



Rijksinstituut voor Volksgezondheid
en Milieu
*Ministerie van Volksgezondheid,
Welzijn en Sport*

Bacteriofagen

Huidige kennis, onderzoek en toepassingen

RIVM Briefrapport 2018-0044
S. David et al.



Rijksinstituut voor Volksgezondheid
en Milieu
*Ministerie van Volksgezondheid,
Welzijn en Sport*

Bacteriofagen

Huidige kennis, onderzoek en toepassingen

RIVM Briefrapport 2018-0044

S. David et al.

Colofon

© RIVM 2018

Delen uit deze publicatie mogen worden overgenomen op voorwaarde van bronvermelding: Rijksinstituut voor Volksgezondheid en Milieu (RIVM), de titel van de publicatie en het jaar van uitgave.

DOI 10.21945/RIVM-2018-0044

S. David (auteur), RIVM
P. Bijkerk (auteur), RIVM
C. van der Vlugt (auteur), RIVM
B. Beishuizen (auteur), RIVM

Contact:

Silke David

ABR programmateam, Centruminfectieziektebestrijding RIVM

abr@rivm.nl

Dit onderzoek werd verricht in opdracht van het Ministerie van VWS in samenwerking met inhoudelijke experts in het kader van het ABR programma

Dit is een uitgave van:

**Rijksinstituut voor Volksgezondheid
en Milieu**

Postbus 1 | 3720 BA Bilthoven

Nederland

www.rivm.nl

Publiekssamenvatting

Bacteriofagen

Huidige kennis, onderzoek en toepassingen

Bacteriofagen (ofwel fagen) zijn virussen die bacteriën kunnen doden. Ze werden begin vorige eeuw ontdekt, ongeveer tegelijk met antibiotica. Fagen hebben een ander werkingsmechanisme dan antibiotica. In theorie zouden ze daarom kunnen worden ingezet om infecties te behandelen die ongevoelig zijn voor antibiotica. Er is echter nog te weinig onderbouwd klinisch onderzoek beschikbaar om de meerwaarde van bacteriofaagbehandeling te kennen en dit veilig en voor meerdere soorten infecties te kunnen doen. Dit blijkt uit een inventarisatie die het RIVM heeft gemaakt van de huidige kennis over bacteriofagen voor de behandeling van infecties bij mensen.

Een faag werkt heel specifiek tegen één type bacterie, terwijl antibiotica werkzaam zijn tegen meerdere bacteriesoorten. Hierdoor kunnen fagen niet zo snel worden ingezet tegen infecties: eerst moet de ziekmakende bacterie geïdentificeerd en opgekweekt worden, waarna er een bijpassende faag of fagen bij moeten worden gezocht. Om deze praktische redenen hadden antibiotica meer succes en is het gebruik van fagen op de achtergrond geraakt.

De kennis over de precieze werking van bacteriofagen bij behandeling van infecties, hoe ze zich gedragen in het lichaam, welke dosering en behandelduur nodig zijn, en de risico's van gebruik is nog beperkt. Door het tijdrovende en complexe bereidingsproces zijn bacteriofagen niet geschikt om acute infecties te behandelen. In theorie zouden ze wel bij chronische infecties kunnen werken, bijvoorbeeld voor oppervlakkige huidinfecties. Om vragen over zulke toepassingen en de meerwaarde daarvan te beantwoorden is gecontroleerd klinisch onderzoek noodzakelijk, maar dat ontbreekt nog.

Daar komt bij dat de huidige Europese wet- en regelgeving voor geneesmiddelen niet gemaakt is voor patiëntspecifieke biologische producten, zoals bacteriofagen. In Europees verband wordt erover nagedacht om de wet- en regelgeving voor biologische producten te veranderen. In andere sectoren, zoals landbouw en voedselproductie, gelden minder strenge regels voor werkzaamheid en het gebruik van deze producten dan voor gebruik bij mensen. In deze sectoren worden fagen al wel ingezet.

Kernwoorden: bacteriofaag, antibiotica, resistentie

Synopsis

Bacteriophages

Current knowledge, research and applications

Bacteriophages (or phages) are viruses that can infect and kill bacteria. Phages were discovered early in the 20th century, in the same period as antibiotics. Phages have a different mode of action compared to antibiotics. In theory, this should allow them to be used to treat infections that are resistant to antibiotics. However, the current scientific evidence is insufficient to determine the value of phage treatment and to use phages safely and for different types of infections. This is the outcome of a literature study done by the RIVM on the current scientific evidence for treatment of human infections with bacteriophages.

A phage is very specific for one type of bacterium, while antibiotics are effective against multiple species of bacteria. This prohibits the use of phages in treatment of acute infections: the causative bacterium has to be identified first before a matching phage or phages can be found. Because of these practical concerns, antibiotics were more successful and phages fell out of favor.

The understanding of the precise mode of action of bacteriophages when treating infections, how they act in the human body, optimal dosage and length of treatment and the risks of use is still limited. Phages are not suitable for treatment of acute infections because of the time-consuming and complex. In theory phages should be useful in treating chronic infections, such as superficial skin infections. More controlled clinical research is needed to answer these questions.

Aside from practical concerns, the current European legislative framework for pharmaceutical products is not suited to personalized biologicals, such as phages. Efforts are being made at the European level for a possible revision of legislation on biologicals. Legislation on the use of biologicals is less strict for different fields such as agriculture and food production, than it is for human use. Phages are already being used in these fields.

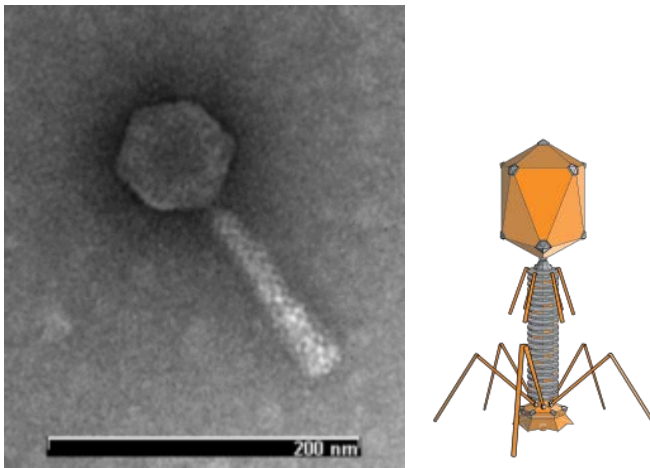
Keywords: bacteriophage, antimicrobial, resistance

Inhoudsopgave

1	Wat is een Bacteriofaag? — 9
1.1	Infectie van een bacterie door een bacteriofaag — 9
1.2	Wat moet je weten om fagen te gebruiken tegen ziekmakende bacteriën? — 10
1.3	Geschiedenis — 10
1.4	Waarom moet een antibacterieel middel voldoen? — 11
2	Bacteriofaagtherapie — 13
2.1	Ervaringen tot nu toe — 13
2.1.1	Oost-Europa — 13
2.1.2	West-Europa — 14
2.1.3	Bacteriofaagtherapie: voorwaarden voor humaan gebruik — 15
2.1.4	Openstaande vragen — 15
2.2	Therapeutische toepassingen van bacteriofagen als alternatief voor antibiotica — 16
2.2.1	Voordelen van faagtherapie — 16
2.2.2	Nadelen van bacteriofaagtherapie — 17
2.2.3	Onderzoek naar klinische toepassing van faagtherapie — 17
3	Overige toepassingen van bacteriofagen — 19
3.1	Toepassing van bacteriofagen tegen ziekten bij dieren en planten — 19
3.2	Toepassing van bacteriofagen in voedselverwerkende industrie — 19
3.3	Toepassing van bacteriofagen in afvalwaterzuivering — 21
3.4	Toepassing van bacteriofaageiwitten — 21
3.5	Toepassing van bacteriofagen in fundamenteel onderzoek — 21
4	Wet- en regelgeving — 23
4.1	Humaan — 23
4.2	Voedsel/veterinair — 24
5	Overige bronnen — 25
5.1	Bevindingen symposium 'The clinical utility of bacteriophages' — 25
5.2	Gesprek met directeur Eliava Instituut, Georgië — 25
5.3	Bezoek aan het Eliava Instituut, Tbilisi, Georgië — 26
6	Bevindingen en conclusies — 29
	Verantwoording — 31
	Literatuur — 33

1 Wat is een Bacteriofaag?

Bacteriofagen, kortweg fagen, zijn virussen die bacteriën kunnen infecteren en doden. De letterlijke betekenis van bacteriofaag is 'bacterie-eter'. Ze bestaan uit een eiwitmantel (capside) met daarin een kern van nucleïnezuren (het genetische materiaal), dat bij de meeste fagen uit DNA, maar soms ook uit RNA bestaat. De meeste fagen hebben een staart waarmee zij zich aan de bacterie hechten. Een microscopische en schematische vorm van een bacteriofaag is weergegeven in Figuur 1.



