

Procedimiento de Microbiología Clínica

Recomendaciones de la Sociedad Española de
Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica



79.

FAGOTERAPIA, manejo en el laboratorio

Editores

Miriam J. Álvarez-Martínez
Patricia Ruiz Garbajosa

Coordinador

M^a del Mar Tomás

Autores

Lucía Blasco
Meritxell De Jesús García-Quintanilla
Jaime Esteban
José Ramon Paño
Jesús Oteo-Iglesias
María Del Mar Tomás



ISBN: 978-84-09-59439-9

EDITORES:

Miriam J. Álvarez-Martínez. Servicio de Microbiología, Hospital Clínic de Barcelona. Departamento de Fundamentos Clínicos, Facultad de Medicina y Ciencias de la Salud, Universidad de Barcelona. Patricia Ruiz Garbajosa, Jefa de Sección. Servicio de Microbiología Hospital Universitario Ramón y Cajal, Madrid

SUGERENCIA DE CITACIÓN:

Tomás M., Blasco L., De Jesús M., Esteban J., Paño J. R., Oteo-Iglesias J., V. 2023. 1. FAGOTERAPIA, manejo en el laboratorio. Tomás M. (coordinadora). Procedimientos en Microbiología Clínica. Álvarez Martínez M.J, Ruiz Carbajosa P. (editores). Sociedad Española de Enfermedades Infecciosas y Micro-biología Clínica (SEIMC). 2023.

AVISO:

Reservados todos los derechos. Los documentos SEIMC o cualquiera de sus partes no podrán ser reproducidos, almacenados, transmitidos, distribuidos, comunicados públicamente o transformados mediante ningún medio o sistema sin la previa autorización de sus responsables, salvo excepción prevista por la ley. Cualquier publicación secundaria debe referenciarse incluyendo “Este documento ha sido elaborado por la SEIMC (Sociedad Española de Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica) y su contenido puede encontrarse en la página web www.seimc.org”

Procedimientos en Microbiología Clínica

Recomendaciones de la Sociedad Española de
Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica

Editores:

Miriam J. Álvarez-Martínez
Patricia Ruiz Garbajosa

79. FAGOTERAPIA, manejo en el laboratorio. 2023

Coordinadora:

María Del Mar Tomás^{1,2,7}

Autores:

Lucía Blasco^{1,2},
Meritxell De Jesús García-Quintanilla^{3,7},
Jaime Esteban^{3,6,7},
José Ramon Paño^{4,6,7*}
Jesús Oteo-Iglesias^{2,5,6,7*}
María Del Mar Tomás^{1,2,7 *}

* Comparten última autoría



¹. Grupo de Microbiología Traslacional y Multidisciplinar (MicroTM)-Instituto de Investigación Biomédica de A Coruña (INIBIC), Departamento de Microbiología-Hospital de A Coruña (CHUAC); Universidad de A Coruña (UDC), A Coruña, España.

². Grupo de Estudio sobre Mecanismos de Acción y Resistencia a los Antimicrobianos (GEMARA) en representación de la Sociedad Española de Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica (SEIMC).

³. Departamento de Microbiología Clínica-Instituto de Investigación Sanitaria Fundación Jiménez Díaz, Madrid, España.

⁴. Hospital Clínico Universitario "Lozano Blesa". Instituto de Investigación Sanitaria Aragón. Zaragoza, España.

⁵. Laboratorio de Referencia e Investigación de Resistencias Antibióticas e Infecciones Sanitarias, Centro Nacional de Microbiología, Instituto de Salud Carlos III, Majadahonda, Madrid, España.

⁶. CIBER de Enfermedades Infecciosas (CIBERINFEC), Instituto de Salud Carlos III, Madrid, España.

⁷. MePRAM, Proyecto de Medicina de Precisión contra las resistencias Antimicrobianas.

INDICE DE CONTENIDOS

1.	Introducción.....	5
2.	Consideraciones clínicas.....	5
3.	Recogida de Muestras. Fagos líticos ambientales.....	7
4.	Transporte y conservación de los Fagos.....	7
5.	Caracterización de la actividad infectiva.....	7
6.	Caracterización genotípica.....	9
7.	Adaptación al huésped y desarrollo de cócteles.....	9
8.	Sinergia con los antibióticos	10
9.	Purificación y concentración.....	10
10.	Estudios preclínicos.....	11
11.	Bibliografía.....	11

DOCUMENTOS TÉCNICOS

INDICE DE LOS DOCUMENTOS TÉCNICOS

PNT-FT-01. FAGOTERAPIA, manejo en el laboratorio OBTENCIÓN DE FAGOS. AGUAS RESIDUALES Y OTROS AMBIENTES

PNT-FT-02. FAGOTERAPIA, manejo en el laboratorio AISLADOS AMBIENTALES y BANCOS de FAGOS

1. INTRODUCCIÓN

Los bacteriófagos (también denominados fagos), son virus que infectan y se replican dentro de las bacterias de forma específica. Son los microorganismos más abundantes y diversos del planeta, superando 10 veces en número a las bacterias ya que se estima un número total de más de 10^{30} . Los fagos representan una de las fuentes de depredación más habituales que actúan sobre las comunidades bacterianas (1).

Los dos sistemas de replicación de los virus más conocidos son el ciclo lítico y el ciclo lisogénico. Los fagos que siguen un ciclo de vida lítico infectan y lisan rápidamente a la célula huésped, lo que los hace más fiables para su uso en terapia fágica, ya que el resultado final es la erradicación de las células bacterianas. Por el contrario, los fagos lisogénicos se integran en el genoma de su huésped bacteriano, llegando a modificar su fenotipo mediante la expresión de genes virales, proceso que se conoce como conversión lisogénica (2).

2. CONSIDERACIONES CLÍNICAS

Los bacteriófagos como terapia se han utilizado desde principios del siglo pasado, tanto en humanos como en animales. Aunque su uso en humanos se abandonó en los países occidentales a favor de las terapias con antibióticos, la terapia con fagos continuó practicándose en Europa del Este (3). En unos 62 países (por ejemplo, Georgia), el uso de la terapia con fagos en humanos nunca se ha detenido y aún se aplica, principalmente contra bacterias patógenas resistentes a los antimicrobianos (AMR). Dentro de la medicina veterinaria, se ha utilizado la terapia con fagos en pollos, bovinos y cerdos (4) y se definen como nuevas terapias (NT) en veterinaria por el Reglamento (UE) 2019/6 (5).

Actualmente, los bacteriófagos están reapareciendo en el arsenal terapéutico como una posible alternativa a la terapia con antibióticos (o para complementar esta última) como terapia de rescate en un callejón sin salida terapéutico, debido a la creciente resistencia a los antibióticos. Algunos estudios muestran sinergias entre fagos y antibióticos, a menudo caracterizadas por una menor aparición de resistencia a antibióticos y/o fagos en bacterias (6).

La base de evidencia para el uso de los fagos como antimicrobiano es sólida en lo que respecta a seguridad, suponiendo una preparación adecuada del material terapéutico, pero es débil en relación con la eficacia en humanos, así como la farmacodinamia (PK/PD, dosis, vías de administración, etc....) (7), por lo que todavía faltan **ensayos clínicos**.

Las ventajas del uso de los fagos como terapia son: i) especificidad (limitando así daños colaterales a la microbiota humana); ii) capacidad de adaptación *in vivo* a la bacteria; iii) potencial de individualización de la dosificación (es decir, replicación continua hasta que la bacteria objetivo son erradicados); iv) capacidad para ser utilizados como sistemas de entrega (portadores de antibióticos, péptidos pequeños y similares); v) acción sinérgica con los antibióticos; vi) y la posibilidad de tener actividad continua frente a las bacterias. Sin embargo, entre las debilidades del uso de fagoterapia destacan: i) necesidad de disponer de una gran colección de fagos; ii) laboratorios acreditados para la producción a gran escala; iii) adaptación (o resistencia) bacteriana a la terapia fágica siendo necesario la monitorización de los genomas bacterianos mediante técnicas de secuenciación, iv) incertidumbre con respecto a sus aplicaciones de mejor uso (tipo de infecciones, vía de administración, combinación con antimicrobianos); v) y en último lugar, insuficientes marcos normativos para su aplicación en el ámbito sanitario. Estos tres últimos aspectos, deben ser gestionados eficazmente para la implementación de dicha terapia frente a bacterias responsables de la infección.

En relación con las vías regulatorias no resueltas, se está trabajando en diferentes países como España,

Australia, UK y Bélgica entre otros, en un intento de proporcionar información para su uso clínico. Los medicamentos de uso clínico deben seguir las prácticas correctas de fabricación (en inglés, GMP, **Good Manufacturing Practices**) definidas como la garantía de calidad que asegura que dichos medicamentos son elaborados y controlados de acuerdo con las normas de calidad apropiadas para el uso al que están destinados siendo certificables. Todos los medicamentos, independientemente de la vía de autorización, deben estar elaborados con los principios de GMP aplicables al producto.

En la actualidad, existe la oportunidad de establecer integración de la ciencia y la medicina al servicio de la salud pública y en una amplia gama de otras áreas en las que las bacterias tienen el potencial de causar problemas (por ejemplo, agricultura, acuicultura, producción de alimentos, contaminación biológica industrial y biocontaminación).

Microbiólogos clínicos e infectólogos australianos detallan en una publicación reciente las inquietudes, expectativas y prioridades de los profesionales sanitarios en relación con la fagoterapia y su avance en la medicina moderna (8). Se detalla una mayor facilidad de uso de fagos a través de la terapia personalizada mediante la vía de **“Uso compasivo”**, destacando los patógenos gramnegativos como principal objetivo de tratamiento de la infección. Además, se considera clave el establecimiento de procedimientos de laboratorios acreditados para la administración de la fagoterapia, así como la monitorización de la terapia de fagos. En relación con las infecciones de mayor interés para la aplicación de la fagoterapia destacan las relacionadas con la fibrosis quística y las infecciones de los pacientes trasplantados e inmunodeprimidos. La principal barrera para la aplicación de la fagoterapia es la dificultad de accesibilidad y logística para la obtención y administración de fago.

Finalmente, destacar el importante papel de la innovación en la terapia fágica permitiendo la disminución de desarrollo de mecanismos de resistencia a la infección por fagos, así como un mayor rango de infección de cepa huésped, a través de fagos sintéticos desarrollados por ingeniería (9) o modificados genéticamente (10), así como la purificación de proteínas derivadas de los fagos como lisinas y depolimerasas, las cuales podrían ser administradas en combinación con antimicrobianos (11).

En el momento actual la AEMPS considera que los fagos en terapéutica humana deben ser considerados un medicamento, a pesar de todas sus particularidades.

Como tal, para su utilización en terapia humana los productos basados en fagos deben cumplir con las normas de correcta fabricación aplicables al producto <https://www.aemps.gob.es/industria-farmaceutica/%20guia-de-normas-de-correcta-fabricacion/?lang=gl>, hacer un desarrollo preclínico, y **ensayos clínicos**. En estos momentos, el proyecto MePRAM (“La Medicina de Precisión contra la Resistencia a Antimicrobianos”, desarrollado en el contexto del “Protocolo de actuación conjunta CIBER-SEIMC) está trabajando en la puesta en marcha de un ensayo clínico aleatorizado de descolonización intestinal mediante fagoterapia en portadores intestinales de *K. pneumoniae* productoras de carbapenemasas.

No obstante, la AEMPS reconoce el papel que puede tener la fagoterapia en casos especiales en los que no existan otras opciones terapéuticas, siempre y cuando la producción del fago o combinación de fagos cumplan con los requisitos de calidad establecidos para su administración en humanos. La utilización de fagoterapia para estos pacientes deberá ser solicitada de forma individualizada, aportando información clínica del paciente, así como de la elaboración del fago o combinación de fagos.

Las solicitudes serán tramitadas a través de los Servicios de Farmacia Hospitalaria donde se trate al paciente y debe contactarse previamente con: medicamentosospeciales@aemps.es

3. RECOGIDA DE MUESTRAS. FAGOS LÍTICOS AMBIENTALES

Los fagos se pueden encontrar en cualquier ambiente, siendo el agua su hábitat habitual. Elevadas concentraciones de fagos pueden localizarse en agua dulce, agua de mar y en plantas de tratamientos de residuos. Con menor frecuencia pueden encontrarse fagos en suelos o en material inanimado. Otra fuente de origen de fagos, son los seres humanos, tanto sanos como infectados. Muestras de saliva, piel y heces han mostrado alta concentración de fagos. Finalmente, cabe destacar que en ambientes más hostiles se han detectado fagos con un amplio espectro de acción frente a diversas especies bacterianas.

4. TRANSPORTE Y CONSERVACIÓN DE LOS FAGOS

La muestra recogida se podrá transportar a temperatura ambiente, será conservada a 4°C en el laboratorio y usada como máximo hasta de una semana después de la recogida. Los fagos requieren que se tengan en cuenta las condiciones en las que son estables, ya que al ser básicamente estructuras proteicas son susceptibles a diversos factores que pueden alterar su estabilidad. Todo ello puede generar una reducción del título de fagos durante el almacenaje o durante la producción. Los factores que pueden afectar negativamente a la estabilidad de los fagos son las proteasas, los cambios de temperatura, los cambios en el pH y fuerza iónica (12, 13). Estas medidas se deben establecer individualmente para cada fago o para cada cóctel de fagos como consecuencia de la naturaleza de cada uno de ellos.

