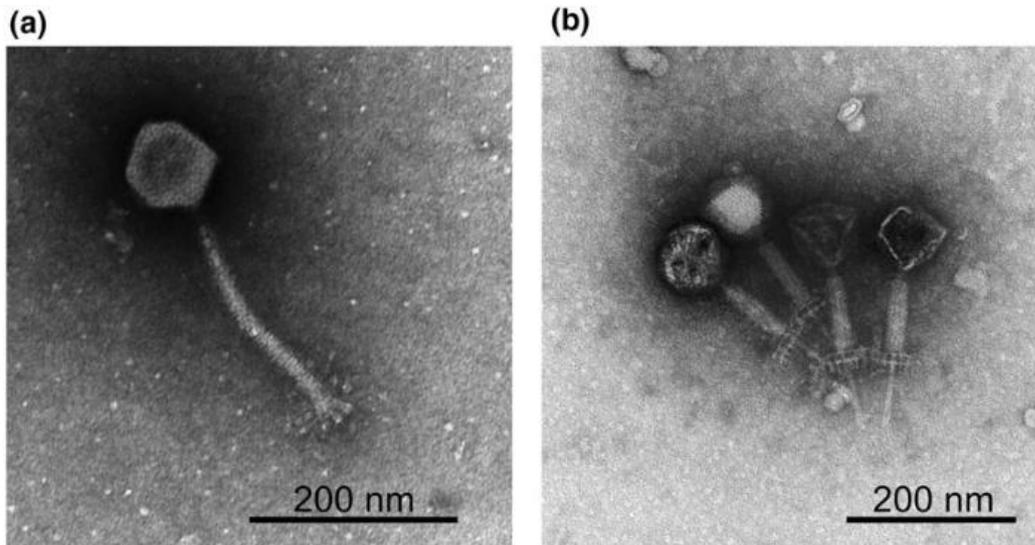


FIGURA 1: (a) partícula con una cabeza negra lo que indica que está vacía sin ADN, (b) una partícula normal con cola contraída (19).

4.2.2. El proceso de infección

El proceso de infección comienza con la adsorción del fago a la superficie de la bacteria hospedadora de manera muy específica, a menudo limitada a un tipo particular de una especie bacteriana. Esta especificidad se debe a la interacción entre ligandos en la superficie del fago y receptores en la bacteria, como lipopolisacáridos, proteínas de la pared celular o ácidos lipoteicoicos (20).

4.2.2.1. Tipos de ciclos

Una vez que el fago se adhiere a la bacteria, puede seguir uno de los dos ciclos de vida principales: el ciclo lítico o el lisogénico:

i) Ciclo lítico

El ciclo lítico es un proceso por el cual un fago (virus que infecta bacterias) se adhiere a una bacteria y utiliza la maquinaria celular de esta para replicar su material genético (17). Durante este ciclo, el fago inyecta su material genético dentro de la célula huésped, llevándola a producir numerosas copias de sí mismo. Eventualmente, la célula hospedadora se rompe o lisa, un proceso que libera los nuevos fagos para que infecten a otras células. Este tipo de crecimiento viral puede ser llevado a cabo por fagos tanto virulentos como

templados. En ambos casos, el resultado es la muerte de la bacteria huésped y la liberación de la progenie de fagos (21).

ii) Ciclo lisogénico

En contraste con el ciclo lítico, durante el ciclo lisogénico, el material genético del fago se integra en el cromosoma de la bacteria hospedadora y se replica junto con ella, sin causar su destrucción. En este estado, conocido como profago, el fago puede permanecer inactivo y no se produce la producción de nuevos fagos infecciosos. Las células que albergan un profago son inmunes a la sobreinfección por el mismo virus. El profago puede integrarse de manera específica en el cromosoma, o replicarse como un plásmido extracromosómico (17).

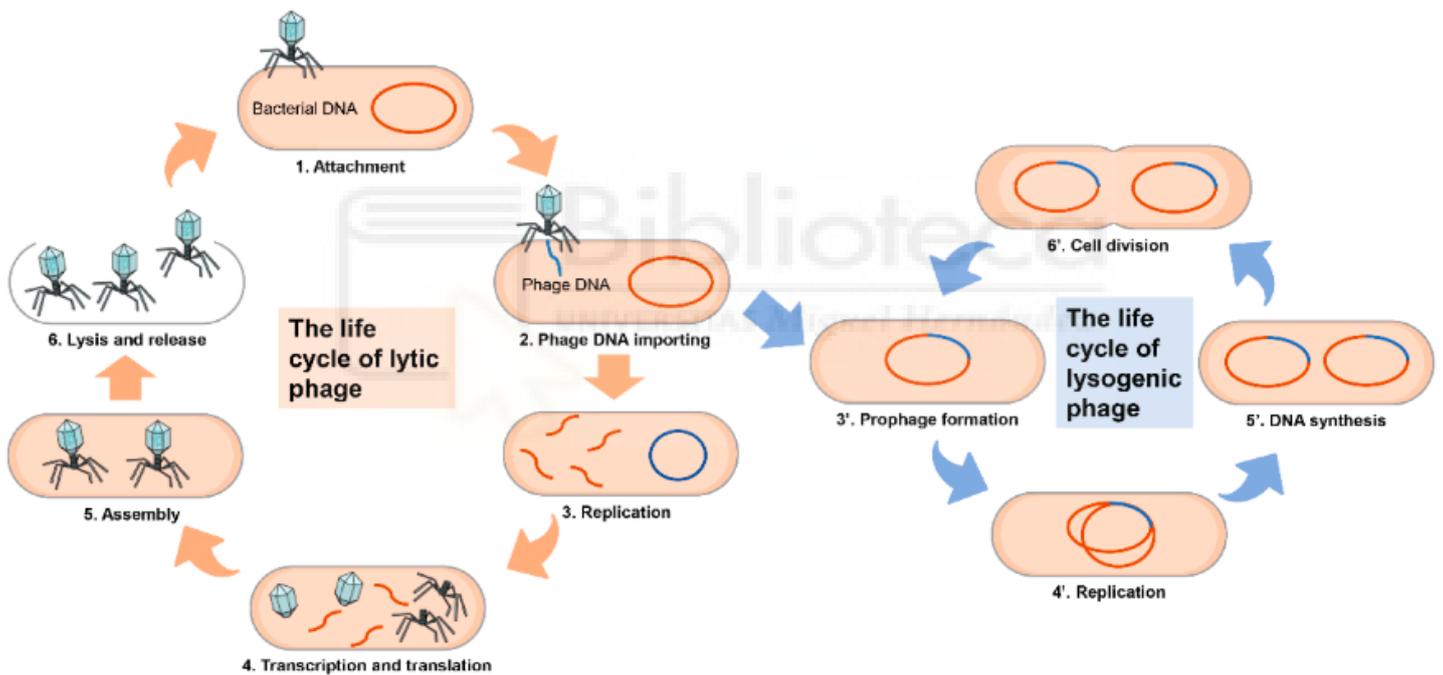


FIGURA 2 : Ciclo lítico y ciclo lisogénico (17).

