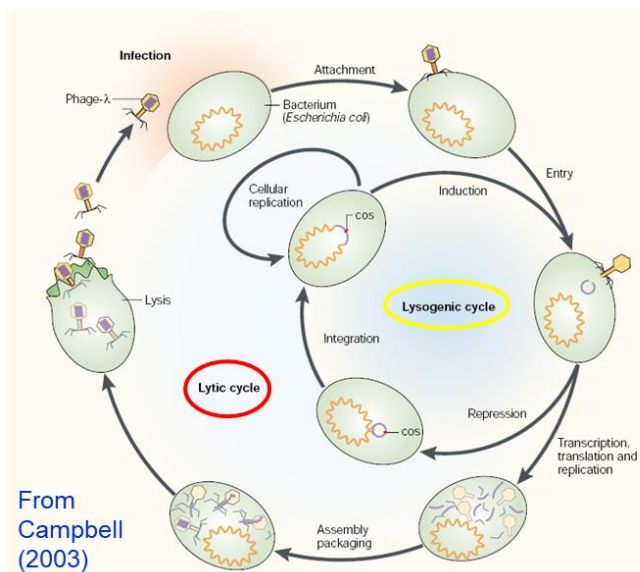


PRUEBA DE FAGO DE BORRELIA PHELIX:

Una forma innovadora de detectar la infección por *Borrelia*
y una respuesta a los enfermos no diagnosticados

¿Qué son los bacteriófagos?

Los fagos pertenecen a la forma de vida más simple y primitiva (los virus). Eligen de una manera extraordinariamente específica el huésped bacteriano que infectan para propagarse. Pueden infectar rápidamente a su huésped e insertar su material genético en él. Como resultado, producen un gran número de copias que pueden infectar aún más (y en algunos casos específicos diezmar) a la bacteria causante de la infección. También pueden hacer que la bacteria sea vulnerable al tratamiento médico clásico al alterar su material genético.



- The **lysogenic cycle**: The phage *infects* a bacterium and inserts its DNA into the bacterial chromosome, allowing the phage DNA (now called a **prophage**) to be copied and passed on along with the cell's own DNA.

- The **lytic cycle**: The phage infects a bacterium, hijacks the bacterium to make lots of phages, and then kills the cell by making it explode (*lyse*).

Los bacteriófagos son ubicuos y forman parte del "ecosistema" natural de los ciclos de vida y replicación de las bacterias. Hemos decidido centrarnos en los bacteriófagos como objetivo para la detección directa de una infección, ya que son específicos y superan en número a la población bacteriana patógena.

¿Por qué utilizar los bacteriófagos como herramienta de diagnóstico?

Las infecciones transmitidas por garrapatas están aumentando en todo el mundo: la enfermedad de Lyme es una de las infecciones transmitidas por vectores más prevalentes en Estados Unidos y Europa y está alcanzando niveles epidémicos (Kugeler et al. 2015; Sykes et al. 2014). Aunque la mayoría de las garrapatas tienen la capacidad de transmitir una serie de patógenos que causan enfermedades en las personas, la enfermedad de Lyme es la enfermedad transmitida por garrapatas más conocida y está causada por bacterias del género *Borrelia*; típicamente *Borrelia burgdorferi* que son bacterias espiroquetas gram negativas. Las *Borrelia* se dividen en "genoespecies"; las más comunes son *B. burgdorferi sensu stricto*, *B. garinii*, *B. afzelii*, *B. spielmanii*, *B. bavariensis* y la recientemente identificada *B. miyamotoi*. La elevada tasa de fracaso de las pruebas relacionadas con las infecciones transmitidas por garrapatas subraya la necesidad de adoptar nuevos enfoques, es decir, no depender de la serología ni de las pruebas de dos niveles.

