



Facultat de Ciències

Memòria del Treball Final de Grau

Títol del treball:

**Teràpia fàgica com alternativa als antibiòtics: passat,
present i futur**

Estudiant: Samira Arrahaoui Douiri

Grau: Biotecnologia

Correu electrònic: saamiraa.96@gmail.com

Tutor: Carles Borrego Moré

Empresa / Institució: Universitat de Girona

Vistiplau tutor:

Nom del tutor: Carles Borrego Moré

Empresa / Institució: Universitat de Girona

Correu electrònic: carles.borrego@udg.cat

Data de dipòsit de la memòria a secretaria de coordinació: 24 de Maig de 2018

“The enemy of my enemy is my friend”

Antic proverbi indi

AGRAÏMENTS

Realitzar el treball de fi de grau ha suposat un període d'aprenentatge intens, no només en el camp científic, però també a nivell personal. Escriure aquest treball ha tingut un gran impacte en mi i és per això que m'agradaria agrair a totes aquelles persones que m'han ajudat i recolzat durant aquest procés.

Primer de tot, agrair el meu tutor, el Dr. Carles Borrego, ja que ha estat en tot moment llegint i rellegint el meu treball, ensenyant-me i guiant-me en aquest camí. Gràcies per la paciència, la dedicació i el temps.

Agrair a la meva família i amics, per aguantar-me en els meus moments d'estrès i donar-me suport quan més ho necessitava, especialment la meva germana, Ikram, per fer-me veure que tot és possible, i la meva amiga, Mireia Obiols, per estar amb mi, escoltar-me i animar-me sempre.

ÍNDEX

1. RESUM	1
1.1. RESUMEN	2
1.2. SUMMARY	3
2. INTRODUCCIÓ	4
2.1. FONAMENTS DE LA BIOLOGIA DELS FAGS.....	4
2.2. HISTÒRIA DE LA TERÀPIA FÀGICA	6
2.3. REAPARICIÓ DE LA TERÀPIA FÀGICA EN EL CONTEXT ACTUAL	8
3. OBJECTIVES	10
4. METODOLOGIA	11
4.1. CERCA BIBLIOGRÀFICA I ANÀLISI DE LES DADES	11
4.2. ÈTICA I SOSTENIBILITAT	12
5. RESULTATS I DISCUSSIÓ	13
5.1. DINÀMICA TEMPORAL DELS ESTUDIS DE TERÀPIA FÀGICA.....	13
5.2. DISTRIBUCIÓ GEOGRÀFICA DELS ESTUDIS EN TERÀPIA FÀGICA.....	16
5.3. ÀREES D'ESTUDI IMPLICADES EN LA TERÀPIA FÀGICA.....	17
5.4. ESTUDIS PRECLÍNICS EN ANIMALS: FAGS CONTRA PATÒGENS DE GRAN RELLEVÀNCIA CLÍNICA	18
5.5. TRACTAMENT D'INFECCIONS BACTERIANES EN HUMANS	22
5.6. DESENVOLUPAMENT I APLICACIÓ DE PROTEÏNES LÍTIQUES DERIVADES DE FAGS	25
6. CONCLUSIONS	28
7. BIBLIOGRAFIA.....	29

1. RESUM

La resistència als antibiòtics està portant a una situació de crisi global ja que molts patògens bacterians han esdevingut multiresistents a aquests fàrmacs i queden pocs antibiòtics als que recórrer. Actualment se estan desenvolupant algunes teràpies que no utilitzen antibiòtics com alternativa viable per tractar malalties infeccioses. Una d'aquestes és l'ús terapèutic de bacteriòfags específics contra patògens bacterians, un mètode conegut com a “teràpia fàgica”.

Els bacteriòfags (o fags) són virus que infecten bacteris i són considerats les entitats més abundants al planeta. Els fags tenen un paper important en els ecosistemes i contribueixen significativament a l'evolució dels seus hostes. Els primers estudis sobre teràpia fàgica es van portar a terme a principis del segle XIX, però en les últimes dècades han augmentat considerablement.

La teràpia fàgica s'ha redescobert recentment després de quedar oblidada en els darrers cinquanta anys degut a l'èxit dels antibiòtics en medicina humana. Abans de la introducció d'aquests fàrmacs, a l'any 1943, els fags ja s'havien utilitzat per tractar infeccions causades per patògens bacterians a l'antiga Unió Soviètica i Europa de l'Est. Els resultats d'aquests primers estudis es van publicar en revistes no anglosaxones (Rússia i Polònia) i no van tenir gaire ressò en la comunitat científica internacional. No obstant, el context actual on l'aparició de patògens multiresistents va en augment, especialment soques d'*Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus* i *Pseudomonas aeruginosa*, ha fet que es revifí l'interès en els estudis sobre teràpia fàgica. Els resultats d'investigacions realitzades recentment són prometedors i han permès a la comunitat científica tenir l'esperança de trobar una teràpia que es pugui aplicar a gran escala. Aquests beneficis s'han aconseguit gràcies al major coneixement de la biologia dels fags, la tecnologia avançada que ha permès millorar la purificació d'aquest tipus de virus, i la seva innocuïtat davant hostes animals i humans.

1.1. RESUMEN

La resistencia a los antibióticos está llevando a una situación de crisis global ya que muchos patógenos bacterianos se han vuelto multiresistentes a muchos de estos fármacos y quedan pocos antibióticos a los que recurrir. Actualmente, se están desarrollando algunas terapias que no utilizan antibióticos como alternativa viable para tratar enfermedades infecciosas. Una de estas es el uso terapéutico de bacteriófagos específicos contra patógenos bacterianos, un método conocido como "terapia fágica".

Los bacteriófagos (o fagos) son virus que infectan bacterias y son considerados las entidades más abundantes en el planeta. Los fagos tienen un papel importante en los ecosistemas y contribuyen significativamente a la evolución de sus huéspedes. Los primeros estudios sobre terapia fágica se llevaron a cabo a principios del siglo XIX, pero en las últimas décadas han aumentado considerablemente.

La terapia fágica se ha redescubierto recientemente tras quedar olvidada en los últimos cincuenta años debido al éxito de los antibióticos en medicina humana. Antes de la introducción de estos fármacos, en el año 1943, los fagos ya se habían utilizado para tratar infecciones causadas por patógenos bacterianos en la antigua Unión Soviética y Europa del Este. Los resultados de estos primeros estudios se publicaron en revistas no anglosajonas (Rusia y Polonia) y no tuvieron mucho eco en la comunidad científica internacional. Sin embargo, en el contexto actual donde la aparición de patógenos multiresistentes va en aumento, especialmente cepas de *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus* y *Pseudomonas aeruginosa*, ha hecho que se reavive el interés en los estudios sobre terapia fágica, donde los resultados de investigaciones realizadas recientemente son prometedores. Esto ha permitido que la comunidad científica tenga la esperanza de encontrar una terapia que se pueda aplicar a gran escala. Estos beneficios se han conseguido gracias al mayor conocimiento de la biología de los fagos, la tecnología avanzada que ha permitido mejorar la purificación de este tipo de virus, y su inocuidad frente a animales y humanos.

1.2. SUMMARY

Antibiotic resistance is a global health concern due to the increase in the number of multidrug resistant pathogens and the few available therapeutic alternatives to combat them. Non-antibiotic therapies are receiving attention as a viable alternative to treat infections caused by resistant pathogens. One of them is the therapeutic use of bacteriophages to target specific bacterial pathogens, the so-called “phage therapy”.

Bacteriophages are viruses that infect bacteria and, according to recent studies, they are the most abundant biological entities in our planet. Phages have a major role in ecosystems and contribute to the evolution of their hosts. The first studies on phage therapy dated back from the early nineteenth century, but in the last decades these studies notably increased.

Phage therapy has recently been re-discovered after being forgotten in the last fifty years due to the success of antibiotics in human medicine. Before the introduction of these drugs, in 1943, phages had already been used to treat infections caused by bacterial pathogens in the former Soviet Union and Eastern Europe. The results of these studies were published in non-English journals (Russia and Poland) and, therefore, they were not widely distributed in the scientific community. However, the current rise on the occurrence of multiresistant pathogens, especially strains of *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus* and *Pseudomonas aeruginosa*, has reignited the interest on phage therapy. Recent promising results have led the scientific community to face the future with optimism if phage therapy will be finally applied at larger scales. These benefits have been achieved on the basis of a better knowledge on phage biology, new and optimized technologies to purify phages and their innocuousness to both animals and humans.

2. INTRODUCCIÓ

Al març de 2016, Tom Patterson, un professor de 69 anys, es va convertir en la primera persona dels Estats Units en la qual va tenir èxit un tractament utilitzant bacteriòfags. A finals de 2015, mentre estava a Egipte, va contraure una infecció potencialment mortal amb una soca d'*Acinetobacter baumannii* resistent a múltiples antibiòtics. Patterson va ser traslladat a l'hospital UC San Diego Health a Califòrnia, on, amb l'aprovació d'emergència de la FDA (Food and Drug Administration), va ser tractat per via intravenosa amb un còctel experimental de fags específics per *A. baumannii*. Després de rebre aquesta primera dosi, el pacient va començar a millorar, després d'haver estat en coma durant mesos (UC San Diego Health, n.d.).

Si bé aquest ha estat només un pacient i la recuperació de Patterson no ha estat fàcil, el seu cas obre de nou una nova via d'investigació dirigida a trobar alternatives als antibiòtics tradicionals pel tractament de malalties infeccioses causades per patògens resistents.

2.1. FONAMENTS DE LA BIOLOGIA DELS FAGS

Els bacteriòfags (o fags) són entitats biològiques no vives i simples que consisteixen en DNA o RNA tancat dins d'una càpsida de proteïnes (Lin et al., 2017). Es classifiquen morfològicament en bacteriòfags caudats, polièdrics, filamentosos o pleomòrfics (**Figura 1**). El ICTV (*International Committee on Taxonomy of Viruses*) proposa l'existència de l'Ordre *Caudovirales* per agrupar totes aquelles famílies de virus amb cua (caudats) i que corresponen al 96% dels bacteriòfags coneguts, i de 7 Famílies de fags sense cua (no caudats) i que no estan incloses dins cap categoria taxonòmica superior (Dias et al., 2013).

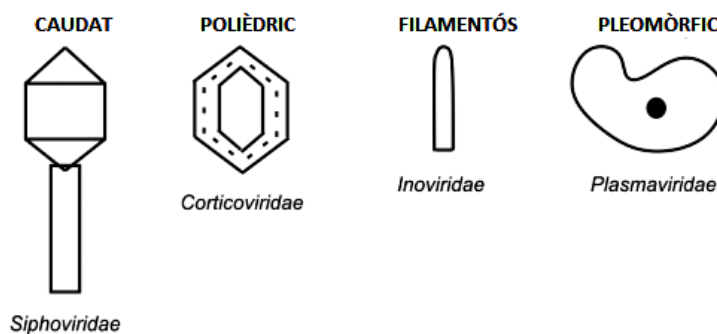


Figura 1. Tipus i exemples de bacteriòfags. Típicament, els fags caudats tenen un cap amb estructura icosaèdrica i una cua amb estructura helicoidal. Les formes cúbiques, filamentoses i pleomòrfiques són menys freqüents. Adaptat de Dias et al., 2013.