5. CARACTERIZACIÓN DE LA ACTIVIDAD INFECTIVA

Una vez aislados los fagos a partir de muestras ambientales es necesario establecer su valor como agentes antimicrobianos, lo que condicionará su uso como terapia fágica. Para ello es necesario enfrentarlos en primer lugar a las bacterias de interés y así establecer su capacidad infectiva.

El análisis de la capacidad infectiva frente a una cepa bacteriana se realiza en primer lugar mediante la técnica del “*spot test*” (14, 15), que consiste en la preparación de placas de doble agar con la bacteria embebida en la capa superior, el depósito de gotas con una solución con fagos sobre esta capa y la observación de presencia de lisis tras un período de incubación. Se considerará que un fago es potencialmente útil frente a una cepa bacteriana concreta cuando sea capaz de producir un punto de lisis transparente, sin ningún tipo de turbidez que indique la aparición de resistencia. Es necesario también descartar el efecto de “*lysis from without*” que consiste en la observación de puntos de lisis derivados de la actividad de las endolisinas acumuladas en las soluciones de fagos (15).

Mediante la técnica de “*spot test*” también es posible establecer el rango de huésped o “*host range*”. Este método consiste en enfrentar el fago con una colección de cepas de interés y hacer una valoración inicial de su capacidad infectiva. Una vez seleccionado las cepas sobre las que tiene una mayor capacidad de infección es necesario establecer la eficiencia de plaqueo o EOP. Esta técnica permite establecer la capacidad de propagación de un fago en una cepa, comparando la capacidad de infección de un fago en una cepa determinada frente a la capacidad de infección del mismo fago sobre su cepa huésped diana. Valores iguales o mayores de 0,5 indican que tiene una buena capacidad para infectar a esa cepa, ya que es igual o superior a la que presenta sobre la cepa huésped diana. De este modo, el fago se seleccionará para continuar con la caracterización si tiene un valor de EOP igual o mayor a 0,5 en la cepa que nos interesa.

La capacidad de infección de los fagos se ve afectada por diversos factores entre los que se encuentran las características de fago, el “*fitness*” de las bacterias y las propiedades del entorno en que ocurre la infección, como es la presencia de iones divalentes en forma de las sales CaCl_2 o MgCl_2 . La determinación de la capacidad infectiva del fago se debe confirmar mediante ensayos de infección en medio líquido, entre ellos

están la curva de adsorción, la “*one step growth curve*” y la curva de infección o de muerte que se realiza con distintas titulaciones de fago/bacteria (16).

El primer paso en la infección es la absorción del fago a la superficie celular que ocurre en tres fases: la fase de contacto en que los fagos interaccionan con la superficie bacteriana; la fase de unión reversible a los receptores de la superficie celular y la que determina la eficacia de la infección, que es la fase de unión irreversible a los receptores presentes en la superficie celular (17).

La curva de adsorción se realiza con el objetivo de seleccionar aquellos fagos que se unan en gran número y en el menor tiempo posible a la bacteria. Para garantizar una buena eficiencia de la infección es recomendable que al menos un 90% de los fagos se adhieran a la bacteria (17).

La “*one step growth curve*” permite establecer la duración de cada una de las fases de la infección y el número de partículas virales generadas por cada célula infectada también conocida como “*burst size*”. La infección por fagos tiene tres fases posteriores a la adsorción: i) fase de eclipse, período en el que no hay viriones completamente formados y que se corresponde con la fase inicial del período de latencia; ii) fase de latencia, en este período existen viriones completos en el citoplasma pero no todavía no han lisado las células; iii) fase de crecimiento o lisis, se corresponde con el período en que los fagos formados dentro de cada célula lisan esta bacteria y son liberados al medio para infectar nuevas bacterias (18).

La obtención de esta curva requiere que inicialmente el cultivo bacteriano se encuentre en fase logarítmica y que esté en las mejores condiciones fisiológicas para que se produzca la replicación del fago. Un punto crítico en esta técnica es la sincronización de la infección, es decir, que todos los fagos comiencen la infección al mismo tiempo. Para ello existen distintas estrategias, como ralentizar la infección justo después de la adsorción del fago, mediante la dilución del cultivo para poner fin a la adsorción del fago o la detención del metabolismo bacteriano durante la adsorción del fago. Cuando se realiza esta curva se asume que un único fago infecta una única célula, para garantizar que esto sea así, se deben emplear multiplicidades de la infección (MOI) lo más próximas a 1 (idealmente 0,1 o 0,001) que sea posible, de forma que la mayoría de las células sean infectadas por un único fago, ya que en caso de emplear MOIs iguales o mayores a uno, aumentaría la posibilidad de que más de un fago infectase una única célula (18).

Un fago ideal para fagoterapia debe ser capaz de propagarse y aumentar su número superando al de la bacteria en el lugar de la infección (19). La velocidad de propagación de los fagos está relacionada con su virulencia, los fagos empleados en terapia deben ser muy virulentos, de forma que un fago con un elevado “*burst size*”, lo que se traduce en una elevada producción de fagos en cada ciclo de replicación, garantiza que un gran número de partículas virales alcancen a las bacterias responsables de la infección sin darles tiempo a dividirse, reduciendo de este modo la capacidad de la bacteria de generar resistencia a los fagos (15).

Una vez conocidas estas características es necesario establecer *in vitro* la capacidad de infección de los fagos en medio líquido, analizando la curva de lisis del cultivo a diferentes MOI del fago. Esto da una idea de la cantidad de fago que habría que utilizar *in vivo*, además de la capacidad de la bacteria para generar resistencia frente al fago.

En la actualidad, se está desarrollando la automatización o semiautomatización de los estudios de la capacidad de infección de los fagos en medio líquido (20). Entre ellos destacan:

i) GKA (*growth kinetics assays*) usando PMA-qPCR. Dicha técnica se basa en el recuento de células bacterianas supervivientes a la exposición a fagos en un cultivo líquido utilizando monoazida de propidio y mediante la detección de bacterias muertas a través de la amplificación por qPCR utilizando cebadores específicos bacterianos (21).

ii) GKA (*growth kinetics assays*) usando citometría de flujo. Se desarrolla la enumeración y evaluación del estado de viabilidad (células vivas, dañadas y muertas) de bacterias células expuestas a fagos en un cultivo líquido, basado en dispersión de luz y fluorescencia usando tintes vivos/muertos (22).

iii) La medición en tiempo real de la densidad óptica de un cultivo bacteriano líquido ante la presencia de fagos en una placa de 96 pocillos usando un sistema automatizado de lectura de la densidad óptica a lo largo del tiempo en un ambiente de incubación aireado (23)

6. CARACTERIZACIÓN GENOTÍPICA

Una vez seleccionado el fago por su capacidad infectiva es necesario analizar su genoma a fin de detectar la presencia de genes que los puedan invalidar para su uso en terapia, pero también la de otros genes que los puedan favorecer como candidatos para la terapia fágica.

Los factores principales que se deben evaluar para considerar a un fago seguro para terapia son: que tenga actividad antibacteriana, el estilo de vida (lítico o lisogénico) y que no posea genes deletéreos. El primero de los factores solo se puede determinar de manera experimental, pero los otros dos se pueden establecer mediante el análisis genómico del fago (24).

El ciclo de vida de los fagos se confirma mediante análisis del genoma en función de la presencia de genes relacionados con la lisogenia, como son las integrasas, recombinasas, CI, CII y Cro; existen herramientas bioinformáticas que permiten hacer este análisis como por ejemplo el *Phage Classification Tool Set* (PHACTS) (25). En caso de detectar cualquier gen que relacione el fago de estudio con el ciclo lisogénico, el fago debe ser descartado como candidato para terapia. Los fagos también serán descartados en el caso de que se identifique cualquier gen relacionado con resistencia a antibióticos, factores de virulencia, toxinas o elementos transductores (24).

El proceso para obtener el genoma de los fagos que se emplearán en terapia fágica incluye: i) obtener una secuencia de genoma completo de alta calidad; ii) identificar los *Open Reading Frames* (ORF); iii) anotar los genes cuyas funciones se hayan identificado con herramientas bioinformáticas; iv) búsqueda de marcadores genéticos deletéreos; v) verificar que la secuencia es representativa de la población y vi) confirmar la ausencia de contaminaciones.

7. ADAPTACIÓN AL HUÉSPED Y DESARROLLO DE CÓCTELES

Generalmente, los fagos se caracterizan por su especificidad frente al huésped, por lo que una de las estrategias para alcanzar un amplio rango de huésped es la combinación de distintos fagos en forma de “cócteles de fagos”. Idealmente, un cóctel de fagos tiene que ser capaz de eliminar al menos el 70-80% de las cepas clínicas diana. El uso de cócteles de fagos también reduce el desarrollo de resistencias bacterianas frente a las infecciones por fagos.

Existen una serie de características deseables en los fagos para su inclusión en un cóctel, como que tengan un efecto inmunomodulador en el paciente o que el desarrollo de la resistencia bacteriana que puedan generar sea a costa de el “*fitness*” de la bacteria, de forma que se traduzca por ejemplo en la reducción de la virulencia (19).

Los cócteles de fagos no deben ser mezclas aleatorias de fagos, ya que cada fago puede interferir con la capacidad de infección del resto de los componentes del cóctel. Esta interferencia puede ser tanto sinérgica como antagónica, por ello los efectos de las distintas combinaciones deben ser analizadas sobre las cepas por el método Appelmans (20). Si un fago candidato demuestra una mayor eficiencia colectivamente que individualmente, la interferencia positiva con los fagos del cóctel está garantizada (19).

Como consecuencia de la estructura poblacional de las bacterias, que puede ser clonal (o epidémica) y panmíctica, el rango de actividad de los fagos depende mayoritariamente de la especie bacteriana. Así, para analizar la actividad de los cócteles de fagos se debería disponer de una colección de aproximadamente unas 50 cepas clínicas circulantes de la especie bacteriana a estudio (19).

Las bacterias tienen una alta capacidad de generar resistencia frente a los fagos. Una forma de vencer esta resistencia es el uso de cócteles de fagos, ya que, aunque se genere resistencia frente a un fago del cóctel la bacteria continúe siendo sensible al resto de fagos que constituyen el cóctel. Además de esto, otra forma de superar la resistencia bacteriana frente a los fagos, consiste en la adaptación de los fagos a la bacteria, ya que ambos microorganismos evolucionan conjuntamente en una “carrera armamentística”. El aprovechamiento de esta coevolución para la terapia fágica se conoce como adaptación de los fagos o entrenamiento de fagos (26, 27). En la actualidad, se han descrito un importante número de mecanismos de adaptación o resistencia de la bacteria al fago (28).

Mediante el proceso de adaptación, siguiendo el método Appelmans, los fagos se propagan en contacto con la bacteria sobre la cual se desee incrementar la actividad infectiva, de forma que cada día se recupera el fago y se vuelve a infectar la bacteria que se denomina ancestral. De esta forma se consigue que el fago evolucione y consiga vencer la resistencia de la bacteria (29).

Los fagos se pueden adaptar de manera individual y luego ser combinados para la creación de un cóctel o bien adaptar todo el cóctel de manera conjunta. El objetivo de la creación de un cóctel es que la capacidad infectiva del cóctel sea mayor que la de los fagos que lo conforman si actuaran de manera independiente, también se pretende con el uso de los cócteles reducir la capacidad de la bacteria para generar resistencia.

8. SINERGIA CON LOS ANTIBIÓTICOS

Múltiples trabajos han analizado la actividad sinérgica de los fagos con los antibióticos (30) mostrando varias importantes conclusiones: i) Diferentes interacciones entre el fago y el antibiótico son fuertemente afectados por la clase de antibióticos; ii) Los fagos generalmente reducen la concentración mínima inhibitoria (MIC) del antibiótico; iii) La combinación de fagos y los antibióticos modulan la adaptación (resistencia) bacteriana; iv) La resistencia bacteriana hacia los antibióticos impacta en la terapia de combinación; v) Factores del paciente tales como el tipo de muestra, afecta a estos tipos de interacciones; y finalmente vi) Fagos similares pueden producir resultados dramáticamente diferentes. Por todo ello, es necesario analizar la combinación de cada cóctel de fagos con un antibiótico o un fago combinado con múltiples antibióticos. Además, determinar la eficacia de un cóctel de fagos combinado con antibióticos en sistemas huésped complejos (pacientes), el efecto de tratamiento simultáneo versus secuencial para reducir las interacciones antagónicas, y los mecanismos reales que producen cada efecto sinérgico y antagónico en combinación (31).

9. PURIFICACIÓN Y CONCENTRACIÓN

Los procesos por los cuales se obtienen los fagos que posteriormente se aplicarán en terapia conllevan la lisis de cultivos bacterianos, lo que supone la presencia de restos bacterianos en el medio. Entre otros componentes hay endotoxinas (lipopolisacáridos), peptidoglicano, exotoxinas, flagelos y ácidos nucleicos. Antes de administrar los preparados de fagos es necesario que estos compuestos se hayan eliminado para evitar reacciones adversas como inflamación, sepsis y shock séptico.