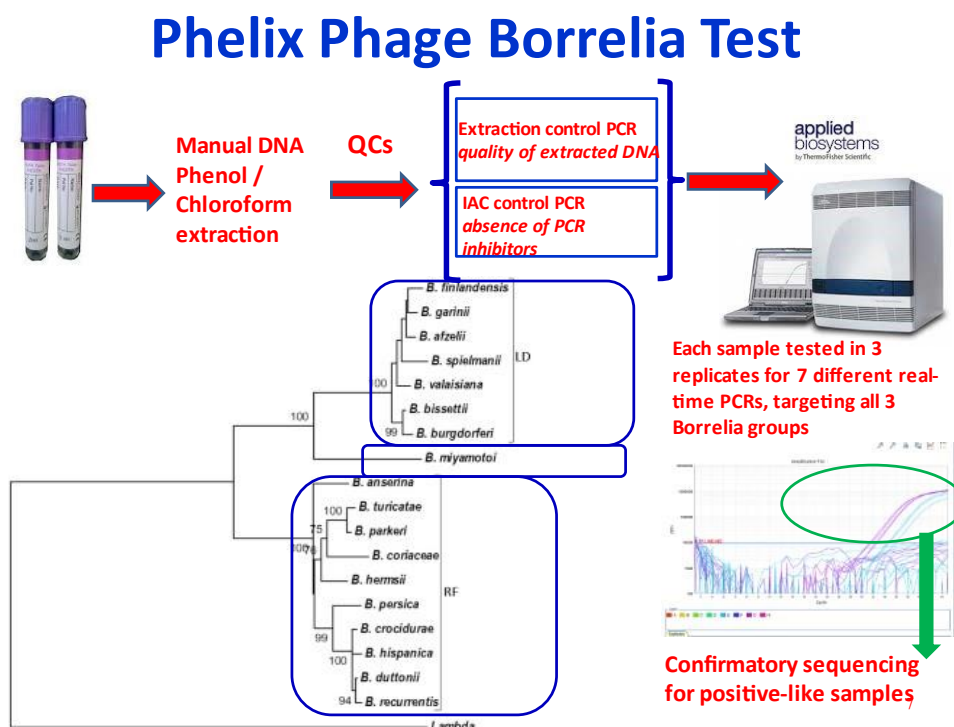
Los ensayos basados en la PCR se utilizan cada vez con más frecuencia en el ámbito clínico, y tienen varias ventajas claras sobre la serología. Detectan directamente la presencia de agentes infecciosos. A diferencia de la serología, no dependen del desarrollo de anticuerpos, que puede tardar varias semanas, y no todos los

pacientes pueden desarrollarlos. Sin embargo, las pruebas de PCR también tienen limitaciones. El cuello de botella actual de las PCR para la detección de *Borrelia* es su baja sensibilidad.

Hemos desarrollado un método directo y específico que es más sensible. Nuestro método de detección (patentado por Phelix R&D y la Universidad de Leicester, WO2018083491A1) consiste en apuntar a la presencia de profagos superados que son parte del ciclo lisogénico de la bacteria. Más concretamente, una forma de aumentar la sensibilidad de un ensayo de PCR es aumentar el número de objetivos de la PCR. En contraste con los métodos actuales de PCR en el diagnóstico de Lyme que amplifican regiones de ADN genómico bacteriano que tienen una sola copia en cada bacteria (como el gen 16S rRNA bacteriano, el gen RecA y la región intergénica 5S-23S), proponemos un ensayo de PCR más sensible, basado en fagos, para detectar la Enfermedad de Lyme y la Fiebre Recaída causadas por especies de *Borrelia*. Para ello, nos dirigimos a secuencias de ADN de fagos específicas de todas las especies de *Borrelia*: Enfermedad de Lyme y Fiebre Recaída. Los bacteriófagos podrían convertirse en una herramienta de diagnóstico basada en el principio de que si hay fagos es porque hay bacterias. Así, el concepto es que ya no buscamos la bacteria sino su bacteriófago específico, que debe encontrar la bacteria para sobrevivir. El material genético del bacteriófago es, por tanto, específico de la bacteria a la que se asocia. La prueba buscará la presencia de bacteriófagos específicos como testigos de una infección específica de *Borrelia*. Los fagos vienen con las bacterias (se transmiten con ellas durante la picadura de la garrapata), y sólo pueden sobrevivir si tienen su huésped bacteriano específico.

