

Fago-terapia: alternativa a la problemática de la multiresistencia microbiana

López Buitrago Juliana, Cano Penagos Daniela, Gaviria Arias Duverney¹

RESUMEN

Los fagos en su definición son entidades biológicas muy diversas, que se componen principalmente de material genético (ADN o ARN), y una estructura proteica. Son conocidas por infectar o invadir a las bacterias y necesitar de ellas para reproducirse, llevando a que la célula sufra finalmente una lisis. Las bacterias, además se reconocen por ser los microorganismos más abundantes en la tierra encontrándose en diferentes condiciones y ambientes, como ejemplo; se pueden hallar en la microbiota del ser humano o de otros organismos, y en entornos y condiciones ambientales con características muy diversas. Cabe mencionar que estas no representan un riesgo al ser humano, por ende, se han llevado a cabo diferentes estudios sobre sus posibles usos, donde se han encontrado múltiples formas de aplicación y se expande aún más a diferentes campos debido a su especificidad al tener un blanco propio, su seguridad al tener muy bajas probabilidades de provocar una reacción negativa al ser suministrada y el posible aprovechamiento de diversos fagos al tiempo como una terapia a infecciones (cocteles de fagos); entre otras. Lo cual ha llevado su estudio a un aprovechamiento que se les puede dar como terapia en diferentes áreas y ser aprovechada además como alternativa a tratamientos contra bacterias multirresistentes a los antibióticos.

Palabras clave: Bacteriófagos, fago-terapia, patógenos, resistencia microbiana, biotecnología

¹ Universidad Libre Pereira; Facultad de Ciencias de la Salud, Exactas y Naturales, Programa de Microbiología

Phago-therapy: alternative to the problem of microbial multiresistance

ABSTRACT

Phages in their definition are very diverse biological entities, which are mainly composed of genetic material (DNA or RNA), and a protein structure. They are known to infect or invade bacteria and need them to reproduce, eventually leading to lysis of the cell. Bacteria are also recognized for being the most abundant microorganisms on earth, being found in different conditions and environments, as an example; They can be found in the microbiota of humans or other organisms, and in environments and environmental conditions with very diverse characteristics. It is worth mentioning that these do not represent a risk to human beings, therefore, different studies have been carried out on their possible uses, where multiple forms of application have been found and it expands even further to different fields due to its specificity as it has a own target, its safety as it has a very low probability of provoking a negative reaction when supplied and the possible use of various phages at the same time as an infection therapy (phage cocktails); among other. Which has taken their study to an advantage that can be given as therapy in different areas and also be used as an alternative to treatments against multiresistant bacteria to antibiotics.

Keywords: Bacteriophages, phage therapy, pathogens, microbial resistance, biotechnology

INTRODUCCIÓN

Los bacteriófagos son entidades biológicas que infectan en específico a las bacterias, por lo que se encuentran de manera ubicua en diferentes ambientes en la tierra. Son parásitos obligados por lo que necesitan siempre de una célula hospedera. Debido a esto los fagos se han venido estudiando como una opción para tratar infecciones contra patógenos, además de diversas características como su especificidad y seguridad, que los hace ser una opción prometedora para su uso en con diversas aplicaciones en el manejo de infecciones. Los fagos, al igual que otros virus, son reconocidos por el sistema inmune como “Invasores” y su vez, son eliminados rápidamente, siendo esto otra ventaja que nos brinda su posible utilización. La prevalencia actual de numerosas bacterias resistentes a antibióticos brinda a los bacteriófagos una posibilidad de uso para su tratamiento en diferentes patologías. Debido a que no solo poseen un potencial terapéutico real, gracias a que son capaces de infectar y matar a su bacteria hospedera, sino que además tiene la capacidad de hacerlo inclusive con aquellas que son resistentes a estos antibióticos. Se ha identificado que una de las consecuencias del uso de antibióticos, de manera indiscriminada, es el desarrollo de resistencia en las bacterias para las cuales se usan. Por esta razón se sugiere un posible papel para la combinación de bacteriófagos con los antibióticos convencionales (1). En estos casos se utilizan concentraciones

subóptimas de antibióticos beta-lactámicos que debilitan la pared celular y posteriormente se aplican los fagos siendo su accionar más eficiente.

El uso de bacteriófagos para el tratamiento de infecciones, ya sean solos o en acompañados de antibióticos se conoce en conjunto como fago-terapia; la cual, se basa en utilizar fagos para lisar las bacterias en el sitio de infección y así combatir la amenaza más cercana que son las bacterias multirresistentes a los antibióticos (2). Pero aparte de esto, han tenido diversos problemas, debido a que no se han realizado las suficientes investigaciones y estudios para obtener una guía sobre su producción, calidad y seguridad; a diferencia de otras producciones farmacéuticas (3). El uso de la fago-terapia en países en desarrollo es una opción viable, pero que a su vez ha tenido diversos contratiempos, debido al tiempo que tomaría formular, producir y aprobar el uso de estos contra bacterias infecciosas que han generado gran impacto por su resistencia a antibióticos, pero en general sus aplicaciones efectivas van desde aspectos quirúrgicos hasta gastroenterológico, tanto en forma terapéutica como profiláctica (3).

BIOLOGÍA BÁSICA BACTERIÓFAGOS

Los fagos son una de las entidades biológicas, no vivas, más simples, pero increíblemente diversas. Estas solamente consisten en ADN o ARN

encerrado dentro de una cápside de proteína. En la Tabla 1, se muestra la clasificación actual de estos organismos en base al tipo de ácido nucleico y su morfología a nivel de la cápside.

Tabla 1. Clasificación por el Comité Internacional de Taxonomía de Virus - ICTV (International Committee on Taxonomy of Viruses) de los virus procariotas (bacterianos y arqueales) <https://talk.ictvonline.org/>.

Orden	Familia	Morfología	Ácidos nucleico
Belfryvirales	Turriviridae	Envuelto, isométrico	Lineal dsDNA
Caudovirales	Ackermannviridae	No-envuelto, Cola contractil	Lineal dsDNA
Caudovirales	Myoviridae	No-envuelto, Cola contractil	Lineal dsDNA
Caudovirales	Siphoviridae	No-envuelto, Sin cola contractil (largo)	Lineal dsDNA
Caudovirales	Podoviridae	No-envuelto, Sin cola contractil (corto)	Lineal dsDNA
Halopanivirales	Sphaerolipoviridae	Envuelto, isométrico	Lineal dsDNA
Haloruvirales	Pleolipoviridae	Envuelto, pleomórfico	Circular ssDNA, circular dsDNA, or Lineal dsDNA
Kalamavirales	Tectiviridae	No-envuelto, isométrico	Lineal dsDNA
Levivirales	Leviviridae	No-envuelto, isométrico	Lineal ssRNA
Ligamenvirales	Lipothirixviridae	Envuelto, Forma de varilla	Lineal dsDNA
Ligamenvirales	Rudoviridae	No-envuelto, Forma de varilla	Lineal dsDNA
Mindivirales	Cystoviridae	Envuelto, esférico	Segmented dsRNA
Petitvirales	Microviridae	No-envuelto, isométrico	Circular ssDNA
Tubulavirales	Inoviridae	No-envuelto, filamentosos	Circular ssDNA
Vinavirales	Corticoviridae	No-envuelto, isométrico	Circular dsDNA
Unassigned	Ampullaviridae	Envuelto, forma de botella	Lineal dsDNA
Unassigned	Bicaudaviridae	No-envuelto, forma de limón	Circular dsDNA
Unassigned	Clavaviridae	No-envuelto, forma de barra	Circular dsDNA
Unassigned	Finnlakeviridae		dsDNA
Unassigned	Fuselloviridae	No-envuelto, forma de limón	Circular dsDNA
Unassigned	Globuloviridae	Envuelto, isométrico	Lineal dsDNA
Unassigned	Guttaviridae	No-envuelto, ovoide	Circular dsDNA
Unassigned	Plasmaviridae	Envuelto, pleomórfico	Circular dsDNA
Unassigned	Portogloboviridae	Envuelto, isométrico	Circular dsDNA
Unassigned	Spiraviridae	Nonveloped, forma de barra	Circular ssDNA
Unassigned	Tristromaviridae	Envuelto, forma de barra	Lineal dsDNA

Como parásitos naturales de las bacterias, los fagos son incapaces de reproducirse independientemente y son en última instancia dependientes en un huésped bacteriano para la supervivencia. Los fagos suelen unirse a receptores específicos en la superficie de la célula bacteriana, para luego poder inyectar su material genético en la célula huésped. Este material genético

puede tener dos opciones, integrarse al material genético bacteriano (profagos) o transferirse verticalmente desde madre a célula hija, secuestrando la maquinaria de replicación bacteriana para producir la próxima generación de fagos. Cuando la progenie de los fagos está lista, estos lisan la célula bacteriana para salir, alcanzando desde unas pocas a más de 1000 partículas virales. Dependiendo de

diversos factores, los profagos pueden activarse liberándose del genoma bacteriano y activando el ciclo lítico de fago (4) (Fig.1)