Els fags (i en general tots els virus) no són capaços de reproduir-se de forma independent i necessiten d'un hoste per a multiplicar-se. Els fags s'uneixen a receptors específics en la paret cel·lular bacteriana i ejecten el seu material genètic dins el citoplasma de la cèl·lula hoste. Una vegada dins la cèl·lula, el genoma pot regular el seu cicle viral de dues maneres, el **cicle lític** o el **cicle lisogènic** (Lin et al., 2017).

El cicle viral del fag comença quan es dona una unió a l'atzar del fag amb un receptor específic que es troba en la superfície bacteriana. Aquesta fase d'adsorció (o infecció) es dona gràcies a proteïnes del fag que actuen de receptors i que es troben a la cua, en el cas dels fags caudats, o en la mateixa càpsida (els no caudats) (Karthik et al., 2014). Després de la unió, el genoma viral (el virus pròpiament dit) penetra dins el citoplasma de l'hoste mitjançant diferents mecanismes, entre els que destaquen la contracció de la cua (en el cas de fags caudats com el T4) o mitjançant proteïnes virals de la càpsida que tenen activitat hidrolítica i causen la desestabilització de la paret i de la membrana cel·lular. El cicle lític es dona quan hi ha la replicació del genoma viral i la producció de noves partícules (els virions que constituïran la progènie) (Meurant, 1979).

En el cicle lític, doncs, el fag infecta la cèl·lula hoste i utilitza els recursos de la cèl·lula per multiplicar-se, fent que la cèl·lula lisi i mori en el procés (Lodish et al., 1986). Les etapes són:

- 1) Adsorció (infecció)
- 2) Penetració
- 3) Expressió gènica, replicació del genoma i síntesi de proteïnes: Es còpia l'àcid nucleic del fag i es dona una expressió dels gens per fer proteïnes, com ara les que formaran la càpsida (Lodish et al., 1986).
- 4) Maduració i acoblament: Les proteïnes i genomes sintetitzats s'han d'acoblar per formar les partícules virals (Lodish et al., 1986).
- 5) Alliberament: La membrana cel·lular es debilita i desestabilitza degut a l'acció d'enzims virals que condueixen a la ruptura de la membrana i l'alliberament de la progènie (Karthik et al., 2014).

El cicle lisogènic, en canvi, es dona quan alguns fags, anomenats temperats, en lloc de matar els seus hostes, s'integren en el seu genoma (pròfags) o es mantenen al citoplasma cel·lular com a episomes (**Figura 2**). El cicle lisogènic pot ser estable durant generacions i el bacteriòfag pot alterar el fenotip del bacteri mitjançant l'expressió de gens que no s'expressen en el curs habitual d'infecció en un procés conegut com a "conversió lisogènica" (Clokier et

al., 2011). Ara bé, sota determinades circumstàncies (exposició a radiació ultraviolada, compostos químics com la Mitomicina C, etc.) el pròfag pot induir el seu cicle lític, començar la multiplicació i acabar lisant l'hoste (Ul Haq et al., 2012).

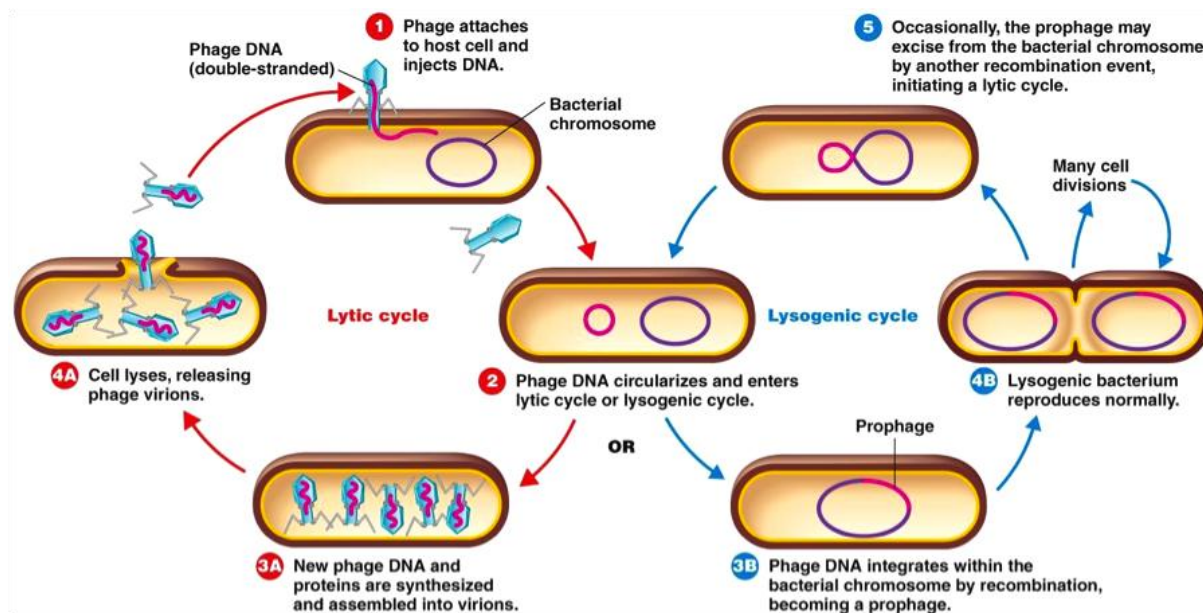


Figura 2. El bacteriòfag pot utilitzar la via lítica (vermell) per multiplicar-se o la via lisogènica (blau) (Tortora et al., 2016).

Els bacteriòfags es troben en gran abundància (hi ha més de 10^{31} fags a la biosfera) i s'estima que els seus orígens es remunten a fa més de tres mil milions d'anys. Es calcula que hi ha al voltant de 10^{23} infeccions de fags per segon a escala global. (Hatfull et al., 2012).

2.2. HISTÒRIA DE LA TERÀPIA FÀGICA

La teràpia fàgica va començar l'any 1896 quan Ernest Hankin va documentar per primera vegada l'existència d'activitat antibacteriana contra *Vibrio cholerae* en les aigües dels rius Ganges i Jumna a l'Índia, i va suggerir que una substància no identificada era responsable d'aquest fenomen i de la limitació de l'expansió de l'epidèmia del còlera (Sulakvelidze, 2011). Dos anys després, el microbiòleg rus Gamaleya va observar un fenomen similar mentre treballava amb *Bacillus subtilis* (Sulakvelidze, 2011). L'any 1925, Frederick Twort va plantejar la hipòtesi que l'activitat antibacteriana podria ser causa dels virus (fags), quan va

observar clapes de lisi en un cultiu de *Staphylococcus aureus*. Tot i aquestes evidències, Twort no va continuar amb aquests experiments i va ser Félix d'Herelle, l'any 1917, que va descobrir els bacteriòfags (Ul Haq et al., 2012). El nom "bacteriòfag" també va ser proposat per d'Herelle i deriva de les paraules "bacteria" i "phagein" (Xu et al., 2015).

El mateix D'Herelle va utilitzar fags per infectar soques de *Shigella* aïllades de pacients amb disenteria. Després de la infecció van aparèixer àrees petites i clares en els cultius confluents de *Shigella* (Xu et al., 2015). A la **Figura 3** s'observen clapes de lisi causades per fags específics de *Shigella* en cultius confluents de *S. dysenteriae* (Jamal et al., 2015).

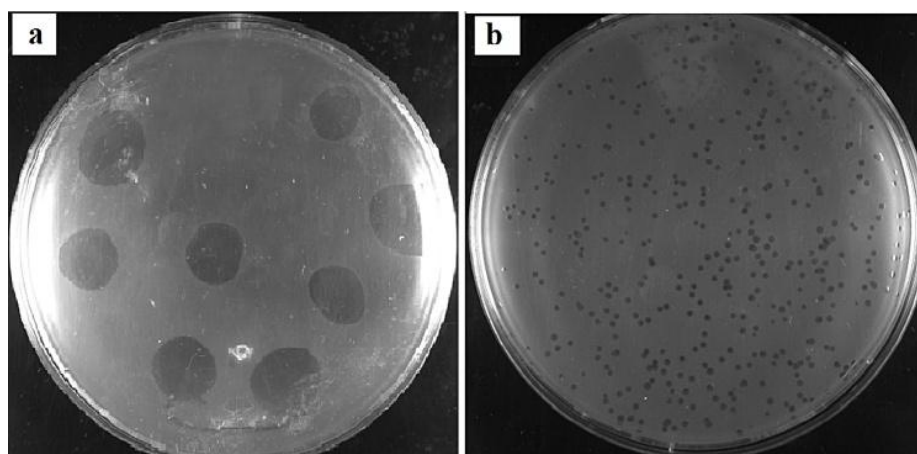


Figura 3. Spot test realitzat a una soca de *Shigella dysenteriae* infectades amb el bacteriòfag WZ. (a) El fag ha produït clapes de lisi, indicant la seva virulència. (b) També es poden observar les clapes de lisi a una dilució més alta (10^{-7}) (Jamal et al., 2015).

La recerca i aplicació de bacteriòfags es va iniciar a partir d'aquell moment. L'any 1919, d'Herelle va començar a provar el fag "anti-disenteria" en pacients humans. Sota la supervisió del professor Victor-Henri Hutinel al Hospital des Enfants-Malades a Paris, va demostrar la seguretat del tractament quan ell mateix va ingerir un lisat del fag. Posteriorment va demostrar la eficàcia del tractament quan va tractar un nen que patia disenteria que es va recuperar completament al cap de pocs dies. Poc després, tres pacients amb disenteria bacteriana també es van recuperar després de ser tractats amb el fag "anti-disenteria", fet que va confirmar l'eficàcia de la teràpia fàgica (Golkar et al., 2014).

Aquests estudis, però, no es van documentar convenientment. El primer estudi ben documentat sobre teràpia fàgica es va realitzar l'any 1921 quan Bruynoghe i Maisin van utilitzar bacteriòfags per tractar malalties de la pell causades per estafilococs (Xu et al., 2015).

La teràpia fàgica es va desenvolupar principalment a Polònia i a les antigues repúbliques soviètiques (Geòrgia i Rússia). Es van realitzar assaigs clínics però la majoria d'aquests estudis no es van dur a terme d'acord amb els estàndards actuals de la investigació mèdica (Verbeken et al., 2014). Ara bé, la segona guerra mundial i el descobriment dels antibiòtics van frenar els estudis sobre els bacteriòfags (Cisek et al., 2017).

2.3. REAPARICIÓ DE LA TERÀPIA FÀGICA EN EL CONTEXT ACTUAL

Actualment, es calcula que unes 700.000 persones moren cada any per infeccions resistents als antibiòtics, i és probable que aquesta xifra augmenti a 10 milions cap a 2050 (Stone, 2015). Les causes principals de l'augment de la resistència als antibiòtics són (Ventola, 2015):

- Ús inapropiat dels antibiòtics, es produeix de tres formes:
 - 1) Prescripció innecessària d'antibiòtics per tractar infeccions virals, contra les que no tenen cap efecte.
 - 2) Prescripció massa freqüent d'antibiòtics d'ampli espectre en lloc d'antibiòtics específics seleccionats mitjançant un diagnòstic més precís.
 - 3) Ús inadequat per part del pacient, al no respectar la dosi o la durada del tractament, permetent que alguns bacteris sobrevisquin i es tornin resistents.
- Ús excessiu d'antibiòtics en ramaderia.
- Control inadequat de les infeccions en els hospitals i clíniques.
- Falta de desenvolupament de nous antibiòtics durant els últims 20 anys.