Figuur 1. Microscopische- en schematische weergave van een bacteriofaag.

Bacteriofagen zijn overal te vinden waar bacteriën zijn: in de bodem, zee- en oppervlaktewater, in voedselproducten (kaas, yoghurt, salami), op planten, dieren en de mens (Brüssow & Kutter, 2005). Elke bacterie heeft specifieke, bijbehorende fagen (Gill & Hyman, 2010). Bacteriofagen tegen een bepaalde pathogene (= ziekmakende) bacterie kunnen doorgaans uit het aangedane weefsel of uit lichaamsexcreties geïsoleerd worden.

Infectie van een bacterie door een bacteriofaag

1.1

Bacteriofagen kunnen alleen bacteriën infecteren. Bacteriofagen zijn zeer specifiek en kunnen niet elke bacterie infecteren: elke bacteriesoort heeft zijn eigen faag (of fagen). Afhankelijk van hun vermeerderingscyclus worden bacteriofagen ingedeeld in twee groepen: lytische en lysogene bacteriofagen.

Een *lytische* bacteriofaag doodt de gevoelige bacterie vrijwel meteen. Hiertoe injecteert de bacteriofaag zijn genetische materiaal in een bacterie, waarna het de bacterie aanzet tot de productie van veel nieuwe bacteriofaagdeeltjes. Vervolgens barst de celwand van de bacterie open (= lysis) en komen de fagen vrij. De nieuwe fagen kunnen nu weer bacteriën infecteren, met explosieve groei van bacteriofagen en dood van de bacteriën tot gevolg.

Een infectie met een *lysogene* bacteriofaag verloopt in twee stappen. Na infectie met de faag wordt het genetische materiaal ingebouwd in het DNA van de bacterie. Als de bacterie zich vermenigvuldigt, wordt ook het faag-DNA mee vermenigvuldigd. Onder stressomstandigheden voor de bacterie kan het faag-DNA geactiveerd worden en knipt een van de faag afkomstig enzym het faag DNA uit het bacterie DNA. Hierna ontstaan weer nieuwe faagdeeltjes en treedt een lytische cyclus op als hierboven beschreven met lysis van de bacterie tot gevolg. Bij het produceren van de nieuwe faagdeeltjes knippen enzymen het DNA. Door fouten tijdens het knippen van het DNA kan het voorkomen dat de faagkop (deels) met bacterie DNA wordt gevuld. Zo is het mogelijk dat ook resistentiegenen en/of virulentiefactoren afkomstig van de bacterie door een faag overgedragen worden naar een andere bacterie die deze genen nog niet had. Lysogene fagen kunnen zo bijdragen aan de verspreiding van genen die van oorsprong afkomstig zijn uit bacteriën.

1.2 Wat moet je weten om fagen te gebruiken tegen ziekmakende bacteriën?

Bij bacteriofaagtherapie wordt gezocht naar een bacteriofaag die specifiek een ziekmakende bacterie kan lyseren. Hiervoor is het om te beginnen nodig om de veroorzakende bacterie te identificeren en op te kweken. Daarnaast moet de juiste faag (of fagen) uit een beschikbare collectie van fagen (een zgn. faagbank) geselecteerd worden. Hierbij wordt gezocht naar strikt lytische fagen. Dit proces kost meestal enkele dagen.

Een bacteriofaag die in het laboratorium (*in vitro*) lysis van een specifieke bacterie veroorzaakt, kan in het lichaam (*in vivo*) minder effectief blijken. Een bacterie kan resistent worden voor de lytische activiteit van een faag, bijv. door verandering van de aanhechtingsplaats van de faag. Gebruikelijk is om daarom met zogenaamde faagcocktails te werken: een combinatie van verschillende geschikte bacteriofagen. Tevens maakt het gebruik van een faagcocktail het mogelijk dat de ziekmakende bacterie soms minder nauwkeurig gekarakteriseerd hoeft te worden. Voor een aantal infecties wordt de ziekmakende bacterie immers vaak wel als bekend beschouwd en volgt bijvoorbeeld ook behandeling met antibiotica op basis van de ziekteverschijnselen.

Kenmerken waar fagen nader op geselecteerd kunnen worden, zijn onder meer de snelheid en de mate waarmee de faag de bacterie lyseert (= virulentie). Deze virulentie wordt doorgaans bepaald door *in vitro* het lytische vermogen van een faag(cocktail) op de bacterie te bepalen. Daarnaast spelen biologische karakteristieken (bv. aanwezigheid van resistentie genen) en fysisch/chemische karakteristieken (bv. gevoeligheid voor temperatuur, pH, etc.) een rol die toepassing als therapie al dan niet mogelijk maken.

1.3 Geschiedenis

Bacteriofagen zijn 100 jaar geleden door twee onderzoekers ontdekt, onafhankelijk van elkaar. De Britse Frederick Twort zag in 1915 een "acute infectieziekte van bacteriën". Félix d'Hérelle, een Frans-Canadees, identificeerde in 1917 voor het eerst een "virus dat

parasiteert op bacteriën” en hij gaf het de naam bacteriofaag. De ontdekking van bacteriofagen was nog voordat de eerste antibiotica werden ontdekt. Dat was namelijk in 1928, de ontdekking van penicilline door de Schot Fleming.

Na de ontdekking van bacteriofagen werd onderzoek gestart naar mogelijke therapeutische inzet tegen bacteriële infecties. Echter, de effectiviteit van faagtherapie was niet altijd even duidelijk en mede door het succes van de toen opkomende antibiotica is de interesse naar de toepassing van bacteriofagen als therapie verminderd. Onderzoek naar andere faagtoepassingen, bijvoorbeeld in de moleculaire biologie en in de voedingsindustrie, zijn in de loop der jaren wel verder ontwikkeld. In de voormalige Sovjet-Unie is na de Tweede Wereldoorlog het onderzoek naar faagtherapie wel doorgezet.

1.4 Waaraan moet een antibacterieel middel voldoen?

Elk antibacterieel middel moet in een voldoende concentratie en in actieve vorm doordringen ter plekke van de infectie. Hiervoor is kennis nodig van de manier waarop het middel zich over de lichaamscompartimenten (bijvoorbeeld bloed, weefsels, organen) verdeelt, en hoe het in het lichaam wordt opgenomen bepaalt de toedieningswijze, bijvoorbeeld oraal, lokaal op de huid of intraveneus.

Een verschil tussen antibiotica en bacteriofagen, die beiden antibacteriële activiteit hebben, is om te beginnen het doordringend vermogen in die lichaamscompartimenten: antibiotica zijn kleine moleculen die diep in weefsels doordringen in vergelijking tot de veel grotere bacteriofagen.

