

Autores: Pilar García, Beatriz Martínez, Lorena Rodríguez, Diana Gutiérrez y Ana Rodríguez

Centro: Instituto de Productos Lácteos de Asturias (IPLA-CSIC). Apdo. 85. 33300-Villaviciosa, Asturias.

E-mail: pgarcia@ipla.csic.es

Teléfono: +34 985 89 21 31

Fax: +34 985 89 22 33

Título: Virus frente a bacterias: otras armas en la lucha contra enfermedades infecciosas

Antecedentes

Uno de los grandes retos de la medicina y de la veterinaria actual es encontrar nuevos agentes antimicrobianos capaces de combatir las infecciones producidas por las bacterias resistentes a los antibióticos. En el campo de la sanidad animal el problema es incluso más complejo, ya que multitud de bacterias zoonóticas son causantes de infecciones también en humanos. Por otro lado, es bien conocido que el uso indiscriminado de antibióticos en ciertos sectores de la producción animal ha favorecido la selección de bacterias resistentes a los antibióticos que ahora encontramos en clínica. De hecho, la necesidad de nuevos sistemas de control de patógenos ha sido el caldo de cultivo para el resurgir de alternativas como la terapia fágica, que a pesar de haber sido descubierta hace mucho tiempo, había quedado relegada a un segundo plano.

La terapia fágica y los enzibióticos

La terapia fágica, es decir, el uso de los fagos para tratar enfermedades infecciosas, fue descubierta a principios del siglo XX por Felix d'Herelle, y se utilizó durante varios años. El descubrimiento de los antibióticos en 1942 y su gran éxito propició que los fagos dejaran de utilizarse en la mayor parte de Europa, a excepción de los países del Este. Actualmente, preparaciones terapéuticas de fagos continúan utilizándose en Polonia, Rusia y Georgia (antigua república soviética) de manera paralela a los antibióticos.

La terapia fágica se basa en la capacidad que tienen algunos fagos de actuar como agentes antimicrobianos, lo que permite utilizarlos para eliminar las bacterias patógenas que originan una determinada infección. Los fagos, o bacteriófagos, son virus que infectan y matan únicamente a bacterias, siendo totalmente inocuos para personas, animales, plantas y para el medio ambiente. Su potencial como antimicrobianos se debe a su particular ciclo de desarrollo (Fig. 1). Éste implica una serie de etapas en las cuales las partículas fágicas se multiplican en el interior de la bacteria para finalmente ser liberadas al exterior. Esta última fase lleva consigo la muerte de la bacteria y es, por tanto, la base del modo de acción de estos antimicrobianos.

La lisis bacteriana originada por los fagos se produce por la acción de ciertas proteínas fágicas llamadas endolisinas. Éstas son capaces de destruir las envueltas que

protegen a la bacteria, lo que ocasiona su lisis. Se ha observado que estas proteínas, las *endolisinas*, pueden actuar también sobre la bacteria cuando se añaden desde el exterior de la misma (Fig. 2). Esto les confiere capacidad antimicrobiana y, por tanto, podrían ser utilizadas como una alternativa a los antibióticos. Por esta razón se han denominado enzibióticos.

Varias características hacen a los fagos y a las endolisinas atractivos para ser utilizados en el control de patógenos en multitud de campos. Entre sus principales ventajas cabe señalar las siguientes:

- a) los fagos son agentes naturales extraordinariamente abundantes, que se encuentran de forma habitual en el ambiente, (en muestras de suelo se han aislado en torno a 10^8 partículas por gramo);
- b) son altamente específicos, por lo que únicamente eliminan a la bacteria patógena, permaneciendo inalterada el resto de la microbiota;
- c) son efectivos incluso sobre bacterias resistentes a los antibióticos;
- d) la capacidad de multiplicación de los fagos sobre la bacteria sensible aumenta aún más su eficacia;
- e) hasta el momento no se han descrito bacterias resistentes a las endolisinas.