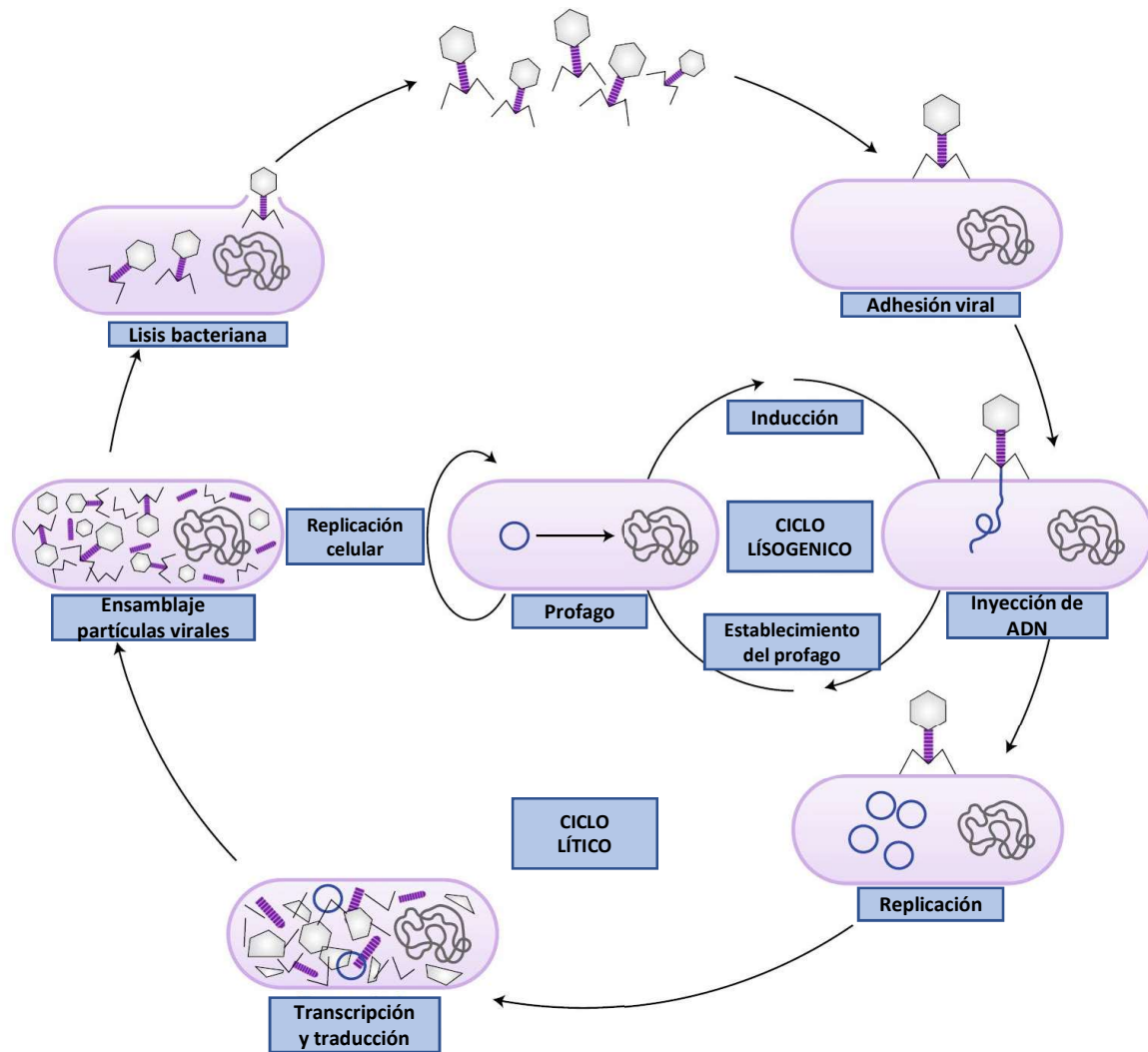


Figura 1. Fagos infectando a las bacterias hospederas en dos vías distintas: ciclo lítico, en el que se crean y dispersan nuevos fagos, y lisogénicos, por lo que el fago y el huésped forman una asociación estable. Imagen adaptada de (5).

La mayoría de los fagos son infecciosos solo para las bacterias. que llevan su receptor complementario, el cual determina efectivamente el rango del huésped del fago lítico (6). La especificidad de hospedero varía entre los fagos, algunos de los cuales son

cepas específicas, mientras que otros han demostrado tener la capacidad de infección a una gama de cepas e incluso géneros de bacterias (2,7). Las bacterias han evolucionado numerosos mecanismos para resistir la infección por fagos líticos, a su vez estos, tienen una

diversidad igualmente impresionante de mecanismos para romper esta resistencia. Para las bacterias, estas estrategias pueden incluir alteración o pérdida de receptores e integración del ADN del fago en repeticiones palindrómicas. Inter espaciadas agrupadas regularmente y asociadas al sistema CRISPR (CRISPR/Cas) (8), mientras que para el fago este puede incluir el reconocimiento de receptores nuevos o alterados y genes anti-CRISPR (9).

Entre los fagos líticos más comunes asociados con patógenos humanos en la microbiota del intestino se encuentran los pertenecientes al orden caudovirales comúnmente conocidos como “fagos de cola”, que contienen como material genético ADN de doble cadena, y por otro lado los Microviridae, que son virus de ADN monocatenarios sin cola (10) we investigate viromes from human subjects on a controlled feeding regimen. Longitudinal fecal samples were analyzed by metagenomic sequencing of DNA from virus-like particles (VLP). En contraste con los fagos líticos, los fagos lisogénicos integran su material genético en el cromosoma bacteriano en forma de profagos endógenos, y con menos frecuencia el ADN del fago puede permanecer separado como plásmido, pero aun así ser transmitido de forma estable a través de las generaciones bacterianas.

El lisógeno bacteriano luego se propaga en cada división celular y luego por alteraciones ambientales que generan

estrés en el profago; se induce al fago lisogénico de la forma del profago latente, desencadenando una transición al ciclo lítico y la liberación de la progenie de fagos en el medio ambiente. Cuando el material genético viral es incorporando en el genoma del hospedero, los genes del profago pueden ser procesados por maquinaria enzimática transcripcional de la bacteria. Hasta 18 profagos han sido encontrados en el genoma bacteriano, por ejemplo; en el patógeno de origen alimentario *Escherichia coli* (*E.coli*) La terapia convencional de fagos se basa en fagos estrictamente líticos, que mata a su huésped bacteriano. Para tratamiento, lítico, los fagos se compilan en preparaciones llamadas “cocteles de fagos” que consisten en múltiples fagos probados y que tienen eficacia *in vitro* contra el patógeno diana.

HISTORIA DE LA FAGO-TERAPIA

Aunque la idea de usar virus bacterianos terapéuticamente contra las infecciones bacterianas ha ganado recientemente gran atención en respuesta a la aparición de patógenos multirresistentes, la práctica ha existido por casi un siglo desde las observaciones iniciales de la inducción de fagos y lisis bacteriana. Frederick Twort describió por primera vez la zona característica de lisis asociada con la infección por fagos en 1915, pero fue Felix d’Herelle quien identificó la fuente de este fenómeno, las placas atribuidas a los virus bacterianos, y acuñó el término “bacteriófago” (literalmente “come

bacterias”). También fue d’Herelle quien concibió la idea de utilizar fagos terapéuticamente y es el responsable de llevar a cabo el primer uso clínico documentado de fagos en el año de 1919 en el Hospital de Enfants-Malades en París, donde los fagos fueron utilizados con éxito para tratar 4 casos pediátricos de disentería bacteriana (17). A pesar de varias pruebas exitosas, los primeros experimentos de D’Herelle fueron notorios por ser mal controlado y su investigación fue vigorosamente refutada (18). Sin embargo, D’Herelle continuó siendo pionero en la terapia de fagos para el tratamiento de la disentería, cólera, y la peste bubónica. Sin embargo, su trabajo estableció las bases para que a principios del siglo 20 se diera el establecimiento de una serie de centros de terapia de fagos, fagos comerciales y plantas de producción en toda Europa e India (19). En un ensayo con el uso de terapia con fagos como tratamiento para el cólera en 1931 en la región de Punjab de la India, involucró una cohorte de 118 sujetos de control y 73 sujetos experimentales que recibieron el tratamiento con fagos, D’Herelle observó un 90% de reducción de la mortalidad con 74 resultados letales en el grupo control y solo 5 en el grupo experimental (Beridze, 1938). Junto con d’Herelle, varios otros empresarios intentaron comercializar la producción de fagos en Brasil y Estados Unidos con preparaciones de fagos para *Staphylococcus*, *Streptococcus*, *E. coli* y otros patógenos bacterianos (19). Estas preparaciones fueron enviadas a todo el

mundo y a los médicos dispuestos, pero el tratamiento fue recibido con un éxito mixto. Esta falta de fiabilidad se debió en gran parte a la preferencia por los antibióticos en la medicina occidental (Beridze, 1938). Se cometieron muchos errores durante estos primeros ensayos de terapia de fagos, y la mayoría se puede atribuir a una mala comprensión de la naturaleza biológica de los fagos. Se produjeron protocolos de purificación y almacenamiento rudimentarios en títulos bajos de fagos activos, contaminación de antígenos bacterianos y fagos que carecían de infectividad a las bacterias objetivo. Además, los sistemas de distribución de los fagos al sitio de infección fueron definidos erróneamente por las limitaciones médicas del momento. Por ejemplo, el papel de la inmunidad innata como respuesta en la eliminación de fagos activos del paciente y su efecto en la disminución de la eficacia de la terapia con fagos, solo se observó recientemente como un mecanismo fisiológico potencialmente confuso (20). Como resultado, la terapia con fagos fue ampliamente rechazada por la mayor parte de la medicina occidental después de la introducción de antibióticos farmacéuticos en la década de 1940. La excepción a esto se encuentra en la antigua Unión Soviética y Europa del Este en donde la terapia de fagos clínicos se ha utilizado ampliamente para tratar infecciones resistentes a los antibióticos causadas por una gama de bacterias infecciosas como el *Staphylococcus*, *Pseudomonas*, *Klebsiella* y *E. coli* (21).