La necessitat de tractaments efectius contra patògens multiresistents ha estat el motiu principal del ressorgiment en l'interès de la teràpia fàgica, que malgrat haver estat descoberta fa molt de temps, havia quedat relegada a un segon pla.

En aquest treball es realitza una revisió de la literatura disponible, obtinguda de varies fonts bibliogràfiques, sobre la teràpia fàgica, i es fa un anàlisi del impacte d'aquest procediment en el passat, el present i les expectatives que té en un futur, tenint en compte la situació actual de resistència a múltiples antibiòtics. En un principi, es va començar aquest projecte amb cert

escepticisme en quan a l'eficàcia dels bacteriòfags per matar bacteris un cop ja han infectat un altre organisme, però els resultats prometedors dels diferents estudis realitzats al llarg dels anys dóna esperances de trobar una alternativa viable a un problema que pot acabar provocant més morts anuals que el càncer.

3. OBJECTIVES

The main objective of this work is to evaluate the use of phage therapy in the past years and to review the specialized literature to assess whether or not the phage therapy is currently used to combat infections caused by antibiotic-resistant bacterial pathogens.

We thus searched scientific information data bases and analyzed the resulting information in terms of the timeline of use, the type of phages used as therapy and the target pathogens. We have also reviewed and discussed the possibility of using “enzybiotic” as an alternative to the conventional antibiotic-based theory.

4. METODOLOGIA

4.1. CERCA BIBLIOGRÀFICA I ANÀLISI DE LES DADES

En aquest treball s'ha realitzat una revisió bibliogràfica de les principals fonts i bases de dades relacionades amb la biomedicina i la virologia. Principalment, s'han utilitzat 3 buscadors online.

La plataforma de recerca més utilitzada per dur a terme aquest projecte ha sigut PubMed, un buscador del *National Center for Biotechnology* (NCBI) amb accés directe a la base de dades de MEDLINE, que conté més de 26 milions de referències a articles de publicacions periòdiques de tot el món en l'àmbit de la biomedicina. La recerca s'ha realitzat principalment en anglès, utilitzant les paraules claus “*bacteriophage therapy*”, “*phage therapy*”, “*bacteriophage*”, “*antibiotic resistance*”, “*biology of phages*”, “*enzybiotic*”. També s'ha realitzat una recerca general a través de Google Scholar, on s'han obtingut documents i articles relacionats amb la teràpia fàgica, publicats per diferents autors i associacions professionals. El tercer buscador online utilitzat ha estat SCOPUS, una base de dades bibliogràfica que conté resums i citacions per articles de revistes acadèmiques, que permet realitzar un anàlisi amb més detall dels resultats obtinguts en les cerques de varies paraules clau.

La recerca s'ha realitzat utilitzant els operadors [AND], que permet obtenir resultats que contenen tots els termes plantejats en la cerca i [OR], que recupera documents que contenen almenys un dels termes especificats en la cerca. També s'ha fet ús de:

- Parèntesis, ja que en una cerca permet controlar l'ordre de procés d'aquesta. Els conceptes continguts entre parèntesis seran tractats en primer lloc i després enllaça aquest resultat amb el concepte que està per fora dels parèntesis.
- Cometes, quan necessites que els resultats d'una recerca continguin la frase exacta que s'ha introduït en el buscador.

S'ha dut a terme la cerca a través de descriptors MeSH (*Medical Subject Headings*), que consisteix en un vocabulari controlat que permet obtenir resultats més precisos i d'aquesta manera eliminar aquells treballs que són irrelevants per aquest projecte.

L'anàlisi estadístic s'ha realitzat mitjançant el programa *IBM SPSS Statistics 21*, on les variables categòriques “*phage therapy*” i “*antibiotic resistance*” s'han analitzat a través del test de Pearson, que dibuixa la línia que millor s'ajusta a través de les dades de les dues variables, i que permet obtenir el coeficient de correlació de Pearson (r), que indica fins on estan tots els punts de dades de les dues variables d'aquesta línia ajustada. També s'ha obtingut el p valor que permet determinar la significació estadística de les dues variables. En tots els casos la significació estadística s'ha fixat a una $\alpha = 0.05$.

4.2. ÈTICA I SOSTENIBILITAT

Aquest projecte segueix les normes de l'ètica acadèmica i s'ajusta a la Llei 1/1996, de 12 d'abril de propietat intel·lectual, on segons l'article 32, sempre s'ha d'indicar la font de la qual procedeixen les idees o materials d'altres autors utilitzats en el treball, distingint clarament quines idees són pròpies i quines són d'altres fonts, estiguin citades literalment, parafrasejades o resumides.

5. RESULTATS I DISCUSSIÓ

A partir de la plataforma de recerca SCOPUS s’han analitzat els resultats de la cerca de les paraules clau “*phage therapy*” i “*antibiotic resistance*” mitjançant les eines analítiques que disposa la web, que permeten un anàlisi visual dels resultats dividits en set categories: any, font, autor, afiliació, país o territori, tipus de document i àrea d’estudi. Un cop s’han obtingut els resultats, s’ha realitzat la discussió d’aquests a través de les bases de dades de PubMed i Google Scholar, a partir de les quals s’han obtingut articles de referència que han permès contextualitzar cada gràfic. En aquest apartat s’analitza l’evolució dels documents d’interès al llarg dels anys, els països/territoris claus que han participat en aquesta evolució i les àrees d’estudi involucrades. També es fa un anàlisi de la recerca dels patògens clínicament més significatius, com han evolucionat els estudis preclínic i clínic, i el desenvolupament de la teràpia amb proteïnes lítiqües derivades de fags.

5.1. DINÀMICA TEMPORAL DELS ESTUDIS DE TERÀPIA FÀGICA

Des de les primeres investigacions en teràpia fàgica a la dècada dels 40 del segle passat (l’any 1944 hi ha el primer document registrat a SCOPUS), els estudis sobre aquesta alternativa als antibiòtics no han anat augmentat gradualment en el temps sinó que s’observa una aturada de pràcticament cinquanta anys (1945–1995) i una revifada en els últims 23 anys (**Figura 4**).

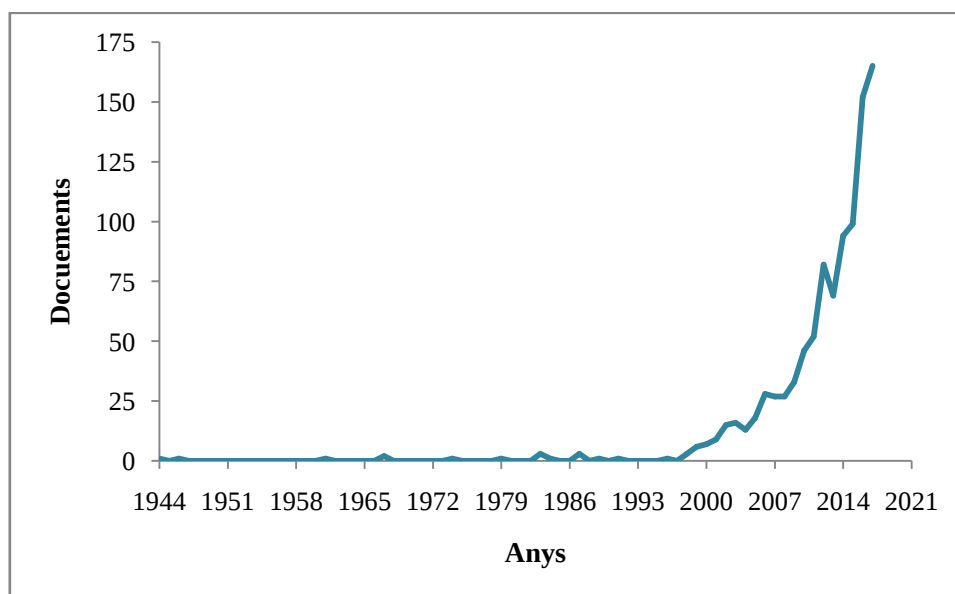


Figura 4. Número de publicacions a la base de dades de SCOPUS que contenen “*phage therapy*” en el títol o el resum publicats des de 1944 fins al 2017.

A l'any 1998 augmenta el nombre de documents publicats relacionats amb la teràpia fàgica. A partir d'aquell moment es dona un augment gairebé exponencial del nombre de publicacions sobre teràpia fàgica i es passa de tenir un total de 17 publicacions en un període de cinquanta anys (entre 1944 i 1997) a 961 publicacions en només 19 anys (1998–2017).

Curiosament, aquest augment en el nombre d'estudis sobre la teràpia fàgica coincideix amb l'augment de publicacions relacionades amb la resistència als antibiòtics en els camps de la biomedicina, l'agricultura i la ramaderia (**Figura 5**), on es passa de 898 publicacions totals en un període de 30 anys (1953–1984) a 15.468 publicacions en un mateix interval de també 30 anys (1985–2017).

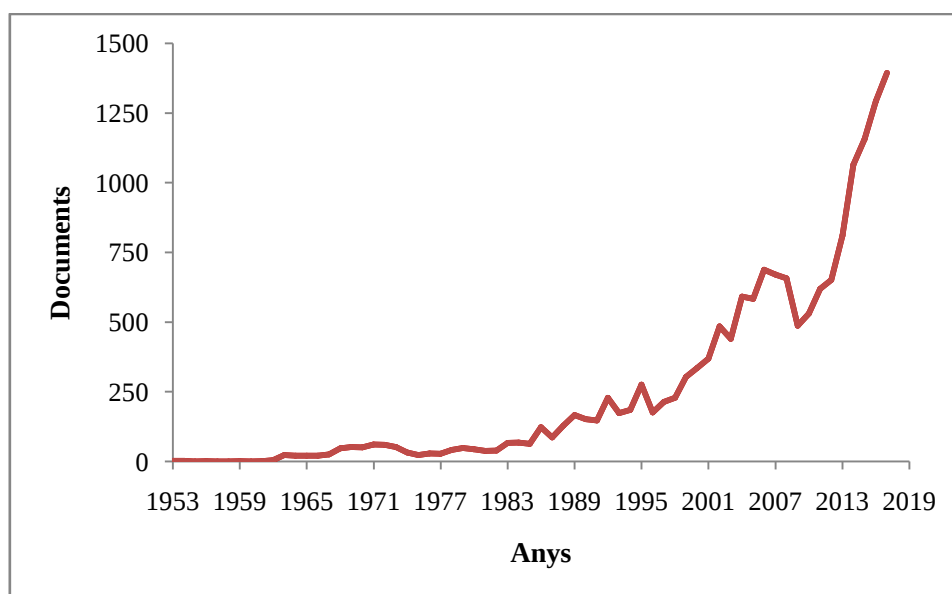


Figura 5. Número de documents a la base de dades de SCOPUS que contenen “antibiotic resistance” en el títol o en el resum publicats des de 1953 fins al 2017. Publicacions relacionades amb les àrees de medicina, immunologia i microbiologia, farmacologia, veterinària, bioquímica, genètica i biologia molecular i agricultura i ciències biològiques.