Hasta la fecha, las endotoxinas son las principales sustancias con posibles efectos deletéreos que deben ser eliminadas mediante técnicas de purificación antes de su uso, evitando una dilución excesiva del preparado. La técnica más utilizada es la cromatografía seguida de un proceso de concentración mediante ultrafiltración para obtener concentraciones de fagos elevadas en volúmenes bajos (32).

La purificación y concentración de fagos es necesaria tanto para la aplicación en humanos como para su uso en modelos animales.

10. ESTUDIOS PRECLÍNICOS

Previamente a la aplicación de los preparados de fagos en humanos es recomendable hacer estudios preclínicos para confirmar su eficacia y ausencia de toxicidad.

Estos estudios incluyen ensayos con fagos en cultivos celulares y estudios en modelos animales, que pueden ser desde estudios en insectos, como la larva de la polilla de la miel, *Galleria mellonella*, hasta estudios en modelos murinos.

Los estudios en células humanas se realizan para determinar si los medicamentos u otros productos tienen efectos sobre la proliferación celular o si provocan citotoxicidad. En el caso de los estudios de fagos en cultivos de células humanas se deben desarrollar para confirmar la ausencia de toxicidad de los preparados de fagos midiendo la viabilidad de las células (32, 33).

Los estudios *in vivo* se pueden realizar con insectos como *G. mellonella*, que permiten establecer si la administración de preparados de fagos tiene un efecto tóxico en las larvas mediante estudios de supervivencia de las larvas de estas polillas. Estos insectos presentan varias características que los hacen adecuados como modelos de estudio de infecciones y tratamientos, ya que tienen un ciclo de vida corto, son muy manejables, se incuban a 37°C, se pueden aplicar dosis precisas y los costes de mantenimiento son bajos. Además, tienen respuesta inmune innata celular y humoral (34,35).

En relación con los estudios animales, especialmente ratones, son múltiples los trabajos que se han llevado a cabo confirmando la ausencia de toxicidad en el tratamiento de infecciones a través de fagos en múltiples localizaciones (36).

11. BIBLIOGRAFÍA

1. Elois MA, Silva RD, Pilati GVT, Rodríguez-Lázaro D, Fongaro G. Bacteriophages as Biotechnological Tools. *Viruses*. 2023;15(2).
2. Gordillo Altamirano FL, Barr JJ. Phage Therapy in the Postantibiotic Era. *Clin Microbiol Rev*. 2019;32(2).
3. Chanishvili N. Bacteriophages as Therapeutic and Prophylactic Means: Summary of the Soviet and Post Soviet Experiences. *Curr Drug Deliv*. 2016;13(3):309-23.
4. Loponte R, Pagnini U, Iovane G, Pisanelli G. Phage Therapy in Veterinary Medicine. *Antibiotics (Basel)*. 2021;10(4).
5. Retraction for Maisonneuve et al., Bacterial persistence by RNA endonucleases. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2018;115(12):E2901.
6. Ambroa A, Blasco L, Lopez M, Pacios O, Bleriot I, Fernandez-Garcia L, et al. Genomic Analysis of Molecular Bacterial Mechanisms of Resistance to Phage Infection. *Front Microbiol*. 2021;12:784949.
7. Nang SC, Lin YW, Petrovic Fabijan A, Chang RYK, Rao GG, Iredell J, et al. Pharmacokinetics/pharmacodynamics of phage therapy: a major hurdle to clinical translation. *Clin Microbiol Infect*. 2023;29(6):702-9.
8. Martin Plymouth SAL, Ameneh Khatami, Holly A. Sinclair, Jessica C. Sacher, Jan Zheng, Ruby CY. Lin and Jonathan R. Iredell. Attitudes to phage therapy among Australian infectious diseases physicians. *MedRxiv preprint*.
9. Mahler M, Costa AR, van Beljouw SPB, Fineran PC, Brouns SJJ. Approaches for bacteriophage genome engineering. *Trends Biotechnol*. 2023;41(5):669-85.
10. Blasco L, Ambroa A, Lopez M, Fernandez-Garcia L, Bleriot I, Trastoy R, et al. Combined Use of the Ab105-2phi-DeltaCI Lytic Mutant Phage and Different Antibiotics in Clinical Isolates of Multi-Resistant *Acinetobacter baumannii*. *Microorganisms*. 2019;7(11).
11. Blasco L, Ambroa A, Trastoy R, Bleriot I, Moscoso M, Fernandez-Garcia L, et al. In vitro and in vivo efficacy of combinations of colistin and different endolysins against clinical strains of multi-drug resistant pathogens. *Sci Rep*. 2020;10(1):7163.

12. Vazquez R, Diez-Martinez R, Domingo-Calap P, Garcia P, Gutierrez D, Muniesa M, et al. Essential Topics for the Regulatory Consideration of Phages as Clinically Valuable Therapeutic Agents: A Perspective from Spain. *Microorganisms*. 2022;10(4).
13. Merabishvili M, Pirnay J-P, Vogeles K, Malik DJ. Production of Phage Therapeutics and Formulations: Innovative Approaches. In: Górski A, Międzybrodzki R, Borysowski J, editors. *Phage Therapy: A Practical Approach*. Cham: Springer International Publishing; 2019. p. 3-41.
14. Kutter E. Phage host range and efficiency of plating. *Methods Mol Biol*. 2009;501:141-9.
15. Khan Mirzaei M, Nilsson AS. Isolation of phages for phage therapy: a comparison of spot tests and efficiency of plating analyses for determination of host range and efficacy. *PLoS One*. 2015;10(3):e0118557.
16. Glonti T, Pirnay JP. In Vitro Techniques and Measurements of Phage Characteristics That Are Important for Phage Therapy Success. *Viruses*. 2022;14(7).
17. Thanki AM, Taylor-Joyce G, Dowah A, Nale JY, Malik D, Clokie MRJ. Unravelling the Links between Phage Adsorption and Successful Infection in *Clostridium difficile*. *Viruses*. 2018;10(8).
18. Hyman P, Abedon ST. Practical methods for determining phage growth parameters. *Methods Mol Biol*. 2009;501:175-202.
19. Merabishvili M, Pirnay JP, De Vos D. Guidelines to Compose an Ideal Bacteriophage Cocktail. *Methods Mol Biol*. 2018;1693:99-110.
20. Daubie V, Chalhoub H, Blasdel B, Dahma H, Merabishvili M, Glonti T, et al. Determination of phage susceptibility as a clinical diagnostic tool: A routine perspective. *Front Cell Infect Microbiol*. 2022;12:1000721.
21. Liu H, Niu YD, Li J, Stanford K, McAllister TA. Rapid and accurate detection of bacteriophage activity against *Escherichia coli* O157:H7 by propidium monoazide real-time PCR. *Biomed Res Int*. 2014;2014:319351.
22. Melo LDR, Monteiro R, Pires DP, Azeredo J. Phage-Host Interaction Analysis by Flow Cytometry Allows for Rapid and Efficient Screening of Phages. *Antibiotics (Basel)*. 2022;11(2).
23. Xie Y, Wahab L, Gill JJ. Development and Validation of a Microtiter Plate-Based Assay for Determination of Bacteriophage Host Range and Virulence. *Viruses*. 2018;10(4).
24. Philipson CW, Voegtly LJ, Lueder MR, Long KA, Rice GK, Frey KG, et al. Characterizing Phage Genomes for Therapeutic Applications. *Viruses*. 2018;10(4).
25. McNair K, Bailey BA, Edwards RA. PHACTS, a computational approach to classifying the lifestyle of phages. *Bioinformatics*. 2012;28(5):614-8.
26. Rohde C, Resch G, Pirnay JP, Blasdel BG, Debarbieux L, Gelman D, et al. Expert Opinion on Three Phage Therapy Related Topics: Bacterial Phage Resistance, Phage Training and Prophages in Bacterial Production Strains. *Viruses*. 2018;10(4).
27. Blasco L, Bleriot I, Gonzalez de Aledo M, Fernandez-Garcia L, Pacios O, Oliveira H, et al. Development of an Anti-*Acinetobacter baumannii* Biofilm Phage Cocktail: Genomic Adaptation to the Host. *Antimicrob Agents Chemother*. 2022;66(3):e0192321.
28. Oromí-Bosch A, Antani JD, Turner PE. Developing Phage Therapy That Overcomes the Evolution of Bacterial Resistance. *Annu Rev Virol*. 2023.
29. Nikolich MP, Filippov AA. Bacteriophage Therapy: Developments and Directions. *Antibiotics (Basel)*. 2020;9(3).
30. Dimitriu T, Kurilovich E, Łapińska U, Severinov K, Pagliara S, Szczelkun MD, et al. Bacteriostatic antibiotics promote CRISPR-Cas adaptive immunity by enabling increased spacer acquisition. *Cell Host Microbe*. 2022;30(1):31-40.e5.
31. Gu Liu C, Green SI, Min L, Clark JR, Salazar KC, Terwilliger AL, et al. Phage-Antibiotic Synergy Is Driven by a Unique Combination of Antibacterial Mechanism of Action and Stoichiometry. *mBio*. 2020;11(4).
32. Luong T, Salabarria AC, Edwards RA, Roach DR. Standardized bacteriophage purification for personalized phage therapy. *Nat Protoc*. 2020;15(9):2867-90.
33. Wahida A, Tang F, Barr JJ. Rethinking phage-bacteria-eukaryotic relationships and their influence on human health. *Cell Host Microbe*. 2021;29(5):681-8.
34. Menard G, Rouillon A, Cattoir V, Donnio PY. *Galleria mellonella* as a Suitable Model of Bacterial Infection: Past, Present and Future. *Front Cell Infect Microbiol*. 2021;11:782733.
35. Blasco L, Tomás M. Use of *Galleria mellonella* as an Animal Model for Studying the Antimicrobial Activity of Bacteriophages with Potential Use in Phage Therapy. *Methods Mol Biol*. 2024;2734:171-180.
36. Zagalios P, Michalik-Provasek J, Gill JJ, Walsh TJ. Therapeutic Bacteriophages for Gram-Negative Bacterial Infections in Animals and Humans. *Pathog Immun*. 2022;7(2):1-45.

Servicio / Unidad de Microbiología Hospital.....	FAGOTERAPIA, manejo en el laboratorio OBTENCIÓN DE FAGOS. AGUAS RESIDUALES Y OTROS AMBIENTES	PNT-FT-01	
		Edición N° 01	Página 1 de 4

PNT-FT-01

FAGOTERAPIA, manejo en el laboratorio

OBTENCIÓN DE FAGOS. AGUAS RESIDUALES Y OTROS AMBIENTES

ELABORADO		REVISADO Y APROBADO	
Nombre / Firma	Fecha	Nombre / Firma	Fecha

EDICIÓN	FECHA	ALCANCE DE LAS MODIFICACIONES
01		Edición inicial

COPIA REGISTRADA N°.....ASIGNADA A.....

Este documento es propiedad del Servicio de Microbiología del Hospital/Centro.....
La información en él contenida no podrá reproducirse total ni parcialmente sin autorización escrita del Responsable de su elaboración. Las copias no registradas no se mantienen actualizadas a sus destinatarios.

Servicio / Unidad de Microbiología Hospital.....	FAGOTERAPIA, manejo en el laboratorio OBTENCIÓN DE FAGOS. AGUAS RESIDUALES Y OTROS AMBIENTES	PNT-FT-01	
		Edición N° 02	Página 2 de 4

1. PROPÓSITO Y ALCANCE

El propósito de este documento es la obtención de fagos líticos.

2. FUNDAMENTO

Los fagos líticos se pueden encontrar en múltiples ambientes, tanto en muestras clínicas, naturaleza y aguas residuales.

3. DOCUMENTOS DE CONSULTA

Gutiérrez, D., Rodríguez, A., Fernández, L., García, P. (2020). Los bacteriófagos: Los virus que combaten infecciones. España: Los Libros de La Catarata.

4. MUESTRAS

4.1. OBTENCIÓN DE LA MUESTRA

La muestra idealmente debe ser recogida en el medio natural donde se encuentra el patógeno de interés. Esta muestra podría recogerse de aguas residuales, desagües, materia fecal o tipo ambiental como ríos, tierra, esquejes de plantas, etc. El éxito en el aislamiento del fago depende en gran parte del conocimiento de la ecología de la bacteria hospedadora del bacteriófago. Dependiendo del caso, la muestra será líquida, siendo suficiente con tomar 50 ml de muestra, o sólida recogida en torundas o directamente en tubos para diluir el contenido posteriormente. Si es posible, se recomienda utilizar recipientes estándar estériles de laboratorio. Ya en el laboratorio, si el recipiente usado para la recogida no es estándar, sería conveniente transferir el contenido recogido a recipientes estériles utilizados en el laboratorio para mayor facilidad de manejo y etiquetado, así como para ocupar menos espacio

4.2. TRANSPORTE Y CONSERVACIÓN

La muestra recogida se podrá transportar a temperatura ambiente, será conservada a 4°C en el laboratorio y usada como máximo hasta de una semana después de la recogida. Lo más recomendable es que se lleven cuanto antes al laboratorio para su procesamiento inmediato, por ejemplo, antes de 4 horas. Si no es posible, las muestras deberán ser guardadas a 4°C hasta el día siguiente que se lleven al laboratorio..