BACTERIÓFAGOS CONTRA PATÓGENOS RELEVANTES EN LA CLÍNICA

Las investigaciones recientes que utilizan modelos animales han explorado el tratamiento de fagos contra un rango de patógenos clínicamente significativos. Por ejemplo, cuando se desafía esta terapia, con el uso de fagos vía oral, contra la sepsis intestinal debido a *P. aeruginosa*, esta salvo al 66,7% de los ratones de la mortalidad en comparación con 0% en el grupo de control (22). En un modelo de hámster de ileocectitis producida por *Clostridium difficile* (*C.difficile*), una dosis única de fago concurrente con la administración de *C. difficile* fue una profilaxis suficiente contra la infección. El tratamiento de fagos después de la infección salvó a 11 de 12 ratones mientras que, en el control, en el que los animales recibieron *C.difficile* y clindamicina, estos murieron entre las 0 y las 96 horas (23). De igual manera se ha identificado que combinaciones de fagos también son capaces de reducir significativamente el crecimiento de *C.difficile in vitro* al igual que su proliferación. La administración intraperitoneal de una sola dosis de fagos fue suficiente para salvar al 100% de los ratones en modelos de bacteriemia utilizando *E.faecium* resistente a vancomicina (24), *E.coli* productora de β -lactamasa de espectro extendido (25) y *P.aeruginosa* resistente a imipenem (25). Los cocteles de fagos han sido utilizados de igual manera para

tratar infecciones en piel, pulmones y tracto gastrointestinal en animales modelos por *P. aeruginosa* resistentes a los antibióticos (22,26). Estudios en modelos animales han mostrado resultados similares en cepas resistentes a antibióticos de *E. coli* O25: H4-ST131 [45], *Vibrio parahaemolyticus*, *S. aureus* (26,27), y *A. baumannii* (22). Incluso hay una indicación de que el tratamiento con fagos es capaz de restaurar la sensibilidad a los antibióticos en bacterias resistentes a antibióticos, como en el caso de *P. aeruginosa* multirresistente. Se han realizado ensayos en humanos para la terapia con fagos por casi un siglo en varios institutos de Europa del Este, entre los más famosos, el Instituto Eliava de Bacteriófagos y el Instituto de Inmunología y Terapia experimental en Wroclaw, Polonia. El Instituto Eliava ha utilizado ampliamente fagos en tratamiento preclínicos y clínicos de patógenos bacterianos comunes tales como *S. aureus*, *E. coli*, *Streptococcus spp.*, *P. aeruginosa*, *Proteus spp.*, *S. dysenteriae*, *Salmonella spp.* y *Enterococcus spp.* (28). Las aplicaciones efectivas van desde aspectos quirúrgicos hasta gastroenterológico, tanto en forma terapéutica como profiláctica. Entre los trabajos reportados encontramos una serie de seis pacientes con úlceras del pie diabético que no respondían a la aplicación tópica de antibióticos los cuales fueron tratados con fagos específicos para *S. aureus*, y como resultado se identificó que el tratamiento fue suficiente para la recuperación en todos los individuos (29).

En un ensayo clínico en 1938, con 219 pacientes con disentería bacteriana (138 niños y 81 adultos), estos fueron tratados únicamente con un cóctel de fagos que consiste en una variedad de fagos dirigidos a *Shigella flexneri*, *Shigella shiga*, *E. coli*, *Proteus spp.*, *P. aeruginosa*, *Salmonella Typhi*, *Salmonella paratyphi A* y *B*, *Staphylococcus spp.*, *Streptococcus spp.* y *Enterococcus spp.* Estos cocteles fueron administrados tanto por vía oral como por vía rectal, y como resultados se identificó que, dentro de las 24 h al tratamiento, el 28% de los pacientes con sangre en sus deposiciones fueron aliviado de este síntoma, con un 27% adicional que mostro mejora dentro de 2-3 d. En conjunto, el 74% de los 219 pacientes mostraron mejoría o fueron completamente curados de sus síntomas (17)however, was not widely accepted in the West. After the emergence of antibiotics in 1940s, phage research was diverted to a more fundamental level. At the same time, phage therapy was widely practiced in the Soviet Union due to collaboration of Felix d'Herelle with his Georgian colleagues. The majority of the articles dedicated to this subject are from the 1930s and 1940s. The old Soviet literature indicates that phage therapy was used extensively to treat a wide range of bacterial infections in the areas of dermatology (Beridze, 1938. Adicionalmente, durante 1974 en una epidemia de fiebre tifoidea, una cohorte de 18.577 niños, fueron inscritos en un ensayo de intervención profiláctica utilizando fagos de tifoidea,

la administración de fagos dio como resultado una disminución de 5 veces la incidencia de tifoidea en comparación con el placebo (28). El potencial de la terapia con fagos aún no se ha desarrollado, ya que los fagos tienden a ser más efectivos contra el patógeno objetivo cuando se usa en combinación con antibióticos (28), siendo una opción de tratamiento que aún no ha sido investigada en humanos. Actualmente no hay productos de terapia de fagos aprobados para uso humano en la UE o Estados Unidos. Sin embargo, En la industria alimentaria, hay varios productos comerciales preparados de fagos utilizados para el control biológico de bacterias patógenas aprobados por la FDA, en virtud de su clasificación como “generalmente considerado como seguro-GRAS”. Las preparaciones se utilizan contra *Salmonella spp.*, *Listeria monocytogenes*, MRSA, *E. coli* O157: H7, *Mycobacterium tuberculosis*, *Campylobacter spp.* y *Pseudomonas syringae*, entre otros (30,31). Los fagos también tienen un valor potencial para la detección de patógenos, un ejemplo de esto es el uso de fagos reporteros bioluminiscente para detectar *Bacillus antracis*. En 2011 se estimaron 48 millones de casos de intoxicación alimentaria solo en los Estados Unidos. La evidencia sugiere que el biocontrol de fagos puede ser un método eficaz para mejorar la seguridad alimentaria en numerosas etapas en la producción y procesamiento de carne, y también tiene potencial para reducir la contaminación bacteriana en frutas, verduras y productos

lácteos. Estas investigaciones en el uso de fagos como sistemas de biocontrol en la producción de alimentos, así como recientes ensayos controlados con placebo en humanos que demostraron la seguridad de la administración de fagos orales (32–35) a higher phage dose (10⁵), están gradualmente llenando el vacío de conocimiento en la seguridad en el uso de terapias basadas en fagos. La evidencia sobre la seguridad en el uso de fagos se está fortaleciendo continuamente con el desarrollo de estudios clínicos controlados, aleatorios, doble ciego, y fase controlado contra placebo. Por ejemplo, ensayos clínicos de terapia de fagos, como la que estableció tanto su seguridad como eficacia en el tratamiento de la otitis crónica causada *P. aeruginosa* resistente a antibióticos (36). Adicionalmente, innovaciones en la herramienta de edición de genes como CRISPR/Cas han creado nuevas oportunidades para la terapia con fagos. Por ejemplo, el uso de fagos transformados genéticamente para distribuir en bacterias un sistema CRISPR/Cas programado para interrumpir los genes de resistencia a antibióticos presentes en plásmidos. Estos fagos pueden ser aplicados a superficies hospitalarias para reducir la frecuencia y propagación genes de resistencia a antibióticos. El campo de la bioingeniería de los fagos todavía está en su infancia, pero sin duda dará muchas tecnologías invaluable como esta.

FAGO-TERAPIA VS TERAPIA ANTIBIÓTICA

Tanto los antibióticos como los fagos funcionan como antibacterianos que alteran las colonias bacterianas por lisis o inhibición, sin embargo, varias diferencias clave hacen que cada antibacteriano sea más o menos apropiado dependiendo de la situación.