4.2.3. Mecanismo de acción de bacteriófagos

El crecimiento de fagos líticos puede ocurrir espontáneamente en una pequeña fracción de células lisogénicas, y es posible inducir sincrónicamente el desarrollo de fagos líticos en toda la población de bacterias lisogénicas mediante tratamientos que dañan el ADN, como la luz ultravioleta o la mitomicina C (20).

La eliminación del profago de una célula lisogénica, convirtiéndola en un estado no lisogénico y restaurando su susceptibilidad a la infección por el fago original, se conoce como curación, en el que el profago se pierde y la bacteria retorna a un estado no lisogénico, recuperando la susceptibilidad a la infección por el fago original (20).

Cuando una bacteria es invadida por fagos, estos intrusos microscópicos pueden tomar dos rutas distintas: destruir al anfitrión o coexistir con él. La elección entre el camino destructivo del ciclo lítico o la convivencia pacífica del ciclo lisogénico se ve influenciada por cuántos fagos están atacando a la misma bacteria al mismo tiempo (22).

Si una horda de fagos invade, es más probable que opten por el ciclo lisogénico, integrándose silenciosamente en el ADN de la bacteria y replicándose con ella sin causar daño inmediato. Este enfoque más sutil puede ser una táctica inteligente para asegurar que los fagos no aniquilen a todas sus casas bacterianas disponibles, manteniendo así un equilibrio que les permite seguir prosperando sin agotar sus recursos (17).

4.3. Interacción fago-bacteria

La interacción entre bacteriófagos y bacterias patógenas es una dinámica de antagonismo evolutivo, observada en experimentos a largo plazo con diferentes cepas y sus fagos específicos. En el uso clínico de fagos, es crucial prevenir la propagación de resistencia, descartando fagos atemperados o aquellos que codifican toxinas potenciales (22). La coevolución fago-bacteria se puede describir como un proceso de adaptación y contraadaptación recíproca, donde ambas partes intercambian constantemente estrategias de ataque y defensa, impulsando tanto la diversidad como la supervivencia en las comunidades de microorganismos (23).

4.3.1. Adaptaciones del fago a la invasión

Iniciando este proceso, los fagos encuentran su camino hacia las bacterias mediante una táctica de precisión, usando estructuras parecidas a colas para adherirse a la superficie bacteriana. Este proceso se asemeja a una llave

maestra que busca su cerradura específica. Una vez que el fago se fija a la bacteria, puede optar por iniciar el ciclo lítico, que requiere destruir la célula hospedadora para completar su ciclo de vida. Este acto de agresión empuja a la bacteria a desarrollar formas de resistir la infección, mientras que el fago, a su vez, evoluciona para superar estas defensas (23)(24).

4.3.1.1. Mecanismos de defensa de las bacterias

Por parte de las bacterias, la resistencia a los fagos puede surgir de nuevas mutaciones genéticas o de una variedad de mecanismos antivirales que tienen como objetivo bloquear cada uno de los pasos que el fago necesita para completar su ciclo de vida. Estas defensas pueden incluir la alteración de las estructuras en su superficie que los fagos necesitan para adherirse o la generación de una sobreproducción de sustancias que impidan que el fago alcance sus receptores habituales. También pueden crear moléculas que actúen como señuelos o inhibidores, obstaculizando el camino del fago hacia su objetivo (23).

4.3.1.2. Mutaciones espontáneas

Las bacterias cuentan con varias líneas de defensa. Entre ellas están las mutaciones espontáneas que son los cambios aleatorios en el ADN de las bacterias, pueden alterar partes de la superficie bacteriana que los fagos utilizan para adherirse(23)(25). Estas modificaciones pueden darle a la bacteria una ventaja, impidiendo que los fagos se unan a ella y la infecten. Entre los elementos de la superficie bacteriana que pueden cambiar se encuentran los lipopolisacáridos (LPS), proteínas en la capa más externa de la célula, ácidos teicoicos que forman parte de la pared celular (26), así como cápsulas y otras estructuras como flagelos. Muchos de estos componentes son esenciales para que la bacteria cause enfermedades y su alteración puede influir en cómo los fagos reconocen y se vinculan a las bacterias (23)(27).

Las mutaciones que protegen a las bacterias de los fagos pueden hacerlas menos capaces de causar enfermedades si afectan factores como los LPS (28). Del mismo modo, mantener sistemas de defensa como las enzimas de modificación del ADN y la inmunidad Repeticiones Palindrómicas Cortas

Agrupadas y Regularmente Interespaciadas (CRISPR-Cas) exige una inversión de recursos, representando un costo que las bacterias deben balancear con su necesidad de supervivencia (28).

4.3.1.3. Defensas Bacterianas: CRISPR-Cas

Además, poseen sistemas sofisticados como el CRISPR-Cas, un tipo de inmunidad adaptativa que permite a las bacterias recordar fagos anteriores y editar su ADN para evitar futuras infecciones. Las mutaciones fortuitas son particularmente importantes, ya que pueden cambiar la forma de las "cerraduras" que los fagos buscan para adherirse, lo que a su vez guía la evolución del fago hacia nuevas formas de ataque (23).

La superficie bacteriana está repleta de moléculas que pueden servir como puntos de anclaje para los fagos. Entre estos se encuentran lipopolisacáridos, proteínas de membrana, ácidos teicoicos y otras estructuras como cápsulas y flagelos, algunos de los cuales están implicados en la capacidad de las bacterias para causar enfermedades (28).

4.4. Terapia convencional con bacteriófagos

El estudio de los bacteriófagos no solo es crucial para comprender las interacciones entre virus y bacterias, sino también como modelos para entender los virus que infectan células animales. Además, el ciclo de vida del fago es fundamental en la investigación de los mecanismos de transferencia genética horizontal en bacterias, un proceso por el cual los genes bacterianos pueden transferirse de una bacteria a otra, contribuyendo a la evolución y adaptación bacteriana (23).

Su capacidad para infectar y matar bacterias específicas los convierte en candidatos potenciales para tratar enfermedades causadas por cepas bacterianas patógenas resistentes a los medicamentos tradicionales (29).

En las terapias clínicas con bacteriófagos, los enfoques se dividen en monofágicos y polifágicos, basados en la diversidad de fagos empleados (29).

4.4.1. Tratamientos monofágicos

Los tratamientos monofágicos se concentran en una cepa específica de fago seleccionada para atacar a la bacteria patógena correspondiente, y aunque permiten tratamientos repetidos sin efectos adversos, presentan un riesgo elevado de que la bacteria desarrolle resistencias (22).

4.4.2. Tratamientos polifágicos

Este tipo de tratamiento se basa en cócteles de fagos, con combinaciones de múltiples bacteriófagos que se emplean para expandir el espectro limitado de acción que caracteriza a los fagos individuales, permitiendo así abarcar un rango más amplio de géneros bacterianos (22).

Estas mezclas pueden ser simples, atacando bacterias del mismo género, o mixtas, dirigidas a varios géneros, incrementando la eficacia contra infecciones por bacterias multidrogorresistentes (MDR), extensivamente drogorresistentes (XDR) y pandrogorresistentes (PDR) (30).