Daarnaast is er verschil in de manier waarop antibiotica en fagen werken tegen bacteriën: antibiotica zijn werkzaam tegen meerdere bacteriesoorten (zogenaamd breedspectrum), terwijl een faag meestal maar werkt tegen 1 specifiek type bacterie. Bij toepassing van bacteriofagen bij behandeling van een patiënt moet daarom eerst nauwkeurig worden vastgesteld door welke bacterie precies de infectie wordt veroorzaakt en vervolgens moet de juiste faag/fagen erbij worden gezocht. Dit heeft als gevolg dat er een grote collectie fagen beschikbaar moet zijn voor alle mogelijke bacteriën, een zogenaamde ‘faagbank’. Het selecteren van de juiste faag tijdens de behandeling van een patiënt is daarom ook tijdrovend en kost meerdere dagen. Een voordeel is echter dat de faag alleen die specifieke bacterie aanpakt en niet andere, voor het lichaam nuttige bacteriën zoals antibiotica dat soms wel doen.

Door de opkomende resistentie tegen verschillende antibiotica is in de laatste jaren, in een zoektocht naar alternatieve therapieën, weer meer aandacht voor de mogelijk therapeutische werking van bacteriofagen. Er is echter nog veel onbekend over de precieze werking van de fagen in het menselijk lichaam en over hun werkzaamheid bij verschillende infecties in verschillende lichaamscompartimenten. In Centraal- en Oost-Europa (onder andere in Georgië) is in de afgelopen decennia veel ervaring opgedaan met het inzetten van fagen als behandeling van bacteriële infecties, met name aan de oppervlakte van het lichaam, op de huid en bij darminfecties.

2 Bacteriofaagtherapie

2.1 Ervaringen tot nu toe

2.1.1 Oost-Europa

Sinds de ontdekking van bacteriofagen 100 jaar geleden is in de voormalige Sovjet-Unie bacteriofaagtherapie tot ontwikkeling gekomen en uitgebreid toegepast, waarbij bacteriofagen ingezet werden als antibacteriële middelen om infecties te behandelen. Het ging hierbij voornamelijk om maagdarminfecties en etterende huidinfecties zoals bij brandwonden. Bij patiënten met uitgebreide brandwonden werden fagen ook intramusculair en intraveneus toegediend ter preventie van sepsis (Van der Vlugt & Verbeek, 2008). Ondanks uitgebreide klinische toepassingen van bacteriofaagtherapie in de voormalige Sovjet Unie, zijn deze inhoudelijk beperkt gedocumenteerd, zodat we het succes en toegevoegde waarde bij behandeling niet kunnen schatten. Ook gezien het tijdperk (periode 1920 – 1960) waarin de meeste behandelingen zijn uitgevoerd, is de documentatie en aanpak niet volgens de huidige standaard voor gecontroleerd klinisch onderzoek opgezet. Daarnaast was er gebrekkige kennis over de karakterisering en identificatie van bacteriofaag en bacterie. De kennis die er is opgedaan, wordt echter wel als waardevol beschouwd. Van de Russische literatuur is door Polischuk et al. een Engelstalig overzicht beschikbaar gemaakt dat opgenomen is als bijlage in het rapport van Van der Vlugt en Verbeek (2008). Dit overzicht maakt melding van bacteriofaagtherapie tegen (oppervlakkige- of darm)infecties veroorzaakt door *Streptococcus pyogenes*, *Staphylococcus aureus*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Escherichia coli*, *Proteus vulgaris/mirabilis*, *Salmonella typhi/typhimurium* en *Shigella dysenteriae/flexneri/sonnei*.

Het in Georgië gelegen George Eliava Instituut (<http://www.eliava-institute.org/>) voert sinds de jaren twintig van de vorige eeuw onderzoek uit naar bacteriofagen. Het Eliava Instituut is het belangrijkste onderzoeksinstituut op het gebied van fagen. Mede door recente media-aandacht staat het Eliava Instituut nu bekend als de plek om met faagtherapie behandeld te worden. Therapieën zijn vooral gericht op huid-, oor-, keel- en – via catheterisatie van urinewegen – blaasontstekingen. Er worden echter ook faagbereidingen geproduceerd voor de landbouw, voor gewasbescherming en voor de voedselveiligheid.

In Polen wordt sinds de jaren zeventig faagtherapie aangeboden via het Instituut van Immunologie en Experimentele Therapie van de Poolse Wetenschapsacademie (<https://www.iitd.pan.wroc.pl/en/OTF/index.html>). In 2005 is daar de Phage Therapy Unit geopend waar op basis van een experimenteel programma faagtherapie aangeboden wordt, dit om aan de regels van de Europese Unie te voldoen. Het gebruikte behandelprotocol is goedgekeurd door een onafhankelijke, medisch-ethische commissie.

2.1.2 *West-Europa*

In de laatste jaren is ook in Europa belangstelling ontstaan voor onderzoek naar bacteriofaagtherapie. In een recente review (Sybesma et al. 2018) wordt een overzicht gegeven van de gecontroleerde, klinische onderzoeken naar bacteriofaag therapie, aangemeld bij ClinicalTrials.gov. Het betreft in totaal veertien onderzoeken, waarvan drie onderzoeken nog moeten aanvangen, en twee onderzoeken nog lopen. Negen onderzoeken zijn afgesloten, sommigen al jaren terug, maar slechts drie onderzoeken hebben een resultaat gepubliceerd. Van deze drie werd één onderzoek afgebroken omdat het aantal patiënten (27) ver achter bleef bij het vooraf vastgestelde aantal dat men naar schatting nodig had (nl. 220) om iets over de eindpunten te kunnen concluderen; één onderzoek toonde geen gunstig effect van bacteriofaag behandeling bij *E. coli* (ETEC en/of EPEC) diarree; en één onderzoek richtte zich uitsluitend op de veiligheid van lokale toediening van bacteriofagen op de huid en huidulcera (bij 64 patiënten).

In Nederland vindt aan de TU Delft onderzoek plaats aan bacteriofagen en antibioticumresistentie (Brouns Lab). Deze onderzoeksgroep heeft een website gepubliceerd voor patiënten die geïnteresseerd zijn in faagtherapie (<https://www.bacteriofagentherapie.nl/>).

Een eerste multicenter klinische (fase I-II) onderzoek is recentelijk afgerond binnen het EU-project 'PhagoBurn' (2015-2017) en werd uitgevoerd door instellingen uit Frankrijk, Zwitserland en België (<http://www.phagoburn.eu/>). Voor dit onderzoek werden slechts 27 patiënten geïncludeerd met *E. coli* en *Pseudomonas*-wondinfecties bij brandwonden, in plaats van de 220 die beoogd waren. De meeste patiënten pasten niet in de vooropgezette onderzoeksopzet omdat hun infecties te complex waren. Bij de behandeling werd een volgens GMP gecertificeerde (productie volgens streng medisch voorschrift) faagcocktail van 12 *E. coli*-fagen en 13 *Pseudomonas*-fagen toegepast op brandwonden en vergeleken met standaardbehandeling met zilverdiazine (https://cordis.europa.eu/result/rcn/208478_en.html). Dit onderzoek is het eerste goed gedocumenteerd onderzoek voor bacteriofaagtherapie. Door de zeer kleine aantallen en voortijdig staken van dit onderzoek kunnen geen algemene conclusies worden getrokken over de werkzaamheid, maar werden geen belemmeringen gezien om onderzoek naar deze behandelmethode te vervolgen. De studie gaf vooral veel inzicht in de uitdagingen van het werken volgens de richtlijnen (Good Manufacturing Practice (GMP) en Good Clinical Practice (GCP)) met fagen.

Een van de deelnemers aan het EU-PhagoBurn project is het Koningin Astrid Militair Hospitaal in Brussel. Zij onderhouden al meer dan 15 jaar een programma (met onder meer faagexperts Jean-Paul Pirnay en Maria Merabishvili) in nauwe samenwerking met het Eliava instituut in Georgië. Sinds 2008 heeft het Belgisch team een eigen productiecapaciteit van een faagcocktail BFC (tegen *Pseudomonas*, *Acinetobacter* en *Staphylococcus aureus*) en ontwikkelden zij de faagcocktails voor de multi-center onderzoek voor faagtoepassing in brandwonden.