• SEGURIDAD

Las reacciones adversas a los antibióticos están bien documentadas e incluyen casos de anafilaxis, nefrotoxicidad, cardiotoxicidad, hepatotoxicidad y neurotoxicidad, al igual que una serie de complicaciones gastrointestinales y hematológicas. La mayoría de las reacciones adversas son reacciones alérgicas, sin embargo, en los raros casos de anafilaxia, esta se asocia con clases específicas de antibióticos o es debida a las altas concentraciones del producto a nivel tisular (37–39). A diferencia de lo reportado en la literatura sobre la seguridad antibiótica, la terapia con fagos solo ha tenido atención recientemente por la medicina occidental y, como resultado, gran parte de la información disponible sobre la seguridad de los fagos es nueva. A pesar de que la administración de fagos orales generalmente es considerada como segura (32–34,40), una consideración importante para la terapia de fagos es

la posibilidad de la translocación de los fagos a través del epitelio del intestino donde posteriormente es capaz de circular dentro de la sangre (41). Sin embargo, algunos datos muestran que la translocación de fagos puede beneficiar al huésped reduciendo la regulación de la respuesta del sistema inmune a antígenos de microbios intestinales indígenas a través de la inhibición de la interleucina-2, factor de necrosis tumoral, y la producción de interferón gamma (41). Otros estudios han descubierto que existe una respuesta inmune innata del hospedero dirigida a eliminación de fagos después de la administración en ratones (20,42). Mientras los pros de la terapia con fagos probablemente superan los contras de pacientes no inmunocomprometidos, la respuesta al fago puede ser indicativa de una potencial reacción adversa en pacientes inmunocomprometidos, que hipotéticamente podría empeorar la condición de un paciente. Actualmente no hay consenso sobre esta posibilidad ya que como otros investigadores argumentan es poco probable que la terapia con fagos sea capaz de provocar tal reacción adversa en pacientes inmunocomprometidos (41,43). Complicaciones adicionales incluyen la posibilidad que los cócteles de fagos induzcan un estado de disfunción en la barrera intestinal conocida como “intestino permeable”. Tetz y Tetz (44), usaron un modelo de ratón para demostrar que la administración oral de un cóctel de fagos comercial de origen ruso era capaz de aumentar la permeabilidad

intestinal y elevar los niveles séricos de complejos circulatorios, inmunes e inflamatorios en la sangre; los cuales, están asociados con una serie de condiciones patológicas. Sin embargo, otro estudio no observó un aumento significativo en los niveles de citoquinas en respuesta al tratamiento con fagos. La posibilidad de que la terapia con fagos altere la función de barrera normal del intestino tendría serias implicaciones para varios trastornos recientemente vinculados a disfunciones de la barrera intestinal, como la enfermedad de Crohn, enfermedad del intestino inflamado y diabetes tipo 1 (45). Además, encontraron que la respuesta inflamatoria al fago dependía de sitio de la infección, claramente, muchas de las preocupaciones de seguridad con la terapia de fagos aún deben ser abordadas. Es probable que la respuesta fisiológica a los fagos también difiere entre los individuos y depende de las cepas de fagos específicas utilizadas. Para determinar la seguridad futura de los tratamientos con fagos en la salud humana las investigaciones deberán centrarse en ensayos clínicos en humanos, como gran parte de la investigación actual sobre la inmunología, la respuesta al fago se limita a modelos animales.

• ESPECIFICIDAD

El marcado contraste con los antibióticos, los fagos tienden a ser específico tanto para especies como para cepas. En ciertas situaciones esto puede

ser una gran ventaja, considerando los efectos colaterales bien documentados de los antibióticos de amplio espectro en nuestra microbiota, entre los que se tienen como la diarrea asociada a antibióticos e infecciones por *C. difficile*. Otras consecuencias de las perturbaciones antibióticas en la comunidad microbiana intestinal entre las que se incluyen el riesgo de asma, obesidad y diabetes (46). La comprensión actual del daño colateral debido a la terapia con fagos es limitada, pero en comparación con los antibióticos, la terapia con fagos ha reportado que resulta en menos perturbación del microbioma intestinal a la vez que reduce eficazmente el transporte intestinal de patógenos tales como *Shigella sonnei* y *E. coli* uropatogénica (47). Mientras que la especificidad de cepa y especie de los compuestos antibacterianos ofrece muchas ventajas, estas vienen con un número de restricciones inherentes. Apuntando a un solo patógeno, la terapia con fagos podría ser menos eficaz contra infecciones tales como heridas de quemadura infectadas, que son a menudo colonizada por más de una cepa de bacterias. Esto puede explicarse creando cócteles de fagos contra una serie de patógenos conocidos, pero el éxito de este enfoque depende del conocimiento de cuales patógenos están siendo tratados, la especificidad afecta significativamente el desarrollo del tratamiento y las pruebas, que también limitan la posibilidad de producción a gran escala y su distribución, como una clara ventaja de antibióticos de amplio espectro.

Bourdin et al (40), inocularon de forma cruzada fagos de 2 regiones geográficas distintas (México y Bangladesh), contra la diarrea asociada a *E. coli* de las mismas regiones y se encontró que los fagos mostraron una alta especificidad de cepa, como a *E. coli* de su región de origen. En un ensayo clínico aleatorizado, Sarker et al (35), administraron un coctel ruso común contra *E. coli* a una cohorte de 120 niños de Bangladesh con diarrea probada microbiológicamente producida por una *E. coli* enterotoxogénica. En este ensayo, no se observó mejora clínica entre los pacientes que recibieron el cóctel de fagos en comparación con el placebo. Estos hallazgos están en línea con el trabajo in vitro que sugiere que los cócteles de fagos están mejor adaptados a las poblaciones bacterianas locales (40), y el rango de hospederos bacterianos puede ser restringido tanto espacial como temporalmente (48). En una inoculación cruzada in vitro de coctel de fagos contra *E. coli* O157 productor de toxina shiga: H7, la lisis ocurrió en aislamientos de origen humano y bovinos, lo que sugiere un potencial para cocteles de fagos regionales para entornos tanto clínicos como agrícolas. Encontraron que los fagos dirigidos a las bacterias resistentes a los antibióticos son más propensos a ser encontradas dentro del entorno del paciente infectado, que, en este caso, fue el efluente del hospital donde las bacterias resistentes a los antibióticos fueron aisladas. La especificidad regional puede, por lo tanto, ser ventajosa al buscar fagos que se dirigen a cepas

bacterianas específicas. La especificidad regional puede ser útil para encontrar fagos con la mayor infectividad hacia el patógeno objetivo, esto beneficiaría especialmente a las regiones con acceso limitado a los antibióticos. Juntos, el montaje y la evidencia de la adaptabilidad local del fago sugiere que tuberías regulatorias también deben ser rápidamente adaptables, es decir, permitiendo la sustitución o adición de fagos en cócteles sin necesidad de ensayos clínicos adicionales para terapia de fagos para trabajar a escala global.

- **PENETRACIÓN DE BIOPELÍCULAS**

La terapia con antibióticos es altamente efectiva contra bacterias plantónicas, como *V. cholerae* y *Yersinia pestis*, sin embargo, el tratamiento es limitado en infecciones bacterianas basadas en biopelículas (49). Los fagos, sin embargo, están equipados con enzimas (por ejemplo, Depolimerasa de EPS), en el exterior de la cápside que es capaz de degradar las sustancias poliméricas extracelulares (EPS), y dispersar biopelículas bacterianas, permitiendo que el fago acceda a las bacterias incrustadas dentro de la matriz de EPS (37), la progenie del fago liberada al completarse el ciclo lítico, y la dispersión de la biopelícula a través de la eliminación de bacterias embebidas en las capas de biopelículas (37,50). La inducción de biopelículas densas y altas dosis de antibióticos, típicamente se requieren con el fin de

lograr que la inhibición del crecimiento bacteriano sea completa. Sin embargo, la erradicación completa es rara y rápidamente comienza el rebrote de colonias después del final de los tratamientos con antibióticos (51–53). Gabisoniya et al (54) en el Instituto Eliava de Bacteriófagos en Tbilisi, Georgia, encontraron que la aplicación de fagos en colonias in vitro de la *P. aeruginosa* no solo impedían la formación adicional de biopelículas por el patógeno sino también promovían la degradación de las biopelículas existentes. Trabajos realizados para el tratamiento con fagos, han demostrado su capacidad de eliminar biopelículas formadas por *L. monocytogenes*, *P. aeruginosa*, y *Staphylococcus epidermidis* en la superficie de dispositivos médicos (7). Estos hallazgos son altamente relevantes al problema de las infecciones persistentes causadas por dispositivos médicos implantados como catéteres, lentes, y prótesis donde la formación de biopelículas es común.