4.4.3. Personalización y uso de cócteles de fagos en terapia

La producción de fagos personalizados para terapia es un proceso relativamente simple y accesible, y estos pueden ser aplicados individualmente o en cócteles. La personalización de fagos implica recolectar y analizar los patógenos aislados de los pacientes para producir fagos específicos o cócteles que se adapten a cada caso.

Los cócteles polifágicos han sido comúnmente usados en ensayos clínicos y muestran un aumento en la efectividad contra un rango más amplio de patógenos (31).

Si bien esta estrategia personalizada puede resultar más costosa y no ser aplicable a diferentes pacientes, ofrece ventajas en combatir la resistencia y proporciona una flexibilidad mayor respecto al espectro de acción del fago(23) (32)(33).

El empleo de fagos ha demostrado ser eficaz en la prevención de la formación de biofilms por bacterias como *Clostridium difficile* y *Proteus mirabilis*, estos últimos relacionados con infecciones de catéteres urinarios.

Además, se ha observado que los fagos pueden ser adaptados en el laboratorio para mejorar su infectividad y la gama de huéspedes, permitiendo así desarrollar tratamientos más efectivos y dirigidos (22)(34).

4.5. Acción combinada de fagos y antibióticos

Se puede mejorar la eficacia de los antibióticos actuales y evitar que se vuelvan obsoletos si son usados en combinación con fagos. Varios estudios han mostrado resultados prometedores, donde esta combinación ha logrado combatir eficazmente las infecciones bacterianas en pruebas de laboratorio y en aplicaciones reales (22).

Esta mezcla de tratamientos es particularmente eficaz contra bacterias que han desarrollado resistencia a varios medicamentos. El fundamento para mezclar fagos y antibióticos surge de la biología evolutiva. La teoría sugiere que cuando las bacterias se ven presionadas por dos tipos de ataques distintos, tienen más dificultades para adaptarse y sobrevivir que si solo se enfrentaran a uno (35).

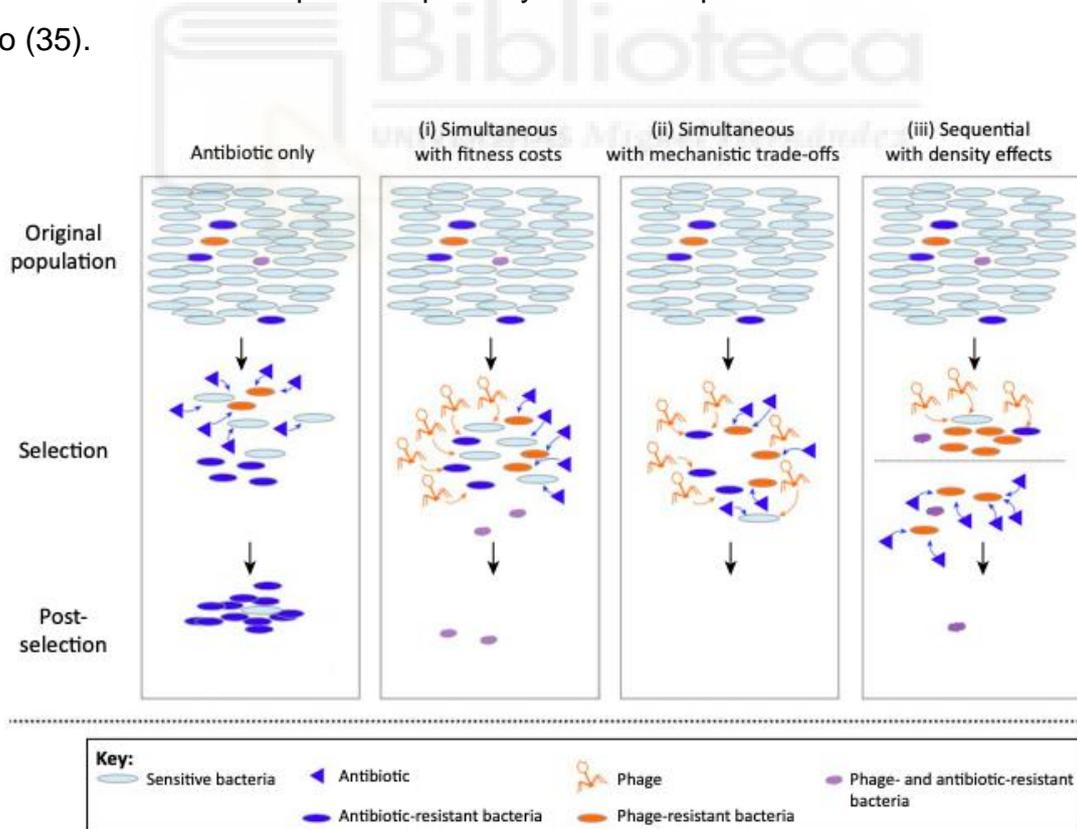


FIGURA 4: Mecanismos sinérgicos entre antibióticos y fagos (35) .

Cuando solo se utilizan antibióticos para tratar una infección (figura 4), es muy común que las bacterias desarrollen resistencia a estos medicamentos. Sin embargo, si combinamos el uso de antibióticos con fagos, la situación cambia: es posible que aparezcan bacterias resistentes tanto a los fagos como a los antibióticos, pero estas tienden a crecer más despacio o son menos dañinas que las bacterias que no tienen resistencia. Además, la probabilidad de que emerjan bacterias con resistencia dual es baja debido a las diferencias en cómo funcionan los mecanismos de resistencia de cada uno. Si se administran fagos y antibióticos de manera secuencial en vez de simultánea, es aún menos probable que las bacterias desarrollen resistencia a ambos tratamientos, ya que las que sobreviven al primer ataque suelen no proliferar después (35).

La colaboración entre fagos y antibióticos también ha mostrado promesa en estudios clínicos y experimentales. Por ejemplo, la combinación de ciprofloxacina y fagos ha impedido la emergencia de cepas resistentes a fagos en biopelículas de *Klebsiella pneumoniae*, y combinaciones similares han tenido éxitos en tratamientos de *Staphylococcus aureus* y *pseudomonas aeruginosa*. Además, se ha visto que la resistencia a los fagos podría incluso revertir la resistencia a ciertos antibióticos en bacterias, proporcionando así un doble beneficio (29).

Se ha explorado una versión modificada del fago filamentoso M13 que inhibe la respuesta del Mecanismo de defensa bacteriano que puede ser activado por dosis bajas de antibióticos (SOS) de las bacterias. Esto, junto con antibióticos seleccionados, ha mostrado una eliminación más eficaz de patógenos. Algunos antibióticos pueden detener la división celular y activar la respuesta SOS, lo que lleva a un aumento de la producción de fagos y un ensamblaje más rápido en condiciones subóptimas para el crecimiento bacteriano (29).

4.6. Avances en la terapia con bacteriófagos modificados mediante bioingeniería

La mayoría de los fagos naturales tienen un rango de hospedadores líticos estrecho, lo que limita su aplicación práctica en la terapia fágica. Por lo tanto, es crucial ampliar o alterar el rango de hospedadores de los fagos mediante la modificación sus módulos genéticos. Las técnicas de biología sintética permiten la modificación de fagos para dirigirse a diferentes hospedadores mediante la ingeniería y mutación de las proteínas que se unen a los receptores de los fagos, que generalmente son las fibras de la cola o las proteínas del pico de la cola (36).

