

## FAGOTERAPIA ¿UN TRATAMIENTO ALTERNATIVO A LOS ANTIBIÓTICOS USADOS EN ACUICULTURA?

por JUAN JOSÉ BORREGO Y JAIME IGNACIO LANZAS

DEPARTAMENTO DE MICROBIOLOGÍA, FACULTAD DE CIENCIAS, CAMPUS DE TEATINOS, UNIVERSIDAD DE MÁLAGA

JJBORREGO@UMA.ES Y JAIME.IG.LD@GMAIL.COM

**Resumen:** Como dice un antiguo proverbio árabe: «El enemigo de mi enemigo es mi amigo». Lo virus bacterianos líticos que afectan a las bacterias patógenas pueden ser potentes agentes antibacterianos y, por tanto, nuestros aliados en el ámbito terapéutico. Estos virus fueron descubiertos en 1915 por el británico Frederick Twort, y dos años después, en 1917, de forma independiente por Felix d'Hérelle. Este último observó zonas claras perfectamente redondas en cultivos bacterianos procedentes de heces de pacientes convalecientes de disentería bacteriana. Así pues, supuso que estas zonas claras (halos de lisis) eran causadas por un «microbio invisible» capaz de matar bacterias, al que denominó «bacteriófago» (comedor de bacterias). En este artículo se hace una breve revisión histórica del uso de los bacteriófagos en el control de infecciones bacterianas, así como sus recientes aplicaciones como agentes terapéuticos, en particular en el campo de la acuicultura, para disminuir el problema de la elevada presencia de cepas bacterianas multirresistentes a antibióticos causantes de altas mortalidades en este sector.

**Abstract:** *As an old Arabic proverb says: «The enemy of my enemy is my friend». Lytic bacterial viruses that affect pathogenic bacteria can be powerful antibacterial agents and, therefore, our allies in the therapeutic field. These viruses were discovered in 1915 by the British Frederick Twort, and two years later, in 1917, independently by Felix d'Hérelle. The latter observed round clear areas in the bacterial culture from stool samples collected from convalescent patients with bacterial dysentery. Thus, he assumed that these clear areas (lysis halos) were caused by an «invisible microbe» able to lyse bacterial cells, which he named as «bacteriophage» (bacterial killer or eater). In this article, a brief historical review of the use of bacteriophages in the control of bacterial infections is carried out, as well as their recent applications as therapeutic agents, specifically in the aquaculture field, to avoid the important trouble of the antibiotic multiresistant bacteria that provoke high mortalities in this sector.*

**Palabras clave:** Bacteriófagos, Fagoterapia, Resistencia a antibióticos, Acuicultura **Key Words:** *Bacteriophages, Phage therapy, Antibiotic resistance, Aquaculture*

En 2017 se cumplió el centenario de la publicación del microbiólogo francés naturalizado canadiense Hubert Haerens, más conocido como Felix d'Herellé en la que se acuñó el término «bacteriófago» para describir a virus que lisaban las bacterias productoras de la disentería bacteriana<sup>[1]</sup>. Aunque estos virus fueron descritos previamente por Ernest Hankin (1896), Nikolay Gamaleya (1898), y Frederik Twort (1915), su aplicación como agentes terapéuticos, es decir agentes biológicos utilizados para combatir infecciones bacterianas, se debe a d'Herellé. Estas aplicaciones terapéuticas fueron continuadas por los ensayos de Richard Brybogne y Joseph Maisinen en 1922, quienes usaron bacteriófagos para el control de infecciones de *Staphylococcus*.

En las décadas siguientes, aunque se profundizó en la biología de los bacteriófagos, los estudios sobre la terapia fágica ni tuvieron continuidad ni interés por la comunidad científica. Hay que recordar que en 1928 se descubrió la penicilina por Sir Alexander

Fleming, y este hecho marcó el inicio de las terapias de las infecciones bacterianas por medio de los antimicrobianos (quimioterapia) en el mundo occidental, llegando hasta nuestros días como el método de elección en la clínica humana. Sin embargo, la fagoterapia no se abandonó, sino que se continuó en la Unión Soviética estalinista, donde gracias a centros de producción repartidos por todo el país, creados por Georges Eliava, se suministraban a los soldados del Ejército Rojo en la II Guerra Mundial, frascos de fagos que llevaban en sus cinturones, y que se utilizaban para la terapia de la disentería o como agentes profilácticos de las infecciones de heridas producidas en los combates. El por qué la fagoterapia se abandonó en los países occidentales, pero continuó en los del Este se debe a diferentes razones, unas económicas debida al auge de empresas farmacéuticas, y otras debida a que los trabajos sobre fagoterapia de la URSS se publicaban en ruso, sin difusión a Occidente, y en el caso de EE UU, los microbiólogos promotores

de la fagoterapia podían levantar sospechas sobre su simpatía al régimen estalinista.