- **COCTELES DE FAGOS**

El desarrollo de cócteles de fagos debido a la diversidad masiva de fagos ambientales es sustancialmente más complicado que diseñar un régimen de combinación de terapia antibiótica. La composición del cóctel de fagos es crítica para el éxito de la terapia con fagos (55) La personalización de cócteles de fagos para cada infección toma mucho tiempo y puede ser costoso, pero, en el otro extremo del espectro, un enfoque

de “talla única para todos”, puede no proporcionar la adecuada especificidad requerida para que resultados clínicos sean favorables. Otras consideraciones son los efectos colaterales de los fagos sobre la microbiota del paciente, sin embargo, ha sido plenamente explorado (47). En el diseño de un cóctel también hay que tener en cuenta el ciclo de vida del fago. Los fagos lisogénicos parecen ser muy comunes en la microbiota intestinal, y se ha determinado que los profagos comprenden la mayoría del viroma del intestino (56). We investigate viromes from human subjects on a controlled feeding regimen. Longitudinal fecal samples were analyzed by metagenomic sequencing of DNA from virus-like particles (VLP). Sin embargo, se ha identificado que algunos fagos lisogénicos son prometedores terapéuticamente, silenciando de manera efectiva los genes de virulencia en bacterias patógenas o suministrando genes para el metabolismo de ácidos grasos de cadena corta; mientras que otros fagos lisogénicos suministran genes de virulencia y de resistencia a antibióticos. Los genes de resistencia a los antibióticos se han recogido de la fracción fágica del ADN en las aguas residuales y se ha reportado que estos persisten más tiempo en los fagos que en las bacterias (15). Los genes de resistencia a los antibióticos también están presentes en los fagos en muestras fecales humanas y se ha identificado en ratones con tratamiento antibiótico, se enriquecen las fracciones de fagos con genes que codifican para resistencia a

antibióticos, lo que indica un posible papel para los fagos como reservorio de genes de resistencia a antibióticos (15). El potencial hipotético de los fagos lisogénicos para complicar las infecciones existentes a través de la transferencia horizontal de genes de resistencia a antibióticos a bacterias infecciosas, en gran medida excluye a estos de la mayoría de los cócteles de fagos. Sin embargo, Regeimbal *et al* (24) demostraron la posibilidad de una aplicación innovadora de fagos lisogénicos mediante el diseño de un cóctel “inteligente”, de 5 fagos que eliminó de una herida cutánea, *A. baumannii* en un modelo de ratón. Este coctel de fagos inteligente estaba compuesto por 4 fagos que eran incapaces de lisar al hospedero y 1 fago que solamente inhibía el crecimiento *in vitro*. El fago inhibidor del crecimiento provocaba la pérdida de la capsula en la bacteria, y la eliminación de la cápsula se sabe que tiene como efecto la disminución de la virulencia de la bacteria; haciéndola susceptible a la lisis de los 4 fagos adicionales. Este tipo coctel diseñado representa el punto de partida para proponer nuevas opciones de tratamiento para eliminar infecciones bacterianas que son resistentes a los tratamientos convencionales. Los fagos lisogénicos tienen muchas propiedades intrigantes que pueden ser útiles para este tipo de manipulación *in situ* de bacterias individuales, y potencialmente el microbioma intestinal humano (57), pero primero se necesita saber mucho más sobre el papel de los fagos

lisogénicos del intestino humano para que el uso de estos se haga de forma más segura y eficaz.

FAGO-TERAPIA EN LA SALUD PÚBLICA DE LOS PAÍSES EN DESARROLLO

El problema de la resistencia a los antibióticos no solo afecta a pacientes individuales en clínicas, sino que existe en todo tipo de institutos de atención médica y afecta a comunidades enteras. Por ejemplo, el brote de *Escherichia coli* hemorrágica enteroagregativa (EAHEC) O104: brote de H4 en Berlín en 2011. El uso de antibióticos fue incluso de ayuda cuestionable (39). Sin embargo, diferentes grupos de investigación obtuvieron potentes fagos líticos contra esta problemática *E. coli* enteroagregativa, ya sea mediante el aislamiento de nuevos fagos del medio ambiente o mediante la selección y “mejora” de los fagos de las colecciones existentes, y esto a menudo se logró en cuestión de días. Como tal, los fagos probablemente podrían haberse usado para ayudar a controlar el brote de *E. coli* O104: H4, que causó la muerte de más de 50 pacientes. Desafortunadamente, el uso autorizado de fagos no fue posible en este contexto de terapia de fagos que de otro modo sería factible, porque según la legislación vigente sobre medicamentos, tal preparación de fagos anti-O104: H4, habría tomado años en desarrollarse, producirse y aprobarse.

Por lo tanto, es crucial establecer nuevas colecciones de fagos terapéuticos (incluso en países de bajos ingresos y emergentes), y así mantener y actualizar continuamente las colecciones de fagos existentes, que pueden ser Se utiliza para contrarrestar epidemias bacterianas de manera oportuna y rentable. En grandes partes del mundo, las enfermedades diarreicas bacterianas de todo tipo son una gran carga para la salud pública. La enfermedad diarreica es uno de los principales problemas en los países del tercer mundo. Muchos agentes causales comunes son bacterias resistentes a múltiples fármacos (MDR), y considerando el mal saneamiento, el control de esas epidemias y pandemias como el cólera, por ejemplo, se descontrola rápidamente. Los bacteriófagos podrían desempeñar un papel importante (40). El grupo Mekalanos (<https://mekalanoslab.med.harvard.edu/>) mostró hace algún tiempo el papel natural efectivo de los bacteriófagos como agentes en el origen del colapso natural de las epidemias de diarrea endémicas locales en Bangladesh (41-42). Esta observación nos lleva a la idea de que un mayor estudio y optimización de esta interacción bacteria / fago, podría llevar la terapia con fagos a las autoridades de salud pública como una forma de controlar o al menos inhibir las enfermedades diarreicas, que siguen siendo un problema importante especialmente en los países en desarrollo.

TERAPIA COMBINADA (BACTERIÓFAGOS - ANTIBIÓTICOS).

Existen ciertas ventajas, y es la capacidad que tienen los fagos de complementarse con otras terapias y/o antibióticos, ya que, cabe resaltar que solo con la utilización de la fago-terapia no se reemplazaría por completo el uso de antibióticos; las combinaciones de los antes mencionados pueden tener un gran beneficio, además de conseguir un efecto beneficioso mayor (58). En los últimos años, se ha visto un gran avance en el estudio, entre la interacción de antibióticos y fagos, lo que lleva a una mejora en cuanto a los tratamientos sobre infecciones bacteriana (59). En presencia de un antibiótico β -lactámico meropenem, KS12 y KS14 mostraron un aumento significativo en el tamaño de la placa. El aumento en el tamaño de la placa sugiere un mayor efecto bactericida de los fagos con antibióticos. Al usar antibióticos a una concentración subinhibitoria, los fagos pueden tener un mayor acceso a los receptores en las células bacterianas que se han alargado (60). A parte de los antes mencionados, se han evaluado diversos tratamientos combinados Verma y *col.* (61) evaluaron la eficacia del fago KPO1K2 en combinación con ciprofloxacina

en biopelículas jóvenes (12 h) de *K. pneumoniae*. La monoterapia con ciprofloxacina o fagos redujo la carga bacteriana en la biopelícula en $1.76 \log_{10}$ o $> 4 \log_{10}$, respectivamente, 3 h después del tratamiento. La terapia combinada de fago-antibiótico no pudo reducir aún más la carga bacteriana en comparación con el tratamiento con fago solo. Sin embargo, la terapia combinada redujo significativamente la aparición de mutantes resistentes a los fagos o antibióticos tanto en las células planctónicas como en la biopelícula.

DESARROLLO DE PRODUCTOS BASADOS EN BACTERIÓFAGOS

Los fagos se están comercializando en varias áreas, (Tabla 2), y siempre es importante considerar la protección de una idea mediante la presentación de Propiedad Intelectual (PI), aunque esto no ha sido fácil ya que ha habido muchos ejemplos en el uso de fagos en el pasado. Además de la terapia con fagos en humanos, existen reportes de su uso en las siguientes áreas: descontaminación (granjas, productos alimenticios e instrumentos), uso de lisinas u otras enzimas de fagos, diagnóstico, terapéutica veterinaria, vehículos de administración de terapia génica y vacunas (62).

Tabla 2. Algunas empresas activas en la comercialización de productos que utilizan fagos (5).