Todas estas ventajas hacen que se estén estudiando múltiples aplicaciones, tanto para fagos como para endolisinas, y que numerosas empresas de biotecnología hayan iniciado líneas de investigación en este campo en varios países (Tabla 1). De hecho, ya se están comercializando productos basados en fagos con aplicaciones tanto terapéuticas como profilácticas. Así por ejemplo, en terapia humana existe *PhageBioDerm*TM, un polímero biodegradable impregnado con antibióticos y fagos que es activo frente a *Pseudomonas aeruginosa*, *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli*, *Streptococcus*, y *Proteus*. En el campo de la agricultura, *AgriPhage*TM es un producto constituido por una mezcla de fagos activos frente a bacterias patógenas de plantas y tiene como finalidad combatir ciertas enfermedades en cosechas vegetales. En el área de la alimentación, *Listex P100*TM es un producto que combina seis fagos para erradicar *Listeria monocytogenes* de algunos alimentos. En sanidad animal, *ListShield*TM (6 fagos) y *EcoShield*TM (3 fagos), productos activos contra *Listeria monocytogenes* y *E. coli* O157:H7, respectivamente, son utilizados para la profilaxis de animales, con objeto evitar el acceso de estas bacterias a la cadena alimentaria.

Nuevos antimicrobianos frente a *Staphylococcus aureus*

En el caso concreto de la mastitis causada por *S. aureus*, hay varios estudios en marcha, encaminados a evaluar las posibilidades que la terapia fágica puede tener como una alternativa en el tratamiento y en la prevención de esta infección. Con ese objetivo se han aislado y caracterizado un número considerable de fagos que infectan específicamente a cepas de *S. aureus* causantes de mastitis (García et al., 2009, O'Flaherty et al., 2005; Son et al., 2010a). Se ha comprobado que estos fagos son capaces de infectar y eliminar suspensiones bacterianas de *S. aureus* en condiciones de laboratorio, aunque únicamente los fagos aislados de los ambientes lácteos son eficaces en leche (Fig. 3A) (García et al., 2009). Sin embargo, el único ensayo *in vivo* realizado hasta ahora para tratar animales afectados por mastitis estafilocócica subclínica ha utilizado infusiones intramamarias del fago K. La baja efectividad observada (sólo se curaron el 17% de los cuarterones infectados) ha sido atribuida a la inhibición del fago por factores presentes en la glándula mamaria) (Gill et al., 2006),

Por otro lado, se está trabajando también en el diseño de enzibióticos específicos frente a *S. aureus*. Se han purificado varias endolisinas que son efectivas frente a todas las cepas de *S. aureus* y se ha comprobado su eficacia a nivel de laboratorio (Fig. 3B)

(Donovan et al., 2006). Incluso se han diseñado mediante ingeniería genética versiones más activas de estas proteínas, capaces de eliminar a la bacteria patógena de manera muy específica y eficaz (Manoharadas et al., 2009). Además, se ha observado cómo la acción de estas proteínas puede potenciarse al combinarlas con otros agentes antibacterianos (García et al., 2010; Daniel et al., 2010). Sin embargo, no se han realizado aún ensayos en animales para el tratamiento de la mastitis con enzibióticos. No obstante, los datos de los que disponemos indican que estas proteínas son eficaces en leche (Obeso et al., 2008). Cabe señalar además que se han utilizado endolisinas en animales de experimentación para eliminar *S. aureus* de las fosas nasales (Fenton et al., 2010), así como para el tratamiento de infecciones sistémicas y para la eliminación de la bacteria de la piel (Gu et al., 2011; Pasiaga et al., 2011).

El conocimiento actual a cerca de la biología de los fagos y del modo de acción de las endolisinas, permite iniciar trabajos de experimentación en animales que confirmen la eficacia de estos agentes *in vivo* en el tratamiento de la mastitis. Inicialmente, se podrían diseñar protocolos de ensayo para tratamientos profilácticos, en los cuales se evaluaría si se puede eliminar la bacteria de la superficie de las ubres, de las pezoneras y del ambiente de los animales. En este sentido, la aplicación de fagos y endolisinas como desinfectantes es una de las aplicaciones que se baraja también en otros campos, como el hospitalario o el alimentario. Se ha observado que *S. aureus*, al igual que muchas bacterias, es frecuentemente resistente a los efectos de los compuestos que se utilizan en la limpieza de las instalaciones y también a los antibióticos, debido a su capacidad para formar estructuras complejas que se denominan biofilms o biopelículas (Fig. 4). En estas estructuras las bacterias se adhieren a las superficies, tanto bióticas como abióticas, y sintetizan sustancias extracelulares que las protegen de los factores ambientales desfavorables. Es por ello, que las bacterias permanecen en superficies en las que el acceso de los desinfectantes es limitado. Varios estudios ya han demostrado la eficacia de fagos y endolisinas para eliminar las biopelículas de *S. aureus* en ensayos de laboratorio (Son et al., 2010b). Queda ahora por trasladar estos resultados al ambiente de las granjas y ver si ambos tipos de agentes pueden constituir una alternativa a los sistemas de limpieza y desinfección actuales y reducir la presencia de *S. aureus* en estos ambientes.