Vanuit Brussel wordt ook een Europees non-profit netwerk (www.p-h-a-g-e.org) van medici, wetenschappers, gezondheidseconomen en beleidsmakers gecoördineerd uit België met deelname van Franse, Zwitserse en Duitse instituten en bedrijven. Het voornaamste doel van dit netwerk is een regulatorisch framework voor faagtherapie in Europa. Daarnaast ondersteunt het netwerk uitwisseling van kennis op gebied van onderzoek naar bacteriofagen en faag therapie. Hiervoor worden fagen verzameld door het DSMZ instituut te Leibnitz. Verder werd en wordt *in vitro* onderzoek verricht ten behoeve van faagtherapie tegen multiresistente Salmonella, *Vibrio cholerae*, mycobacteriële infecties (tuberculose) en Klebsiella.

Het UMC Utrecht heeft aangekondigd een onderzoek te willen starten naar faagtherapie voor de behandeling van chronische *Pseudomonas*-longinfecties bij patiënten met cystische fibrose. Het betreft een gerandomiseerde dubbelblinde opzet die als pilotstudie moet dienen voor verder onderzoek. Ten tijde van het symposium over de klinische toepassingen van fagen, georganiseerd door het UMCU op 22 februari jl., was het onderzoeksprotocol nog niet ingediend bij de medisch-ethische toetsingscommissie.

2.1.3

Bacteriofaagtherapie: voorwaarden voor humaan gebruik

Bacteriofaagtherapie is een stapsgewijs proces: de infectie-veroorzakende bacterie wordt uit patiëntmateriaal geïsoleerd en geïdentificeerd. Uit de faagbank wordt een faag c.q. faagcocktail geselecteerd die werkzaam is tegen deze bacterie. Dit is een tijdrovend proces dat enkele dagen kost. Tijdens de behandeling wordt het effect van de toediening gemonitord. Indien nodig wordt een tweede selectieronde uitgevoerd tegen de nog aanwezige bacteriën en herhaalt men het bovengenoemde proces.

Bacteriofaagpreparaten dienen volgens de regels van Good Manufacturing Practice (GMP) gezuiverd en geproduceerd te worden. GMP-eisen betreffen onder andere een gecontroleerd en consistent productieproces waarbij het eindproduct een bekende therapeutische werking heeft. Voor opslag in een faagbank is fysiologische en genetische karakterisering eveneens van belang (Pirnay et al., 2015).

2.1.4

Openstaande vragen

Allereerst zijn er vragen te beantwoorden over de veiligheid van de inzet van fagen voor behandeling bij de mens. Volgens de huidige eisen voor geneesmiddelen moet je in de eerste plaats weten wat er precies in het fagenpreparaat zit. Naast het vaststellen van kwaliteit en de veiligheid bij gebruik bij de mens mag er van faagtherapie ook geen bedreiging ontstaan voor het milieu, bijvoorbeeld door lozing van bij de therapie gebruikte fagen in oppervlaktewater. Om de veiligheid van faagtherapie vast te kunnen stellen is nader onderzoek nodig. Vragen die hierbij beantwoord moeten worden zijn onder meer de wijze van identificatie en karakterisering van de te gebruiken lytische fagen (Salmond, 2015). Het voldoen aan GMP-eisen blijkt in de praktijk lastig te zijn voor faagtherapie: een productieproces ontworpen voor de ene faag hoeft niet altijd bruikbaar te zijn voor een andere faag omdat ze in een biologisch systeem, namelijk bacteriën, geproduceerd worden. Bij uiteindelijke toepassing zijn er bovendien vragen met betrekking tot

dosis-effect relatie en de gewenste toedieningswijze (oraal, aerosol, lokaal cutaan, lokaal via drain, intrarectaal, intra-urinair via catheter, en intraveneus) van fagen bij de mens.

Vragen van meer fundamentele aard die nog openstaan zijn: 'Wat bepaalt de specificiteit van een bacteriofaag voor een bepaalde bacteriesoort?', 'Hoe kan deze specificiteit beïnvloed worden?', 'In welke mate vindt resistentie-ontwikkeling tegen fagen plaats?', 'Onder welke omstandigheden worden lysogene fagen actief?' en 'Hoe verloopt de interactie tussen fagen en het immuunsysteem?'. Kennis hierover kan bacteriofaagtherapie toegankelijker en onder artsen en beroepsgroep breder gedragen maken, en de meerwaarde verduidelijken.

2.2 Therapeutische toepassingen van bacteriofagen als alternatief voor antibiotica

Bij faagtherapie wil men strikt lytische fagen gebruiken die hun erfelijk materiaal in bacteriën injecteren, zich daarin vermenigvuldigen en daarna de bacterie lyseren (doden). De lysogene fagen moeten worden vermeden, omdat ze niet direct tot lysis van de bacterie leiden. Lysogene fagen nestelen zich immers in het erfelijke materiaal van de bacterie en kunnen daar lang inactief aanwezig blijven.

Bij behandeling van humane infecties met fagen zijn twee verschillende aanpakken mogelijk:

- een 'personalized' behandeling waarbij een specifieke faag of fagen tegen de ziekmakende bacterie wordt gebruikt. Deze behandeling vraagt allereerst om identificatie en kweek van de ziekmakende bacterie. De faag kan vooraf, of tijdens het ziekteverloop, geselecteerd worden op lytische activiteit tegen de betreffende bacterie, *of*
- een faagcocktail met daarin meerdere soorten fagen die lytisch actief zijn tegen één of meer verschillende ziekmakende bacteriën. Ook bij deze aanpak kan van de vooraf identificatie en kweek van een of meer ziekmakende bacteriën uitgegaan worden, waarbij de fagen op hun lytische activiteit worden geselecteerd. Daarnaast zou een faagcocktail ingezet kunnen worden bij de empirische therapie van infectieziekten die karakteristiek maar door één of enkele, bekende bacteriën worden veroorzaakt.

2.2.1 Voordelen van faagtherapie

Faagtherapie heeft potentieel een aantal voordelen ten opzichte van behandeling met antibiotica. Zo zijn er in principe tegen iedere Grampositieve of Gramnegatieve bacterie een of meerdere fagen te selecteren. Fagen zijn ook actief tegen multiresistente bacteriën en kunnen dus toegepast worden als er geen effectief antibioticum meer voor handen is. Immers, de werking van antibiotica verschilt met die van fagen, en daarmee ook de resistentie. Verder hebben fagen een hoge specificiteit voor bacteriën, waardoor de eigen microbiële flora niet wordt aangetast. Tevens zijn ze specifiek voor bacteriën, en is er geen schade aan humane cellen (eukaryoten) te verwachten. Mogelijk door gebrek aan gedetailleerde rapportages van bacteriofaagtherapie zijn er weinig bijwerkingen bekend. In de PhagoBurn klinische trial werden

geen bijwerkingen gemeld bij gebruik van faagcocktails in brandwonden. Lytische bacteriofagen doden de bacteriën zeer snel (binnen enkele uren), waardoor resistentie ontwikkeling beperkt is. Omdat bacteriofagen afhankelijk zijn van de specifieke bacterie om te overleven verdwijnen ze vanzelf uit het lichaam als er geen bacterie meer aanwezig is (Loc-Carrillo & Abedon, 2011).

2.2.2 *Nadelen van bacteriofaagtherapie*

De specificiteit van de faag is ook een nadeel. Selectie van een passende faag(cocktail) tegen de ziekteverwekkende bacterie kan immers zeer tijdrovend en kostbaar zijn. Dit maakt bacteriofaagtherapie ongeschikt voor een behandeling van een acute bacteriële infectieziekte.