Aquests resultats permeten adivinar una relació clara entre el número de articles relacionats amb la resistència bacteriana als antibiòtics i la reaparició del interès en la teràpia fàgica. De fet, un anàlisi estadístic permet demostrar que ambdues variables es troben correlacionades significativament ($r=0.914$, $p= 1,94 \cdot 10^{-26}$).

En el *timeline* dels esdeveniments clau del desenvolupament de la resistència als antibiòtics (**Figura 6**), s'observa que des de la dècada dels 50 fins a la dècada dels 80, la indústria farmacèutica introduïa molts antibiòtics nous per resoldre el problema emergent de la resistència microbiana. Però després d'això, el descobriment de nous antibiòtics va disminuir, cada cop s'introduïen menys fàrmacs i apareixien més resistències. Com a resultat, l'any 2015, moltes dècades després de que els primers pacients fossin tractats amb antibiòtics, les infeccions bacterianes tornaven a convertir-se en una amenaça (Ventola, 2015).

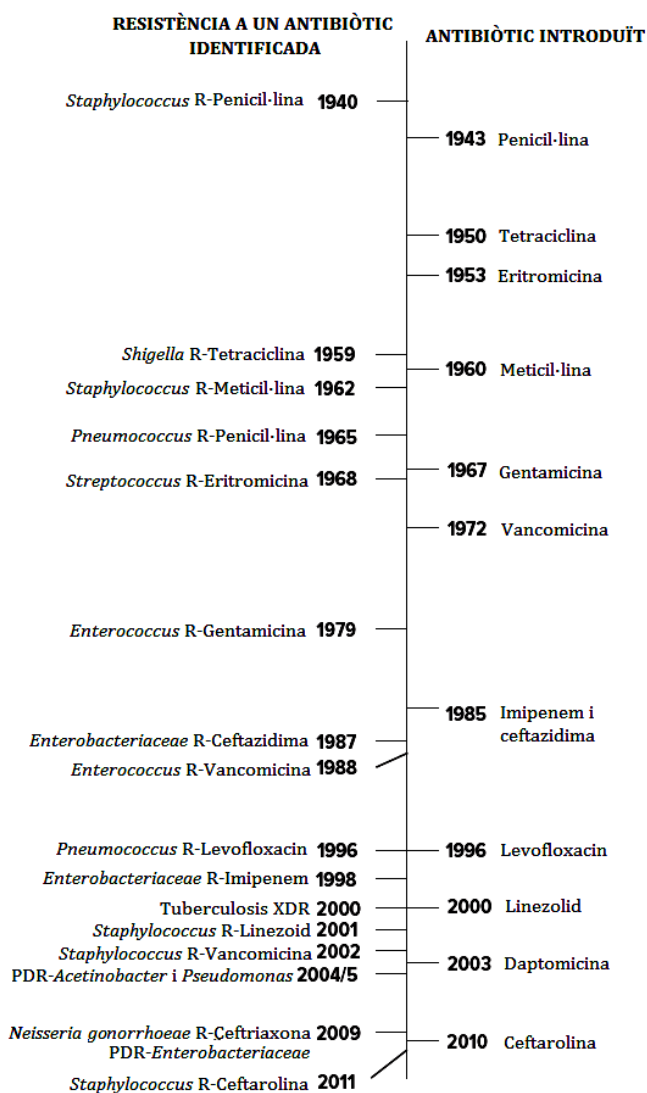


Figura 6. Cronograma de la introducció d'antibiòtics a la societat i les respectives resistències adquirides des de 1940 fins a 2011. R=Resistant (no susceptibilitat a almenys un agent en alguna categoria antimicrobiana); XDR=Extensively drug-resistant (no susceptibilitat a almenys un agent en gairebé totes les categories antimicrobianes); PDR= Pan-drug-resistant (no susceptibilitat a tots els agents de totes les categories antimicrobianes). Els bacteris XDR i PDR es denominen superbacteris. Adaptat de Ventola, 2015.

Aquest cronograma coincideix amb la reintroducció de la teràpia fàgica a la societat actual. Tot i que la investigació amb fags mai va ser abandonada a l'antiga URSS, la literatura anglesa va redescobrir la teràpia fàgica en animals en la dècada dels 80 i, consegüentment, les proves amb humans van començar en els anys 2000, amb la primera fase de prova realitzada a Estats Units publicada l'any 2009 (Wittebole et al., 2013).

5.2. DISTRIBUCIÓ GEOGRÀFICA DELS ESTUDIS EN TERÀPIA FÀGICA

Actualment, els països amb un nombre major de publicacions relacionats amb la teràpia fàgica són els Estats Units i Gran Bretanya (**Figura 7**). Això es deu al creixent problema de la resistència als antibiòtics en aquests països, fet que preocupa a la població. A Gran Bretanya, aproximadament un 39% de les infeccions de *Staphylococcus aureus* en hospitals són resistents a múltiples antibiòtics. Als Estats Units, aquest nombre és proper al 50%. S'estima que 90.000 pacients nord-americans moren cada any a causa d'infeccions adquirides en hospitals, moltes d'elles causades per bacteris multiresistents (Häusler, 2006).

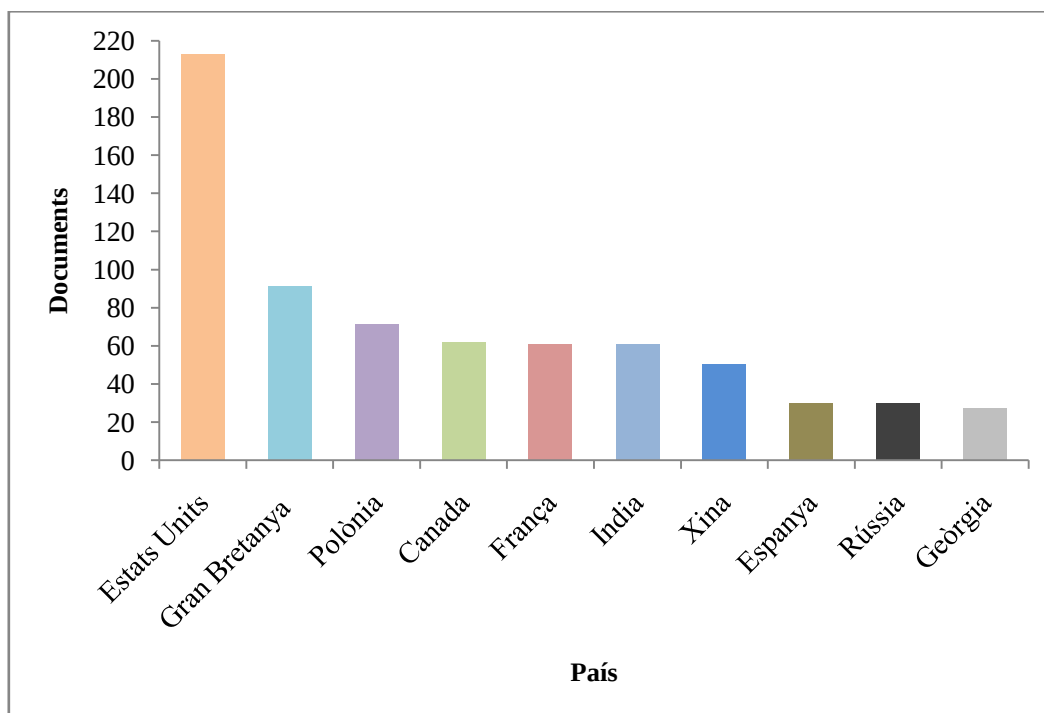


Figura 7. Països amb major nombre de publicacions relacionades amb la teràpia fàgica des de 1944 fins al 2017 registrades a SCOPUS.

Ara bé, el país que ha aportat els estudis més precisos sobre la teràpia fàgica és Polònia, a través del Institut Hirszfeld d'Immunologia i Teràpia Experimental a Wroclaw (HIIET) (Cisek et al., 2017). De fet, aquest institut és l'únic centre a la Unió Europea on els pacients poden tractar-se amb teràpia fàgica (Häusler, 2006). El Institut Hirszfeld es va fundar l'any 1952 i el seu personal ha participat activament en la investigació de la teràpia fàgica des de 1957, quan es van utilitzar fags terapèutics per tractar infeccions de *Shigella*. HIIET va ser fonamental per desenvolupar i produir fags per al tractament de la septicèmia, la furunculosis i les infeccions pulmonars i del tracte urinari (Sulakvelidze, 2011).

Abans del 1944 (any a partir del qual comencen els registres de SCOPUS), el país que més va investigar en teràpia fàgica fou Geòrgia (pertanyent a la URSS en el moment en que es van realitzar els estudis), a través de l'Institut Eliava (EIBMV). L'EIBMV es va fundar l'any 1923 per Giorgi Eliava, juntament amb Felix d'Herelle. Al llarg dels anys, el centre va produir preparacions de fags a nivell industrial contra una dotzena de patògens bacterians, incloent *Staphylococcus*, *Pseudomonas*, *Proteus* i molts patògens entèrics (Sulakvelidze, 2011).

5.3. ÀREES D'ESTUDI IMPLICADES EN LA TERÀPIA FÀGICA

Els estudis sobre la teràpia fàgica han incrementat al llarg dels anys, especialment els relacionats amb les àrees d'immunologia i microbiologia, medicina i bioquímica, genètica i biologia molecular (**Figura 8**).

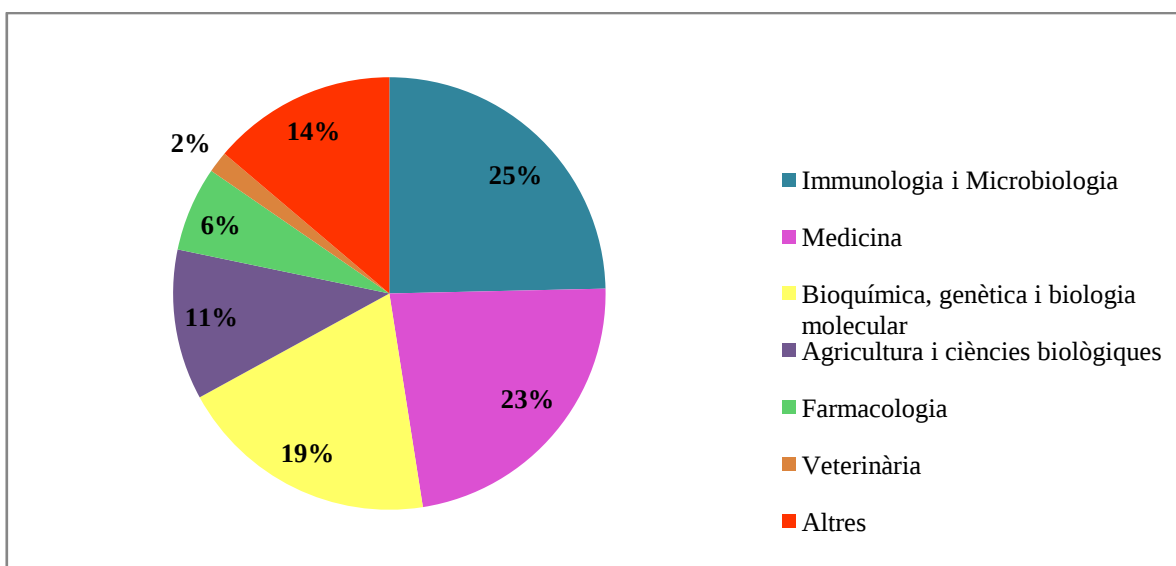


Figura 8. Número de publicacions sobre teràpia fàgica registrades a SCOPUS dividides segons les diferents àrees d'estudi, des de 1944 fins al 2017.