Conclusiones

La necesidad actual de nuevos agentes antimicrobianos para luchar contra las bacterias resistentes a los antibióticos ha propiciado el resurgir de la terapia fágica. El uso de fagos y endolisinas como antimicrobianos ofrece nuevas vías para el tratamiento y la profilaxis de infecciones como la mastitis. La base del conocimiento de fagos y endolisinas frente a *S. aureus* es lo suficientemente sólida como para iniciar los ensayos a nivel de campo y por tanto, esperamos que los prometedores resultados obtenidos en el laboratorio puedan corroborarse con estudios en animales.

Referencias

Daniel A, Euler C, Collin M, Chahales P, Gorelick KJ, Fischetti VA. 2010. Synergism between a novel chimeric lysin and oxacillin protects against infection by methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *Antimicrob. Agents Chemother.* 54(4):1603-1612.

Donovan DM, Lardeo M, Foster-Frey J. 2006. Lysis of staphylococcal mastitis pathogens by bacteriophage phi11 endolysin. *FEMS Microbiol. Lett.* 265(1):133-139.

Fenton M, Casey PG, Hill C, Gahan CG, Ross RP, McAuliffe O, O'Mahony J, Maher F, Coffey A. 2010. The truncated phage lysin CHAP(k) eliminates *Staphylococcus aureus* in the nares of mice. *Bioeng. Bugs.* 1(6):404-407.

García P, Madera C, Martínez B, Rodríguez A, Suárez J E. 2009. Prevalence of bacteriophages infecting *Staphylococcus aureus* in dairy samples and their potential as biocontrol agents. *J. Dairy Sci.* 92: 3019-3026.

García P, Martínez B, Rodríguez L, Rodríguez A. 2010. Synergy between the phage endolysin LysH5 and nisin to kill *Staphylococcus aureus* in pasteurized milk. *Int. J. Food Microbiol.* 15;141(3):151-155.

Gill JJ, Pacan JC, Carson ME, Leslie KE, Griffiths MW, Sabour PM. 2006. Efficacy and pharmacokinetics of bacteriophage therapy in treatment of subclinical *Staphylococcus aureus* mastitis in lactating dairy cattle. *Antimicrob. Agents Chemother.* 50(9):2912-2918.

Gu J, Zuo J, Lei L, Zhao H, Sun C, Feng X, Du C, Li X, Yang Y, Han W. 2011. LysGH15 reduces the inflammation caused by lethal methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* infection in mice. *Bioeng. Bugs.* 2(2):96-99.

Manoharadas S, Witte A, Bläsi U. 2009. Antimicrobial activity of a chimeric enzymatic towards *Staphylococcus aureus*. *J. Biotechnol.* 139(1):118-23.

Obeso J M, Martínez B, Rodríguez A, García P. 2008. Lytic activity of the recombinant staphylococcal bacteriophage PhiH5 endolysin active against *Staphylococcus aureus* in milk. *Int. J. Food Microbiol.* 128: 212-218.

O'Flaherty S, Ross RP, Flynn J, Meaney WJ, Fitzgerald GF, Coffey A. 2005. Isolation and characterization of two anti-staphylococcal bacteriophages specific for pathogenic *Staphylococcus aureus* associated with bovine infections. *Lett. Appl. Microbiol.* 41(6):482-486.

Pastagia M, Euler C, Chahales P, Fuentes-Duculan J, Krueger JG, Fischetti VA. 2011. A novel chimeric lysin shows superiority to mupirocin for skin decolonization of methicillin-resistant and -sensitive *Staphylococcus aureus* strains. *Antimicrob. Agents Chemother.* 55(2):738-744.

Son JS, Kim EB, Lee SJ, Jun SY, Yoon SJ, Kang SH, Choi YJ. 2010a. Characterization of *Staphylococcus aureus* derived from bovine mastitis and isolation of two lytic bacteriophages. *J. Gen. Appl. Microbiol.* 56(4):347-353.