Sin embargo, los bacteriófagos (o fagos) no cayeron en el olvido de los investigadores, ya que fueron claves para el desarrollo de la genética microbiana y la biología molecular entre los años 1940 y 1980, iniciando con los experimentos de George Guthrie y Robert Sinsheimer (transfección), Norton Zinder y Joshua Lederberg (transducción) y los de Max Delbrück y Salvador Luria, quienes demostraron, gracias a los fagos, que las mutaciones bacterianas se producían al azar (pre-adaptativas), así como para el desarrollo de la biotecnología del ADN recombinante, basadas en la clonación y secuenciación del ADN que surgieron gradualmente a partir de los años 70. En la actualidad, el estudio de los bacteriófagos sigue siendo fuente de descubrimientos, como ilustra el descubrimiento de los genes *CRISPR-cas* en los genomas bacterianos que promueven mecanismos de resistencia a infecciones por bacteriófagos<sup>[2]</sup>. Los bacteriófagos también han aportado una serie de herramientas moleculares como enzimas fágicas, incluyendo ligasas, nucleasas, endolisinas y polimerasas<sup>[3]</sup>.

En los últimos años, el problema del aumento de la resistencia bacteriana a los antibióticos, ha provocado la aparición de bacterias multirresistentes denominadas *superbugs*, lo que constituye una de las mayores amenazas sanitarias del siglo XXI. Estas *superbugs* muestran resistencias a prácticamente todos los antimicrobianos conocidos en la actualidad, poniendo en jaque a la industria farmacéutica que es incapaz de renovar y generar nuevos antibióticos y antimicrobianos capaces de combatir las infecciones nosocomiales producidas por estas bacterias patógenas. Desde los años 80 del siglo XX, el mundo occidental ha vuelto a pensar en la fagoterapia, primero en Estados Unidos con los trabajos de William Smith y Michael Huggins, y luego en la Unión Europea a través del proyecto *Phagoburn*, en el que participaban centros de investigación y PYMES de Francia, Bélgica y Suiza. En este

proyecto se evaluaba el uso de la fagoterapia para combatir infecciones bacterianas cutáneas debidas a quemaduras. Como continuación de este estudio, la empresa francesa PherecydesPharma ha liderado un nuevo proyecto denominado *PhagoProd* para la producción industrial de esta terapia. En España se ha creado la red FAGOMA formada por investigadores y empresas encaminada a poner en común los resultados del uso de los bacteriófagos en infecciones causadas por bacterias multirresistentes. De hecho, la fagoterapia es una de las siete estrategias que ha establecido el *National Institute of Allergy and Infectious Diseases* de Estados Unidos para solucionar el problema de la resistencia a antimicrobianos.

En 2017, para celebrar el 1º centenario de la publicación de d'Herellé, se organizaron dos conferencias en el Instituto Pasteur de París y en el Instituto Eliava de Tbilisi (Georgia), en los que se establecieron las siguientes líneas de investigación de los virus microbianos en el siglo XXI: 1) el estudio de la abundancia de los bacteriófagos en el medioambiente y su impacto en la ecología global, desde el océano al intestino humano; y 2) el reconocimiento de los bacteriófagos como potenciales agentes terapéuticos para el tratamiento de infecciones causadas por bacterias patógenas resistentes a los antibióticos. Asimismo, se planteó el papel de los bacteriófagos en el desarrollo de las tecnologías de edición del genoma basadas en *CRISPR-cas*, así como el descubrimiento de nuevas familias de virus microbianos, incluyendo los *crAssphages* y la familia *Autolykiviridae*.

Un aspecto muy interesante del uso de la fagoterapia es su aplicación en el control de enfermedades bacterianas en la acuicultura<sup>[4]</sup>. Los fagos se usan tanto de forma aislada como en cócteles inyectando a los animales o suplementando los piensos<sup>[5]</sup>, mejorando así la sanidad de los animales cultivados, como la salubridad alimentaria de éstos hacia el consumidor (Fig. 1).



Figura 1. Vías de administración de fagos en Acuicultura [5].