5. MEDIOS DE CULTIVO, REACTIVOS Y PRODUCTOS

- Agua estéril
- Tubos estériles cónicos (15 ml; Fisher Scientific, cat. no. 11317211)
- Tubos Microcentrífuga (1.7 ml; Sorenson, cat. no. 11500)
- Tubos Microcentrífuga (2.0 ml; Sorenson, cat. no. 12030)
- Tubos centrífuga cónicos (15 and 50 ml; VWR, cat. no. 430790 and 430828)
- MgSO₄, Sulfato de Magnesio (Fisher Scientific, cat. no. 10 625871)
- CaCl₂, Cloruro de Calcio (Fisher Scientific, cat. no.12664987)
- Agarosa (Ecogen, cat. no. BIO-41026)
- Placas de Petri (10 cm; Fisher Scientific, cat. no. 08-757-100D)

Servicio / Unidad de Microbiología Hospital.....	FAGOTERAPIA, manejo en el laboratorio OBTENCIÓN DE FAGOS. AGUAS RESIDUALES Y OTROS AMBIENTES	PNT-FT-01	
		Edición N° 02	Página 3 de 4

- LB, Luria Bertani
- Banco de cepas huésped dianas
- Buffer SM (Tris-HCl, 50 mM; NaCl, 0.1 M; MgSO₄·7H₂O, 8 mM)

6. APARATOS Y MATERIAL

- Micropipetas (Fisher Scientific, cat. no. 10236072)
- Puntas de micropipeta de con filtro (Fisher Scientific, cat. no.15743479)
- Gradillas para tubos sarstedt o similares (Starsted cat. no. 95.64.251)
- Agitador tipo vortex (Fisher Scientific, cat. no. 10287462)
- Tubos de reacción de 1,5 ml de “calidad molecular” (tipo sarstedt) (Starsted cat. no. 72.690.001)
- Contenedores de residuos (Praxisdients cat. no. 314115)
- Placas de Petri estériles (10 cm; Fisher Scientific, cat. no. 08-757-100D)
- Microcentrifugas (Fisher Scientific, cat. no.15344204)
- Balanza (Balsur, cat. no. FC-100)
- Matraces y probetas (Quercus Lab, cat. no. 45001094)
- Filtros de concentración jeringa Millipore (Merck, cat. no. 044450)

7. PROCEDIMIENTO

Las muestras líquidas serán centrifugadas para retirar los restos sólidos y el sobrenadante se filtrará con filtros de tamaño de poro 0,22 µm. Para posibilitar la propagación del bacteriófago de interés, cinco mililitros del sobrenadante filtrado serán incubados 16-18 horas con 100 µl de un cultivo crecido en fase estacionaria de la bacteria o bacterias diana si la bacteria es de crecimiento rápido o serán incubadas más tiempo para bacterias con tiempos de generación más largos, se añadirán cinco mililitros del medio de cultivo adecuado al patógeno doblemente concentrado suplementado con MgSO₄ y CaCl₂ a concentración final de 10 mM. La aireación dependerá del patógeno en cuestión.

Transcurrido el tiempo, de nuevo se centrifugará el contenido y se filtrará para obtener el “lisado” que va a ser objeto de estudio de análisis para detectar posibles bacteriófagos de interés. Las muestras sólidas requerirán un paso previo que consiste en añadir a un volumen de muestra (por ejemplo 10 mililitros) el mismo volumen de medio de crecimiento de la bacteria doblemente concentrado, suplementado con MgSO₄ y CaCl₂, y 100 µl de un cultivo crecido en fase estacionaria para incubarlo de la misma manera que se ha descrito para las muestras líquidas.

Posteriormente, se sembrarán en placa dos réplicas por cada lisado más un control sin lisado utilizando la técnica de placa de doble agar (capa superior con 0,3 % de agarosa) (Ver documento técnico II. Fagoterapia) que permitirá visualizar calvas de lisis si las hubiera. En caso de tener varias bacterias huésped dianas, se realizará este paso para cada bacteria individual. De nuevo, los medios de cultivo y las condiciones de incubación (temperatura, tiempo y aireación) serán los adecuados para el crecimiento de la bacteria diana. Sería recomendable tener un banco de cepas huésped diana que se utilizarán para el aislamiento de los fagos y su propagación, que cumplan, en la medida de lo posible, los requisitos de no portar resistencias, factores de virulencia ni profagos (1)

Servicio / Unidad de Microbiología Hospital.....	FAGOTERAPIA, manejo en el laboratorio OBTENCIÓN DE FAGOS. AGUAS RESIDUALES Y OTROS AMBIENTES	PNT-FT-01	
		Edición N° 02	Página 4 de 4

8. OBTENCIÓN Y EXPRESIÓN DE RESULTADOS

En bacterias de crecimiento rápido, tras 16-18 horas se examinarán las placas comparándolas con la placa control. Si el aspecto es similar al control se dejarán hasta las 24 horas de incubación y si se mantiene igual y se interpretará que la siembra no contiene bacteriófagos. Sin embargo, si aparecen calvas de lisis o de menor densidad de crecimiento se concluirá que existe al menos un tipo de bacteriófago capaz de infectar al patógeno de interés. Para bacterias de crecimiento lento se ajustarán los tiempos según el tiempo de generación.

Seguidamente, si hay calvas no solapantes, se procederá a aislar una única calva de cada morfología similar utilizando una pipeta Pasteur y se introducirá en un microtubo, añadiendo SM buffer (*Sault-Magnesium*), mezclando con agitación y centrifugando para obtener un sobrenadante que se guardará a 4°C, para su posterior titulación y propagación con el fin de obtener un título elevado de un único bacteriófago.

Si en la placa hay tal concentración de calvas que no es posible aislar sólo una por solapamiento, se raspará la capa de agarosa y se resuspenderá el contenido en medio SM mezclando con agitación; posteriormente se centrifugará para obtener un sobrenadante del que se sembrarán diluciones con el objetivo de obtener calvas aisladas, luego se procederá tal y como se indica en el párrafo anterior.

9. RESPONSABILIDADES

El procedimiento deberá llevarse a cabo por personal técnico cualificado con un entrenamiento específico. La supervisión de la técnica y de los resultados emitidos deberá realizarla el Facultativo Especialista responsable del laboratorio de Microbiología que los emite.

10. LIMITACIONES AL PROCEDIMIENTO

Para la obtención de un máximo rendimiento en relación con la obtención de fagos líticos, se requiere un banco de cepas huésped dianas susceptibles de ser infectadas por los fagos a estudio.

11. BIBLIOGRAFÍA

1. Glonti T, Pirnay JP. In Vitro Techniques and Measurements of Phage Characteristics That Are Important for Phage Therapy Success. *Viruses*. 2022;14(7).
2. Kropinski AM, Mazzocco A, Waddell TE, Lingohr E, Johnson RP. Enumeration of bacteriophages by double agar overlay plaque assay. *Methods Mol Biol*. 2009;501:69-76.
3. Kutter E. Phage host range and efficiency of plating. *Methods Mol Biol*. 2009;501:141-9.

Servicio / Unidad de Microbiología Hospital.....	FAGOTERAPIA, manejo en el laboratorio AISLADOS AMBIENTALES y BANCOS de FAGOS	PNT-FT-02	
		Edición N° 01	Página 1 de 20

PNT-FT-02

FAGOTERAPIA, manejo en el laboratorio AISLADOS AMBIENTALES y BANCOS de FAGOS

ELABORADO		REVISADO Y APROBADO	
Nombre / Firma	Fecha	Nombre / Firma	Fecha

EDICIÓN	FECHA	ALCANCE DE LAS MODIFICACIONES
01		Edición inicial

COPIA REGISTRADA N°.....ASIGNADA A.....

Este documento es propiedad del Servicio de Microbiología del Hospital/Centro.....
La información en él contenida no podrá reproducirse total ni parcialmente sin autorización escrita del Responsable de su elaboración. Las copias no registradas no se mantienen actualizadas a sus destinatarios.

Servicio / Unidad de Microbiología Hospital.....	FAGOTERAPIA, manejo en el laboratorio AISLADOS AMBIENTALES y BANCOS de FAGOS	PNT-FT-02	
		Edición N° 01	Página 2 de 20

1. PROPÓSITO Y ALCANCE

- PASO 1. Caracterización de la actividad infectiva
- PASO 2. Caracterización genotípica
- PASO 3. Adaptación al huésped/desarrollo cócteles
- PASO 4/5. Producción, purificación y concentración
- PASO 6. Caracterización fisicoquímica y almacenamiento

2. FUNDAMENTO

- PASO 1. Caracterización de la actividad infectiva
 - Método 01. Propagación y titulación de los fagos en técnica doble agar
 - Método 02. Test de la gota o *spot test*
 - Método 03- *Host Range*
 - Método 04. Eficiencia de plaqueo (EOP)
 - Método 05. Curva de adsorción (Opcional)
 - Método 06- *One Step Growth Curve* (Opcional)
 - Método 07. Curva de Infección en medio líquido (Estudios de cinética)
- PASO 2. Caracterización genotípica
 - Método 01. Tipos de Secuenciación
 - Método 02. Búsqueda de contaminaciones
 - Método 03. Anotación funcional de proteínas
 - Método 04. Identificación de genes de lisogenia, resistencia y virulencia
- PASO 3. Adaptación al huésped/desarrollo cócteles
 - Método 01. Método Appelmans. Preparación de cócteles. Sinergia con los antibióticos
- PASO 4/5. Producción, purificación y concentración
 - Método 01. Ampliación del proceso de purificación mediante ultracentrifugación en gradiente de densidad
 - Método 02. Aplicaciones de membranas de filtración en la producción de fagos
 - Método 03. Desarrollo de cromatografía de fago. Eliminación de endotoxinas
 - Método 04. Titulación de fagos
- PASO 6. Caracterización fisicoquímica y almacenamiento

3. DOCUMENTOS DE CONSULTA

1. Oliver A (Coordinador). López Causapé C, González Candelas F, Tomás Carmona MM, Oliver A. Procedimiento en Microbiología Clínica 71. Aplicaciones de las técnicas de secuenciación masiva en la Microbiología Clínica. SEIMC 2021. Disponible en <https://seimc.org/contenidos/documentoscientificos/procedimientosmicrobiologia/seimc-procedimiento71.pdf>
2. Morosini Reilly MI (Coordinador). Canut Blasco A, Collazos Blanco A, Díez Aguilar M, Morosini Reilly MI, Rodríguez Gascón A, Seral García C. Procedimiento en Microbiología Clínica 70. Métodos Microbiológicos para la determinación in vitro de la actividad de combinaciones de antimicrobianos. SEIMC 2020. Disponible en <https://seimc.org/contenidos/documentoscientificos/procedimientosmicrobiologia/seimc-procedimiento70.pdf>
3. Farmacopea europea (EP2.6.12). Disponible en EUROPEAN PHARMACOPOEIA 5.0. [http://uspbpep.com/ep50/2.6.12.%20Microbiological%20examination%20of%20non-sterile%20products%20\(total%20viable%20aerobic%20count\).pdf](http://uspbpep.com/ep50/2.6.12.%20Microbiological%20examination%20of%20non-sterile%20products%20(total%20viable%20aerobic%20count).pdf)
4. Farmacopea europea (EP 2.6.14). Disponible en EUROPEAN PHARMACOPOEIA 5.0. <https://gmpua.com/Validation/Method/LAL/EUPHARMACOPOEIA.pdf>

Servicio / Unidad de Microbiología Hospital.....	FAGOTERAPIA, manejo en el laboratorio AISLADOS AMBIENTALES y BANCOS de FAGOS	PNT-FT-02	
		Edición N° 01	Página 3 de 20

5. Farmacopea europea (EP 2.2.3). Disponible en EUROPEAN PHARMACOPOEIA 7.0.

<http://www.fptl.ru/biblioteka/farmacop/EP-7.0-2.pdf>

6. Farmacopea europea (EP 2.5.12). Disponible en EUROPEAN PHARMACOPOEIA 6.0.

<http://www.uspbpep.com/ep60/2.5.12.%20water-%20semi-micro%20determination%2020512e.pdf>

4. PROGRAMAS Y HERRAMIENTAS BIOINFORMÁTICAS

- EDGE Bioinformatics software <https://github.com/LANL-Bioinformatics/EDGE/releases>
- GOTTCHA web <https://github.com/LANL-Bioinformatics/GOTTCHA>
- Kraken tool <https://ccb.jhu.edu/software/kraken/>
- MetaPhlAn web <https://github.com/biobakery/MetaPhlAn>
- BWA-mem <https://bio-bwa.sourceforge.net>
- RefSeq tool <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/refseq/>
- RAST server <https://rast.nmpdr.org>
- FIGfam web <http://www.theseed.org/wiki/FIGfams/>
- GLIMMER-3 tool <https://bio.tools/glimmer>
- BLASTp web <https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>
- HMMER tool <http://hmmer.org>
- HHpred web <https://toolkit.tuebingen.mpg.de/tools/hhpred>
- pVOGs tool <http://dmk-brain.ecn.uiowa.edu/pVOGs>
- tRNAscan-SE web <http://lowelab.ucsc.edu/tRNAscan-SE/>
- ARAGORN web <https://www.ansikte.se/ARAGORN/>
- PHASTER tool <https://phaster.ca>
- RAST server <https://rast.nmpdr.org>
- PHANOTATE web <https://github.com/deprekate/PHANOTATE>
- PHACTS server <http://www.phantome.org/PHACTS/>
- VirulenceFinder2.0 <https://cge.food.dtu.dk/services/VirulenceFinder/>
- ResFinder 4.1 <https://cge.food.dtu.dk/services/ResFinder/>
- Aribav2-6.2 <https://github.com/sanger-pathogens/ariba>