Son JS, Lee SJ, Jun SY, Yoon SJ, Kang SH, Paik HR, Kang JO, Choi YJ. 2010b. Antibacterial and biofilm removal activity of a podoviridae *Staphylococcus aureus* bacteriophage SAP-2 and a derived recombinant cell-wall-degrading enzyme. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 86(5):1439-1449.

Tablas

Tabla 1. Principales empresas de biotecnología que han iniciado el estudio de fagos para el biocontrol de patógenos.

Empresa	País	Página Web	Aplicación
Gangagen	USA	http://www.gangagen.com/	Infecciones en humanos
Intralytix	USA	http://www.intralytix.com/	Seguridad alimentaria
Omnilytics	USA	http://www.phage.com/home5.html	Cosechas vegetales (Agriphage)
Phage Biotech	Israel	http://www.phage-biotech.com/	Infecciones en humanos
Hexal Genentech	Germany	http://www.hexal-gentech.com/index.html	Infecciones en humanos
Novolytics	UK	http://www.novolytics.co.uk/	Infecciones en humanos
Biophage Inc.	Canadá	http://www.biophagepharma.net/index.html	Ambientales, humanos y animales
Biopharm Pharmaceuticals	Georgia	http://www.biopharmservices.com/Pharma.aspx	Infecciones en humanos
EBI Food Safety	Netherlands	http://www.ebifoodsafety.com	Seguridad alimentaria (Listex P100TM)
BigDNA	UK	(http://www.bigdna.com/)	Infecciones en animales
JSC Biochimpharm	Georgia	(http://www.biochimpharm.ge/)	Infecciones en humanos
Biocontrol	UK	(http://www.biocontrol-ltd.com/)	Infecciones en humanos
Innophage	Portugal	(http://www.innophage.com/)	Infecciones en humanos
Phico Therapeutics	UK	(http://www.phicotherapeutics.co.uk/)	Infecciones en humanos
Phage International	USA, Georgia	(http://www.phageinternational.com/)	Infecciones en humanos
Targanta Therapeutics	USA	(http://www.targanta.com/)	Infecciones en humanos
Viridax	USA	(http://www.viridax.com/)	Infecciones en humanos

Figuras

Figura 1. Morfología y ciclo de vida de un fago. A) Imagen al microscopio electrónico de una partícula fágica. B) Esquema del ciclo de multiplicación de un fago: 1. Adsorción a la bacteria sensible, 2. Inyección del material genético, 3. Replicación del material genético, 4. Síntesis y ensamblaje de las proteínas estructurales, 5. Lisis de la bacteria que provoca la muerte celular.