El tratamiento con bacteriófagos se ha propuesto como un método para controlar los biofilms bacterianos (37)(38). Por ejemplo, el fago T4 puede infectar y replicarse dentro de los biofilms de *Escherichia coli* (38)(39), alterando su morfología mediante la eliminación de células bacterianas. Asimismo, se ha modificado a los fagos para extender su rango natural de huéspedes. Un caso notable es el de *E. coli*, que produce la cápsula de polisacárido K1 y normalmente es resistente a la infección por el fago T7, pero es susceptible a una versión modificada de T7 diseñada para expresar la endosialidasa K1-5 (38)(40)(41).

La degradación enzimática de los componentes de las Sustancias Poliméricas Extracelulares (EPS) es una estrategia útil para desintegrar los biofilms, aunque las células bacterianas no se eliminan (38)(42)(44). Se ha informado que los fagos líticos naturales con depolimerasas de polisacáridos incorporadas pueden combinar la lisis inducida por fagos y la degradación de EPS para reducir los biofilms bacterianos. Estas depolimerasas, que se encuentran en la superficie de los fagos, degradan los polisacáridos capsulares bacterianos permitiendo el acceso a las superficies celulares bacterianas (38)(43)(44).

Sin embargo, las probabilidades de aislar un fago natural que sea específico para las bacterias objetivo y que exprese una enzima degradante de EPS relevante son generalmente bajas (38)(45).

Por lo tanto, se propone una estrategia de diseño modular en la que los fagos que matan bacterias de manera específica por especie sean modificados para expresar las enzimas degradantes de EPS más efectivas para el biofilm objetivo. Esta estrategia debería permitir el desarrollo de una biblioteca diversa de fagos dispersantes de biofilms, en lugar de intentar aislar tales fagos del ambiente. Al multiplicarse dentro del biofilm y secuestrar la maquinaria bacteriana, los fagos activos enzimáticamente y diseñados mediante ingeniería deberían lograr altas concentraciones locales de ambos, enzima y fago lítico, para atacar múltiples componentes del biofilm, incluso con pequeñas inoculaciones iniciales de fagos (46)(47).

La rápida replicación de los fagos, seguida de la lisis bacteriana y la expresión de enzimas degradantes de biofilms, debería hacer de esta estrategia de ataque dual un método autocatalítico eficiente para eliminar biofilms bacterianos en entornos ambientales, industriales y clínicos. Este diseño también elimina la necesidad de expresar, purificar y administrar grandes dosis de enzimas a sitios específicos de infección que pueden ser difíciles de acceder y debería mejorar la eficacia de la terapia con fagos para eliminar biofilms. La secuenciación genómica cada vez más rentable y las tecnologías de biología sintética, que incluyen la refactorización de genomas de fagos y la síntesis de ADN a gran escala, deberían permitir aún más la producción de fagos enzimáticos modificados y extender significativamente el limitado repertorio de fagos degradantes de biofilms que se han aislado del medio ambiente (38).

Los fagos modificados que expresan enzimas degradantes de biofilms son más eficaces para eliminar biofilms bacterianos que los fagos que no poseen actividad enzimática. Aunque los resultados iniciales se obtuvieron con un fago prototipo, los investigadores sugieren que el diseño puede adaptarse para trabajar con una variedad de fagos y enzimas degradantes de biofilms, abordando así una amplia gama de biofilms (38).

Se considera que el tratamiento con bacteriófagos manipulados podría ser una valiosa adición a las terapias disponibles para combatir biofilms bacterianos en entornos médicos, industriales y biotecnológicos (36)(38).

Se anticipa que futuras mejoras en este enfoque podrían incluir la evolución dirigida para optimizar la actividad enzimática, retrasar la lisis celular o emplear múltiples promotores de fagos para incrementar la producción de enzimas. Este enfoque también podría orientarse a atacar múltiples componentes de EPS de biofilms con distintas proteínas y dirigirse a biofilms de múltiples especies con una mezcla de fagos enzimáticamente activos específicos para diferentes especies (38).

4.7. Avances clínicos en el uso de bacteriófagos

Recientes avances en la aplicación clínica de bacteriófagos han mostrado resultados prometedores, en particular el estudio de Detric y colaboradores en 2019 (4)(48). Este estudio describió la primera aplicación clínica publicada de fagos genéticamente modificados para tratar una infección diseminada causada por *Mycobacterium abscessus*, una bacteria conocida por su resistencia a los antibióticos. En el estudio, se seleccionaron un fago obligatoriamente lítico y dos fagos temperados de una biblioteca de más de 1.800 fagos, que demostraron ser efectivos contra el aislado clínico. Mediante la técnica de Recombinación de ADN electroporado de Recombinación de ADN Electroporado de bacteriófagos (BRED), se modificaron los fagos temperados para eliminar los módulos de lisogenización (4)(49).

El tratamiento con este cóctel adaptado de fagos, administrado tanto tópica como intravenosamente durante siete meses, fue bien tolerado y condujo a una mejora clínica significativa. Este enfoque se hizo posteriormente extensivo en una serie de casos que involucró a 20 pacientes adicionales, confirmando la seguridad y efectividad de los fagos modificados como agentes antimicobacteriales (4)(50).

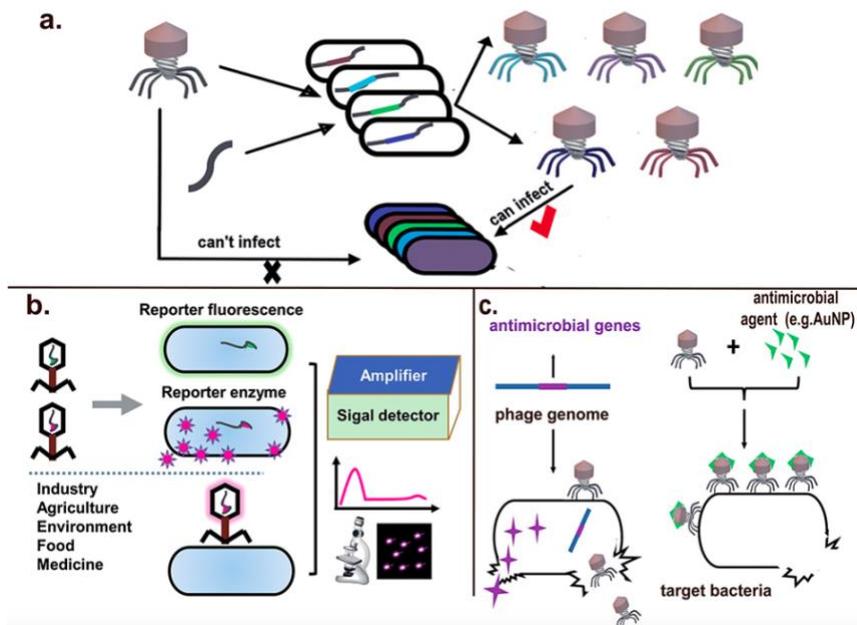


FIGURA 1: Aplicaciones de fagos ingenierizados. (a) Es posible expandir o alterar el espectro de huéspedes de los fagos ajustando las proteínas que se enlazan a los receptores. (b) Los fagos que contienen elementos fluorescentes o enzimáticos se pueden emplear para identificar bacterias en áreas como la medicina, la industria alimenticia y las ciencias ambientales. (c) Los fagos pueden servir como vectores de transporte para llevar genes antimicrobianos o sustancias bactericidas que incrementen la eficacia en la eliminación de bacterias (51).