De eerder genoemde, goed gedocumenteerd PhagoBurn klinisch onderzoek, vermeldt dat de houdbaarheid en stabiliteit van faagcocktails nog te wensen over laat. Het aanleggen van een voorraad van faagcocktails wordt daarmee bemoeilijkt.

Een andere zorg is een overdreven ontstekingsreactie die mogelijk zou kunnen ontstaan als binnen korte tijd de meerderheid van de ziekmakende bacteriën doodgaan. Daarbij komen veel lichaamsvreemde eiwitten of mogelijk zelfs toxines uit de gedode bacteriën vrij, die het afweersysteem van de patiënt stimuleren tot afgifte van een overmaat aan ontstekingsbevorderende stoffen, en de patiënt zo juist zieker zouden kunnen maken. Hierover is bij faagbehandeling nog weinig bekend, aanwijzingen voor dit verschijnsel op basis van therapeutische ervaringen in Oost-Europa zijn onvoldoende beschreven (Van der Vlugt & Verbeek, 2008).

Bacteriën hebben ook diverse resistentie mechanismen ontwikkeld om zich te wapenen tegen faaginfecties. In de natuur houden bacteriën en fagen elkaar in evenwicht doordat zij zich telkens aan elkaar aanpassen (co-evolutie). In tegenstelling tot antibiotica kunnen fagen met resistente bacteriën door ontwikkelen waardoor blijvende resistenties bij bacteriën kunnen worden ontweken. Therapeutisch gebruik van fagen zal waarschijnlijk echter wel de evolutionaire druk op bacteriën om resistentie te ontwikkelen verhogen. In hoeverre resistentieontwikkeling daadwerkelijk een belangrijk nadeel van faagtherapie is en wat de oorzaak daarvan is, is onvoldoende onderzocht (Loc-Carrillo & Abedon, 2011). Mogelijk kan een combinatie van antibiotica en faagtherapie het ontstaan van faagresistentie verminderen of voorkomen. Dat leek mogelijk het geval bij een dierproef bij ratten met intraveneuze toediening van fagen (Oechslin, 2017).

2.2.3 *Onderzoek naar klinische toepassing van faagtherapie*

Gezien bovenstaande argumenten is het noodzakelijk om mogelijke klinische toepassing systematisch en gecontroleerd te onderzoeken. Het klinisch onderzoek binnen het PhagoBurn-project laat zien dat dat mogelijk is en welke drempels er te nemen zijn. Buiten deze studie zijn beschikbare data uit zowel Oost- als West-Europa tot nu toe veelal gebaseerd op de behandeling van individuele patiënten, waarbij niet goed valt uit te maken wat de bijdrage is van patiëntkarakteristieken, bacteriële kenmerken, effectiviteit van de gekozen faagtherapie of effect

van gelijktijdig gegeven antibiotische therapie bij het herstel van die patiënt.

Voorbeelden van recente patiëntbeschrijvingen zijn de behandeling van een multiresistente *Acinetobacter baumannii*-infectie van een patiënt met een chronische geïnfecteerde alveesklier, in de Verenigde Staten (Schooley, 2017). De patiënt werd behandeld met meermalige dagelijkse injectie van een gepersonaliseerde faagcocktail in combinatie met een antibioticum. De faagcocktail voorkwam het ontstaan van resistentie niet, en meerdere wisselingen van faagcocktails waren noodzakelijk. De patiënt overleefde en een synergistisch effect van fagen en antibiotica werd daarbij als mogelijke bijdrage gesuggereerd.

Een ander gepubliceerde patiëntbeschrijving betreft een Nederlandse patiënt die in België met faagtherapie behandeld werd voor een multiresistente *Pseudomonas*-bloedbaaninfectie vanuit geïnfecteerde doorligplekken (Jennes, 2017). Faagtherapie was de enige optie gezien ernstige bewerkingen van het laatste werkzame antibioticum (colistine). De patiënt overleed een half jaar later aan een longontsteking veroorzaakt door een *Klebsiella* bacterie.

Bij 6 patiënten met een diabetische voet met een *S. aureus*-wondinfectie zijn goede behandelresultaten gepubliceerd na lokale behandeling (Fish, 2016).

Een belangrijke beperking bij het op waarde schatten van beschrijvingen van succesvolle behandeling van individuele patiënten is "publication bias": de vertekening die nu eenmaal ontstaat als positieve resultaten wel, maar negatieve resultaten niet gepubliceerd worden. Gecontroleerd klinisch onderzoek kan hier uitkomst bieden.

3 Overige toepassingen van bacteriofagen

3.1 Toepassing van bacteriofagen tegen ziekten bij dieren en planten

Naast de curatieve sector bieden bacteriofagen mogelijk ook een kans om antibioticagebruik in de dier- en plantensector te verminderen. Met name bij ziekten die een economisch belang betreffen zoals in de veeteelt, vis- en schelpdierkweek en in landbouwgewassen wordt bacteriofaagtoediening als interessant beschouwd. Succesvol gebruik van bacteriofagen is in enkele onderzoeken aangetoond (Greer, 2005; Alvarez & Biosca, 2017). Hierbij is de gedachte dat bacteriofagen enerzijds zouden kunnen worden ingezet tegen bacteriën die resistent zijn tegen antibiotica (veeteelt en viskweek), anderzijds worden er mogelijke toepassingen beschreven ter voorkoming van bacteriële infecties (*pre-harvest*, zie Figuur 2).

Aan de Wageningen Universiteit en Research Centrum (WUR) start een onderzoeksprogramma (<https://www.wur.nl/nl/show/Faagtherapie-ter-verbetering-van-voedselveiligheid-en-diergezondheid.htm>) als onderdeel van het ALTANT-programma (ALTERNatieven voor ANTibiotica). Het onderzoek richt zich op bacteriofaagtherapie tegen *Streptococcus suis*, een belangrijk pathogeen in varkens.

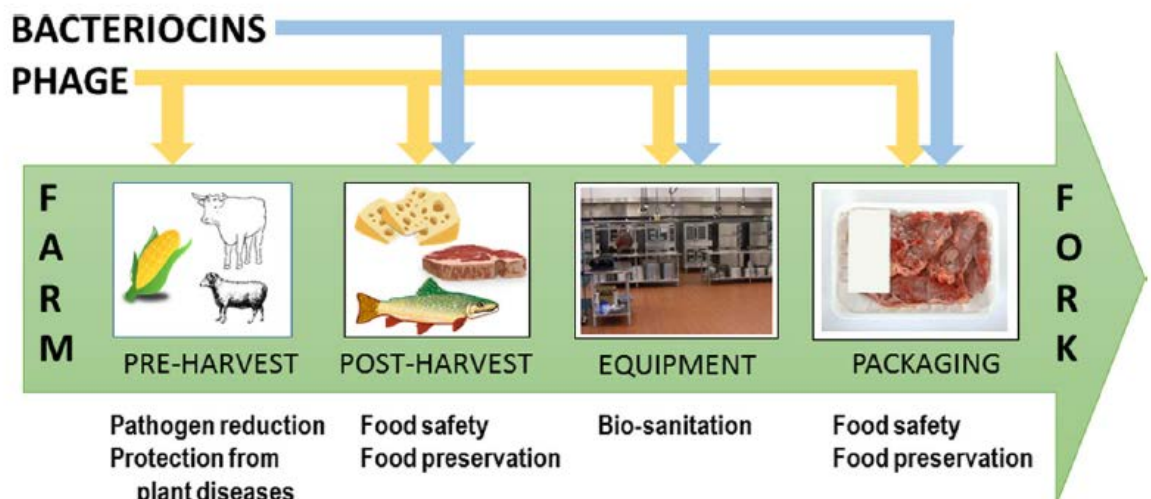
Om ontwikkeling van plantenziekten te voorkomen is weliswaar aangetoond dat bacteriofaagpreparaten effectief kunnen zijn (Jones et al., 2007), echter deze middelen worden in de praktijk nog niet toegepast. P.h.a.g.e.org ondersteunt uitwisseling van kennis op gebied van onderzoek naar bacteriofagen en faag therapie o.a. *in vitro* onderzoek naar de *E. coli*-bacterie verantwoordelijk voor de uitbraak van voedselvergiftiging in Duitsland in 2011. Ook in Nederland is er op dit gebied kennisontwikkeling gaande (Verbeek en Van der Vlugt, WUR). Het faagpreparaat Agriphage™ van het Amerikaanse bedrijf Omnilytics, dat werkzaam is tegen de Xanthomonas- en Pseudomonas-bacterie die bladvlekkenziekte veroorzaakt in tomaat en paprika, is in 2005 door de Environmental Protection Agency (EPA) goedgekeurd voor gebruik in landbouw. Het gewas kan in elk groeistadium besproeid worden met de faagoplossing om bacteriële infectie van bladeren en oogstvermindering te voorkomen. Bewijzen voor werking zijn vooralsnog alleen gebaseerd op *in vitro* onderzoek.