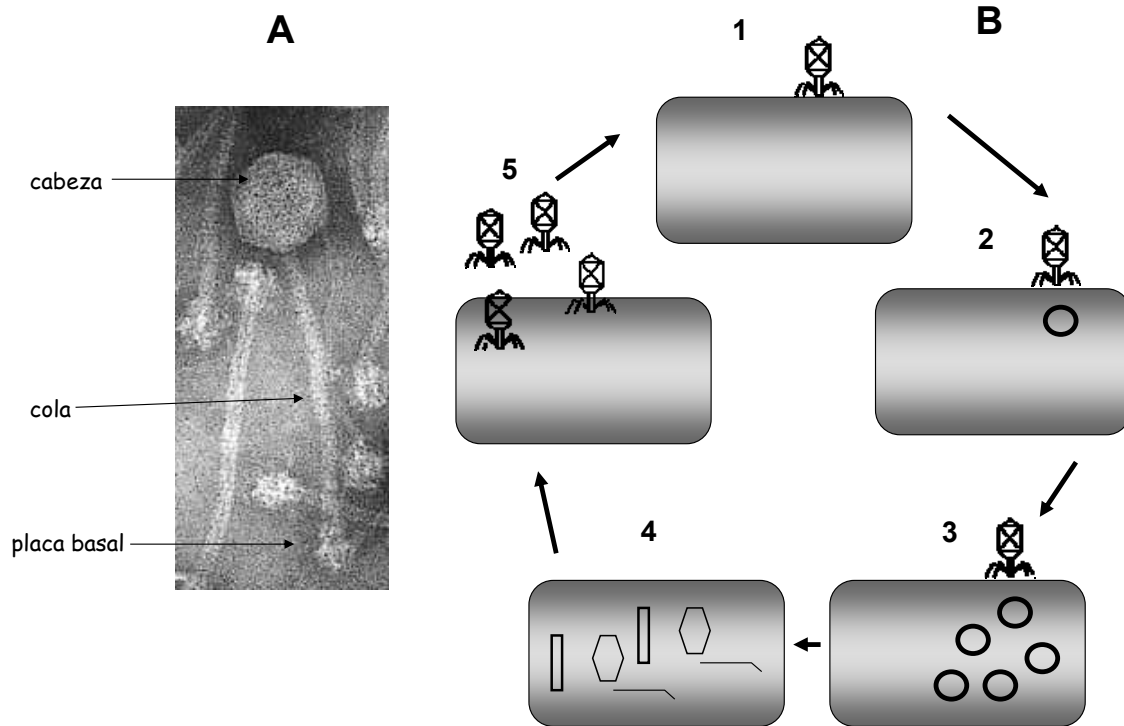


Figura 2. Modo de acción de una endolisina sobre una suspensión bacteriana. 1, suspensión bacteriana control; 2, suspensión bacteriana tratada con endolisina.

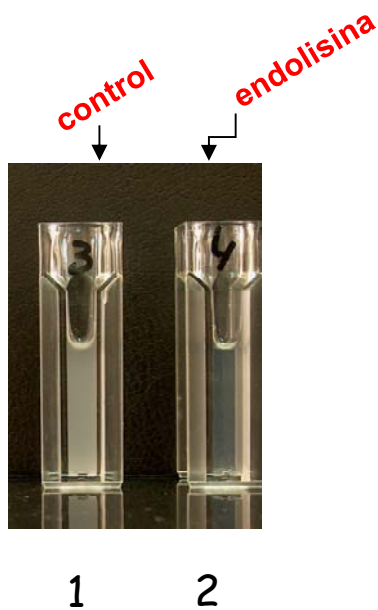


Figura 3. Eficacia *in vitro* de la inhibición del crecimiento de *S. aureus* en presencia de fagos específicos (A) y reducción del número de bacterias en suspensión en presencia de endolisina (B).

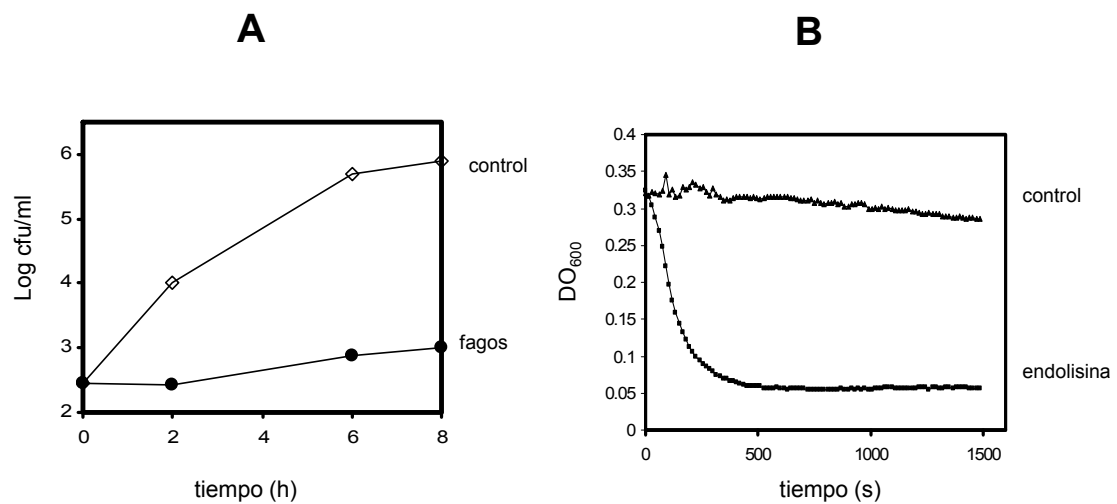


Figura 4. Representación esquemática de los diferentes estadios en la formación de un biofilm (o biopelícula). En determinadas superficies difícilmente accesibles, algunas células bacterianas pueden depositarse y multiplicarse, a la par que sintetizan compuestos extracelulares que mantienen a las células unidas y protegidas frente a la acción de desinfectantes. Una vez maduras, estas biopelículas son responsables de contaminaciones recurrentes ya que las células pueden desprenderse de la misma.