Les àrees més estudiades són aquelles que permeten un millor coneixement del funcionament dels bacteriòfags i els possibles efectes d'aquests, ja que el fet que s'hagi relegat aquesta teràpia, tot i haver ser descoberta abans que els antibiòtics, es deu principalment a quatre motius:

- 1) Els fags tenen propietats biològiques, físiques i farmacològiques diferents en comparació amb els antibiòtics convencionals. S'han de replicar per tal d'aconseguir un efecte antibacterià viable, fet que resulta en una farmacodinàmica/farmacocinètica complexa (Cooper et al., 2016).
- 2) L'especificitat dels fags individuals requereix còctels complexos de fags per tractar infeccions d'espècies individuals (Cooper et al., 2016).
- 3) La resistència bacteriana és també un dels problemes associats amb l'ús de fags. No obstant, els fags es desenvolupen en cicles coevolutius respecte el seu hoste, donant lloc contínuament la partícules adaptades a la resistència de la cèl·lula bacteriana (Dias et al., 2013).
- 4) També hi ha una aprensió a utilitzar fags en el tractament ja que poden facilitar la transferència de gens entre bacteris (Dias et al., 2013).

5.4. ESTUDIS PRECLÍNICS EN ANIMALS: FAGS CONTRA PATÒGENS DE GRAN RELLEVÀNCIA CLÍNICA

Les possibles conseqüències i la seguretat de la teràpia fàgica es poden estimar a partir d'estudis fets amb models animals. La informació obtinguda d'aquests estudis pre-clínic resulta vital per poder iniciar després les proves en humans sense perill. Investigacions recents utilitzant models animals han explorat el tractament amb fags contra un rang de patògens de gran rellevància clínica, tan per animals com humans (**Figura 9**).

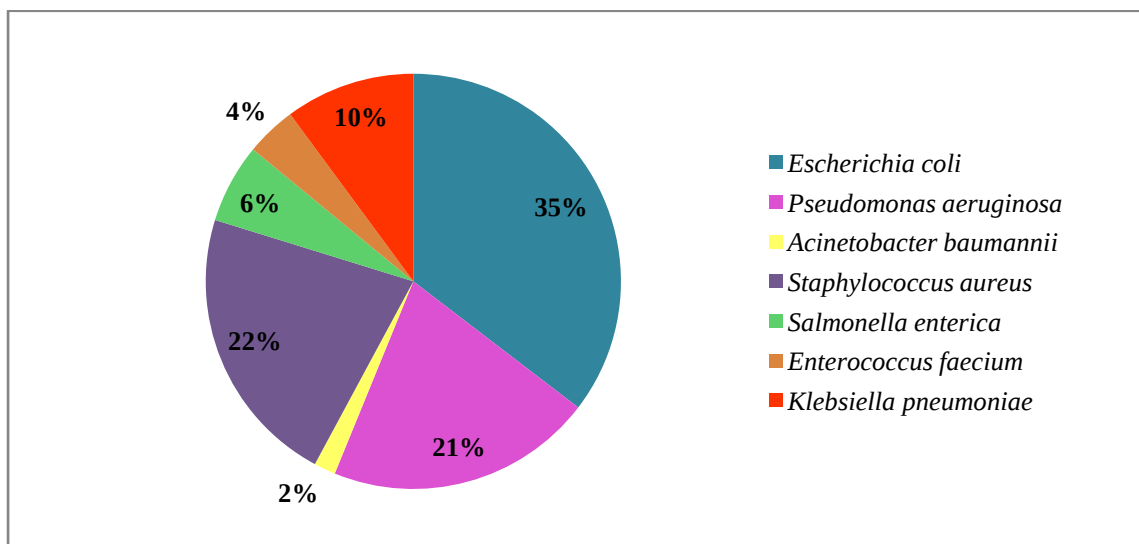


Figura 9. Número d'estudis en animals, realitzats amb diferents patògens, registrats a SCOPUS fins l'any 2017.

Els estudis pre-clítics utilitzant teràpia fàgica en animals s'han centrat bàsicament en combatre infeccions causades per diferents soques d'*E. coli* (35% del total dels estudis, **Figura 9**). Això és deu a la gran diversitat de soques d'*E. coli* amb diferent virulència i infectivitat (Brüssow, 2005). Aquestes malalties poden ser intestinals (diarrea) o extra-intestinals (infecció del tracte urinari, septicèmia, pneumònia i meningitis) (Bolocan et al., 2016). Els animals més utilitzats en aquests estudis han estat:

- **Ratolins:** Els estudis amb animals que van suposar el ressorgiment de la teràpia fàgica en els països occidentals van ser duts a terme pel laboratori de William Smith al *Institute for Animal Disease Research* a Houghton, Cambridgeshire, Gran Bretanya (Sulakvelidze, 2011). Els autors van documentar l'èxit de tractar infeccions causades per diferents soques d'*E.coli* amb fags específics. Van començar amb un model de ratolí que patia meningitis a causa d'una infecció amb la soca d'*E. coli* K1 (Smith & Huggins, 1982). Baixes dosis del fag anti-K1, administrades intramuscularment, van protegir els ratolins contra una dosi massiva de patogen aplicada al múscul oposat al mateix temps. El fag anti-K1 va ser més eficient *in vivo* que una gran quantitat d'antibiòtics (Brüssow, 2005).
- **Vedells:** L'èxit dels assaigs amb ratolins va animar a Smith i els seus col·laboradors a continuar amb els estudis preclítics en animals. Van realitzar el tractament amb fags a vedells que patien diarrea a causa d'infeccions amb una soca d'*E.coli* enteropatògena

anomenada B44. Es van infectar oralment els vedells amb la soca B44 i es van tractar posteriorment amb una barreja de fags B44/1 i B44/2, o B44/1 i B44/3, específics contra aquesta soca d'*E.coli*. Els vedells tractats amb la barreja de fags, ja sigui 1h o 8h després de la infecció amb B44, o al moment de patir la diarrea, van mostrar un índex de mortalitat inferior a aquells vedells que no van ser tractats (Smith & Huggins, 1983). Aquesta efectivitat també va ser present en els vedells que no es van alimentar amb calostre, i que, per tant, eren més susceptibles a les infeccions bacterianes, ja que no tenien les immunoglobulines amb activitat antibacteriana que aquest els hi aporta (Nocek et al., 1984). En aquest estudi també es va demostrar la necessitat d'utilitzar còctels de fags per tal d'obtenir espectres més amplis d'activitat en comparació amb fags individuals (Chan & Abedon, 2012). Es van examinar els vedells morts que van ser infectats amb els fags i la majoria van presentar un elevat nombre de mutants d'*E. coli* B44 resistents al fag B44/1 en l'intestí prim. La seva mort va ser causa de la incapacitat del fag B44/2 per controlar la proliferació d'aquests mutants. Es van obtenir millors resultats en els vedells tractats a l'inici de la diarrea substituint el fag B44/2 amb el fag B44/3, ja que, tot i que aquest fag és menys virulent contra *E. coli* B44, és més actiu contra els mutants resistents a B44/1 (Smith & Huggins, 1983).

- **Pollastres:** *E. coli* causa infeccions respiratòries severes en pollastres. En un estudi realitzat per Huff i col·laboradors (2002), es van administrar fags mitjançant un aerosol a pollastres infectats amb *E. coli*. L'aerosol, que contenia una barreja de dos fags, va reduir a la meitat la mortalitat dels pollastres infectats. Quan es va augmentar la dosi de fags, es va observar una protecció important contra la infecció fins a 3 dies després del tractament (Huff et al., 2002). Un altre estudi va documentar l'eficàcia d'administrar intramuscularment un fag contra infeccions d'*E. coli* a pollastres. Quan es va infectar els animals amb el mateix nombre de fags que de bacteris, no es va observar cap tipus de morbiditat en els pollastres, i encara que s'administrés menys quantitat de fag, aquest era capaç de conferir una protecció significativa, demostrant la multiplicació *in vivo* del fag (Barrow et al., 1998).

Amb un percentatge molt similar, es troben els estudis pre-clínic per tractar infeccions de *Staphylococcus aureus* (22%) i *Pseudomonas aeruginosa* (21%).

S.aureus és un dels patògens més temuts per disposar d'una gran diversitat de factors de virulència i resistències múltiples que permeten una gran infectivitat (abscessos de la pell,

infeccions de ferides, endocarditis, osteomielitis, pneumònia i síndrome de xoc tòxic) i la capacitat d'adaptar-se a l'ambient intracel·lular, on troba protecció contra els mecanismes de defensa i antibiòtics (Capparelli et al., 2007). Els tres experiments més rellevants per a tractar infeccions causades per *S. aureus* en animals han estat:

- Matsuzaki i col·laboradors (2003) van tractar ratolins infectats amb una dosi letal d'una soca de *S. aureus* anomenada SA37 i van administrar intraperitonealment als ratolins un fag específic contra la soca utilitzada. La millora dels ratolins va coincidir amb l'aparició ràpida del fag en la circulació, on va romandre en una concentració elevada fins que es va eradicar el patogen. Això indica que, fins i tot en infeccions extremadament greus, els fags poden contrarestar la letalitat de l'agent infecciós (Każmierczak, Górski, & Dabrowska, 2014).
- Un efecte similar de fags contra *S. aureus* va ser demostrat per Capparelli i col·laboradors (2007). L'estudi descriu un fag actiu contra *S. aureus* resistent a meticil·lina. Quan es va inocular en ratolins el fag simultàniament amb *S. aureus*, el fag va curar el 97% dels ratolins. Quan el fag es va aplicar 10 dies de la infecció amb dosi no letals, el fag també va eliminar totalment el patogen. El fag també va prevenir la formació d'abscessos i en va reduir la càrrega bacteriana (Capparelli et al., 2007).
- L'eficàcia de la teràpia fàgica contra *S. aureus* també va ser demostrada per Wills i col·laboradors (2005). En aquest treball, es van infectar conills subcutàniament amb *S. aureus* per provocar abscessos cutanis. Els animals tractats simultàniament amb fags anti-estafilococs no es van observar abscessos (Każmierczak et al., 2014).