3.2 Toepassing van bacteriofagen in voedselverwerkende industrie

Rood vlees, kip en onbewerkte groenten kunnen besmet zijn met bacteriën die voedselbederf of zelfs voedselvergiftiging kunnen veroorzaken. Deze besmetting ontstaat soms al vroeg in het teeltproces (*pre-harvest*, zie Figuur 2) of in een later stadium tijdens de bereiding van het product (*post-harvest*). Toevoeging van bacteriofagen zou de groei van deze bacteriën tegen kunnen gaan en bederf van de producten vertragen of zelfs voorkomen. Op verschillende momenten in het productieproces kunnen bacteriofaag preparaten worden toegevoegd.

In 2007 heeft de Amerikaanse FDA voor het eerst een toepassing van een bacteriofaagpreparaat goedgekeurd in de voedselverwerkende

industrie. Dit preparaat, LISTEX™ P100, is ontwikkeld door het Nederlandse bedrijf Microos en is bedoeld als aanvulling op conventionele ontsmetting om groei van de *Listeria*-bacterie te voorkomen. Door de specificiteit voor uitsluitend bacteriële cellen worden bacteriofagen als veilig aangemerkt voor gebruik op voedingsmiddelen bedoeld voor humane consumptie. In 2016 heeft ook de EFSA een opinie uitgebracht over de veiligheid van LISTEX™ P100, waaruit blijkt dat dit als aanvulling van conventionele ontsmettingsmethodes gezien moet worden (Allende et al., 2016). Het Amerikaanse bedrijf Intralytix heeft inmiddels 3 faagpreparaten op de markt gebracht: ListShield™, EcoShield™, en SalmoFresh™. Zoals de merknaam aangeeft, werkzaamheid tegen respectievelijk *Listeria*, *Escherichia coli* O157:H7 en *Salmonella*-infecties in voedselproducten. ListShield™ is in Amerika ook goedgekeurd voor toevoeging in voedselproducten (Álvarez et al., 2017). (Zie voor verdere informatie over regelgeving van degelijke producten in de EU ook hoofdstuk 4)



Figuur 2. Gebruik van bacteriofagen tijdens de verschillende stappen in de voedselproductieketen. In de VS ook wel 'farm-to-fork approach' genoemd. (Uit: Mills et al., 2017).

Voor de reiniging van voedselverwerkende apparatuur zijn bacteriofaagpreparaten ook potentieel geschikt. Het bovenvermelde ListShield™ heeft hiertoe een goedkeuring van de Amerikaanse EPA gekregen op basis van *in vitro* studies. Bacteriofaagtoepassing wordt als kans gezien waar huidige chemische ontsmettingsmethoden niet (meer) werken.

Bacteriofagen zijn potentieel ook bruikbaar om ziekmakende bacteriën in de voedselketen op te sporen. Hiertoe worden bacteriofagen die specifiek zijn voor betreffende bacterie genetisch gemodificeerd met een fluorescerend gen. Indien de bacteriofaag de bacterie tegenkomt en infecteert, wordt het fluorescerende eiwit geproduceerd en zichtbaar gemaakt. Deze opsporingsmethode maakt het mogelijk om lage

bacterieconcentraties (10-1000 cellen) aan te tonen (Loessner et al., 1996; Goodridge & Griffiths, 2002).

3.3 Toepassing van bacteriofagen in afvalwaterzuivering

In slib van afvalwaterzuiveringsinstallaties komen veel ziekmakende en soms ook antibioticaresistente bacteriën voor. Onderzoekresultaten (Jassim et al., 2016, Withey et al., 2005) laten zien dat ook hier het gebruik van bacteriofagen mogelijk is om deze ongewenste bacteriën te verminderen, terwijl de gunstige bacteriën, nodig in het zuiveringsproces, overleven.

3.4 Toepassing van bacteriofaageiwitten

In plaats van het gebruik van intacte bacteriofagen vindt er ook onderzoek plaats naar het gebruik van eiwitten geproduceerd door fagen. Het gaat hierbij om specifieke eiwitten, 'lysines' genaamd, die door de faag geproduceerd worden en er voor zorgen dat de celwand van de bacterie van binnen uit kapot gaat waarna de cel openbarst. Gebruik van gezuiverde lysines, geproduceerd door een genetisch gemodificeerd organisme, hebben een vergelijkbaar effect als de bacteriofaag (Yoong et al., 2004, Keary et al., 2016) en kunnen makkelijker op grote schaal geproduceerd worden.

3.5 Toepassing van bacteriofagen in fundamenteel onderzoek

Bacteriofagen worden ook gebruikt in fundamenteel genetisch onderzoek. Hierbij worden lysogene fagen ingezet om genetisch materiaal van de ene naar een andere bacterie over te dragen met als doel dit materiaal in te bouwen in het bacterieel DNA. Deze techniek kan worden gebruikt om bacteriën genetisch te modificeren met bepaalde genen, of om genen juist uit te schakelen. Fagen kunnen ook worden gebruikt als selectiemethode voor eiwit-eiwit interacties, via de 'faagdisplay'-methode. Via recombinatie kunnen fagen met veel verschillende kandidaatsequenties worden geproduceerd in een bacterie. Het kandidaateiwit komt tot expressie op de mantel van de faag, en kan zo binden aan het doeleiwit. Fagen die binden kunnen in een bacterie weer worden opgekweekt.

4 Wet- en regelgeving

4.1 Humaan

EU Directive 2001/83/EC beschrijft het regulatoire raamwerk voor medicinale producten voor menselijk gebruik. Het gaat hierbij om geneesmiddelen die gemaakt worden via een industrieel proces of met een methode waar een industrieel proces bij betrokken is. Om als geneesmiddel te worden toegelaten tot de Europese markt zijn diverse preklinische en gecontroleerde, klinische studies noodzakelijk en worden er eisen gesteld aan de kwaliteit van het product. Deze eisen hebben tot doel om de kwaliteit, werkzaamheid en risico's te kunnen vaststellen. Tot op heden is er geen bacteriofaagproduct ter registratie/markttoelating aangemeld dat aan de standaarden voor deze studies voldoet en waarvoor een gunstige balans tussen de baten en risico's (i.e., werkzaamheid t.o.v. risico's) is aangetoond.