5. MUESTRAS

Fagos líticos

6. MEDIOS DE CULTIVO, REACTIVOS Y PRODUCTOS

- Agua estéril
- Tubos estériles cónicos (15 ml; Fisher Scientific, cat. no. 11317211)
- Tubos Microcentrífuga (1.7 ml; Sorenson, cat. no. 11500)
- Tubos Microcentrífuga (2.0 ml; Sorenson, cat. no. 12030)
- Tubos centrífuga cónicos (15 and 50 ml; VWR, cat. no. 430790 and 430828)
- MgSO₄, Sulfato de Magnesio (Fisher Scientific, cat. no. 10 625871)
- CaCl₂, Cloruro de Calcio (Fisher Scientific, cat. no. 12664987)
- Agarosa (Ecogen, cat. no. BIO-41026)
- Placas de Petri (10 cm; Fisher Scientific, cat. no. 08-757-100D)
- LB, Luria Bertani

Servicio / Unidad de Microbiología Hospital.....	FAGOTERAPIA, manejo en el laboratorio AISLADOS AMBIENTALES y BANCOS de FAGOS	PNT-FT-02	
		Edición N° 01	Página 4 de 20

- Banco de cepas huésped dianas
- Buffer SM (Tris-HCl, 50 mM; NaCl, 0.1 M; MgSO₄·7H₂O, 8 mM; gelatina, 0.002 %)
- Triptona (Fisher Scientific, cat. no. BP1421-2)
- Extracto de levadura (Fisher Scientific, cat. no. BP1422-2)
- NaCl, Cloruro de sodio (Fisher Scientific, cat. no. 7647-14-5)
- Agar (CulGenes, cat. no. C6002)
- PBS (BioPioneer, cat. No. MB1001)
- Base Tris (Fisher Scientific cat. no. 77-86-1)
- Glicina (Millipore Sigma, cat. no. G4392)
- SDS (Fisher Scientific, cat. no. BP166-500)
- Etanol, absoluto (Millipore Sigma, cat. no. E7023-500 ml)
- Kit Nanobind CBB Big DNA (Circulomics, cat. no. NB-900-001-01)
- ADNasa I (Life Technologies, cat. no. 90083)
- RNasa A (Life Technologies, cat. no. EN0531)
- PEG-8000 (Fisher Scientific, cat. no. BP233-100)
- Sulfato de magnesio heptahidratado (MgSO₄; Fisher Scientific, cat. no. M63-500)
- Ácido acético (Fisher Scientific, cat. no. A38S 500)
- Columnas de centrifugación de eliminación de endotoxinas de alta capacidad Pierce, 1 ml (ThermoFisher Scientific, cat. no. 88277)
- Kit de cuantificación de endotoxina cromogénica Pierce LAL (ThermoFisher Scientific, cat. no. 88282)

7. APARATOS Y MATERIAL

- Cabina de bioseguridad (ESCO, cat. no. AC2-4S9-NS)
- Lector de placas de microtitulación (BMG, modelo: Clariostar, cat. no. 0430-100)
- Mezclador vórtex (VWR, cat. no. 12620-838)
- Espectrofotómetro (Denovix, cat. no. DS-11 FX+)
- Centrífuga de alta velocidad (Beckman Coulter, modelo: Avanti JXN-26 IVD, cat. no. B38623)
- Rotor de centrífuga de ángulo fijo para 1 L (Beckman Coulter, modelo: JLA-8.1000, cat. no. 969328)
- Ultracentrífuga (Beckmann Coulter, Optima-L-90K, cat. no. 365672)
- Rotor SW41 (Beckman Coulter, cat. no. 331336)
- Microcentrífuga (Sartorius, cat. no. A-14C)
- Sistema de electroforesis tetravertical Mini-PROTEAN (Bio-Rad, cat. no. 1658028FC)
- Gel imager ChemiDoc XRS+ System (Bio-Rad, cat. no. 1708265)
- Mechero Bunsen (VWR, cat. no. 89038-530)
- Pipeta (1000, 200, 20 y 10 µL; Sartorius, cat. no. UX-24505-33, -34, -35 y -36, respectivamente)
- Pipeta multicanal (8 × 10 µL; Sartorius, cat. no. UX-24505-44)
- Controlador electrónico de pipetas (Argos, modelo: OmegaZen, cat. no. 25300-96)
- Baño de agua (10 L; Cole Parmer, cat. no. WE-14576-08)
- Bomba peristáltica (Cole Parmer, modelo: Masterflex, cat. no. EW-07522-20)
- Cabezal de bomba (Cole Parmer, cat. no. EW-77253-00)
- Tubos (ThermoFisher Scientific, n.º de cat. 8060-3015; Cole-Parmer, cat. no. ZX-06422-01)
- Incubadora/agitador microbiológico (Eppendorf, modelo: S44i, cat. no. S44I200005)
- Incubadora de células (Eppendorf, modelo: C170i, cat. no. 6731010015)
- Incubadora (VWR, modelo: 5420, cat. no. 97005-252)

Servicio / Unidad de Microbiología Hospital.....	FAGOTERAPIA, manejo en el laboratorio AISLADOS AMBIENTALES y BANCOS de FAGOS	PNT-FT-02	
		Edición N° 01	Página 5 de 20

- ThermoMixer (Eppendorf, cat. no. 2231000574)
- Placa de agitación (Heathrow, cat. no. HP8885794)
- Hemocitómetro (Hauser Scientific, cat. no. 3110V)
- Sistema de purificación de agua Milli-Q (Millipore Sigma, cat. no. ZRXQ010T0)
- Gradilla para tubos magnéticos (ThermoFisher Scientific, modelo: DynaMag-2, cat. no. 12321D)
- Espectrofotómetro BioTek Epoch 2 microplaca (Fisher Scientific, cat. no. 17217809)
- Secuenciador de ADN (Oxford Nanopore, modelo: MinION, cat. no. SQK-RAD004)/ Illumina Platform
- Ordenador con sistema Linux o Apple Macintosh

8. PROCEDIMIENTOS-INTERPRETACIÓN DE RESULTADOS



-PASO 1. Caracterización de la actividad infectiva

• Método 01. Propagación y titulación de los fagos en técnica doble agar

- Propagación en medio líquido: Se prepara un cultivo de la cepa huésped diana (que es aquella en la que se ha aislado el fago, idealmente cepas que no porten profagos ni genes de resistencia) a partir de una dilución 1/100 de un cultivo *overnight* de la misma, en 10 ml de medio de cultivo suplementado con $MgCl_2$ y/o $CaCl_2$ si es necesario. Incubar a temperatura y aireación óptimas para el crecimiento bacteriano, por ejemplo, en gramnegativas aerobias a 37°C en agitación a 180 rpm. Cuando el cultivo alcanza una densidad óptica entre 0,3-0,5 DO (600 nm) este se infecta con 100 μ l de fagos concentrados ($\geq 10^8$ UFP/ml). Incubar a 37°C durante unas 5h o hasta que el cultivo esté completamente lisado.

Finalmente se recupera el lisado en el sobrenadante y se incuba en presencia de cloroformo al 1% (si es tolerado por el fago) durante 20 min a temperatura ambiente. Centrifugar y filtrar por filtros de 0,45 μ m. Guardar a 4° C.

- Propagación en medio sólido: Inocular 5 ml de medio de cultivo con una dilución 1/100 de un cultivo “overnight” de la cepa huésped. Incubar a la temperatura y agitación adecuada para la bacteria hasta que alcance una densidad óptica de 0,5 DO (600 nm). Preparar tantas alícuotas de entre 150-250 μ l del cultivo e infectar con 20-50 μ l de un stock de fagos con título alto ($\geq 10^8$ UPF/ml). Incubar durante 10 min a temperatura ambiente y preparar placas de doble agar como se ha descrito anteriormente. Incubar toda la noche a la temperatura adecuada para la bacteria.

Al día siguiente añadir 3-4 ml de buffer SM y poner en una placa de agitación a 100 rpm durante 3-4 horas. Recuperar el SM buffer, añadir cloroformo al 1% (siempre y cuando el fago lo tolere) e incubar a temperatura ambiente durante 20 min. Centrifugar y filtrar el sobrenadante por un filtro de 0,45 μ m. Guardar a 4° C.

La técnica doble agar es una técnica empleada tanto para hacer recuento de fagos como para la propagación de los mismos. Consiste en la preparación de placas tipo Petri del tamaño que se desee con medio de cultivo sólido en dos capas, la inferior con mayor concentración de agar y la superior con menor. El

Servicio / Unidad de Microbiología Hospital.....	FAGOTERAPIA, manejo en el laboratorio AISLADOS AMBIENTALES y BANCOS de FAGOS	PNT-FT-02	
		Edición N° 01	Página 6 de 20

medio de cultivo debe ser un medio en el que la bacteria de elección crezca adecuadamente, generalmente se emplea LB o TA, este último es más claro y facilita la observación de las placas de lisis. En primer lugar, se preparan las placas con la capa inferior de medio a una concentración de agar de 1,5 % (P/V), una vez solidificadas se dejan secar unos 15 min, de modo que queden ligeramente húmedas.

En la capa superior es donde ocurre la infección, para ello en primer lugar se añaden 150-250 ml de un cultivo bacteriano a una DO (600 nm) de 0,5-0,6. Posteriormente se añade el volumen adecuado de stock de fagos y se incuban a temperatura ambiente. Transcurridos 10 minutos, a la mezcla de bacteria y fago se le añaden 3-4 ml de medio de cultivo “soft” con agar al 0,4 % (P/V), aunque esta concentración puede variar en función de la capacidad de difusión del fago. Inmediatamente esta mezcla se añade sobre la capa inferior de medio para formar la capa superior y se mantiene a temperatura ambiente durante 20 minutos. Finalmente, las placas se incuban en una estufa durante 18 horas a la temperatura adecuada para la bacteria.

Para la titulación de los fagos en primer lugar, se debe preparar un cultivo de la cepa bacteriana huésped. Para ello se inoculan 5 ml de medio de cultivo adecuado con una dilución 1/100 de un cultivo “overnight” de la cepa. Se incuba en las condiciones idóneas para la bacteria hasta que se alcanza 0,5 DO (600 nm). Se prepara una dilución seriada del stock de fagos en tampón SM o en suero salino. Se prepararán al menos diluciones hasta la – 7.

Se toman 150-250 µl del cultivo a 0,5 DO (600 nm) y se depositan en tantos tubos como diluciones de fagos se vayan a preparar. Cada uno es infectado con 10 µl correspondientes a cada una de las diluciones de fagos y se preparan placas de doble agar. Se incuban en una estufa a la temperatura adecuada para la bacteria durante toda la noche. Al día siguiente se cuentan las UFP (Unidades Formadoras de Placas) en las placas en las que se puedan contar 30-300. El título se calcula con la fórmula:

$$\text{UFP/ml} = (\text{N}^\circ \text{ de UFP} \times \text{Dilución}) / \text{Volumen de fago inoculado}$$

• Método 02. Test de la gota o *spot test*

Este test se realiza para determinar la capacidad del fago de infectar y lisar las cepas bacterianas que se desee estudiar. Se realiza en placas de doble capa de agar. En este caso, la capa superior de agar se prepara mezclando el cultivo bacteriano con el agar *soft*. Una vez solidificada la capa superior de agar se añade una gota de 1 µl de solución de fagos. Se espera a que la gota se absorba en el agar y se incuba durante 18 horas en una estufa a la temperatura ideal de crecimiento de la bacteria.

El *spot test* se realiza a partir de una dilución seriada de los fagos para diferenciar la lisis debida a la actividad del fago de la lisis *from without*. Para llevar a cabo este protocolo se debe hacer una dilución seriada del stock de fago que se desea testar y se hará un spot como se ha descrito anteriormente con cada una de las diluciones. Se considerará que la lisis es producida por el fago si en alguna de las placas se observan placas de lisis individuales.

• Método 03. *Host Range*

Este método consiste en enfrentar el fago con una colección de cepas de interés y hacer una valoración inicial de su capacidad infectiva. Para conocer el rango de huésped de un fago, se debe realizar la técnica del “*spot test*” descrita en el Método 02, a través de diluciones seriadas enfrentando un fago a las cepas bacterianas que se desee (2). Se deben considerar como huéspedes del fago aquellas cepas en las que el

Servicio / Unidad de Microbiología Hospital.....	FAGOTERAPIA, manejo en el laboratorio AISLADOS AMBIENTALES y BANCOS de FAGOS	PNT-FT-02	
		Edición N° 01	Página 7 de 20

“*spot test*” produce un “*spot*” completamente lisado correspondiente a las concentraciones más altas de fago y placas de lisis individuales en los “*spot*” más diluidos.