Pseudomonas aeruginosa, es tracta d'un patogen bacterià oportunista present en diversos ambients com l'aigua, el sòl i les plantes (Prince, 2012). És un dels patògens que causa més malalties, incloent pneumònia, infeccions del torrent sanguini i infeccions del tracte urinari (Endimiani et al., 2006). La majoria de les infeccions causades per *P. aeruginosa* són difícils de tractar utilitzant antibiòtics convencionals, ja que aquest microorganisme presenta una alta resistència intrínseca a un ampli ventall d'antibiòtics (Pires et al., 2015). A més, *P. aeruginosa* té la capacitat de formar biofilms, que disminueixen l'activitat dels antibiòtics fins al punt que no es poden aconseguir concentracions efectives *in vivo* (Harper et al., 2011). Els fags, però, tenen diversos avantatges sobre els antibiòtics en el tractament d'infeccions causades per

patògens protegits en biofilms. En primer lloc, mentre que els antibiòtics només afecten els bacteris que es troben en la superfície del biofilm, els fags poden infectar les cèl·lules en la superfície però la seva multiplicació genera gran quantitat de partícules fàgiques que difonen a les capes profundes d'aquestes biopel·lícules, destruint-les progressivament (Harper et al., 2011). En segon lloc, els fags poden transportar (Verma et al., 2010) o, en alguns casos, induir l'expressió d'enzims bacterians que dissolen la matriu del biofilm (Hanlon, 2007). Finalment, els fags també poden infectar cèl·lules en estat latent i romandre dins d'elles fins que re-emprenquin el creixement (Pearl et al., 2008).

La majoria dels assaigs clínics amb teràpia fàgica per tractar infeccions de *P. aeruginosa* que s'han realitzat en l'última dècada s'han fet amb ratolins. Una gran part dels casos van mostrar taxes de supervivència dels ratolins infectats que oscil·laven entre el 80% i el 100% després del tractament, essent l'administració intraperitoneal o intranasal més eficient (Pires et al., 2015). També es va observar el gran potencial de la teràpia fàgica en bagres i gossos, ja que els fags van poder tractar amb èxit lesions ulceratives i otitis cròniques, respectivament (Pires et al., 2015). Els fags també van ser capaços d'augmentar la vida útil de larves de papallona i *Drosophila melanogaster* infectades per *P. aeruginosa* (Pires et al., 2015).

Altres patògens utilitzats per dur a terme els assaigs preclínics utilitzant models animals han estat, de més a menys quantitat d'estudis publicats a SCOPUS, *Klebsiella pneumoniae*, *Salmonella enterica*, *Enterococcus faecium* i *Acinetobacter baumannii*.

5.5. TRACTAMENT D'INFECCIONS BACTERIANES EN HUMANS

Els assaigs clínics en pacients humans estan dissenyats per respondre preguntes específiques sobre intervencions biomèdiques. Només es duen a terme després d'haver rebut l'autorització sanitària i l'aprovació del comitè ètic al país on es demana l'aprovació de la teràpia. Mitjançant la base de dades de SCOPUS, s'han determinat les principals fonts de publicacions d'estudis clínics de teràpia fàgica en humans des de 1983 fins a 2017 (**Figura 10**).

Els primers registres a SCOPUS de publicacions sobre la profilaxi i el tractament d'infeccions bacterianes en humans amb teràpia fàgica es donen a través de la revista *Archivum Immunologiae et Therapiae Experimentalis* (AITE), des de l'any 1983 fins al 2003. AITE va ser fundada l'any 1953 per Ludwik Hirszfeld (Vähä-Koskela, 2008), mateix fundador del Institut Hirszfeld d'Immunologia i Teràpia Experimental a Polònia, que ha publicat

regularment, des de principis dels anys 80, documents detallats dels resultats dels assaigs clínics en humans (Inal, 2003). L'any 2005, però, l'institut va haver d'obrir la seva pròpia clínica especialitzada en teràpia fàgica, on el seu objectiu és l'admissió de pacients per al tractament amb fags seguint un protocol aprovat per un comitè independent de bioètica, ja que després de la unió de Polònia a la Unió Europea, es troben sota les directrius de EMA (*European Medicines Agency*), les quals no autoritzen els fags com a producte mèdic (IITD, n.d.).

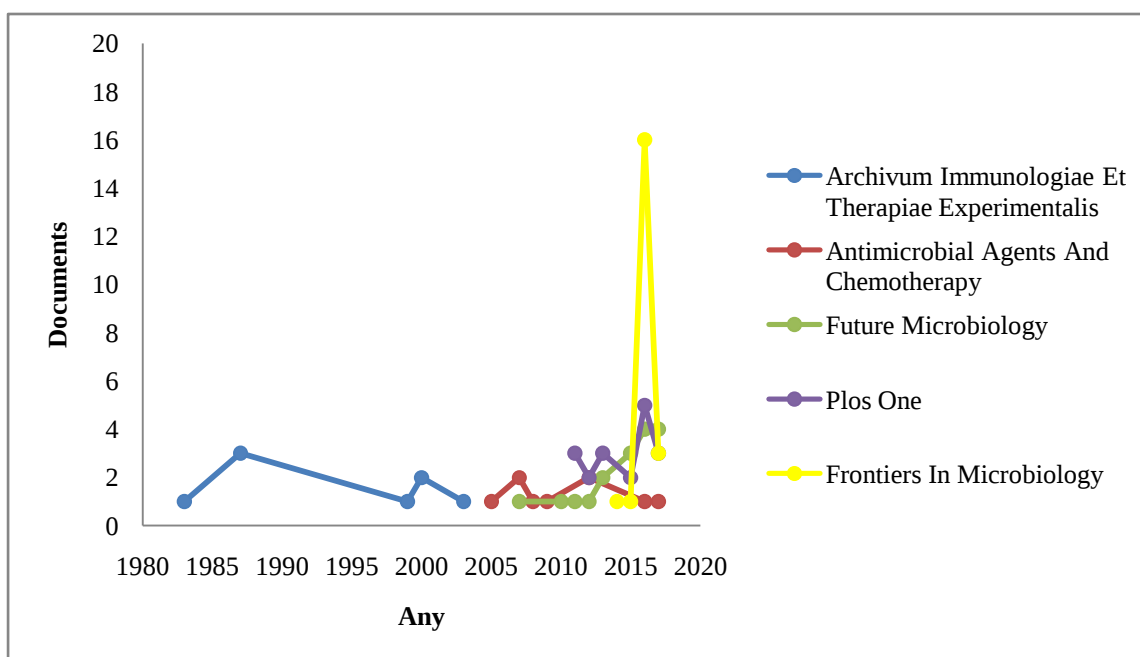


Figura 10. Número de documents publicats per diferents fonts sobre estudis clínics en humans registrats a SCOPUS del 1983-2017.

Els estudis publicats a AITE són els més exhaustius sobre assaigs clínics de teràpia fàgica en humans, i es van realitzar des de l'Institut Hirsfeld en 10 departaments hospitalaris diferents. Aquests estudis es van dur a terme en 550 pacients d'entre 1 setmana d'edat a 86 anys, 518 dels quals van patir infeccions amb soques d'*E. coli*, *Klebsiella*, *Pseudomonas*, *Salmonella*, *Staphylococcus* i *Streptococcus* resistents als antibiòtics (Inal, 2003). Els fags, específics per cada soca, es van administrar tòpicament 3 vegades al dia, mitjançant gotes d'ulls, o per via oral després de neutralitzar l'àcid estomacal. El tractament va durar una mitjana de 5 setmanes i la taxa d'èxit va ser del 75-100%, depenent del bacteri. Per als 518 pacients per als quals la

teràpia amb antibiòtics era ineficaç, la taxa d'èxit va ser major, un 94%. L'únic efecte secundari va ser el dolor hepàtic, causa de les endotoxines alliberades durant la lisi dels bacteris. Altres estudis realitzats per l'Institut, altament efectius, van documentar l'èxit d'administrar fags subcutàniament a pacients amb infecció per soques resistents, entre altres malalties, d'osteomielitis, contra la qual els antibiòtics són pràcticament ineficaços a causa de la mala circulació (Inal, 2003).

A partir de l'any 2005 s'han publicat diversos articles de revisió que abasten diverses qüestions relacionades amb la teràpia fàgica en humans (inclosos assaigs clínics complets i en curs, i qüestions normatives i ètiques). Les principals fonts de publicacions d'aquests documents han estat les revistes *Antimicrobial Agents And Chemotherapy*, *Plos One*, *Frontiers In Microbiology* i *Future Microbiology*.

Els assaigs clínics en humans que impliquen nous fàrmacs es classifiquen comunament en cinc fases. Cada fase del procés d'aprovació del medicament es tracta com un assaig clínic independent. En els darrers anys només s'han realitzat i publicat quatre estudis en fase I i un en fase II relacionats amb la teràpia fàgica en els països occidentals (Doffkay et al., 2015).

Dos dels quatre assaigs clínics en fase I es van enfocar en avaluar la seguretat d'utilitzar fags alhora de tractar infeccions causades per *Pseudomonas* MDR i *S. aureus* resistents a la meticil·lina (MRSA) (Doffkay et al., 2015). El primer es va completar l'any 2008 al *Southwest Regional Wound Care Center* a Lubbock, Texas (Estats Units). Aquest estudi va utilitzar un còctel de 8 fags anomenat WPP-201 elaborat per l'empresa *Intralytix*. El còctel contenia dos fags actius contra *S. aureus*, cinc contra *P. aeruginosa* i un contra *E. coli*. Es van tractar 21 pacients amb el còctel de fags i un altre grup de 18 pacients van rebre també fosfat salí (PBS) estèril (grup control). Segons els resultats d'aquest assaig, no es van observar efectes adversos associats a l'aplicació d'aquesta preparació de múltiples bacteriòfags (Rhoads et al., 2009).

Un altre assaig en fase I sobre seguretat contra aquests dos patògens es va dur a terme l'any 2009 a Bèlgica. El còctel de fags estudiat s'anomena BFC-1 i està format per tres fags exclusivament lítics. En aquest assaig tampoc es van observar efectes adversos utilitzant el còctel de fags (Kutter et al., 2010).

L'únic assaig clínic realitzat en fase II amb fags va ser realitzat per l'empresa britànica *Biocontrol Limited* l'any 2007. Després d'obtenir resultats prometedors en estudis preclínics

amb gossos que patien otitis crònica causada per una soca resistent de *P. aeruginosa*, van realitzar un assaig clínic en fase I/II en humans amb otitis. Es va utilitzar un còctel de 6 fags anomenat Biophage-PA. Es van triar 24 pacients amb otitis externa, la infecció va ser causada per soques de *Pseudomonas* sensibles a almenys un d'aquests sis fags. La meitat dels pacients seleccionats van ser tractats tòpicament amb una dosi única que contenia 105 fags de cadascun dels 6 tipus. L'altra meitat dels pacients seleccionats van rebre PBS-glicerol 10% diluït com a placebo. En els resultats de l'estudi es va determinar que la presència de bacteris i els símptomes de la malaltia es van reduir en el grup que va rebre tractament, però no en el grup placebo, i tampoc van haver-hi efectes secundaris notables en els pacients. No es va aconseguir, però, l'eradicació bacteriana completa i això pot ser causa de la baixa dosi de fags utilitzada (Doffkay et al., 2015).