Uit een workshop georganiseerd door het European Medicines Agency (EMA) in 2015 blijkt dat er nog vele wetenschappelijke en regulatoire uitdagingen zijn voor een therapie op basis van bacteriofagen (Pelfrene et al., 2016). Op regulatorisch vlak hebben deze uitdagingen vooral te maken met de aard van mogelijke faagproducten: faagcocktails zijn in hoge mate 'personalized' en faagbanken zouden moeten voldoen aan GMP-eisen. Om faagtherapie goed te kunnen reguleren zijn aanvullingen op het huidige regulatoire raamwerk nodig (Fauconnier, 2017; Pirnay et al., 2015). Een mogelijkheid is de introductie van een 'biological master file' (BMF) (Fauconnier, 2017). De BMF zou een individuele faag, of een groep homologe fagen beschrijven, en het productieproces en de veiligheid. Voor de BMF zou registratie nodig zijn, maar voor gepersonaliseerde faagproducten op basis van de BMF niet, omdat het dan om een individuele bereiding gaat. Soortgelijke procedures met een 'master file' bestaan al voor vaccinantigenen en bloedplasma. Magistrale Bereiding door apothekers, in nauwe samenwerking met faagexperts, wordt in België als kans gezien om bacteriofaagcocktails voor humane therapeutische toepassingen (als 'ultimum refugium' behandeling, zie onder) beschikbaar te kunnen maken.

Hoewel er nog geen fagen geregistreerd staan als geneesmiddel is faagtherapie wel op een aantal plaatsen in Europa beschikbaar. Het betreft hier echter therapieën die staan aangemerkt als experimentele behandeling (zie eerder). Artikel 37 van de Declaratie van Helsinki (WMA, 2013) biedt een mogelijkheid door het toestaan van "onbewezen interventies" als uiterste redmiddel bij de behandeling van individuele patiënten voor wie bestaande therapieën niet effectief of mogelijk zijn. In Georgië is faagtherapie beschikbaar omdat het van oudsher onderdeel is van de zorg en er geen beperkende EU-regels gelden. Het Eliava Instituut beschikt over Georgische vergunningen om zowel kant-en-klare als gepersonaliseerde faagcocktails te produceren, echter wel slechts voor topicale en gastrointestinale toepassing (maar niet voor intraveneuze toediening).

De Werkgroep Statusbepaling van de EMA heeft een verkennende discussie gevoerd over bacteriofagen, maar heeft (nog) geen standpunt kunnen formuleren ten aanzien van bacteriofaagtherapie.

4.2 Voedsel/veterinair

De Food Standards Agency (UK) heeft in 2015 een systematisch onderzoek naar de beschikbare informatie over het gebruik van fagen in voedsel uitgevoerd (Campden BRI, 2016). Een belangrijk punt uit deze verkenning is de vraag of behandeling van voedsel met fagen een voortdurend beschermend effect heeft, of slechts eenmalig bacteriën doodt. In het eerste geval zouden fagen als voedingsadditief worden beschouwd, en in het tweede geval als hulpmiddel bij de verwerking van voedsel. Voor voedingsadditieven gelden strengere EU-regels. Voor het gebruik als hulpmiddel bij verwerking zouden EU-regels voor voedselhygiëne gelden. In Amerika heeft de Food and Drug Administration (FDA) een aantal faagproducten gekeurd als veilig voedingsadditief voor vleeswaren en vis. Bij beoordeling hiervan werd vier hoofdzaken onderzocht: (1) de veiligheid van de individuele fagen; (2) de veiligheid van mogelijke residuen van de te bestrijden bacterie en de noodzaak van eventuele limieten daarvoor; (3) de mogelijkheid dat het voedingsadditief ongewenste genen mee draagt; en (4) de noodzaak voor overige specificaties van eigenschappen en veiligheid.

De FDA heeft ook faagpreparaten voor de reiniging van voedselverwerkende apparatuur goedgekeurd. In Europa zou dergelijk middel onder de Biocide-regelgeving vallen (Álvarez et al., 2017). De toelatingseisen voor faagpreparaten in deze sector zijn minder stringent en worden verstrekt op werkzaamheid *in vitro*.

5 Overige bronnen

5.1 Bevindingen symposium 'The clinical utility of bacteriophages'

Op 22 februari j.l. vond het symposium 'The clinical utility of bacteriophages' plaats in Utrecht. In de ochtend werd er fundamenteel onderzoek naar het gebruik van fagen tegen *Pseudomonas aeruginosa*-infecties gepresenteerd (Rob Lavigne, KU Leuven), onderzoek naar de interactie tussen fagen en het immuunsysteem (Laurent Debarbieux, Pasteur Instituut) en onderzoek naar resistentie van bacteriën tegen fagen (Stan Brouns, TU Delft). Na de lunch ging het over de klinische ervaring met fagen, waarover gepresenteerd werd door Maria Kutateladze (Eliava Instituut, Georgië), Jean-Paul Pirnay (Koningin Astrid Militair Hospitaal, Brussel), Wilbert Sybesma (Universiteit van Zürich), Martha Clokie (University of Leicester) en Esmee Ruizendaal (UMCU).

Op het symposium werd bevestigd dat er nog een lange weg te gaan is voordat fagen algemeen beschikbaar zullen zijn als antibacteriële therapie. Het wettelijk kader waarbinnen medicinale producten gereguleerd worden is onvoldoende toegesneden op faagtherapie. Als tijdelijke oplossing hebben de Belgische onderzoekers er voor gekozen op basis van artikel 37 uit het Verdrag van Helsinki een beperkt aantal patiënten te behandelen. De Belgische Minister zet zich nu in om de ontwikkeling van een 'Dedicated Phage Therapy Framework' op de Europese agenda te krijgen. Verder zal de farmaceutische industrie zeer aarzelend zijn om faagcocktails te produceren omdat dit product niet door patentwetgeving beschermd kan worden. Dit maakt ontwikkeling en commercialisatie onaantrekkelijk. Fundamentele onderzoeksvragen zoals hoe fagen zich in het menselijk lichaam gedragen, en welke interactie er tussen fagen en het immuunsysteem is, staan nog open. De gepresenteerde klinische data betreffen steeds individuele of kleine aantallen patiënten waardoor er nog geen algemene conclusies getrokken kunnen worden. De individuele cases die gepresenteerd werden waren op enkele uitzonderingen na positief, met succesvolle bestrijding van de infectie en zonder gerapporteerde bijwerkingen.

5.2 Gesprek met directeur Eliava Instituut, Georgië

In een persoonlijk gesprek tussen Maria Kutateladze (Eliava Instituut, Georgië) en Jaap van Dissel (RIVM-CIb) gaf mevrouw Kutateladze aan dat het Eliava Instituut werkzaam is op allerlei terreinen: naast de bereiding van bacteriofaagcocktails voor humane therapie worden ook bacteriofagen verkocht voor toepassing in de landbouw en wordt er onderzoek gedaan aan bacteriofagen. Het Eliava Instituut werkt voor humane toepassingen met bacteriofaagcocktails met een breed spectrum. De therapieën betreffen met name huid en darmaandoeningen. Patiënten worden poliklinisch behandeld en buitenlandse patiënten vaak op afstand, na insturen van lichaamsmateriaal. Binnen Georgië betreft het ook patiënten die uitbehandeld zijn met conventionele geneeswijzen, inclusief antibiotica. Desgevraagd gaf mevrouw Kutateladze aan dat er geen systematische

verzamelde gegevens van behandelde patiënten beschikbaar zijn. Onduidelijk is of deze wel binnen het instituut beschikbaar zijn.

5.3 **Bezoek aan het Eliava Instituut, Tbilisi, Georgië**

Een delegatie van het RIVM en het Ministerie van VWS heeft 23-24 april jl. een bezoek gebracht aan het Eliava Institute of Bacteriophage, Microbiology and Virology, te Tbilisi, Georgië. Tevens waren bij een deel van het bezoek journalisten aanwezig van het programma 'Dokters van morgen'.

Het Instituut is begonnen als een Nationaal Instituut dat, naast bacteriofagen, vaccins en immuunglobuline ontwikkelde en produceerde; het heeft zich in de Sovjet tijd verder gespecialiseerd in en later beperkt tot de ontwikkeling en productie aan bacteriofagen. Het Instituut heeft bijna 100 jaar ervaring met het gebruik van bacteriofagen en het behoud van dat erfgoed is een belangrijke drijfveer van de directeur.