Estas aplicaciones se han centrado en un número limitado de especies acuícolas y en la determinación de protocolos útiles para la prevención y el tratamiento de las enfermedades causadas por los siguientes patógenos bacterianos: *Streptococcus agalactiae*, *Edwardsiella tarda* y *E. ictaluri*, *Aeromonas hydrophila* y *A. salmonicida*, *Tenacibaculum maritimum*, *Pseudomonas plecoglossicida*, *Flavobacterium columnare* y *F. psychrophilum*, *Lactococcus garviae*, y *Vibrio anguillarum* y *V. splendidus*, todos ellos provocan grandes mortalidades en los cultivos de salmónidos, tilapia, ayu, seriola, pez zebra, lengua-

dos, pez gato, anguila, por citar los más representativos [6,7,8,9,10,11,12,13,14,15,16,17,18]. Pero el uso de la fagoterapia también se ha extendido a otras prácticas de la acuicultura, como el cultivo de crustáceos [19,20,21,22,23,24]; control de patógenos de moluscos [14,25?]; o como agentes depuradores de las aguas de cultivo [28,29], lo que conllevaría una mayor salubridad del producto y seguridad alimentaria de los consumidores.

En la Fig. 2 se expone un cronograma de los principales hitos de la fagoterapia aplicada a la Acuicultura.

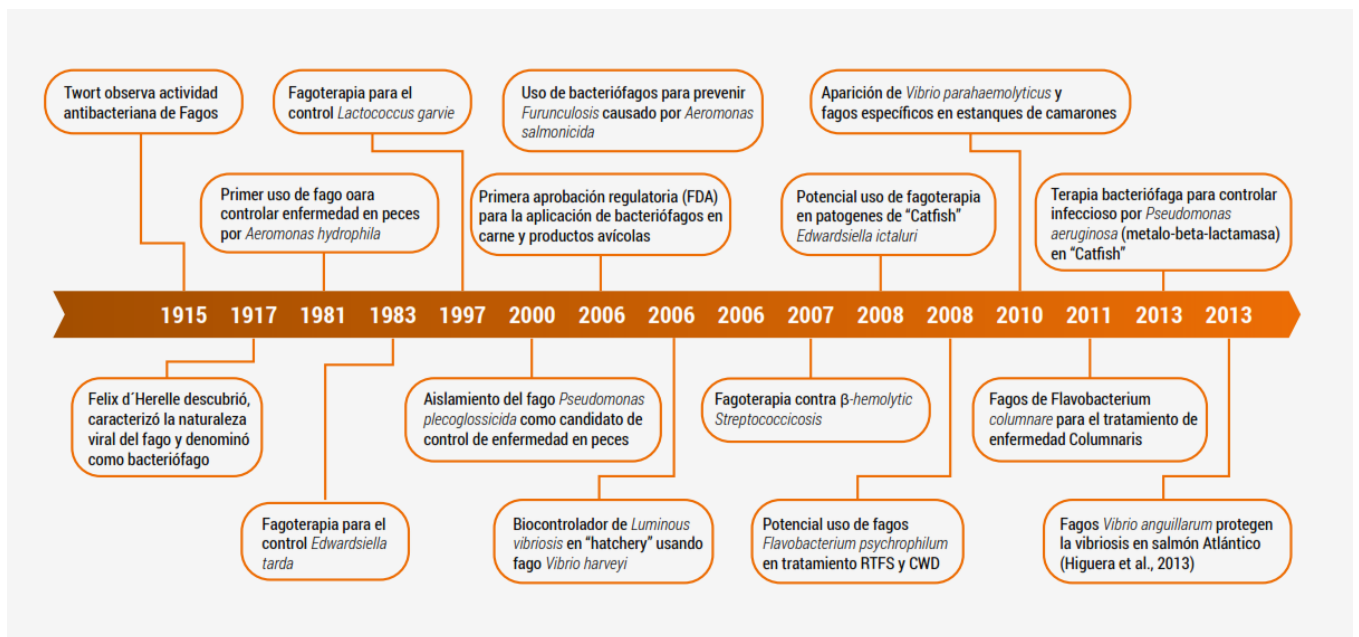


Figura 2. Principales hitos de fagoterapia en Acuicultura [4].

El uso de los fagos como terapia plantea una serie de interrogantes, relacionados con la bioseguridad, biotecnología y percepción de estos agentes, que con el tiempo deben ser resueltos. Hasta ahora, la investigación con fagos se ha llevado a cabo principalmente con virus aislados del entorno natural del que proceden las especies acuícolas objeto del estudio. No obstante, en un futuro, se podría plantear el uso de biotecnología para ampliar el potencial de éstos tanto en medicina como el sector agroalimentario. Sin embargo, las terapias con virus modificados a través de ingeniería genética, aún necesitan un largo recorrido y, en el caso de la acuicultura, de la aceptación de los consumidores hacia un alimento que ha sido tratado con estas terapias durante la fase de cultivo. La utilización de enzimas fágicas (enzimbióticos) sobre los patógenos podrían paliar este rechazo<sup>[30,31]</sup>.