• Método 04. Eficiencia de plaqueo (EOP)

Esta técnica permite establecer la capacidad de propagación de un fago en una cepa, comparando la capacidad de infección de un fago en una cepa determinada frente a la capacidad de infección del mismo fago sobre su cepa huésped. Los recuentos que determinan la eficiencia de plaqueo (EOP) se deben obtener para todas las cepas que se quieran analizar y para la cepa huésped original del fago.

El cálculo de la EOP se realiza mediante recuento de placas de lisis en placa de doble agar siguiendo el mismo protocolo que en el caso de la titulación.

Una vez obtenidos los recuentos se aplica la siguiente fórmula:

$$EOP = \frac{\text{UFP obtenidos para la cepa de análisis}}{\text{UFP obtenidos para la cepa huésped diana}}$$

Los valores de EOP son específicos de cada cepa y fago, cuando el EOP es $\geq 0,5$ indica que una alta capacidad de infección, por lo que el fago se considerará un buen candidato para tratar las infecciones provocadas por esa cepa. Se considera que la infección es moderada si el valor de EOP está entre 0,1-0,5, por lo que estos deberían descartarse como candidatos para tratar la infección, aunque podría valorarse según las circunstancias. Cuando se obtiene un valor $\leq 0,1$ se considera que no hay infección y se descartaría el fago como candidato.

• Método 05. Curva de adsorción (Opcional)

La determinación de la tasa de adsorción de los fagos se realiza en base al número de fagos libres en el sobrenadante.

Antes de iniciar el análisis es necesario añadir 10 µl de cloroformo en tubos de 1,5 ml. Se prepararán tantos tubos como muestras se vayan a tomar durante el ensayo. Una vez preparados se mantendrán en hielo.

En primer lugar, se debe diluir un cultivo bacteriano en fase logarítmica media hasta una concentración aproximada de 10^7 UFC/ml en 20 ml de medio de cultivo suplementado con CaCl_2 y/o MgCl_2 (dependiente del tipo de fago). Los fagos previamente cuantificados deben estar a temperatura ambiente y se utilizarán a una concentración aproximada de 10^5 UFP/ml.

En el matraz con los 20 ml de cultivo a temperatura ambiente se añadirán los fagos a MOI 0,01 (10^5 UFP/ml). El matraz se mantendrá a temperatura ambiente sin agitación durante la duración de la curva, de 10 a 15 min. A intervalos de 1 min se debe tomar una alícuota de 1 ml que se deposita en los tubos con cloroformo, se agita y se mantiene en hielo durante 15 min. Transcurrido este tiempo se centrifuga y se recupera el sobrenadante. De cada uno de los tubos se realizan diluciones seriadas hasta la dilución -6 y se preparan placas de doble agar, empleando la cepa huésped de plaqueo, que será la cepa huésped original para ese fago, previamente crecida hasta 0,5 DO (600nm). Las placas se incubarán durante toda la noche a la temperatura adecuada para la cepa y al día siguiente se harán los recuentos de las UFP para cada punto de la curva.

Servicio / Unidad de Microbiología Hospital.....	FAGOTERAPIA, manejo en el laboratorio AISLADOS AMBIENTALES y BANCOS de FAGOS	PNT-FT-02	
		Edición N° 01	Página 8 de 20

Se considerará el tiempo de adsorción de un fago, el punto en el que la curva se estabiliza.

• Método 06. *One Step Growth Curve* (Opcional)

Antes de realizar esta curva es necesario tener en cuenta una serie de consideraciones, así, para el correcto desarrollo de esta curva es necesario utilizar un fago que tenga una tasa de adsorción $\geq 90\%$ en 5 minutos, de forma que la infección ocurra de manera simultánea en todas las células. Además, será necesario hacer varias replicas para poder establecer con exactitud el tiempo de latencia del fago. En el caso de que el fago tenga un período de latencia demasiado corto a 37°C se podría optimizar bajando la temperatura de 30°C siempre que sea posible.

En primer lugar, se prepara un cultivo de la cepa en las condiciones óptimas para la bacteria. Tras incubarlo toda la noche, se prepara una dilución 1/100 en un matraz con el medio de cultivo suplementado con CaCl_2 1mM, y se incuba en agitación hasta que alcance la fase logarítmica. En este momento 1 ml del cultivo bacteriano se infecta con el fago a MOI 0,01 o 0,001, y se mantiene a temperatura ambiente durante el período de adsorción. Posteriormente, se centrifuga a 6000 rpm durante 10 min y el precipitado se suspende en 1 ml de medio de cultivo. Este paso se debe repetir 3 veces. Posteriormente, un matraz conteniendo 20 ml de medio de cultivo suplementado con CaCl_2 ser inocula con 20 μl del cultivo infectado, y se incuba a la temperatura y velocidad de agitación óptimas para la bacteria. Se deben tomar alícuotas cada 2 min hasta que acabe la fase de latencia y luego cada 5 min hasta que finalice la fase de lisis.

• Método 07. *Curva de Infección en medio líquido* (Estudios de cinética)

La curva en medio líquido se debe realizar a distintas MOI para determinar la relación de fago-célula a la que la infección es mayor y se genera menor resistencia al fago.

Se prepara un cultivo de la cepa de interés que se incuba toda la noche en medio de cultivo líquido en las condiciones idóneas para la bacteria. Al día siguiente, el cultivo se diluye 100 veces y se incuba hasta alcanzar la fase logarítmica. En este momento se añade el fago a la concentración correspondiente a la MOI que se quiera analizar, generalmente 0,1, 1 y 10, aunque estos valores pueden variar en función del fago y la cepa bacteriana. Posteriormente, el cultivo infectado se incuba en las condiciones idóneas para la bacteria durante al menos 6 h, aunque es recomendable hacerlo durante 24h. Se tomarán muestras a intervalos de 1h y se medirán en un espectrofotómetro a λ 600nm.

Existe la posibilidad de llevar a cabo métodos automatizados de medición de la curva de infección (estudios cinéticos) en medio líquido utilizando tecnologías como qPCR, citometría de flujo y/o lector de densidad óptica siguiendo las indicaciones del fabricante.

Los fagos ideales serán aquellos que muestren un adecuado resultado por **spot test**, una buena eficiencia en el **EOP** junto con una fuerte inhibición en el crecimiento bacteriano mediante los **ensayos de cinética**. Dichos fagos serán seleccionados para su secuenciación genómica y posterior producción y purificación.

Servicio / Unidad de Microbiología Hospital.....	FAGOTERAPIA, manejo en el laboratorio AISLADOS AMBIENTALES y BANCOS de FAGOS	PNT-FT-02	
		Edición N° 01	Página 9 de 20



PASO 2. CARACTERIZACIÓN GENOTÍPICA

Previamente a la secuenciación del genoma es necesario obtener una cantidad suficiente de ADN del fago escogido, para ello es necesario propagarlo y obtener un lisado a una concentración de fago $\geq 10^9$ PFU ml⁻¹. Este lisado se tratará en primer lugar con DNAsa y con RNAsa para eliminar los ácidos nucleicos bacterianos y posteriormente se romperán las cápsides mediante el tratamiento con proteinasa K. Finalmente, el DNA se puede extraer mediante el uso de un kit comercial (Promega Wizard® DNA Clean-Up) o bien por el método del fenol: cloroformo: alcohol isoamílico, precipitándolo finalmente con alcohol absoluto y lavándolo con alcohol al 70 % antes de resuspenderlo en agua destilada. La calidad del ADN extraído y la presencia de potenciales contaminantes puede evaluarse utilizando la absorbancia diferencial de luz UV: una ratio de absorbancia 260/280 nm comprendido entre 1,8-2 es indicativo de que el extracto únicamente contiene ADN y una ratio 260/230 nm entre 2,0-2,2 es indicativo de la ausencia de contaminantes.

• Método 01. Tipos de Secuenciación

En este paso se podrá utilizar cualquier método de secuenciación de los empleados en la secuenciación de microorganismos. A partir del ADN extraído y purificado se prepararán las librerías genómicas mediante el uso de un kit comercial (Tecnologías Illumina y/o Nanopore). El método para la preparación de las librerías va a depender de la tecnología de secuenciación que se vaya a utilizar, aunque la fragmentación y el multiplexado son procesos comunes a todas. Para mayor información sobre la secuenciación consultar el Procedimiento 71 de la SEIMC.

• Método 02. Búsqueda de contaminaciones

Una vez secuenciado el genoma es necesario descartar la presencia de secuencias de ADN que no se correspondan con el genoma de los fagos. Para ello es necesario emplear aplicaciones informáticas como *EDGE Bioinformatics software* (<https://github.com/LANL-Bioinformatics/EDGE/releases>), que entre otras características permite detectar secuencias de la cepa.

La confirmación de que el genoma pertenece exclusivamente a un fago y no a la cepa huésped se realiza también mediante la clasificación taxonómica del genoma con herramientas como: i) GOTTCHA (<https://github.com/LANL-Bioinformatics/GOTTCHA>); ii) Kraken (<https://ccb.jhu.edu/software/kraken/>); y finalmente iii) MetaPhlAn (<https://github.com/biobakery/MetaPhlAn>). En relación a los estudios de alineamiento de secuencias y mapeo, destacan las herramientas informáticas, BWA-mem (<https://bio-bwa.sourceforge.net>), y RefSeq (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/refseq/>) que se usan para procesar las lecturas obtenidas en la secuenciación. Se considera que las secuencias están libres de contaminantes si el tamaño de las secuencias ensambladas está dentro del rango del tamaño de genoma de una familia de virus y si menos del 5% de las secuencias coinciden con las secuencias del huésped.

Servicio / Unidad de Microbiología Hospital.....	/FAGOTERAPIA, manejo en el laboratorio AISLADOS AMBIENTALES y BANCOS de FAGOS	PNT-FT-02	
		Edición N° 01	Página 10 de 20

• Método 03. Anotación funcional de proteínas

Una vez conocido el genoma del fago es necesario anotar las proteínas que porta, para ello existen diversas herramientas: i) RAST (<https://rast.nmpdr.org>); ii) FIGfam (<http://www.theseed.org/wiki/FIGfams/>); y iii) GLIMMER-3 (<https://bio.tools/glimmer>). Una vez anotado se puede realizar una confirmación manual de estas proteínas o de las que de una función hipotética utilizando otras herramientas: i) BLASTp (<https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>); ii) HMMER (<http://hmmer.org>); iii) HHpred (<https://toolkit.tuebingen.mpg.de/tools/hhpred>); y iv) pVOGs (<http://dmk-brain.ecn.uiowa.edu/pVOGs>). En muchos casos los fagos son portadores de ARN de transferencia, que se pueden anotar con: tRNAscan-SE (<http://lowelab.ucsc.edu/tRNAscan-SE/>) y ARAGORN (<https://www.ansikte.se/ARAGORN/>).

• Método 04. Identificación de genes de lisogenia, resistencia y virulencia

Antes de seleccionar un fago para su uso en terapia es necesario descartar que sea portador de genes de lisogenia, resistencia y virulencia. Para identificar proteínas implicadas en el ciclo lisogénico se pueden utilizar distintas herramientas bioinformáticas como: i) PHASTER (<https://phaster.ca>); ii) RAST (<https://rast.nmpdr.org>); iii) PHANOTATE (<https://github.com/deprekate/PHANOTATE>) iv) PHACTS (<http://www.phantom.org/PHACTS/>). Los genes de virulencia y resistencia bacteriana se pueden identificar con herramientas como: i) VirulenceFinder2.0 (<https://cge.food.dtu.dk/services/VirulenceFinder/>), ii) ResFinder 4.1 (<https://cge.food.dtu.dk/services/ResFinder/>) y iii) Aribav2-6.2 (<https://github.com/sanger-pathogens/ariba>), respectivamente.



PASO 3. ADAPTACIÓN AL HUÉSPED/DESARROLLO DE CÓCTELES

• Método 01. Método Appelmans. Preparación de cócteles. Sinergia con antibióticos

Este método se puede realizar con un único fago o bien utilizando todos los fagos que van a componer un cóctel. El fin último de este método es la adaptación del fago o del cóctel de fagos a la cepa bacteriana que queremos eliminar.

Para iniciar este protocolo se realizan diluciones seriadas del fago o de la mezcla de fagos hasta la dilución más alta que se quiera probar. Posteriormente los fagos a cada una de las diluciones se mezclan con un cultivo de la bacteria diana que se habrá diluido hasta una concentración de 10^6 UFC/ml. Se cultiva en las condiciones óptimas para la bacteria durante 48 h o más si la bacteria es de crecimiento lento. Se hará una valoración del crecimiento bacteriano midiendo la densidad óptica a O.D. 600 nm cada 24 h y comparándolo con los controles.

Se selecciona el tubo con la mayor dilución de fagos y la densidad óptica similar al control, se le añade cloroformo (1%), y se agita a 4° C durante 2 h. Tras este período, se recupera la fase superior y se filtra con un filtro de 0,45 µm o 0,22 µm.

Servicio / Unidad de Microbiología Hospital.....	FAGOTERAPIA, manejo en el laboratorio AISLADOS AMBIENTALES y BANCOS de FAGOS	PNT-FT-02	
		Edición N° 01	Página 11 de 20

Este proceso se repetirá de 3 a 4 veces con cada cepa.