5. DISCUSIÓN

Los fagos, aunque potentes en su capacidad de atacar bacterias específicas, enfrentan el desafío de la resistencia emergente. A lo largo del tiempo, las bacterias pueden desarrollar mecanismos de defensa que les permiten evadir o neutralizar la acción de los fagos, como la modificación de receptores bacterianos que impiden el anclaje del fago. Este fenómeno puede reducir significativamente la eficacia a largo plazo de los tratamientos con fagos, especialmente en entornos clínicos donde la presión selectiva es alta (45)(52).

Cuando los fagos son introducidos en el cuerpo humano, el sistema inmunitario puede reconocerlos como entidades extrañas. Esto provoca respuestas inmunes que pueden incluir la producción de anticuerpos específicos contra los fagos. Además, el sistema reticuloendotelial, que forma parte del sistema inmunológico y se encarga de filtrar la sangre, puede capturar y eliminar los fagos antes de que alcancen su objetivo. Esta rápida eliminación compromete la duración de la acción de los fagos y, por ende, su eficacia terapéutica (45)(53).

La acción de los fagos a menudo resulta en la lisis (destrucción) de las bacterias, lo cual puede liberar endotoxinas contenidas en las bacterias. Esta liberación de toxinas puede provocar reacciones inflamatorias severas en el paciente, agravando su estado clínico en lugar de aliviarlo, especialmente en casos donde la carga bacteriana es alta (45). Sin embargo, se han diseñado fagos no líticos y no replicativos para matar bacterias mientras se minimiza la liberación de endotoxinas (54). También se están logrando progresos en el desarrollo de preparaciones de fagos libres de toxinas (55).

Una de las ventajas de los fagos, su alta especificidad, también puede ser una desventaja significativa. Esta especificidad implica que cada fago es efectivo solo contra cepas bacterianas específicas. Esta característica requiere la disponibilidad de una biblioteca extensa y bien caracterizada de fagos para identificar el fago adecuado para cada infección, lo que complica la logística y la rapidez de la respuesta terapéutica (38)(56).

El uso indiscriminado de fagos puede tener impactos imprevistos en el microbioma humano, perturbando su equilibrio natural. Esto puede llevar a disbiosis o desequilibrios en la flora intestinal y otras comunidades microbianas del cuerpo, resultando en consecuencias para la salud que van desde molestias digestivas hasta condiciones más serias como infecciones por patógenos oportunistas (57)(58).

Una de las limitaciones en cuanto a la regulación y aprobación del uso de la fagoterapia es que a pesar de su potencial, la fagoterapia aún enfrenta barreras significativas en términos de regulación y aprobación por entidades como la administración de alimentos y medicamentos (FDA) y la agencia Europea de Medicamentos (EMA). Estas limitaciones restringen la investigación clínica y el acceso a tratamientos basados en fagos, retrasando su integración en la práctica médica convencional y limitando la inversión en su desarrollo (5).

Existen múltiples desafíos en la producción y estandarización de la fagoterapia como alternativa a los antibióticos. La fabricación de preparaciones de fagos que sean tanto efectivas como consistentes presenta desafíos técnicos significativos. La necesidad de producir cócteles de fagos que mantengan una potencia y calidad constantes es crítica para asegurar resultados clínicos predecibles y seguros. Además, la estandarización de protocolos para la purificación y caracterización de fagos es esencial para garantizar la seguridad y eficacia de los tratamientos (38).

Una de las características más notables de los fagos es su capacidad para adaptarse y multiplicarse exponencialmente en el sitio de la infección. Esta propiedad permite que los fagos aumenten su número rápidamente, potenciando su eficacia en la eliminación de bacterias patógenas (59). Al atacar de manera específica a las bacterias, los fagos se reproducen dentro de las células bacterianas, explotándolas al final de su ciclo de vida, lo que resulta en la liberación de más fagos listos para atacar otras células bacterianas.

Los fagos tienen una potente actividad lítica que les permite destruir eficientemente sus objetivos bacterianos. Esto los convierte en una herramienta poderosa contra infecciones bacterianas, especialmente aquellas resistentes a

los antibióticos convencionales (58)(59). La acción lítica de los fagos no solo elimina las bacterias, sino que también ayuda a descomponer los biofilms bacterianos, que son estructuras protectoras que las bacterias forman para resistir los tratamientos antibióticos (60).

Los biofilms son difíciles de tratar con antibióticos debido a su estructura protectora, pero los fagos pueden penetrar y descomponer estas estructuras, facilitando la eliminación de las bacterias que se esconden dentro (61)(62)(63). Una de las desventajas es que el sistema inmunológico humano puede reconocer y neutralizar los fagos, lo que podría limitar su eficacia terapéutica. La falta de protocolos estandarizados y la necesidad de aprobación regulatoria representan barreras significativas para la implementación generalizada de la fagoterapia en la práctica clínica.

Por otro lado, una ventaja significativa de los fagos es su toxicidad selectiva. A diferencia de los antibióticos, los fagos no pueden infectar células eucariotas, lo que significa que son seguros para las células humanas y no causan efectos secundarios en el (64)(61). Esta especificidad también minimiza el impacto en el microbioma, manteniendo la flora bacteriana beneficiosa mientras se eliminan las bacterias patógenas. Debido a su espectro limitado de huéspedes bacterianos, los fagos pueden actuar sin afectar de manera amplia el microbioma. Esto es crucial, ya que la preservación del microbioma es importante para mantener la salud general del huésped (59)(61). A diferencia de los antibióticos de amplio espectro, los fagos pueden eliminar las bacterias patógenas sin destruir las bacterias beneficiosas.

La posibilidad de usar fagos en combinación con antibióticos es otro beneficio destacado. Esta combinación puede mejorar la eficacia del tratamiento, especialmente en infecciones difíciles de tratar y en casos de resistencia a los antibióticos (65)(66)(67). Se ha documentado un paciente con una infección por *Pseudomonas aeruginosa* multirresistente, que fue tratado exitosamente utilizando una combinación de fagos y ceftazidima (68).

En muchos estudios clínicos, los pacientes han recibido fagos junto con antibióticos, lo que ha mostrado resultados prometedores, aunque a veces es difícil distinguir el efecto de cada tratamiento individual.

La integración de la fagoterapia con tratamientos antibióticos convencionales podría revolucionar la manera en que tratamos las infecciones bacterianas en un mundo cada vez más afectado por la resistencia a los antimicrobianos. La versatilidad de los fagos, derivada de su diversidad genética, abundancia y ubiquidad, permite encontrar prácticamente fuentes ilimitadas de fagos. Esta diversidad genética también facilita la creación de cócteles de fagos, que pueden atacar diferentes receptores bacterianos y mitigar los mecanismos de protección del huésped bacteriano (68). Además, la ingeniería genética puede ampliar aún más la diversidad y eficiencia de los fagos, ayudando a evitar la resistencia a los fagos y mejorar su eficacia en el tratamiento de infecciones (68).