Empresa	Fundada	Fondos (millones de dolares)	Plataforma	Blanco	Estado actual
Adaptive Phage Therapeutics	2016	5 semilla	Terapia de fagos individualizada, PhageBank, Prueba rapida de rango de hospedero	Enfermedad infecciosa, urinaria infecciones del tracto	Predínico
AmpliPhi Biosciences	2002	8,23 capitalizacion de mercado	Combinaciones de fagos para bacterias	Enfermedad infecciosa	Fase 1 cóctel de tres fagos, prueba de seguridad de la piel; acceso individual para <i>S. aureus</i> y <i>P. aeruginosa</i>
BiomX (Ness Ziona, Israel)	2015	24	Cócteles de fago personalizados	Enfermedad del intestino irritable	Predínico
C3J Therapeutics	2005	136	Péptidos antimicrobianos y fagos de ingeniería	Enfermedad infecciosa, microbioma	Predínico
Eligo Bioscience (Paris)	2014	20,2 - serie A (Khosla, Seventure)	Fago construidos mediante CRISPR	Enfermedad infecciosa	Predínica
EnBiotix	2012	No divulgado	Fago de ingeniería	Articulación, piel, herida, fibrosis quística, infecciones articulación protésica	Predínico
Intralytix	1998	17,5	Cóctel de fagos contra <i>E. coli</i> invasiva y adherente	Enfermedad de Crohn	Fase 1/2
Locus Biosciences	2015	26	Fago construidos mediante CRISPR	Infectious disease, microbiome	Preclinical
Nemesis Biosciences (Cambridge, UK)	2014	2,3	Transmid	Bacterias productoras de β -lactamasas de espectro extendido	Predínico
Pherecydes Pharma (Romainville, France)	2006	12,3	Terapia de fagos individualizada	Enfermedad infecciosa	Fase 2 (quemaduras)

Las lisinas han tenido éxito en una variedad de modelos animales para controlar los patógenos Gram-positivos (35) the use of bacterial viruses infecting the pathogen in a species-specific way, is a potential alternative. METHOD T4-like coliphages or a commercial Russian coliphage product or placebo was orally given over 4 days to Bangladeshi children hospitalized with acute bacterial diarrhea. Safety of oral phage was assessed clinically and by functional tests; coliphage and *Escherichia coli* titers and enteropathogens were determined in stool and quantitative diarrhea parameters (stool output, stool

frequency. En este sentido también se han presentado varios trabajos en relación con uno o varios aspectos de la terapia con fagos en humanos, y en la actualidad se presentan como una alternativa viable para superar el problema presente de la resistencia a los antibióticos.

Sin embargo, es importante distinguir dos enfoques para los cuales los problemas regulatorios serán significativamente diferentes. Actualmente, un enfoque adoptado por *PhicoTherapeutics* (Reino Unido) implica la modificación genética de un fago para transportar un gen que

codifica una proteína que generalmente es tóxica para las bacterias. Esta estrategia tiene la ventaja de ser una tecnología de plataforma (SASPject™) que es potencialmente aplicable a cualquier bacteria, pero tiene la desventaja de que los fagos no se replican y, por lo tanto, no hay replicación en el sitio de la infección. Además, puede haber obstáculos regulatorios sustanciales debido a la naturaleza de Organismos Genéticamente Modificado (OGM). Otras compañías (por ejemplo, *Intralytix*, *BioControl*, *BioPhage Pharma* y *Novolytics*) están empleando fagos líticos obligatorios naturales o mutantes espontáneos derivados de ellos comúnmente como un cóctel de varios fagos orientados a infectar a la gran mayoría de las cepas clínicamente significativas de un patógeno en particular (63). En la medida que no hay productos de terapia de fagos en el mercado del mundo occidental, es esencial que las compañías de fagos se adhieran a las estrategias adecuadas de desarrollo de fármacos que permita una adecuada oportunidad de éxito. En el Reino Unido, la empresa *BioControl* ha liderado el primer ensayo en el Reino Unido de un producto de fago contra las infecciones del oído por *Pseudomonas*. Después de su éxito temprano en la infección del oído en perros, esta empresa ha completado el primer ensayo de Fase I/IIa en humanos. No se reportaron problemas para obtener la aprobación de la entidad reguladora del Reino Unido, *Search Results Web result with site links Medicines*

and Healthcare products Regulatory Agency (MHRA), y la compañía ahora está llevando a cabo una prueba de fase III. Varias compañías de fagos han identificado los grandes mercados que están disponibles para los productos de fagos contra *Staphylococcus aureus* resistente a la meticilina (MRSA) y *Clostridium difficile*. Varias de las compañías enumeradas en la Tabla 2 afirman que están trabajando en esta área, pero solo tres, *Novolytics Limited* (Reino Unido), *Phico Therapeutics* (Reino Unido) y *BioPhage Pharma Inc.* (Canadá) están cerca de los ensayos clínicos, el enfoque que están tomando estas compañías se basa en la prevención más que en la cura (63). El transporte nasal de *Staphylococcus aureus* ahora es ampliamente aceptado como un factor de riesgo para la autoinfección con la misma cepa, y cada vez es más común que los pacientes sometidos a cirugía electiva sean examinados para el transporte nasal de MRSA. El enfoque preventivo de fagos sería erradicar el paso nasal de MRSA antes de la hospitalización, lo que debería reducir la incidencia de infección. Este enfoque tiene menos obstáculos regulatorios y menores que ir directamente a un tratamiento intravenoso y potencialmente hará que los productos de fagos se comercialicen mucho más rápidamente (62).

ENSAYOS CLÍNICOS DE TERAPIA DE FAGOS EN HUMANOS

Hasta la fecha, los ensayos de terapia de fagos humanos han sido en gran

medida empíricos, con un uso rutinario limitado a Georgia, Polonia y Rusia (64). En particular, el Instituto George Eliava en Georgia tiene una larga experiencia en la selección, aislamiento y preparación de cócteles de monófago y fago contra una variedad de patógenos bacterianos para la terapia de fagos. La aplicación terapéutica de fagos también se ha llevado a cabo durante varias décadas en el Instituto de Inmunología y Terapia Experimental en Polonia (65). Sin embargo, los datos clínicos experimentales publicados en revistas rusas y polacas son de difícil acceso debido a las barreras de seguridad y de idioma. Aunque el informe y la evaluación de la terapia con fagos necesitan mejorar, particularmente con respecto a la eficacia y la tolerabilidad y el uso de números de pacientes adecuados, se han publicado varios informes de casos exitosos. Los informes proporcionan alguna evidencia de que el desarrollo de la terapia con fagos es una alternativa prometedora para combatir la resistencia bacteriana a los antibióticos. En Francia, el regulador nacional de salud autorizó el primer tratamiento de pacientes con infecciones extremadamente resistentes a los medicamentos y difíciles de tratar

mediante la terapia con fagos. Desde entonces, seis casos con diversas infecciones bacterianas han sido tratados con éxito (64). Aunque no se realizaron varios tratamientos utilizando estándares clínicos adecuados para la aprobación de medicamentos en el mundo occidental, mostraron potencial terapéutico para los fagos y cómo se pueden aplicar los fagos (65,66).

Los nuevos productos terapéuticos generalmente deben pasar por un proceso largo y completo que involucra ensayos preclínicos y clínicos para obtener la aprobación regulatoria para el acceso al mercado. En los Estados Unidos, el tiempo promedio para la aprobación de un nuevo medicamento de las pruebas preclínicas es de 12 años y los costos ascienden a millones de dólares debido a la duración, el tamaño y la complejidad de los ensayos clínicos en humanos. Por estas razones, la cantidad de ensayos clínicos formales de terapia de fagos (como se enumera en www.ClinicalTrials.gov o (<https://globalclinicaltrialdata.com/>) es muy limitado (65). Sin embargo, algunos de los ensayos clínicos de terapia de fagos humanos en curso se resumen en la Figura 2 (66).