5.6. DESENVOLUPAMENT I APLICACIÓ DE PROTEÏNES LÍTIQUES DERIVADES DE FAGS

El desenvolupament de la biologia molecular i els mètodes de seqüenciació de nova generació han obert noves possibilitats en el disseny de proteïnes recombinants derivades de fags. A partir de l'any 1999 comencen els registres a la base de dades de SCOPUS dels documents sobre enzims lítics provinents de fags com alternativa als antibiòtics, els anomenats "enzibiòtics". Actualment, un 10% del total de publicacions sobre teràpia fàgica des del 1999 al 2017 correspon a recerca feta amb aquests compostos (**Figura 11**).

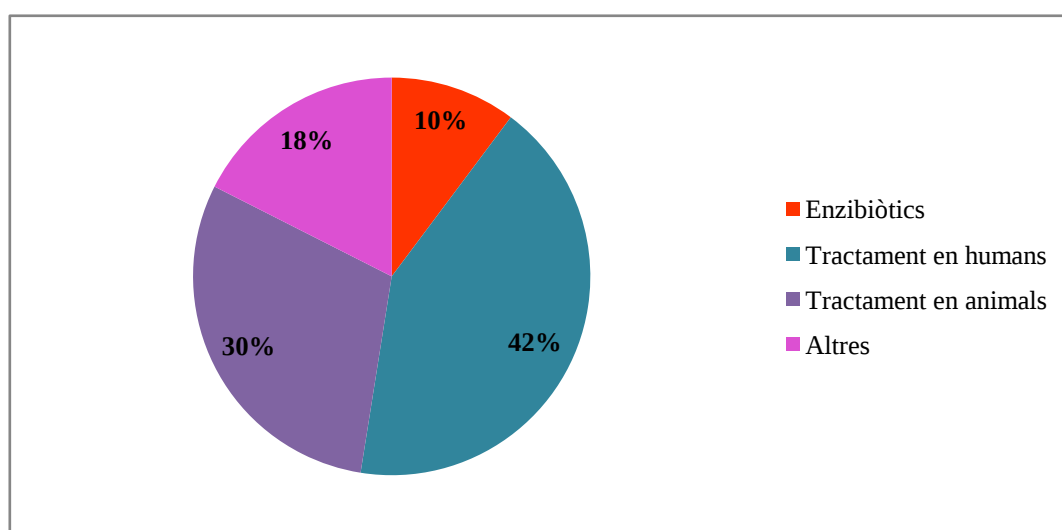


Figura 11. Número de publicacions registrades a SCOPUS des del 1999 al 2017 dividides en diferents temes d'estudi.

La majoria dels bacteriòfags codifiquen per dos tipus de proteïnes lítiques de la paret cel·lular: proteïnes implicades en el primer pas de la infecció viral, responsables de la degradació de la paret cel·lular, anomenades depolimerases, i proteïnes codificades per gens lítics (holines, endolisines, etc.) responsables de l'alliberament de la progènie durant el cicle lític (Drulis-Kawa et al., 2015). Aquests últims són els més utilitzats com a enzimbòtics.

Durant les últimes etapes de la infecció, les endolisines (o lisines) codificades pels fags s'acumulen en el citoplasma bacterià fins que es completa l'acoblament de les partícules virals. Seguidament, les holines produeixen porus a la membrana citoplasmàtica que permeten la translocació de les endolisines a través de la membrana. Això fa que es degradi el peptidoglicà de la paret i provoqui la lisi cel·lular (sistema holina-endolisina) (**Figura 12**) (Rodríguez-Rubio et al., 2016).

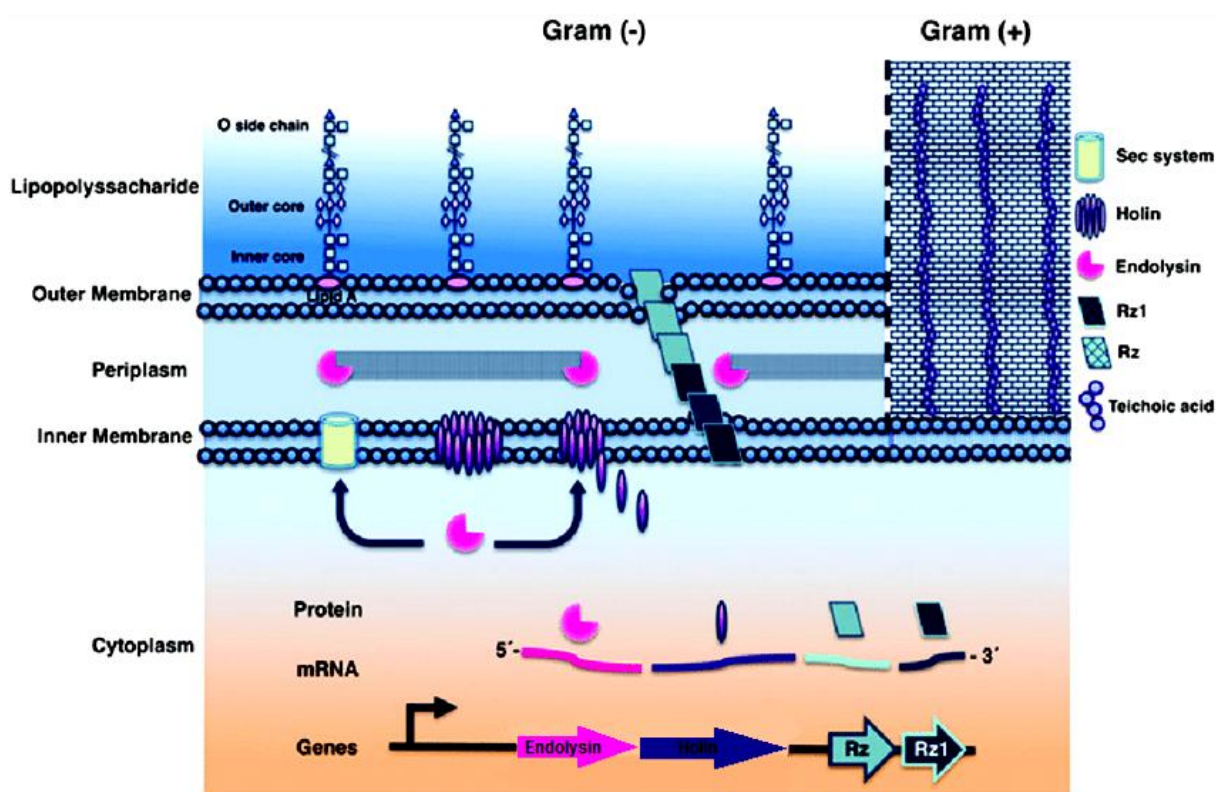


Figura 12. Components dels fags implicats en la lisi bacteriana. Les holines i les endolisines poden actuar de manera combinada o independent, però cadascuna té una funció específica i diferent que augmenta l'eficàcia de la irrupció del peptidoglicà quan actuen en combinació o amb altres proteïnes accessòries com Rz i Rz1 (Peñafiel et al., 2015).

Aquestes proteïnes han rebut molta atenció com a possibles agents antimicrobians, ja que són d'acció ràpida, potents i no tenen cap efecte sobre les cèl·lules eucariotes. S'han realitzat estudis on han tractat amb endolisines ratolins que patien bacterièmia causada per soques d'*A. baumannii*, *Streptococcus pneumoniae*, i MRSA, entre d'altres, i on s'han obtingut resultats favorables, ja que les lisines van permetre als ratolins sobreviure (Lin et al., 2017). Altres estudis també han demostrat que la acció combinada dels enzimiòtics i antibiòtics és molt més eficaç que l'ús dels antibiòtics sols (Lin et al., 2017).

No obstant això, quan es consideren enzims lítics exògens per a la teràpia, s'ha de tenir en compte que la majoria de les lisines no tenen una senyal secretora que els hi permeti creuar la membrana cel·lular. En el cas dels bacteris gram-positius, les lisines exògenes no tindrien cap dificultat per assolir la capa de peptidoglicà. En el cas dels bacteris gram-negatius, en canvi, la paret cel·lular és més complexa, principalment a causa de la presència d'una membrana externa, que dificulta l'accés de les lisines al peptidoglicà localitzat en l'espai periplàsmic. Per tant, es necessiten més investigacions per resoldre aquest problema (Villa et al, 2010).

6. CONCLUSIONS

The main conclusions of this work are:

- The renewed interest in phage therapy is clear, especially in the past 20 years. The abundance in the number of publications related to this topic matches the increase of publications about antibiotic resistance. Accordingly, the scientific community is focused on finding new ways to defeat multidrug resistant pathogens.
- The main countries that explored phage therapy were the former Soviet Union and Eastern Europe. However, the increase in the mortality rate of patients suffering from infectious diseases caused by resistant pathogens in Western countries (e.g. United States and UK) has boosted the number of research papers on phage therapy published by North American and British research teams in the recent years.
- The main targets of the pre-clinical and clinical studies of phage therapy have been strains of *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus* and *Pseudomonas aeruginosa*, which are the deadliest pathogens to animals and humans.
- The "enzybiotics" are a promising alternative to combat pathogens due to its structural resemblance to conventional antibiotics and its innocuousness to eukaryotic hosts.
- Overall, phage therapy is a promising tool to combat bacterial infections and it appears a viable alternative to conventional antibiotic treatment.

7. BIBLIOGRAFIA

- Barrow, P., Lovell, M., & Berchieri, a. (1998). Use of lytic bacteriophage for control of experimental *Escherichia coli* septicemia and meningitis in chickens and calves. *Clinical and Diagnostic Laboratory Immunology*, 5(3), 294–298. <https://doi.org/10.1128/IAI.70.11.6251>
- Bolocan, A. S., Callanan, J., Forde, A., Ross, P., & Hill, C. (2016, November 1). Phage therapy targeting *Escherichia coli*-a story with no end? (W. Kneifel, Ed.), *FEMS Microbiology Letters*. Oxford University Press. <https://doi.org/10.1093/femsle/fnw256>
- Brüssow, H. (2005). Phage therapy: The *Escherichia coli* experience. *Microbiology*, 151(7), 2133–2140. <https://doi.org/10.1099/mic.0.27849-0>
- Capparelli, R., Parlato, M., Borriello, G., Salvatore, P., & Iannelli, D. (2007). Experimental phage therapy against *Staphylococcus aureus* in mice. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 51(8), 2765–2773. <https://doi.org/10.1128/AAC.01513-06>
- Chan, B. K., & Abedon, S. T. (2012). Phage Therapy Pharmacology: Phage Cocktails. *Advances in Applied Microbiology*, 78, 1–23. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-394805-2.00001-4>
- Cisek, A. A., Dąbrowska, I., Gregorczyk, K. P., & Wyżewski, Z. (2017). Phage Therapy in Bacterial Infections Treatment: One Hundred Years After the Discovery of Bacteriophages. *Current Microbiology*, 74(2), 277–283. <https://doi.org/10.1007/s00284-016-1166-x>
- Clokie, M. R. J., Millard, A. D., Letarov, A. V., & Heaphy, S. (2011). Phages in nature. *Bacteriophage*, 1(1), 31–45. <https://doi.org/10.4161/bact.1.1.14942>
- Cooper, C. J., Mirzaei, M. K., & Nilsson, A. S. (2016). Adapting drug approval pathways for bacteriophage-based therapeutics. *Frontiers in Microbiology*, 7(AUG), 1–15. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2016.01209>
- Dias, R. S., Eller, M. R., Salgado, R. L., Silva, C. C., & Paula, S. O. De. (2013). The Use of Phage: Therapy, Biocontrol and Commercial Microbiology. *Bacteriophages: Biology, Applications and Role in Health and Disease*, (January), 1–34.
- Doffkay, Z., Dömötör, D., Kovács, T., & Rákhely, G. (2015). Bacteriophage therapy against plant, animal and human pathogens. *Acta Biologica Szegediensis*, 59(Twort 1915), 291–302.
- Drulis-Kawa, Z., Majkowska-Skrobek, G., & Maciejewska, B. (2015). Bacteriophages and phage-derived proteins--application approaches. *Current Medicinal Chemistry*, 22(14), 1757–1773. <https://doi.org/10.2174/0929867322666150209152851>
- Endimiani, A., Luzzaro, F., Pini, B., Amicosante, G., Rossolini, G. M., & Toniolo, A. Q. (2006). *Pseudomonas aeruginosa* bloodstream infections: risk factors and treatment outcome related to expression of the PER-1 extended-spectrum beta-lactamase. *BMC Infectious Diseases*, 6, 52. <https://doi.org/10.1186/1471-2334-6-52>
- Golkar, Z., Bagasra, O., & Gene Pace, D. (2014). Bacteriophage therapy: A potential solution for the antibiotic resistance crisis. *Journal of Infection in Developing Countries*, 8(2), 129–136. <https://doi.org/10.3855/jidc.3573>
- Hanlon, G. W. (2007). Bacteriophages: an appraisal of their role in the treatment of bacterial infections. *International Journal of Antimicrobial Agents*, 30(2), 118–128.