Este enfoque combinado es valioso porque mejora la eficacia del tratamiento al atacar la bacteria desde diferentes ángulos, lo cual dificulta el desarrollo de resistencia bacteriana y puede proporcionar una solución más completa y duradera en comparación con el uso de un solo agente terapéutico porque se ha demostrado que no sólo resulta efectivo en la (66).

Además, la utilización de cócteles, ya sean simples con al menos dos fagos para un mismo género o mixtos a partir de dos géneros diferentes, representa una estrategia innovadora para superar la especificidad de los fagos y mejorar los resultados terapéuticos en la fagoterapia (30). Este enfoque tiene el potencial de revertir la resistencia bacteriana, dado que los diferentes fagos atacan distintos receptores en la superficie bacteriana (31). Descifrar estos mecanismos permitirá usar fagos y antibióticos de manera más estratégica, optimizando su potencial para mantener a raya las infecciones bacterianas y su resistencia a los tratamientos (35).

Esta sinergia se ha observado cuando dosis subletales de antibióticos estimulan a las bacterias para que incrementen la producción de fagos. Aunque el uso de dosis bajas de antibióticos puede activar mecanismos de defensa bacterianos, como el sistema SOS, que potencian la supervivencia y resistencia, combinaciones específicas de fagos y antibióticos pueden evitar tales respuestas. Este enfoque no solo se dirige a bacterias multirresistentes, sino que también ofrece una opción viable para controlar y tratar infecciones en

entornos donde estas bacterias resistentes son particularmente desafiantes (29).

En definitiva, las bacterias que solo resisten a un tipo de tratamiento suelen ser vencidas por el otro, y el sistema inmunológico del paciente actúa como una tercera defensa, contribuyendo a eliminar la infección (35). La terapia combinada de fagos y antibióticos está emergiendo como un enfoque formidable y sinérgico para combatir bacterias resistentes. Esta sinergia no solo parece prevenir la evolución de nuevas resistencias, sino que también puede disminuir la virulencia de las bacterias durante la infección. En el proceso de defensa contra los fagos, las bacterias pueden acabar haciéndose vulnerables a antibióticos a los que antes resistían. Los fagos depredadores pueden atacar componentes de la superficie bacteriana cruciales para su defensa contra los antibióticos, impactando su capacidad de absorber nutrientes y mantener su estructura celular (22).

En conjunto, la sinergia fago-antibiótico (PAS) y el uso de fagos modificados representan un avance intrigante en la medicina antimicrobiana. Aunque los mecanismos exactos de esta sinergia aún no se comprenden completamente, la investigación continua promete refinar estas terapias combinadas y optimizar su uso en la lucha contra las infecciones resistentes. El éxito de estas terapias combinadas puede variar dependiendo de varios factores, como la dosis de antibióticos y las condiciones experimentales. Sin embargo, la promesa de estas interacciones sinérgicas fomenta la necesidad de más investigación para maximizar su efectividad en la lucha contra las infecciones bacterianas resistentes a los tratamientos convencionales (69).

Esta combinación no solo es prometedora en entornos de laboratorio, sino que también ha mostrado éxito en ambientes clínicos, donde las bacterias resistentes a los antibióticos presentan desafíos significativos.

6. CONCLUSIONES

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

1. Los bacteriófagos muestran una notable capacidad para atacar y eliminar bacterias específicas, minimiza los efectos adversos sobre las células humanas y el microbioma, haciendo que sean generalmente seguros para el uso en humanos.

2. La combinación de fagos con antibióticos ha demostrado ser sinérgica, incrementando la eficacia del tratamiento y reduciendo la probabilidad de desarrollar resistencias.

3. La biología sintética y la ingeniería genética han permitido modificar fagos para ampliar su espectro de acción y mejorar su capacidad de degradar biofilms bacterianos, crucial para tratar infecciones crónicas y recurrentes.

4. La fagoterapia ofrece una perspectiva renovada y esperanzadora en la lucha contra las infecciones bacterianas resistentes, con el potencial de complementar o incluso sustituir los tratamientos antibióticos tradicionales especialmente para el tratamiento de infecciones multirresistentes.

7. BIBLIOGRAFÍA

1. Tarín-Pelló A, Suay-García B, Pérez-Gracia MT. Antibiotic resistant bacteria: current situation and treatment options to accelerate the development of a new antimicrobial arsenal. *Expert Rev Anti Infect Ther.* 2022;20(8):1095-108. doi: 10.1080/14787210.2022.2078308
2. O'Neill J. Tackling drug-resistant infections globally: final report and recommendations. Government of the United Kingdom; 2016
3. Aranaga C, Pantoja LD, Martínez EA, Falco A. Phage Therapy in the Era of Multidrug Resistance in Bacteria: A Systematic Review. *Int J Mol Sci.* 2022;23(9):4577. doi: 10.3390/ijms23094577
4. Petrovic Fabijan A, Iredell J, Danis-Wlodarczyk K, Kebriaei R, Abedon ST. Translating phage therapy into the clinic: Recent accomplishments but continuing challenges. *PLoS Biol.* 2023;21(5):e3002119. doi: 10.1371/journal.pbio.3002119.
5. McCallin S, Sacher JC, Zheng J, Chan BK. Current State of Compassionate Phage Therapy. *Viruses.* 2019;11(4):343. doi: 10.3390/v11040343.
6. Pirnay JP, Ferry T, Resch G. Recent progress toward the implementation of phage therapy in Western medicine. *FEMS Microbiol Rev.* 2022;46(1):fuab040.doi: 10.1093/femsre/fuab040.
7. Bertagnolio S, Dobрева Z, Centner CM, Olaru ID, Donà D, Burzo S, et al. WHO global research priorities for antimicrobial resistance in human health. *Lancet Microbe.* 2024;100902.doi: 10.1016/S2666-5247(24)00134-4.
8. Sierra Benítez EM, León Pérez MQ, Sierra Benítez EM, León Pérez MQ. Terapia antibacteriana: origen y evolución en el tiempo. *Revista Médica Electrónica.* 2019;41(5):1300-8.
9. Hankin ME. The bactericidal action of the waters of the Jamuna and Ganges rivers on Cholera microbes. *Ann. Inst. Pasteur* 10:511–523 (1896). *Bacteriophage.* 2011;1(3):117-26. doi:10.4161/bact.1.3.16736.
10. Abedon ST, Thomas-Abedon C, Thomas A, Mazure H.

Bacteriophage prehistory: Is or is not Hankin, 1896, a phage reference Bacteriophage. 2011;1(3):174-8.doi: 10.4161/bact.1.3.16591.

11. Letarov A. The Overlooked Bacteriophage: Nikolai F. Gamaleya 1899 Paper. Phage (New Rochelle). 2022;3(2):81-4.doi: 10.1089/phage.2022.0018.