De acuerdo con Sierio y otros<sup>[32]</sup>, la fagoterapia tiene una serie de ventajas sobre otros métodos de control de los patógenos bacterianos como por ejemplo:

1. Su especificidad por el hospedador: los bacteriófagos pueden infectar solo a una especie o cepa particular bacteriana.
2. No afectan a células eucarióticas: por lo que no tienen efectos nocivos ni tóxicos para el hombre.
3. Se replican autónomamente: por lo que se necesita menos dosis y mejora tanto el tratamiento como su producción con agentes terapéuticos.
4. Son muy efectivas sobre bacterias multirresistentes.
5. Son efectivos incluso en bacterias patógenas productoras de biopelículas, que impiden el acceso de los quimioterapéuticos a las bacterias dianas.
6. Los bacteriófagos tienen los mismos receptores de las células eucarióticas que utilizan los patógenos en el proceso infectivo, lo que conlleva un proceso de competencia por el receptor.
7. Los bacteriófagos son respetuosos con el medio ambiente.

Como conclusión se puede decir que, en un futuro no muy lejano, los fagos, o sus enzimas, podrían utilizarse en tratamiento complementarios o sustitutivos de los antibióticos, permitiendo de esta manera reducir el uso de éstos, lo que contribuiría a ralentizar la aparición de nuevas resistencias en las bacterias patógenas. No obstante, para garantizar su eficacia, su seguridad y su uso legal en diferentes aplicaciones se debe:

- Desarrollar una legislación específica e implementar regulaciones para su uso.
- Promover un coste competitivo para su producción a gran escala.
- Mejorar sus formulaciones para cada aplicación concreta para obtener preparaciones o cocteles de bacteriófagos estables y de alta pureza.
- Aumentar el aislamiento de bacteriófagos contra patógenos bacterianos emergentes.
- Optimizar y estandarizar los métodos de administración de bacteriófagos (dosis, tiempo, ruta de administración, etc.) para garantizar la efectividad de la fagoterapia.
- Determinar la eficacia de cócteles de diferentes bacteriófagos líticos que reconozcan distintos receptores bacterianos.
- Aplicar combinaciones de diferentes aproximaciones terapéuticas: fagos, endolisinas y antimicrobianos.

## Referencias

- [1] d'Hérelle, F. Sur un microbe invisible antagoniste des bacilles dysentériques. *Compt. Rend. Acad. Sci.* 165: 373-375, 1917.
- [2] Barrangou, R. y otros. CRISPR provides acquired resistance against viruses in prokaryotes. *Science*, 315: 1709-1712, 2007.
- [3] Drulis-Kawa, Z. y otros. Bacteriophages and phage-derived proteins -Application approaches. *Curr. Med. Chem.* 22: 1757-1773, 2015.
- [4] Choudhury, T. y otros. Advances in bacteriophage research for bacterial disease control in Aquaculture. *Rev. Fish. Sci. Aquac.* 25: 113-125, 2018.
- [5] Romero, J. y otros. Fagos y fagoterapia: una herramienta alternativa a los antibióticos contra SRS. *Salmon Expert* 62: 60-65, 2018.
- [6] Nakai, T. y otros. Protective effects of bacteriophage on experimental *Lactococcus garvieae* infection in yellowtail. *Dis. Aquat. Org.* 37: 33-41, 1999.
- [7] Park, S.C. y otros. Isolation of bacteriophages specific to a fish pathogen, *Pseudomonas plecoglossicida*, as a candidate for disease control. *Appl. Environ. Microbiol.* 66: 1416-1422, 2000.
- [8] Stenholm, A.R. y otros. Isolation and characterization of bacteriophages infecting the fish pathogen *Flavobacterium psychrophilum*. *Appl. Environ. Microbiol.* 74:4070-4078, 2008.
- [9] Kim, J.H. y otros. Isolation and identification of bacteriophages infecting Ayu *Plecoglossus altivelis altivelis* specific *Flavobacterium psychrophilum*. *Vet. Microbiol.* 140: 109-115, 2010.
- [10] Carrias, A. y otros. Comparative genomic analysis of bacteriophages specific to the channel catfish pathogen *Edwardsiella ictaluri*. *Virology* 538: 1-12, 2011.