- <https://doi.org/10.1016/j.ijantimicag.2007.04.006>
- Harper, D. R., & Enright, M. C. (2011). Bacteriophages for the treatment of *Pseudomonas aeruginosa* infections. *Journal of Applied Microbiology*. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2672.2011.05003.x>
- Hatfull, G. F., & Hendrix, R. W. (2012). Bacteriophages and their Genomes, 1(4), 298–303. <https://doi.org/10.1016/j.coviro.2011.06.009>.Bacteriophages
- Häusler, T. (2006). Bug killers. *Nature Medicine*, 12(6), 600–601. <https://doi.org/10.1038/nm0606-600>
- Huff, W., Huff, G., Rath, N., Balog, J., & Donoghue, A. (2002). Prevention of *Escherichia coli* infection in broiler chickens with a bacteriophage aerosol spray. *Poultry Science*, 81(10), 1486–1491. <https://doi.org/10.1093/ps/81.10.1486>
- IITD. (n.d.). Phage Therapy Unit of the Medical Centre of the Institute of Immunology and Experimental Therapy PAS. Retrieved May 18, 2018, from <https://www.iitd.pan.wroc.pl/en/OTF/index.html>
- Inal, J. M. (2003). Phage therapy: a reappraisal of bacteriophages as antibiotics. *Archivum Immunologiae et Therapiae Experimentalis*, 51, 237–244. <https://doi.org/10.3389/fphar.2014.00105>
- Jamal, M., Chaudhry, W. N., Hussain, T., Das, C. R., & Andleeb, S. (2015). Characterization of new Myoviridae bacteriophage WZ1 against multi-drug resistant (MDR) *Shigella dysenteriae*. *Journal of Basic Microbiology*, 55(4), 420–431. <https://doi.org/10.1002/jobm.201400688>
- Karthik, K., Muneeswaran, N. S., & Manjunathachar, H. V. (2014). Bacteriophages : Effective Alternative to Antibiotics. *Advances in Animal and Veterinary Sciences*, 2(3), 1–7. <https://doi.org/10.14737/journal.aavs/2014/2.3s.1.7>
- Kaźmierczak, Z., Górski, A., & Dabrowska, K. (2014). Facing antibiotic resistance: *Staphylococcus aureus* phages as a medical tool. *Viruses*, 6(7), 2551–2570. <https://doi.org/10.3390/v6072551>
- Kutter, E., De Vos, D., Gvasalia, G., Alavidze, Z., Gogokhia, L., Kuhl, S., & Abedon, S. (2010). Phage Therapy in Clinical Practice: Treatment of Human Infections. *Current Pharmaceutical Biotechnology*, 11(1), 69–86. <https://doi.org/10.2174/138920110790725401>
- Lin, D. M., Koskella, B., & Lin, H. C. (2017). Phage therapy: An alternative to antibiotics in the age of multi-drug resistance. *World Journal of Gastrointestinal Pharmacology and Therapeutics*, 8(3), 162. <https://doi.org/10.4292/wjgpt.v8.i3.162>
- Lodish, H., Berk, A., Matsudaira, P., Kaiser, C. A., Krieger, M., Scott, M. P., ... Darnell, J. (1986). *Biología Celular y Molecular*. Society, 1092.
- Meurant, G. (1979). *ADVANCES IN APPLIED MICROBIOLOGY*. Pratiyogita Darpan Group (Vol. 7). Retrieved from <http://books.google.gr/books?id=4e3RAZyEf3IC>
- Nocek, J. E., Braund, D. G., & Warner, R. G. (1984). Influence of neonatal colostrum administration, immunoglobulin, and continued feeding of colostrum on calf gain, health, and serum protein. *Journal of Dairy Science*, 67(2), 319–333. [https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302\(84\)81305-3](https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302(84)81305-3)
- Pearl, S., Gabay, C., Kishony, R., Oppenheim, A., & Balaban, N. Q. (2008). Nongenetic individuality in the host-phage interaction. *PLoS Biology*, 6(5), 0957–0964.

- <https://doi.org/10.1371/journal.pbio.0060120>
- Peñafiel, E. M., Ramírez, F. F., & Kawabe, L. K. (2015). The use of bacteriophages in the development of new alternatives in therapy. *The Battle Against Microbial Pathogens: Basic Science, Technological Advances and Educational Programs*, (February 2016), 346–353.
- Pires, D. P., Vilas Boas, D., Sillankorva, S., & Azeredo, J. (2015). Phage Therapy: a Step Forward in the Treatment of *Pseudomonas aeruginosa* Infections. *Journal of Virology*, 89(15), 7449–7456. <https://doi.org/10.1128/JVI.00385-15>
- Prince, A. S. (2012). *Pseudomonas aeruginosa*. In *Principles and Practice of Pediatric Infectious Diseases: Fourth Edition* (p. 842–846.e2). <https://doi.org/10.1016/B978-1-4377-2702-9.00157-4>
- Rhoads, D. D., Wolcott, R. D., Kuskowski, M. A., Wolcott, B. M., Ward, L. S., & Sulakvelidze, A. (2009). Bacteriophage therapy of venous leg ulcers in humans: results of a phase I safety trial. *Journal of Wound Care*, 18(6), 237–243. <https://doi.org/10.12968/jowc.2009.18.6.42801>
- Rodríguez-Rubio, L., Gutiérrez, D., Donovan, D. M., Martínez, B., Rodríguez, A., & García, P. (2016). Phage lytic proteins: Biotechnological applications beyond clinical antimicrobials. *Critical Reviews in Biotechnology*. <https://doi.org/10.3109/07388551.2014.993587>
- Smith, H. W., & Huggins, M. B. (1982). Successful Treatment of Experimental *Escherichia coli* Infections in Mice Using Phage: its General Superiority over Antibiotics. *Journal of General Microbiology*, 128(1982), 307–318. <https://doi.org/10.1099/00221287-128-2-307>
- Smith, H. W., & Huggins, M. B. (1983). Effectiveness of Phages in Treating Experimental *Escherichia coli* Diarrhoea in Calves, Piglets and Lambs. *Microbiology*, 129(8), 2659–2675. <https://doi.org/10.1099/00221287-129-8-2659>
- Stone, J. (2015). New Antibiotic Resistance Report Is The Stuff Of Nightmares. *Forbes*, 1–16. Retrieved from <https://www.forbes.com/sites/judystone/2014/12/12/new-antibiotic-resistance-report-is-the-stuff-of-nightmares/#6032e1f522b1>
- Sulakvelidze, A. (2011). The challenges of bacteriophage therapy. *Industrial Pharmacy*, 45(31), 14–18. <https://doi.org/10.1128/AAC.45.3.649>
- Tortora, G. J., Funke, B. R., & Case, C. L. (2016). Viruses, Viroids, and Prions. In *Microbiology: An Introduction* (Twelfth ed, pp. 1–16). Pearson Education, Ltd.
- UC San Diego Health. (n.d.). Bacteriophage Therapy - UC San Diego Health. Retrieved April 22, 2018, from <https://health.ucsd.edu/news/topics/phage-therapy/Pages/default.aspx>
- Ul Haq, I., Chaudhry, W. N., Akhtar, M. N., Andleeb, S., & Qadri, I. (2012). Bacteriophages and their implications on future biotechnology: A review. *Virology Journal*, 9(1), 9. <https://doi.org/10.1186/1743-422X-9-9>
- Vähä-Koskela, M. (2008). Archivum Immunologiae et Therapiae Experimentalis: Preface. *Archivum Immunologiae et Therapiae Experimentalis*, 56(1 SUPPL.), 1s. Retrieved from <http://www.embase.com/search/results?subaction=viewrecord&from=export&id=L354164440http://sfx.library.uu.nl/utrecht?sid=EMBASE&issn=0004069X&id=doi:&atitle=Archivum+Immunologiae+et+Therapiae+Experimentalis%3A+Preface&stitle=Arch.+Immunol.+Ther.+Exp.&title>

- Ventola, C. L. (2015). The antibiotic resistance crisis: part 1: causes and threats. *P & T: A Peer-Reviewed Journal for Formulary Management* (2015), 40(4), 277–283. <https://doi.org/Article>
- Verbeken, G., Pirnay, J. P., Lavigne, R., Jennes, S., De Vos, D., Casteels, M., & Huys, I. (2014). Call for a dedicated European legal framework for bacteriophage therapy. *Archivum Immunologiae et Therapiae Experimentalis*, 62(2), 117–129. <https://doi.org/10.1007/s00005-014-0269-y>
- Verma, V., Harjai, K., & Chhibber, S. (2010). Structural changes induced by a lytic bacteriophage make ciprofloxacin effective against older biofilm of *Klebsiella pneumoniae*. *Biofouling*, 26(6), 729–737. <https://doi.org/10.1080/08927014.2010.511196>
- Villa, T. G., & Veiga-Crespo, P. (2010). Advantages and disadvantages in the use of antibiotics or phages as therapeutic agents. o Title. *Enzybiotics: Antibiotic Enzyme, and Therapeutics*, 27–58.
- Wittebole, X., De Roock, S., & Opal, S. M. (2013). A historical overview of bacteriophage therapy as an alternative to antibiotics for the treatment of bacterial pathogens. *Virulence*, 5(1), 226–235. <https://doi.org/10.4161/viru.25991>
- Xu, Y., Liu, Y., Liu, Y., Pei, J., Yao, S., & Cheng, C. (2015). Bacteriophage therapy against Enterobacteriaceae. *Virologica Sinica*, 30(1), 11–18. <https://doi.org/10.1007/s12250-014-3543-6>