En el caso de querer hacer un **cóctel de fagos** se deben comparar los valores de densidad óptica a 600 nm de los fagos individuales con los valores obtenidos con la mezcla de fagos. Para considerar un cóctel como válido los valores obtenidos con la mezcla deben ser menores que los valores obtenidos con los fagos solos.

Para los estudios de sinergia del cóctel de fagos (o fagos concretos) con antibióticos, se realizan pruebas de sinergia de fagos y antibióticos mediante dos técnicas principalmente: i) Estudios de curvas de muerte bacteriana (manual o automatizada) a partir de diluciones bacterianas en medio líquido a OD600 en intervalos de 1 h durante 6 h, la cual permite medir la actividad bactericida de la combinación si esta está presente; ii) Método de tablero o *Checkerboard test*, que aporta datos de inhibición en combinación. El desarrollo de ambas técnicas se especifica en el Procedimiento Seimc sobre los “Métodos microbiológicos para la determinación in vitro de la actividad de combinaciones de antimicrobianos.2020.



PASO 4/5. PRODUCCIÓN, PURIFICACIÓN Y CONCENTRACIÓN

• Método 01. Ampliación del proceso de purificación mediante ultracentrifugación en gradiente de densidad

La ultracentrifugación en gradiente de densidad es una técnica común utilizada para aislar y purificar una amplia gama de fagos únicamente en función de su densidad. En este caso se realizará la técnica de separación mediante ultracentrífuga isopícnica de gradiente de densidad que aprovecha las diferencias de densidad entre impurezas gruesas y fagos autoformación gradientes, la solución de fago se coloca en capas sobre el medio de gradiente y se centrifuga, y, a medida que las moléculas de soluto sedimentan para formar el gradiente, fagos idénticos forman bandas en sus puntos isopínicos.

Para realizar la ultracentrifugación de fagos en primer lugar se debe preparar un gradiente de densidad escalonada de CICs (Cloruro (Cl) de cesio (Cs)) en un tubo transparente de fondo redondo para ultracentrífuga. El gradiente se preparará por capas de 2 ml de $d = 1,6$, 3 ml de $d = 1,5$ y 3 ml de $d = 1,3$ de abajo hacia arriba. El volumen sobrante del tubo se llenará con el lisado del fago previamente filtrado. Los tubos se deben colocar y equilibrar en los soportes del rotor y mantener a 4°C. Los tubos se ultracentrifugarán a 28.000 g durante 4h a 4°C. Al finalizar se pinchará el tubo con una aguja de calibre 26 y una jeringa en la zona donde está la banda visible que contiene los fagos. Con esta técnica se logra la eliminación de otras cepas de fagos no deseadas y macro impurezas. Es decir, diferentes fagos serán separados en función de su densidad.

Además, grandes agregados de endotoxinas permanecerán cerca de la parte superior del gradiente, mientras que los microsolutos pasarán al fondo del gradiente.

Tras la ultracentrifugación se debe utilizar la diálisis para eliminar residuos de CICs de las partículas de fago en solución por difusión selectiva y pasiva a través de una membrana semipermeable. Las partículas de fago que son más grandes que los poros de la membrana de 100 kDa se retienen, pero las moléculas pequeñas y las sales del tampón pasan libremente a través de la membrana, reduciendo la concentración de esas moléculas en la preparación de fagos. La diálisis también logra la eliminación de pequeñas bacterias y el intercambio de tampones de almacenamiento para productos de fagos, pero diluye la preparación de fagos.

Servicio / Unidad de Microbiología Hospital.....	FAGOTERAPIA, manejo en el laboratorio AISLADOS AMBIENTALES y BANCOS de FAGOS	PNT-FT-02	
		Edición N° 01	Página 12 de 20

• Método 02. Aplicaciones de membranas de filtración en la producción de fagos

Se pueden utilizar dos tipos de filtración para recuperar fagos la microfiltración sin salida y la ultrafiltración de flujo cruzado. La microfiltración sin salida se utiliza para retener tanto las células bacterianas como las partículas que se recogen en la superficie de la membrana formando una capa de filtración que mejora la eficiencia de separación. La principal desventaja de este método es la suciedad que se acumula en la membrana. Para evitar que la membrana se ensucie se recomienda evitar el uso de cloroformo para esterilizar los derivados de la lisis final de las células bacterianas resistentes a los fagos, que normalmente se desarrollan con cultivo. También se deben realizar dos rondas de centrifugación para los lisados, con un cambio de botella estéril en el medio. Además, se debe utilizar un diseño de filtro de cartucho plisado, que proporciona una mayor superficie. Por último, se utilizan dos filtros de cartucho plisados para medir el tamaño de los poros de la membrana en dos pasos.

A continuación, se debe ultra-filtrar por membrana los lisados con un alto concentración de fagos. Dicho sistema funciona mediante la introducción de lisado filtrado sin salida bajo presión a través de la superficie de la membrana, en lugar de directamente sobre el microfiltro. Durante la filtración, cualquier material más pequeño que el poro de la membrana de flujo cruzado de 100 kDa pasa a través de la membrana, mientras que las partículas de fago suspendidas más grandes permanecen en la corriente retenida. Un tamaño de poro de membrana de 100 kDa proporciona el equivalente a una partícula esférica con un diámetro de 3 nm y, por lo tanto, es suficiente retener todos los fagos conocidos. Por otro lado, se debe emplear tampón recién esterilizado en autoclave para aumentar la pureza y mejorar la separación de los fagos de los desechos bacterianos y el medio de crecimiento. Simultáneamente, para enjuagar los micro-solutos de la solución de fago se debe extraer el permeado a la misma velocidad a la que se agrega el tampón.

• Método 03. Desarrollo de cromatografía de fago. Eliminación de endotoxinas

La eliminación de endotoxinas es fundamental cuando se producen fagos terapéuticos en sistemas bacterianos. La eliminación de las endotoxinas se debe realizar mediante cromatografía de afinidad, que es probablemente el método más fiable y el más empleado. Posteriormente se recomienda el uso del ensayo LAL (Ensayo del lisado de amebocitos del *Limulus*) debido a su sensibilidad, reproducibilidad y simplicidad para detección de endotoxinas, que utiliza el sistema de coagulación de la sangre del cangrejo herradura y los coágulos exposición a endotoxinas. Dicho método (ensayo LAL), se fundamenta en la coagulación de la hemolinfa por medio de la interacción de la endotoxina con los amebocitos contenidos en esta, lo que causa la liberación de una cascada de reacciones que hacen que se forme un gel visible y consistente.

Es importante tener en cuenta que para realizar una prueba de LAL todo el material de vidrio debe ser apirógeno y la preparación de la muestra debe ser de modo aséptico, para evitar contaminación. Un aspecto crítico a tener en cuenta es la validación del ensayo. Es válido puntualizar que lo que se valida es la muestra o su dilución y no se realizan ensayos de linealidad, exactitud o precisión como se describe para la mayoría de los métodos analíticos. El método empleado es semicuantitativo. La prueba consiste en la adición de 0,1 ml de lisado y 0,1 ml de producto a evaluar en tubos despirogenizados, que se colocan al baño María a 37 °C y luego se invierte el tubo con cuidado a 180 °C. Si la solución ha formado un gel y permanece en el fondo del tubo la prueba es positiva; de lo contrario, si la solución permanece líquida la prueba es negativa (<http://scielo.sld.cu/pdf/vac/v21n3/vac06312.pdf>).

• Método 04. Titulación de fagos

La técnica de doble capa de agar descrita en el paso 1 se utiliza habitualmente para cuantificar el número de

Servicio / Unidad de Microbiología Hospital.....	FAGOTERAPIA, manejo en el laboratorio AISLADOS AMBIENTALES y BANCOS de FAGOS	PNT-FT-02	
		Edición N° 01	Página 13 de 20

partículas de fagos en las preparaciones. Una alternativa a la técnica de la doble capa consiste en realizar varias diluciones en serie de diez veces de un fago stock en una microplaca y aplicar estas diluciones en una placa Petri de agar sembrada con bacterias. La titulación de placas convencional también se puede sustituir o complementar con el uso de pruebas en tiempo real. PCR cuantitativa (qPCR) si se dispone de cebadores para la cepa del fago.



-PASO 6. CARACTERIZACIÓN FÍSICOQUÍMICA Y ALMACENAMIENTO

La preparación de los fagos para su aplicación será distinta en función de la vía de administración, pero en todos los casos es necesario en primer lugar la identificación de la cepa huésped bacteriana y la producción de los preparados de fagos siguiendo los procesos anteriormente descritos.

Los preparados de fagos empleados en terapia son “ingredientes farmacéuticos activos de fagos” o *Phage active pharmaceutical ingredients* (APIs). Cada API contiene un único tipo de fagos y varios API se pueden combinar en una preparación magistral ampliando el espectro de acción del medicamento.

Los API se preparan a partir de lotes de fagos de calidad controlada, previamente caracterizados y purificados. Una vez obtenidos los lotes de fagos se debe garantizar que cumplan los criterios de calidad establecidos en la normativa como por ejemplo ISO17025.

Los criterios de calidad que se deben establecer son los siguientes:

- Identidad del fago: se establecerá que cepas de fagos compone el API mediante técnicas de identificación genómica como la secuenciación descrita en el paso 2 o si es posible mediante técnicas de amplificación del ADN como la PCR.
- Evaluación cuantitativa de los fagos: la cantidad de fago que compone el API se realizará mediante la técnica de titulación descrita en el paso 1 o bien mediante qPCR.
- Determinación cuantitativa de la carga biológica: la cuantificación de la carga microbiológica europea se realizará siguiendo la metodología descrita en la farmacopea europea (EP2.6.12) ([http://uspbpep.com/ep50/2.6.12.%20Microbiological%20examination%20of%20non-sterile%20products%20\(total%20viable%20aerobic%20count\).pdf](http://uspbpep.com/ep50/2.6.12.%20Microbiological%20examination%20of%20non-sterile%20products%20(total%20viable%20aerobic%20count).pdf)).

Los APIs deben tener una carga ≤ 10 UFC/100 ml o g.

- Endotoxinas bacterianas: se determinará la presencia de endotoxinas siguiendo la metodología descrita en la farmacopea europea (EP 2.6.14) (<https://gmpua.com/Validation/Method/LAL/EUPHARMACO-POEIA.pdf>). El límite de endotoxinas depende del producto terapéutico final y de la vía de administración. La dosis máxima administrada por la vía prevista por hora no debe contener endotoxina suficiente para provocar una reacción tóxica, por ejemplo, como se describe en el EP5.1.10 la dosis máxima por vía intravenosa es de 5 unidades de endotoxina UE/Kg/h.

- pH: Se determina en base a la metodología descrita en la farmacopea europea (EP 2.2.3) (<http://www.fptl.ru/biblioteka/farmacop/EP-7.0-2.pdf>). Los preparados de fagos se diluyen en tampón SM a diferentes pHs. Los fagos se cuantifican en placas de doble agar como se ha descrito en el método 01. Los preparados para la formulación deben estar a pH 6-8.

Servicio / Unidad de Microbiología Hospital.....	FAGOTERAPIA, manejo en el laboratorio AISLADOS AMBIENTALES y BANCOS de FAGOS	PNT-FT-02	
		Edición N° 01	Página 14 de 20

- Contenido en agua: se realiza según la farmacopea europea (EP 2.5.12) <http://www.uspbpep.com/ep60/2.5.12.%20water%20semi-micro%20determination%2020512e.pdf>
- El contenido en agua máximo permitido en un API es de 3% m/m excepto en para fórmulas como los liofilizados.
- Impurezas: cuando se en la obtención de los fagos para el API se empleen reactivos como el cloroformo se debe emplear un protocolo adecuado para la cuantificación de los reactivos residuales y establecer cuáles son las cantidades seguras.

El almacenamiento de los APIs se debe realizar en condiciones que no alteren la titulación ni la viabilidad de los fagos. Así previamente será necesario determinar el pH y la temperatura en que los fagos permanecen estables más tiempo. La solución de almacenamiento debe presentar un pH estable y neutro y bajo contenido iónico (por ejemplo, DPBS sin Ca^{2+} y Mg^{2+}) para la producción de API y preparaciones magistrales, mantenidas a 4°C en vidrio. La liofilización con estabilizadores, como sacarosa y thehalosa, podría mantener la capacidad infectiva de los fagos durante 8 años y hasta 126 días después de la resuspensión en solución salina (CaCl_2 y/o MgCl_2) para su administración. Sin embargo, la variabilidad entre los fagos es importante, por lo que las concentraciones del estabilizador, la influencia del pH y la osmolaridad son parámetros importantes que necesitan ser optimizados individualmente para cada fago y/o cóctel de fagos.

9. RESPONSABILIDADES

El procedimiento deberá llevarse a cabo por personal técnico cualificado con un entrenamiento específico. La supervisión de la técnica y de los resultados emitidos deberá realizarla el Facultativo Especialista responsable del laboratorio de Microbiología que los emite.

10. LIMITACIONES DEL PROCEDIMIENTO

Este procedimiento está desarrollado especialmente para fagos que infectan bacterias Gram-negativas cultivadas aeróbicamente a 37 C°. Además, los protocolos deben adaptarse a los fagos líticos a estudio, titulación de fagos, así como las bacterias huésped diana y clínicas a estudio. Recientes investigaciones en relación a los fagos están siendo potenciadas, por lo que no se descarta una actualización este procedimiento de fagoterapia en los próximos meses.