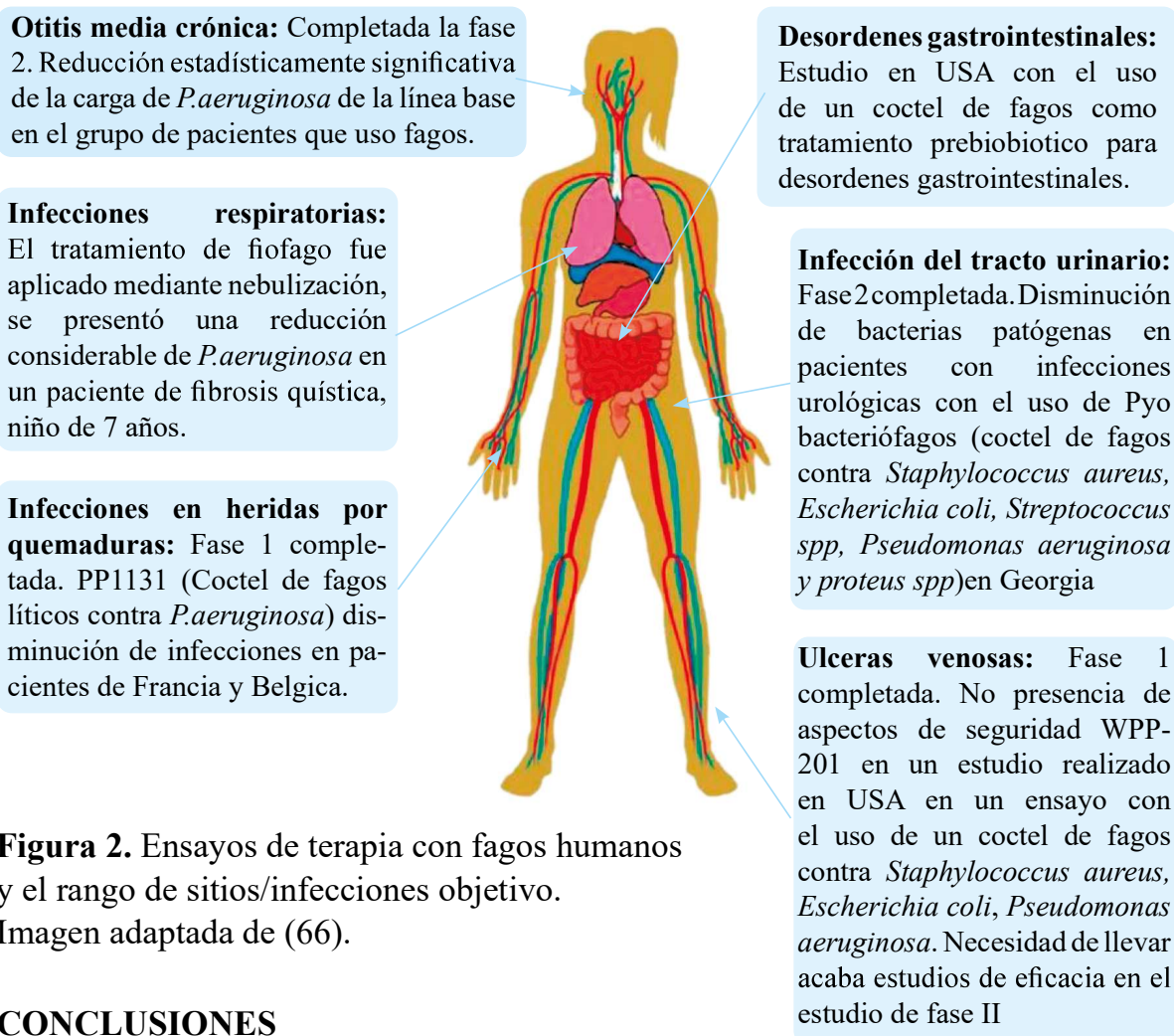


Figura 2. Ensayos de terapia con fagos humanos y el rango de sitios/infecciones objetivo. Imagen adaptada de (66).

CONCLUSIONES

Históricamente muchas de las limitaciones y fallas de la terapia de fagos se pueden atribuir a la falta de comprensión de la biología del fago, y que ahora parece ingenuo. Sin embargo, se centra en gran medida en la calidad de esta evidencia histórica y está claro que, durante el curso de los próximos años, una variedad de fagos producto de la terapia, se someterán a ensayos clínicos, y se podrán hacer evaluaciones rigurosas con respecto a su seguridad y eficacia que deberían de una vez por todas establecer si esta terapia tiene lugar como anti-infección estratégica

en medicina occidental. Mientras tanto, tener mayor expansión de la terapia con fagos como tratamiento experimental de acuerdo con las normas corrientes internacionales (informadas por consentimiento escrito de los pacientes), aprobación institucional, junta de revisión y el seguro político necesario, con un enfoque implementado en el Instituto Wroclaw en los últimos tres años, que podría considerarse en casos en que los antibióticos fallen.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Romero J, Miranda CD. Fagos y fagoterapia: una herramienta alternativa a los antibióticos contra SRS. 2018;(July).
2. Lin DM, Koskella B, Lin HC. Phage therapy: An alternative to antibiotics in the age of multi-drug resistance. *World J Gastrointest Pharmacol Ther.* 2017;8(3):162.
3. Reina J, Reina N. Palabras clave: Bacteriofagos; Fagoterapia. *Rev Esp Quim.* 2018;31(2):101–4.
4. Weinbauer MG. Ecology of prokaryotic viruses. *FEMS Microbiol Rev* [Internet]. 2004 May;28(2):127–81. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15109783>
5. Schmidt C. Phage therapy's latest makeover. Vol. 37, *Nature biotechnology*. NLM (Medline); 2019. p. 581–6.
6. Rakhuba D V, Kolomiets EI, Dey ES, Novik GI. Bacteriophage receptors, mechanisms of phage adsorption and penetration into host cell. *Polish J Microbiol* [Internet]. 2010;59(3):145–55. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21033576>
7. Motlagh AM, Bhattacharjee AS, Goel R. Biofilm control with natural and genetically-modified phages. *World J Microbiol Biotechnol.* 2016 Apr;32(4):67.
8. Labrie SJ, Samson JE, Moineau S. Bacteriophage resistance mechanisms. *Nat Rev Microbiol* [Internet]. 2010 May;8(5):317–27. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20348932>
9. Koskella B. Bacteria-phage interactions across time and space: merging local adaptation and time-shift experiments to understand phage evolution. *Am Nat* [Internet]. 2014 Aug;184 Suppl:S9-21. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25061680>
10. Minot S, Sinha R, Chen J, Li H, Keilbaugh SA, Wu GD, et al. The human gut virome: inter-individual variation and dynamic response to diet. *Genome Res* [Internet]. 2011 Oct;21(10):1616–25. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21880779>
11. Ohnishi M, Kurokawa K, Hayashi T. Diversification of *Escherichia coli* genomes: are bacteriophages the major contributors? *Trends Microbiol*

[Internet]. 2001 Oct;9(10):481–5. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11597449>

12. Hatfull GF, Hendrix RW. Bacteriophages and their genomes. *Curr Opin Virol* [Internet]. 2011 Oct;1(4):298–303. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22034588>
13. Penadés JR, Chen J, Quiles-Puchalt N, Carpena N, Novick RP. Bacteriophage-mediated spread of bacterial virulence genes. *Curr Opin Microbiol* [Internet]. 2015 Feb;23:171–8. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25528295>
14. Quirós P, Colomer-Lluch M, Martínez-Castillo A, Miró E, Argente M, Jofre J, et al. Antibiotic resistance genes in the bacteriophage DNA fraction of human fecal samples. *Antimicrob Agents Chemother* [Internet]. 2014;58(1):606–9. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24165177>
15. Colomer-Lluch M, Jofre J, Muniesa M. Antibiotic resistance genes in the bacteriophage DNA fraction of environmental samples. *PLoS One*. 2011 Mar;6(3):e17549.
16. Wang X, Wood TK. Cryptic prophages as targets for drug development. *Drug Resist Updat* [Internet]. 2016;27:30–8. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27449596>
17. Chanishvili N. Phage therapy--history from Twort and d'Herelle through Soviet experience to current approaches. *Adv Virus Res*. 2012;83:3–40.
18. Wittebole X, De Roock S, Opal SM. A historical overview of bacteriophage therapy as an alternative to antibiotics for the treatment of bacterial pathogens. *Virulence* [Internet]. 2014 Jan 1;5(1):226–35. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23973944>
19. Sulakvelidze A, Alavidze Z, Morris JG. Bacteriophage therapy. *Antimicrob Agents Chemother* [Internet]. 2001 Mar;45(3):649–59. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11181338>
20. Hodyra-Stefaniak K, Miernikiewicz P, Drapała J, Drab M, Jończyk-Matysiak E, Lecion D, et al. Mammalian Host-Versus-Phage immune response determines phage fate in vivo. *Sci Rep*. 2015 Oct;5:14802.

21. Weber-Dabrowska B, Mulczyk M, Górski A. Bacteriophage therapy of bacterial infections: an update of our institute's experience. *Arch Immunol Ther Exp (Warsz)* [Internet]. 2000;48(6):547–51. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11197610>
22. Watanabe R, Matsumoto T, Sano G, Ishii Y, Tateda K, Sumiyama Y, et al. Efficacy of bacteriophage therapy against gut-derived sepsis caused by *Pseudomonas aeruginosa* in mice. *Antimicrob Agents Chemother* [Internet]. 2007 Feb;51(2):446–52. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17116686>
23. Ramesh V, Fralick JA, Rolfe RD. Prevention of *Clostridium difficile* -induced ileocectitis with Bacteriophage. *Anaerobe* [Internet]. 1999 Apr;5(2):69–78. Available from: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1075996499901920>
24. 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* [Internet]. 2016;60(10):5806–16. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27431214>
25. Wang J, Hu B, Xu M, Yan Q, Liu S, Zhu X, et al. Therapeutic effectiveness of bacteriophages in the rescue of mice with extended spectrum beta-lactamase-producing *Escherichia coli* bacteremia. *Int J Mol Med* [Internet]. 2006 Feb;17(2):347–55. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16391836>
26. Soothill JS. Treatment of experimental infections of mice with bacteriophages. *J Med Microbiol* [Internet]. 1992 Oct;37(4):258–61. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/1404324>
27. Wills QF, Kerrigan C, Soothill JS. Experimental bacteriophage protection against *Staphylococcus aureus* abscesses in a rabbit model. *Antimicrob Agents Chemother* [Internet]. 2005 Mar;49(3):1220–1. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15728933>
28. Kutateladze M, Adamia R. Bacteriophages as potential new therapeutics to replace or supplement antibiotics. *Trends Biotechnol* [Internet]. 2010 Dec;28(12):591–5. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20810181>