- [11] Prasad, Y. y otros. Lytic bacteriophages specific to *Flavobacterium columnare* rescue catfish, *Clarias batrachus* (Linn.) from columnaris disease. *J. Environ. Biol.* 32: 161-168, 2011.
- [12] Kim, J. y otros. Isolation and characterization of a lytic *Myoviridae* bacteriophage PAS-1 with broad infectivity in *Aeromonas salmonicida*. *Curr. Microbiol.* 64: 418-426, 2012.
- [13] Higuera, G. y otros. Recently discovered *Vibrio anguillarum* phages can protect against experimentally induced vibriosis in Atlantic salmon, *Salmo salar*. *Aquaculture* 395: 128-133, 2013.
- [14] Katharios, P. y otros. Isolation and characterization of a N4-like lytic bacteriophage infecting *Vibrio splendidus*, a pathogen of fish and bivalves. *PLoS ONE* 12: e0190083, 2017.
- [15] Luo, X. y otros. Characterization of bacteriophage HN 48 and its protective effects in Nile tilapia *Oreochromis niloticus* against *Streptococcus agalactiae* infections. *J. Fish Dis.* 41: 1477-1484, 2018.
- [16] Nikapitiya, C. y otros. Isolation and characterization of phage (ETP-1) specific to multidrug resistant pathogenic *Edwardsiella tarda* and its in vivo biocontrol efficacy in zebrafish (*Danio rerio*). *Biologicals* 63: 14-23, 2020.
- [17] Akmal, M. y otros. Isolation, characterization, and application of a bacteriophage infecting the fish pathogen *Aeromonas hydrophila*. *Pathogens* 9: 215, 2020.
- [18] Kawato, Y. y otros. A novel Jumbo *Tenacibaculum maritimum* lytic phage with head-fiber-like appendages. *Arch. Virol.* 165: 303-311, 2020.
- [19] Karunasagar, I. y otros. Biocontrol of pathogens in shrimp hatcheries using bacteriophages. *Aquaculture* 268: 288-292, 2007.
- [20] Shivu, M.M. y otros. Molecular characterization of *Vibrio harveyi* bacteriophages isolated from aquaculture environments along the coast of India. *Environ. Microbiol.* 9: 322-331, 2007.
- [21] Crothers-Stomps, C. y otros. Isolation of lytic bacteriophage against *Vibrio harveyi*. *J. Appl. Microbiol.* 108: 1744-1750, 2010.
- [22] Quiroz-Guzmán, E. y otros. Bacteriophage cocktails as an environmentally-friendly approach to prevent *Vibrio parahaemolyticus* and *Vibrio harveyi* infections in brine shrimp (*Artemia franciscana*). *Aquaculture* 492: 273-279, 2018.
- [23] Chen, L. y otros. Isolation and characterization of specific phages to prepare a cocktail preventing *Vibrio* sp. Va-F3 infections in shrimp (*Litopenaeus vannamei*). *Front. Microbiol.* 10: 2337, 2019.
- [24] Matamp, N. y Bhat, S.G. Genome characterization of novel lytic *Myoviridae* bacteriophage  $\phi$ VP-1 enhances its applicability against MDR-biofilm-forming *Vibrio parahaemolyticus*. *Arch. Virol.* 165: 387-396, 2020.
- [25] Jun, J.W. y otros. Eating oysters without risk of vibriosis: Application of a bacteriophage against *Vibrio parahaemolyticus* in oysters. *Int. J. Food Microbiol.* 188: 31-35, 2014.
- [26] Wang, Y. y otros. Bacteriophage therapy for the control of *Vibrio harveyi* in greenlip abalone (*Haliotis laevis*). *Aquaculture* 473: 251-258, 2017.
- [27] Kim, H.J. y otros. Application of the bacteriophage pVco-14 to prevent *Vibrio coralliilyticus* infection in Pacific oyster (*Crassostrea gigas*) larvae. *J. Invert. Pathol.* 167: 107244, 2019.
- [28] Le, T.S. y otros. Protective effects of bacteriophages against *Aeromonas hydrophila* causing Motile *Aeromonas* Septicemia (MAS) in striped catfish. *Antibiotics* 7: 16, 2018.
- [29] Maganha de Almeida Kumlien, A.C. y otros. Antimicrobial resistance and bacteriophages: An overlooked intersection in water disinfection. *Trends Microbiol.* 29: 517-527, 2021.
- [30] Carvalho, C. y otros. Bacteriophages and their derivatives for the treatment and control of food-producing animal infections. *Crit. Rev. Microbiol.* 43: 583-601, 2017.
- [31] Dy, R.L. y otros. Phage-based biocontrol strategies and their application in agriculture and aquaculture. *Biochem. Soc. Trans.* 46: 1605-1613, 2018.
- [32] Sieiro, C. y otros. A hundred years of bacteriophages: Can phages replace antibiotics in Agriculture and Aquaculture? *Antibiotics* 9: 493, 2020.