Este enfoque ofrece una mayor sensibilidad debido al hecho de que hay muchos más fagos circulantes en comparación con las bacterias (una media de 1 a 100 fagos por bacteria), por lo que es preciso y más sensible que las pruebas de PCR convencionales que suelen ser negativas debido a la baja concentración bacteriana en la sangre. También es una prueba DIRECTA, que evidencia el material genético propio de las bacterias en el cuerpo, en contraste con todas las pruebas indirectas existentes (ELISA, Western BLOT, prueba LTT/ELISPOT). En segundo lugar, permite diferenciar los distintos subtipos de bacterias (*B. burgdorferi* s.l., *B. miyamotoi*, ...), así como las fiebres recidivantes. Por último, esta prueba es también la mejor opción para la detección precoz (recuerde que los anticuerpos necesitan varias semanas para aparecer...).

¿Qué es la prueba de fagos Phelix?



La prueba Phelix Phage (patente n° WO2018083491A1) se realiza en sangre completa o la primera orina de la mañana, pero también puede utilizarse para cualquier otro material que se sospeche que contenga un patógeno determinado (como una biopsia, un líquido de punción de una articulación inflamada, líquido

cefalorraquídeo o garrapatas). El primer paso es extraer el ADN de la muestra proporcionada utilizando un método manual específico para garantizar la mejor recuperación posible del ADN patógeno. El ADN extraído se somete primero a dos pasos de verificación de la calidad: (i) para garantizar la calidad del ADN extraído y (ii) para asegurar la ausencia de inhibidores de la reacción de PCR. Si la muestra supera estos dos pasos de control de calidad, se somete a continuación a 7 PCRs en tiempo real utilizando cebadores y sondas propias para la detección específica de fagos. Las 7 PCRs tienen como objetivo detectar los siguientes objetivos (i) *Borrelia miyamotoi*, (ii) *Borrelia burgdorferi sensu lato* (*B. burgdorferi s.s.*, *B. bissetti*, *B. bavariensis*, *B. valaisiana*, *B. afzelii*, *B. garinii*), (iii) Fiebre recurrente (*B. hermsii*, *B. recurrentis*, *B. crocidurae*, *B. duttonii*). Cada objetivo se prueba en 3 réplicas. Si la muestra muestra amplificación es probable que sea positiva. Estos fragmentos amplificados se analizan a continuación mediante secuenciación para confirmar la positividad de la muestra (es decir, para excluir los falsos positivos).

Significado

Es importante analizar el resultado de la prueba dentro del contexto clínico de la persona que está siendo diagnosticada. El resultado de la prueba de fagos por PCR se comunica como positivo o negativo. Un resultado positivo significa que en el momento de la prueba, el paciente tenía *Borrelia* presente en su cuerpo. Un resultado positivo en ausencia de síntomas sugiere que, a pesar de la presencia de la bacteria, el sistema inmunitario parece controlar la situación. En el caso de una prueba positiva después de un diagnóstico serológico reciente o anterior, es importante discutir sobre la posibilidad de una etapa tardía/síndrome post-Lyme o forma crónica de borreliosis. Un resultado negativo significa que en el momento de la prueba y en una muestra determinada, no se evidenció la presencia de *Borrelia*. Es importante recordar que en los estadios tardíos el número de bacterias es muy bajo y se oculta sobre todo en los tejidos y las biopelículas; en consecuencia, el número de fagos circulantes también será bajo. Es aconsejable volver a realizar la prueba en el período en el que se note el empeoramiento de los síntomas y/o tras el uso de un agente que rompa biopelículas adecuado. Recuerde que las garrapatas portan y transmiten muchos otros patógenos (*Bartonella*, *Rickettsia*, *Anaplasma*, etc.) que dan síntomas muy similares. Por lo tanto, una prueba de *Borrelia* negativa con síntomas persistentes podría sugerir la presencia de otros patógenos. Por último, también es importante recordar que en las fases avanzadas los síntomas están reflejando profundas desregulaciones inmunológicas (véase <https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fimmu.2020.01560/full>.) y gastrointestinales como consecuencia de una(s) enfermedad(es) transmitida(s) por vectores no tratada(s) previamente. La inflamación crónica y las infecciones de bajo grado son las complicaciones resultantes de las enfermedades transmitidas por vectores no cubiertas y, por lo tanto, deben abordarse además de las pruebas para detectar la presencia de un patógeno específico.