29. Priyadarshani I, Rath B. Commercial and industrial applications of micro algae – A review. 2012;3(4):89–100.
30. Monk AB, Rees CD, Barrow P, Hagens S, Harper DR. Bacteriophage applications: where are we now? *Lett Appl Microbiol* [Internet]. 2010 Oct;51(4):363–9. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20796209>
31. Nannapaneni R, Soni KA. Use of Bacteriophages to Remove Biofilms of *Listeria monocytogenes* and other Foodborne Bacterial Pathogens in the Food Environment. In: *Biofilms in the Food Environment* [Internet]. Chichester, UK: John Wiley & Sons, Ltd; 2015. p. 131–44. Available from: <http://doi.wiley.com/10.1002/9781118864036.ch5>
32. Bruttin A, Brüssow H. Human volunteers receiving *Escherichia coli* phage T4 orally: a safety test of phage therapy. *Antimicrob Agents Chemother*. 2005 Jul;49(7):2874–8.
33. Merabishvili M, Pirnay J-P, Verbeken G, Chanishvili N, Tediashvili M, Lashkhi N, et al. Quality-controlled small-scale production of a well-defined bacteriophage cocktail for use in human clinical trials. *PLoS One*. 2009;4(3):e4944.
34. McCallin S, Alam Sarker S, Barretto C, Sultana S, Berger B, Huq S, et al. Safety analysis of a Russian phage cocktail: from metagenomic analysis to oral application in healthy human subjects. *Virology*. 2013 Sep;443(2):187–96.
35. Sarker SA, Sultana S, Reuteler G, Moine D, Descombes P, Charton F, et al. Oral Phage Therapy of Acute Bacterial Diarrhea With Two Coliphage Preparations: A Randomized Trial in Children From Bangladesh. *EBioMedicine* [Internet]. 2016 Feb;4:124–37. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26981577>
36. Wright A, Hawkins CH, Anggård EE, Harper DR. A controlled clinical trial of a therapeutic bacteriophage preparation in chronic otitis due to antibiotic-resistant *Pseudomonas aeruginosa*; a preliminary report of efficacy. *Clin Otolaryngol* [Internet]. 2009 Aug;34(4):349–57. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19673983>
37. Abedon ST. Ecology of Anti-Biofilm Agents I: Antibiotics versus Bacteriophages. *Pharmaceuticals* (Basel). 2015 Sep;8(3):525–58.

38. Rouveix B. Antibiotic safety assessment. *Int J Antimicrob Agents* [Internet]. 2003 Mar;21(3):215–21. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12636981>
39. Shehab N, Patel PR, Srinivasan A, Budnitz DS. Emergency department visits for antibiotic-associated adverse events. *Clin Infect Dis* [Internet]. 2008 Sep 15;47(6):735–43. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18694344>
40. Bourdin G, Navarro A, Sarker SA, Pittet A-C, Qadri F, Sultana S, et al. Coverage of diarrhoea-associated *Escherichia coli* isolates from different origins with two types of phage cocktails. *Microb Biotechnol*. 2014 Mar;7(2):165–76.
41. Górski A, Wazna E, Dabrowska B-W, Dabrowska K, Swiata-Jeleń K, Miedzybrodzki R. Bacteriophage translocation. *FEMS Immunol Med Microbiol*. 2006 Apr;46(3):313–9.
42. Jun JW, Shin TH, Kim JH, Shin SP, Han JE, Heo GJ, et al. Bacteriophage therapy of a *Vibrio parahaemolyticus* infection caused by a multiple-antibiotic-resistant O3:K6 pandemic clinical strain. *J Infect Dis*. 2014 Jul;210(1):72–8.
43. Borysowski J, Górski A. Is phage therapy acceptable in the immunocompromised host? *Int J Infect Dis*. 2008 Sep;12(5):466–71.
44. Tetz G, Tetz V. Bacteriophage infections of microbiota can lead to leaky gut in an experimental rodent model. *Gut Pathog* [Internet]. 2016;8:33. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27340433>
45. Pincus NB, Reckhow JD, Saleem D, Jammeh ML, Datta SK, Myles IA. Strain Specific Phage Treatment for *Staphylococcus aureus* Infection Is Influenced by Host Immunity and Site of Infection. *PLoS One* [Internet]. 2015;10(4):e0124280. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25909449>
46. Mikkelsen KH, Allin KH, Knop FK. Effect of antibiotics on gut microbiota, glucose metabolism and body weight regulation: a review of the literature. *Diabetes Obes Metab* [Internet]. 2016 May;18(5):444–53. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26818734>

47. Galtier M, De Sordi L, Maura D, Arachchi H, Volant S, Dillies M-A, et al. Bacteriophages to reduce gut carriage of antibiotic resistant uropathogens with low impact on microbiota composition. *Environ Microbiol*. 2016;18(7):2237–45.
48. Koskella B, Brockhurst MA. Bacteria-phage coevolution as a driver of ecological and evolutionary processes in microbial communities. *FEMS Microbiol Rev*. 2014 Sep;38(5):916–31.
49. Costerton JW. Introduction to biofilm. *Int J Antimicrob Agents*. 1999 May;11(3–4):217–21; discussion 237–9.
50. Hughes KA, Sutherland IW, Jones M V. Biofilm susceptibility to bacteriophage attack: the role of phage-borne polysaccharide depolymerase. *Microbiology*. 1998 Nov;144 (Pt 1):3039–47.
51. Anwar H, Strap JL, Chen K, Costerton JW. Dynamic interactions of biofilms of mucoid *Pseudomonas aeruginosa* with tobramycin and piperacillin. *Antimicrob Agents Chemother*. 1992 Jun;36(6):1208–14.
52. Amorena B, Gracia E, Monzón M, Leiva J, Oteiza C, Pérez M, et al. Antibiotic susceptibility assay for *Staphylococcus aureus* in biofilms developed in vitro. *J Antimicrob Chemother*. 1999 Jul;44(1):43–55.
53. Hyman P, Abedon ST. Practical methods for determining phage growth parameters. *Methods Mol Biol* [Internet]. 2009;501:175–202. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19066822>
54. Gabisoniya TG, Loladze MZ, Nadiradze MM, Chakhunashvili NK, Alibegashvili MG, Tamarashvili NG, et al. Effects of bacteriophages on biofilm formation by strains of *Pseudomonas aeruginosa*. *Appl Biochem Microbiol*. 2016 May;52(3):293–7.
55. Laxminarayan R, Duse A, Wattal C, Zaidi AKM, Wertheim HFL, Sumpradit N, et al. Antibiotic resistance-the need for global solutions. *Lancet Infect Dis*. 2013 Dec;13(12):1057–98.
56. Minot S, Sinha R, Chen J, Li H, Keilbaugh SA, Wu GD, et al. The human gut virome: inter-individual variation and dynamic response to diet. *Genome Res*. 2011 Oct;21(10):1616–25.

57. Saini RK, Harish Prashanth K V., Shetty NP, Giridhar P. Elicitors, SA and MJ enhance carotenoids and tocopherol biosynthesis and expression of antioxidant related genes in *Moringa oleifera* Lam. leaves. *Acta Physiol Plant*. 2014 Oct;36(10):2695–704.
58. Gordillo Altamirano FL, Barr JJ. Phage therapy in the postantibiotic era. *Clin Microbiol Rev*. 2019;32(2):1–25.
59. Lakhani CM. HHS Public Access. *Physiol Behav*. 2019;176(3):139–48.
60. Kamal F, Dennis JJ. Burkholderia cepacia complex phage-antibiotic synergy (PAS): Antibiotics stimulate lytic phage activity. *Appl Environ Microbiol*. 2015;81(3):1132–8.
61. Verma V, Harjai K, Chhibber S. Characterization of a T7-Like Lytic Bacteriophage of *Klebsiella pneumoniae* B5055: A Potential Therapeutic Agent. *Curr Microbiol* [Internet]. 2009 Sep 30;59(3):274–81. Available from: <http://link.springer.com/10.1007/s00284-009-9430-y>
62. Housby JN, Mann NH. Phage therapy. *Drug Discov Today*. 2009;14(11–12):536–40.
63. Nikolich MP, Filippov AA. Bacteriophage therapy: Developments and directions. *Antibiotics*. 2020;9(3).
64. Jault P, Leclerc T, Jennes S, Pirnay JP, Que Y-A, Resch G, et al. Efficacy and tolerability of a cocktail of bacteriophages to treat burn wounds infected by *Pseudomonas aeruginosa* (PhagoBurn): a randomised, controlled, double-blind phase 1/2 trial. *Lancet Infect Dis* [Internet]. 2019 Jan;19(1):35–45. Available from: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1473309918304821>
65. Chang RYK, Wallin M, Lin Y, Leung SSY, Wang H, Morales S, et al. Phage therapy for respiratory infections. *Adv Drug Deliv Rev* [Internet]. 2018 Aug;133:76–86. Available from: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0169409X18301960>
66. Romero-Calle D, Guimarães Benevides R, Góes-Neto A, Billington C. Bacteriophages as Alternatives to Antibiotics in Clinical Care. *Antibiotics*. 2019 Sep;8(3):138.