12. BIBLIOGRAFÍA

1. Kropinski AM, Mazzocco A, Waddell TE, Lingohr E, Johnson RP. Enumeration of bacteriophages by double agar overlay plaque assay. *Methods Mol Biol.* 2009;501:69-76.
2. Kutter E. Phage host range and efficiency of plating. *Methods Mol Biol.* 2009;501:141-9.
3. Hyman P, Abedon ST. Practical methods for determining phage growth parameters. *Methods Mol Biol.* 2009;501:175-202.
4. Kropinski AM. Practical Advice on the One-Step Growth Curve. *Methods Mol Biol.* 2018;1681:41-7.
5. Philipson CW, Voegtly LJ, Lueder MR, Long KA, Rice GK, Frey KG, et al. Characterizing Phage Genomes for Therapeutic Applications. *Viruses.* 2018;10(4).
6. Hunt M, Mather AE, Sanchez-Buso L, Page AJ, Parkhill J, Keane JA, et al. ARIBA: rapid antimicrobial resistance genotyping directly from sequencing reads. *Microb Genom.* 2017;3(10):e000131.
7. Merabishvili M, Pirnay JP, De Vos D. Guidelines to Compose an Ideal Bacteriophage Cocktail. *Methods*

Servicio / Unidad de Microbiología Hospital.....	FAGOTERAPIA, manejo en el laboratorio AISLADOS AMBIENTALES y BANCOS de FAGOS	PNT-FT-02	
		Edición N° 01	Página 15 de 20

9. Luong T, Salabarria AC, Edwards RA, Roach DR. Standardized bacteriophage purification for personalized phage therapy. Nat Protoc. 2020;15(9):2867-90.
10. Pasqua S, Niotta MC, Di Martino G, Sottile D, Douradinha B, Miele M, et al. Complete intra-laboratory validation of a LAL assay for bacterial endotoxin determination in EBV-specific cytotoxic T lymphocytes. Mol Ther Methods Clin Dev. 2021;22:320-9.
11. Pirnay JP, Verbeken G, Ceyssens PJ, Huys I, De Vos D, Ameloot C, et al. The Magistral Phage. Viruses. 2018;10(2).
12. Duyvejonck H, Merabishvili M, Vaneechoutte M, de Soir S, Wright R, Friman VP, et al. Evaluation of the Stability of Bacteriophages in Different Solutions Suitable for the Production of Magistral Preparations in Belgium. Viruses. 2021;13(5).

Servicio / Unidad de Microbiología Hospital.....	FAGOTERAPIA, manejo en el laboratorio AISLADOS AMBIENTALES y BANCOS de FAGOS	PNT-FT-02	
		Edición N° 01	Página 16 de 20

ANEXO

PROTOCOLO 1

Aislados ambientales y Banco de Fagos



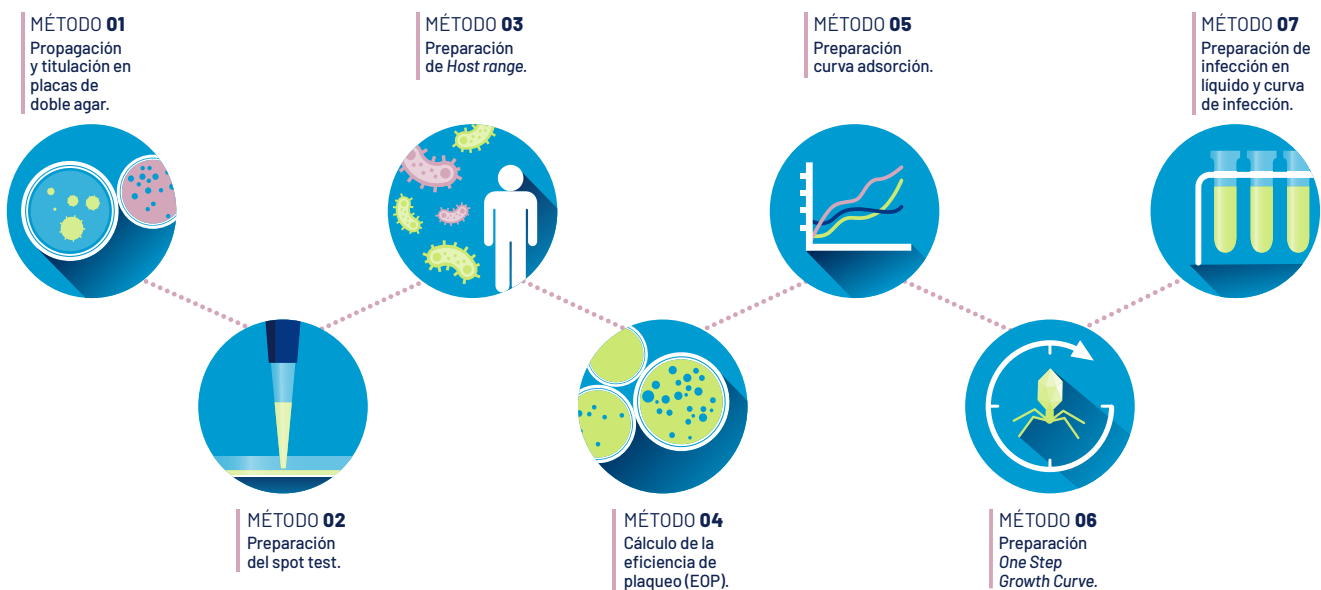
Servicio / Unidad de Microbiología Hospital.....	FAGOTERAPIA, manejo en el laboratorio AISLADOS AMBIENTALES y BANCOS de FAGOS	PNT-FT-02	
		Edición N° 01	Página 17 de 20

ANEXO

PROTOCOLO 1
Aislados ambientales
Banco de Fagos

PASO 1

Caracterización de la actividad infectiva y selección



Servicio / Unidad de Microbiología Hospital.....	FAGOTERAPIA, manejo en el laboratorio AISLADOS AMBIENTALES y BANCOS de FAGOS	PNT-FT-02	
		Edición N° 01	Página 18 de 20

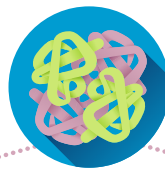
ANEXO

PROTOCOLO 1
Aislados ambientales
y Banco de Fagos

PASO 2 Caracterización genotípica



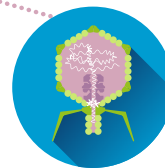
MÉTODO 01
Esquema de secuenciación.
Tipos de secuenciación:
Illumina, Minion, Ion Torrent.



MÉTODO 03
Anotación funcional proteínas:
RAST, FIGfam, GLIMMER-3, THEA.
Anotación manual ORFs: PHASTER,
BLASTp, HMMER, Hhpred, PhAnTOME, pVOGs.
Anotación tRNAs: tRNAscan-SE, ARAGORN.



MÉTODO 02
Búsqueda de contaminaciones.
• Contaminación por secuencias del huésped: EDGE Bioinformatics software.
• Clasificación taxonómica: GOTTECHA, Kraken, MetaPhlAn y BWA-mem mapeado para RefSeq.



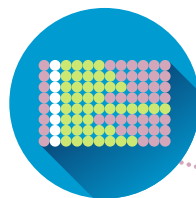
MÉTODO 04
Identificación de genes lisogenia:
PHASTER, RAST, THEA, PHACTS.
Genes de virulencia:
Virulence Finder.
Genes de resistencia:
Resistance Finder.

Servicio / Unidad de Microbiología Hospital.....	FAGOTERAPIA, manejo en el laboratorio AISLADOS AMBIENTALES y BANCOS de FAGOS	PNT-FT-02	
		Edición N° 01	Página 19 de 20

ANEXO

PROTOCOLO 1
Aislados ambientales
y Banco de Fagos

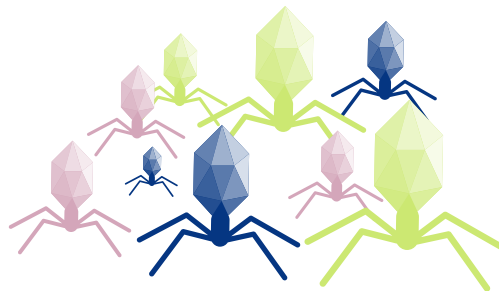
PASO 3
Adaptación al huésped y desarrollo de cócteles



MÉTODO 01
Desarrollo del
método Appelmans.



MÉTODO 02
Preparación de
un cóctel de
fagos obtenidos
por Appelmans.



Servicio / Unidad de Microbiología Hospital.....	FAGOTERAPIA, manejo en el laboratorio AISLADOS AMBIENTALES y BANCOS de FAGOS	PNT-FT-02	
		Edición N° 01	Página 20 de 20

ANEXO

PROTOCOLO 1
**Aislados ambientales
y Banco de Fagos**

PASO 4
Purificación y concentración



MÉTODO 01
Ultracentrifuga, fagos
centrifugados y
recuperación de los
fagos desde el tubo.



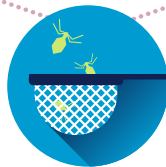
MÉTODO 03
Desarrollo de
cromatografía de fagos.
Eliminación de
endotoxinas.



MÉTODO 05
Estudios de Investigación
(Pequeña escala).
Tratamientos Medicina
Personalizada (Gran escala).
Formula magistral.



MÉTODO 02
Preparación de
los protocolos
de filtración.



MÉTODO 04
Dilución seriada de
fagos y técnica de
doble agar con placas
de lisis para recuentos.



PROCEDIMIENTOS EN MICROBIOLOGÍA CLÍNICA (número 1, 2023)

FAGOTERAPIA, manejo en el laboratorio

Editores: Miriam Álvarez-Martínez y Patricia Ruiz Garbajosa

Coordinadora: María del Mar Tomás*

Autores: Lucía Blasco^{1,2}, Meritxell de Jesús García Quintanilla^{3,7}, Jaime Esteban^{3,6,7}, José Ramon Paño^{4,6,7*}, Jesús Oteo-Iglesias^{2,5,6,7*} y María del Mar Tomás^{1,2,7 *}

1. Grupo de Microbiología Traslacional y Multidisciplinar (MicroTM)-Instituto de Investigación Biomédica de A Coruña (INIBIC), Departamento de Microbiología-Hospital de A Coruña (CHUAC); Universidad de A Coruña (UDC), A Coruña, España; 2. Grupo de Estudio sobre Mecanismos de Acción y Resistencia a los Antimicrobianos (GEMARA) en representación de la Sociedad Española de Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica (SEIMC); 3. Departamento de Microbiología Clínica-Instituto de Investigación Sanitaria Fundación Jiménez Díaz, Madrid, España; 4. Hospital Clínico Universitario "Lozano Blesa". Instituto de Investigación Sanitaria Aragón. Zaragoza, España; 5. Laboratorio de Referencia e Investigación de Resistencias Antibióticas e Infecciones Sanitarias, Centro Nacional de Microbiología, Instituto de Salud Carlos III, Majadahonda, Madrid, España; 6. CIBER de Enfermedades Infecciosas (CIBERINFEC), Instituto de Salud Carlos III, Madrid, España; 7. MePRAM, Proyecto de Medicina de Precisión contra las resistencias Antimicrobianas.

***Autor de correspondencia:** María Tomás; Email: MA.del.Mar.Tomas.Carmona@sergas.es

La terapia con fagos líticos (también llamada fagoterapia) es una forma médica de control biológico de infecciones bacterianas, que utiliza virus naturales, llamados bacteriófagos o fagos, así como virus sintéticos (o modificados genéticamente) y proteínas derivadas de los fagos, como agentes antibacterianos. Hace más de 100 años desde el inicio de la aplicación de la fagoterapia, sin embargo, en la actualidad está experimentando un resurgimiento en interés, con un número creciente de estudios de casos clínicos publicados debido a la crisis de la resistencia a los antimicrobianos. Por todo ello, la terapia con fagos, se enfrenta a desafíos médicos, biológicos, normativos y económicos. En este procedimiento, analizamos estos desafíos y desarrollamos las diversas líneas de protocolización en el manejo de los fagos líticos en el laboratorio. Nos centramos en la obtención de fagos líticos naturales ambientales y/o en muestras clínicas, así como en los pasos a seguir para el desarrollo de un banco de fagos mediante la caracterización de la actividad infectiva y genómica de los fagos líticos, la adaptación al huésped/desarrollo cócteles (o combinaciones) de fagos junto la producción, purificación y concentración de dichos cócteles de fagos, y finalmente, la caracterización fisicoquímica y almacenamiento de los mismos. Además, es necesario el soporte de las agencias regulatorias, en el caso de España, la AEMPS (Agencia Española de Medicamentos y Productos Sanitarios) para su uso clínico.

El éxito terapéutico de la fagoterapia frente a las bacterias resistentes a los antimicrobianos dependerá de su aplicación a través de ensayos clínicos, así como a través del "uso compasivo" frente a determinadas infecciones mediante una medicina personalizada. Por ello, es clave la estandarización de protocolos en laboratorios clínicos y servicios para obtener resultados que permitan avalar dicha terapia en el tratamiento de enfermedades infecciosas.