12. D'Herelle F. On an invisible microbe antagonistic toward dysenteric bacilli: brief note by Mr. F. D'Herelle, presented by Mr. Roux. 1917. Res Microbiol. 2007;158(7):553-4.doi: 10.1016/j.resmic.2007.07.005.

13. Summers WC. Félix Hubert d'Herelle (1873–1949): History of a scientific mind. Bacteriophage. 2017;6(4):e1270090.doi: 10.1080/21597081.2016.1270090.

14. Summers WC. The strange history of phage therapy. Bacteriophage. 2012;2(2):130-3.doi: 10.4161/bact.20757.

15. Chanishvili N. Phage therapy--history from Twort and d'Herelle through Soviet experience to current approaches. Adv Virus Res. 2012;83:3-40.doi: 10.1016/B978-0-12-394438-2.00001-3.

16. Brüssow H, Hendrix RW. Phage Genomics: Small Is Beautiful. Cell. 2002;108(1):13-6.doi: 10.1016/s0092-8674(01)00637-7.

17. Tu Q, Pu M, Li Y, Wang Y, Li M, Song L, et al. Acinetobacter Baumannii Phages: Past, Present and Future. Viruses. 2023;15(3):673.doi: 10.3390/v15030673.

18. Boniver M, Wotquenne P, Moutschen M, Rousseau AF. [Phage therapy, an additional strategy against multidrug-resistant bacteria]. Rev Med Liege. 2022;77(9):510-5.

19. Shimamori Y, Pramono AK, Kitao T, Suzuki T, Aizawa SI, Kubori T, et al. Isolation and Characterization of a Novel Phage SaGU1 that Infects *Staphylococcus aureus* Clinical Isolates from Patients with Atopic Dermatitis. Curr Microbiol. 2021;78(4):1267-76.doi: 10.1007/s00284-021-02395-y.

20. Holmes RK, Jobling MG. Genetics. In: Baron S, éditeur. Medical Microbiology. 4th éd. Galveston (TX): University of Texas Medical Branch at

Galveston; 1996

21. Lin J, Du F, Long M, Li P. Limitations of Phage Therapy and Corresponding Optimization Strategies: A Review. *Molecules*. 2022;27(6):1857.doi: 10.3390/molecules27061857.

22. Torres-Barceló C. The disparate effects of bacteriophages on antibiotic-resistant bacteria. *Emerg Microbes Infect*. 2018;7(1):168.doi: 10.1038/s41426-018-0169-z.

23. Oechslin F. Resistance Development to Bacteriophages Occurring during Bacteriophage Therapy. *Viruses*. 2018;10(7):351.doi: 10.3390/v10070351.

24. Buckling A, Rainey PB. Antagonistic coevolution between a bacterium and a bacteriophage. *Proc Biol Sci*. 2002;269(1494):931-6.doi: 10.1098/rspb.2001.1945.

25. Labrie SJ, Samson JE, Moineau S. Bacteriophage resistance mechanisms. *Nat Rev Microbiol*. 2010;8(5):317-27.doi: 10.1038/nrmicro2315.

26. Mangalea MR, Duerkop BA. Fitness Trade-Offs Resulting from Bacteriophage Resistance Potentiate Synergistic Antibacterial Strategies. *Infect Immun*. 2020;88(7):e00926-19.doi: 10.1128/IAI.00926-19.

27. Bertozzi Silva J, Storms Z, Sauvageau D. Host receptors for bacteriophage adsorption. *FEMS Microbiol Lett*. 2016;363(4):fnw002. doi: 10.1093/femsle/fnw002.

28. León M, Bastías R. Virulence reduction in bacteriophage resistant bacteria. *Front Microbiol*. 2015;6:343.doi: 10.3389/fmicb.2015.00343.

29. Saha D, Mukherjee R. Ameliorating the antimicrobial resistance crisis: phage therapy. *IUBMB Life*. 2019;71(7):781-90. doi: 10.1002/iub.2010.

30. Vallenas-Sánchez YPA, Bautista-Valles MF, Llaque-Chávarri F, Mendoza-Coello ME, Vallenas-Sánchez YPA, Bautista-Valles MF, et al. Cóctel de bacteriófagos como sustituto de antimicrobianos en dermatología de animales de compañía. *Journal of the Selva Andina Animal Science*. 2022;9(2):97-117.

31. Peh E, Szott V, Reichelt B, Friese A, Rösler U, Plötz M, et al. Bacteriophage cocktail application for *Campylobacter* mitigation - from in vitro to in vivo. *BMC Microbiol.* 2023;23:209.doi: 10.1186/s12866-023-02963-1.
32. Chan BK, Abedon ST, Loc-Carrillo C. Phage cocktails and the future of phage therapy. *Future Microbiol.* 2013;8(6):769-83.doi: 10.2217/fmb.13.47.
33. O'Flynn G, Ross RP, Fitzgerald GF, Coffey A. Evaluation of a cocktail of three bacteriophages for biocontrol of *Escherichia coli* O157:H7. *Appl Environ Microbiol.* 2004;70(6):3417-24.
34. Lehman SM, Donlan RM. Bacteriophage-mediated control of a two-species biofilm formed by microorganisms causing catheter-associated urinary tract infections in an in vitro urinary catheter model. *Antimicrob Agents Chemother.* 2015;59(2):1127-37.doi: 10.1128/AAC.03786-14.
35. Torres-Barceló C, Hochberg ME. Evolutionary Rationale for Phages as Complements of Antibiotics. *Trends Microbiol.* 2016;24(4):249-56.doi: 10.1016/j.tim.2015.12.011.
36. Merrill CR, Scholl D, Adhya SL. The prospect for bacteriophage therapy in Western medicine. *Nat Rev Drug Discov.* 2003;2(6):489-97.doi: 10.1038/nrd1111.
37. Curtin JJ, Donlan RM. Using bacteriophages to reduce formation of catheter-associated biofilms by *Staphylococcus epidermidis*. *Antimicrob Agents Chemother.* 2006;50(4):1268-75.doi: 10.1128/AAC.50.4.1268-1275.2006.
38. Lu TK, Collins JJ. Dispersing biofilms with engineered enzymatic bacteriophage. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2007;104(27):11197-202.doi: 10.1073/pnas.0704624104.
39. Doolittle MM, Cooney JJ, Caldwell DE. Lytic infection of *Escherichia coli* biofilms by bacteriophage T4. *Can J Microbiol.* 1995;41(1):12-8.doi: 10.1139/m95-002.
40. Itoh Y, Wang X, Hinnebusch BJ, Preston JF, Romeo T.

Depolymerization of beta-1,6-N-acetyl-D-glucosamine disrupts the integrity of diverse bacterial biofilms. *J Bacteriol.* 2005;187(1):382-7.doi: 10.1128/JB.187.1.382-387.2005.

41. Scholl D, Adhya S, Merrill C. *Escherichia coli* K1's capsule is a barrier to bacteriophage T7. *Appl Environ Microbiol.* 2005;71(8):4872-4.doi: 10.1128/AEM.71.8.4872-4874.2005.

42. Xavier JB, Picioreanu C, Rani SA, van Loosdrecht MCM, Stewart PS. Biofilm-control strategies based on enzymic disruption of the extracellular polymeric substance matrix--a modelling study. *Microbiology (Reading).* 2005;151(Pt 12):3817-32.doi: 10.1099/mic.0.28165-0.