Conclusiones generales

Este método, disponible públicamente desde julio de 2019, se utiliza eficazmente para evaluar tanto muestras humanas como garrapatas. Los datos agregados están mostrando una media del 30 % de resultados negativos y un 70 % de positivos, entre los cuales más del 60 % indicaron la presencia de fagos específicos para el grupo de la fiebre recurrente de *Borrelia* en general, y *Borrelia miyamotoi* y *Borrelia hermsii* en particular (datos no publicados). Además, las garrapatas de 2019 - 2021 han sido analizadas con el mismo método. Los resultados obtenidos en las garrapatas mostraron que más del 60% fueron positivos para el grupo de la fiebre recurrente de *Borrelia* (principalmente *B. miyamotoi* y *B. hermsii*) y sólo el 10% para *B. burgdorferi* sl (datos no publicados). Además, el diseño de la prueba de *B. burgdorferi* sl se evaluó más a fondo utilizando un panel del biobanco de la enfermedad de Lyme que incluía muestras de patentes en fase inicial y muestras de control.

Por lo tanto, la elevada expansión general de los casos no diagnosticados de la enfermedad de Lyme en todo el mundo podría estar relacionada con la elección del cribado, que se centra únicamente en *B. burgdorferi* sl y sólo en raras ocasiones realiza pruebas para *B. miyamotoi* y otras especies de *Borrelia* de la fiebre recurrente, mientras que estas últimas parecen ser cada vez más frecuentes.

Por qué realizar la prueba de fagos de Borrelia

A diferencia de la serología, esta prueba no depende del desarrollo de anticuerpos, que puede tardar varias semanas, y no todos los pacientes son capaces de desarrollarlos.

Es la mejor opción para la detección precoz (los anticuerpos necesitan varias semanas para aparecer....)

Es más sensible que las pruebas convencionales de PCR de Borrelia, que suelen ser negativas debido a la baja concentración de bacterias en la sangre.

Los bacteriófagos circulan en la sangre, por lo que el método de los fagos es adecuado para los pacientes en fase avanzada.

Es una prueba DIRECTA, a diferencia de todas las pruebas indirectas existentes (ELISA, Western BLOT, LTT/ELISPOT), que evidencia una presencia bacteriana continua dado que si hay fagos es porque hay bacterias.

La elevada expansión general de casos de la enfermedad de Lyme no diagnosticados en todo el mundo podría estar relacionada con la elección del cribado centrado sólo en B. burgdorferi si y que sólo en raras ocasiones se realizan pruebas para B. relapsing fever y B. miyamotoi mientras que parecen ser mucho más prevalentes, según nuestros datos obtenidos tanto en muestras humanas como de garrapatas.

La búsqueda de la presencia real de la bacteria mediante pruebas basadas en fagos podría apaciguar el debate y las controversias sobre la elección de las pruebas y los pacientes en fase tardía/crónica.

Información práctica

El Phelix Phage Borrelia Test se realiza principalmente en sangre (2 tubos EDTA con tapa de color lavanda) o la primera orina de la mañana (esto es lo más adecuado para la detección temprana y/o después del uso de rompepelículas), pero también puede realizarse en otros tipos de muestras biológicas (suero, punción lumbar, biopsia, garrapatas, etc., según las necesidades). Los kits se envían previa solicitud (correo electrónico a info@redlabs.be). Los formularios de solicitud pueden descargarse aquí: <https://redlabs.be/ordering-tests/request-forms/>.

Referencias

First peer-reviewed publication by Shan et al, Frontiers in Microbiology 2021:

<https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fmicb.2021.651217/full>

Patent: WO2018083491A1

Este nuevo enfoque, desarrollado por Phelix R&D y el Laboratorio dirigido por el Pr Matha Clockie en la Universidad de Leicester, fue presentado en más de 15 conferencias internacionales por el Dr. Jinyu Shan (PhD, PI de la prueba Phelix Phage en la Universidad de Leicester), el Dr. Louis Teulières (MD, PhD, co-inventor de la prueba) y la Dra. Tanja Mijatovic (PhD, CSO y directora del Laboratorio R.E.D. que realiza esta prueba).

Para saber más sobre la prueba, puede visitar <https://redlabs.be/phelix-phage-borrelia/>

Información complementaria

Por favor, lea <https://blog.redlaboratories.be/2022/05/phelix-phage-test-factors-potentially.html#more> para conocer los factores que pueden afectar a los resultados.

Los Laboratorios R.E.D. tienen la certificación ISO9001:2015