43. Hughes KA, Sutherland IW, Jones MV. Biofilm susceptibility to bacteriophage attack: the role of phage-borne polysaccharide depolymerase. *Microbiology (Reading).* 1998;144 (Pt 11):3039-47.doi: 10.1099/00221287-144-11-3039.

44. Hughes KA, Sutherland IW, Clark J, Jones MV. Bacteriophage and associated polysaccharide depolymerases – novel tools for study of bacterial biofilms. *Journal of Applied Microbiology.* 1998;85(3):583-90.

45. Projan S. Phage-inspired antibiotics *Nat Biotechnol.* 2004;22(2):167-8.doi: 10.1038/nbt0204-167.

46. Andrianantoandro E, Basu S, Karig DK, Weiss R. Synthetic biology: new engineering rules for an emerging discipline. *Mol Syst Biol.* 2006;2:2006.0028.doi: 10.1038/msb4100073.

47. Chan LY, Kosuri S, Endy D. Refactoring bacteriophage T7. *Molecular Systems Biology.* 2005;1(1):2005.0018.doi: 10.1038/msb4100025.

48. Dedrick RM, Guerrero-Bustamante CA, Garland RA, Russell DA, Ford K, Harris K, et al. Engineered bacteriophages for treatment of a patient with a disseminated drug-resistant *Mycobacterium abscessus*. *Nat Med.* 2019;25(5):730-3.doi: 10.1038/s41591-019-0437-z.

49. Marinelli LJ, Piuri M, Swigonová Z, Balachandran A, Oldfield LM, van Kessel JC, et al. BRED: a simple and powerful tool for constructing mutant

and recombinant bacteriophage genomes. PLoS One. 2008;3(12):e3957.doi: 10.1371/journal.pone.0003957.

50. Dedrick RM, Smith BE, Cristinziano M, Freeman KG, Jacobs-Sera D, Belessis Y, et al. Phage Therapy of Mycobacterium Infections: Compassionate Use of Phages in 20 Patients With Drug-Resistant Mycobacterial Disease. Clin Infect Dis. 2023;76(1):103-12.doi: 10.1093/cid/ciac453.

51. Sun Q, Shen L, Zhang BL, Yu J, Wei F, Sun Y, et al. Advance on Engineering of Bacteriophages by Synthetic Biology. Infect Drug Resist. 2023;16:1941-53.

52. Sulakvelidze A, Alavidze Z, Morris JG. Bacteriophage Therapy. Antimicrob Agents Chemother. 2001;45(3):649-59.doi: 10.1128/AAC.45.3.649-659.2001.

53. Merrill CR, Biswas B, Carlton R, Jensen NC, Creed GJ, Zullo S, et al. Long-circulating bacteriophage as antibacterial agents. Proc Natl Acad Sci U S A. 1996;93(8):3188-92.doi: 10.1073/pnas.93.8.3188.

54. Hagens S, Bläsi U. Genetically modified filamentous phage as bactericidal agents: a pilot study. Lett Appl Microbiol. 2003;37(4):318-23.doi: 10.1046/j.1472-765x.2003.01400.x.

55. Hagens S, Habel A, von Ahsen U, von Gabain A, Bläsi U. Therapy of experimental pseudomonas infections with a nonreplicating genetically modified phage. Antimicrob Agents Chemother. 2004;48(10):3817-22.doi: 10.1128/AAC.48.10.3817-3822.2004.

56. Bartlett JG. Narrative review: the new epidemic of *Clostridium difficile*-associated enteric disease. Ann Intern Med. 2006;145(10):758-64.doi: 10.7326/0003-4819-145-10-200611210-00008.

57. Górski A, Międzybrodzki R, Borysowski J, Dąbrowska K, Wierzbicki P, Ohams M, et al. Phage as a modulator of immune responses: practical implications for phage therapy. Adv Virus Res. 2012;83:41-71.doi: 10.1016/B978-0-12-394438-2.00002-5.

58. Royer S, Morais AP, da Fonseca Batistão DW. Phage therapy as strategy to face post-antibiotic era: a guide to beginners and experts. *Arch Microbiol.* 2021;203(4):1271-9.doi: 10.1007/s00203-020-02167-5.
59. Pelfrene E, Willebrand E, Cavaleiro Sanches A, Sebris Z, Cavaleri M. Bacteriophage therapy: a regulatory perspective. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy.* 2016;71(8):2071-4.doi: 10.1093/jac/dkw083.
60. Ldr M, H O, Dp P, K D, J A. Phage therapy efficacy: a review of the last 10 years of preclinical studies. *Critical reviews in microbiology* 2020];46(1).doi: 10.1080/1040841X.2020.1729695.
61. Malik DJ, Sokolov IJ, Vinner GK, Mancuso F, Cinquerrui S, Vladisavljevic GT, et al. Formulation, stabilisation and encapsulation of bacteriophage for phage therapy. *Adv Colloid Interface Sci.* 2017;249:100-33.doi: 10.1016/j.cis.2017.05.014.
62. Jo A, Ding T, Ahn J. Synergistic antimicrobial activity of bacteriophages and antibiotics against *Staphylococcus aureus*. *Food Sci Biotechnol.* 2016;25(3):935-40.doi: 10.1007/s10068-016-0153-0.
63. Chaudhry WN, Concepción-Acevedo J, Park T, Andleeb S, Bull JJ, Levin BR. Synergy and Order Effects of Antibiotics and Phages in Killing *Pseudomonas aeruginosa* Biofilms. *PLoS One.* 2017;12(1):e0168615.doi: 10.1371/journal.pone.0168615.
64. S A, Rt S. What's Old Is New Again: Bacteriophage Therapy in the 21st Century. *Antimicrobial agents and chemotherapy.* 2019 [;64(1).doi: 10.1128/AAC.01987-19.
65. Pires DP, Melo L, Vilas Boas D, Sillankorva S, Azeredo J. Phage therapy as an alternative or complementary strategy to prevent and control biofilm-related infections. *Curr Opin Microbiol.* 2017;39:48-56.doi: 10.1016/j.mib.2017.09.004.
66. Markoishvili K, Tsitlanadze G, Katsarava R, Morris JG, Sulakvelidze A. A novel sustained-release matrix based on biodegradable poly(ester amide)s and impregnated with bacteriophages and an antibiotic

shows promise in management of infected venous stasis ulcers and other poorly healing wounds. *Int J Dermatol.* 2002;41(7):453-8. doi:10.1046/j.1365-4362.2002.01451.x.

67. Chan BK, Turner PE, Kim S, Mojibian HR, Elefteriades JA, Narayan D. Phage treatment of an aortic graft infected with *Pseudomonas aeruginosa*. *Evol Med Public Health.* 2018;2018(1):60-6. doi: 10.1093/emph/eoy005.

68. 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. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy.* 2017;61(10):10.1128/aac.00954-17. doi: 10.1128/AAC.00954-17.

69. Endy D. Foundations for engineering biology. *Nature.* 2005;438(7067):449-53. doi: 10.1038/nature04342.