Het Eliava Instituut werkt als onderzoeksinstituut onder autoriteit van het Ministerie van Wetenschap en Onderwijs van Georgië. Het Eliava Instituut bestaat uit de Eliava Foundation en vijf spin-off bedrijven waaronder een medisch diagnostisch centrum, een productie faciliteit voor bacteriofagen, een productiefaciliteit voor bacteriologische media, het Eliava Phage Therapy Center (polikliniek) en apotheek, en een managementgroep. Geld dat verdiend wordt gaat van de spin-offs terug in de stichting, die daarmee onderzoeksbeurzen binnen het Eliava Instituut honoreert. Juist dit jaar waren de eerste twee onderzoeksaanvragen toegekend.

Het Instituut heeft praktisch gezien een eeuw ervaring met het onderhouden, selecteren, opkweken en zuiveren van bacteriofagen. Het succes van bacteriofaagtherapie komt tijdens de presentaties steeds naar voren. Effectiviteit zou naast goede resultaten in het lab (*in vitro*) ook blijken uit grootschalige toepassing in het verleden in het leger, in kinderdagverblijven en bij individuele toepassing. De onderbouwing van de klinische effectiviteit blijft summier en niet verifieerbaar.

Belangrijkste redenen voor deze kwalificatie zijn: (1) dat de succesvolle toepassingen voornamelijk individuele casus beschrijvingen betreft, en geen gerandomiseerd gecontroleerd onderzoek van groepen patiënten, en (2) dat de beschrijving van uitkomsten hoofdzakelijk subjectieve beoordelingen betreft, en geen harde objectieve uitkomstmaten of een voor behandeling-geblindeerde beoordeling van klinische verbetering. Ook de directeur huldigde overigens de opvatting dat een gebrek aan gecontroleerd klinisch onderzoek de brede toepassing van bacteriofagen in de weg stond.

Het Instituut heeft diverse samenwerkingen met Amerika en Europa (bijv. Horizon 2020), in projecten die therapie ontwikkelen voor uiteenlopende indicaties, maar ook fundamenteel onderzoek naar klinische en niet-klinische toepassingen omvatten. Het Instituut heeft op basis van de lange ervaring veel praktische kennis in te brengen in de samenwerkingen.

De productie van bacteriofagen vindt plaats in een faciliteit die met steun van de EU volgens GMP standaarden is ingericht, maar de faciliteit

en het personeel is nog niet GMP gecertificeerd. De productiefaciliteit voor bacteriologische media is ISO 9001:2008 geaccrediteerd. De faagpreparaten die het instituut uitgeeft voor behandelingen worden gemiddeld 1x per jaar getest op hun werking tegen de bacteriën waartegen ze bedoeld zijn. Indien er verminderde lytische activiteit vastgesteld wordt, dan wordt het preparaat 'verbeterd' door effectievere fagen te selecteren. Dit kan door nieuwe fagen te selecteren uit bemonsteringen van het milieu, of via natuurlijke selectie onder laboratorium condities. De laatste methode bleek de meest gebruikelijke.

Een belangrijk kwaliteitskenmerk dat genoemd wordt is selectie van fagen met de relatief hoogste lytische activiteit. Een voordeel hiervan is dat een eventuele mogelijkheid van revitalisatie van profagen (dit zijn bacteriofagen die eerder ingebouwd zijn in het erfelijk materiaal van bacteriën) en overdracht van bacteriële genen tot een minimum beperkt blijft. Enerzijds, omdat vanwege de sterke lytische activiteit de conversie naar lysogenie beperkt zal zijn. En anderzijds, mochten profagen vrijkomen, dan zal aanwezigheid van de lytische faag beschikbaarheid van een bacteriële gastheercel sterk doen verminderen. Hieruit wordt in Eliava geconcludeerd dat op deze manier overdracht van resistentiegenen tot een minimum beperkt wordt.

Na de presentaties en discussie vond er een rondleiding plaats. Hierbij is de bibliotheek bezocht, waar een enorme collectie aan literatuur opgeslagen is. Deze literatuur is moeilijk toegankelijk vanwege taal en wijze van documentatie. De onderzoeksfaciliteiten zijn ook bezocht. Het betreft hier modern ingerichte laboratoria op BSL-1 en BSL-2 niveau, waar werkzaamheden met pathogene bacteriën uitgevoerd worden. Een deel van de laboratoria is minder nieuw en een ander deel wordt nog gerenoveerd en is momenteel buiten gebruik. De productiefaciliteit is gedeeltelijk bezocht. Cleanrooms waren niet toegankelijk, maar via een raam was een indruk te verkrijgen. Hier worden faagpreparaten opgekweekt en opgewerkt, waarna uitverdeling en verpakking volgt. Een aparte afdeling is verantwoordelijk voor kwaliteitscontrole van de faagpreparaten.

Tenslotte is de polikliniek bezocht. Hier worden lokale en buitenlandse patiënten ontvangen en behandeld voor een breed scala aan (met name chronische) infecties. In de kliniek wordt zowel diagnostiek als behandeling verricht door een team van medisch specialisten. Voor problematiek waarvoor de specifieke expertise niet in huis is, hebben ze afspraken met externe medisch specialisten. Bacteriofagen preparaten zijn in openbare apotheken in Georgië zonder recept van een arts te verkrijgen. Belangrijkste indicaties voor bacteriofagen therapie bij Georgische patiënten zijn IBS (prikkelbaar darm syndroom), dysbacteriose (verstoring van de balans van verschillende soorten darmbacteriën), (chronische) diarree, en faryngitis (keelontsteking).

Na het bezoek aan het Eliava Instituut is een universitair ziekenhuis bezocht, een van de twee grootste ziekenhuizen in Tbilisi. Hier is gesproken over AMR en infectiepreventie. Met de intensive care hoofdspecialist van deze universitaire kliniek, een consulterend internist-infectioloog van het andere, tweede grote ziekenhuis in Tbilisi, en een arts-epidemioloog van het nationale Volksgezondheidsinstituut is ook

het gebruik van bacteriofagen bij de behandeling van infecties bij patiënten besproken. Men was eensgezind in de mening dat bacteriofaagtherapie sinds tientallen jaren niet meer voor de behandeling van infecties bij ziekenhuispatiënten in Georgië wordt toegepast. De belangrijkste reden daarvoor die in het gesprek genoemd werd was het ontbreken van gecontroleerd klinisch onderzoek voor de klinische werkzaamheid van bacteriofagentherapie.

6 Bevindingen en conclusies

Bacteriofagen werden in 1917 ontdekt, maar werden de laatste decennia, behalve in de voormalige Sovjet-Unie, niet gebruikt als therapie voor infectieziekten. Veel onderzoek uit die beginjaren voldoet niet aan de huidige standaarden voor klinisch onderzoek. De laatste jaren wordt er in Europa weer onderzoek gedaan naar bacteriofagen als antibacteriële therapie. Het aantal gecontroleerde onderzoeken, en de grootte daarvan is echter nog beperkt. De klinische voorbeelden van bacteriofaagtherapie, zowel die in Georgië als die in Europa, betreffen de behandeling van oppervlakkige huidinfecties, of chronische infecties waarvoor soms geen antibiotica behandeling meer beschikbaar is.

Bacteriofagen hebben een fundamenteel ander werkingsmechanisme dan antibiotica. Dat maakt hen in theorie geschikt voor behandeling van infecties met bacteriën die ongevoelig zijn voor antibiotica. Bacteriofagen zijn zeer specifiek in de bacteriën die ze kunnen doden, waardoor een behandeling met bacteriofagen niet de overige eigen microbiële flora aantast. Deze specificiteit is echter ook een nadeel: het is nodig om te weten welke bacterie de infectie veroorzaakt. Dan pas kunnen de geschikte strikt lytische bacteriofagen geselecteerd worden om de infectie te behandelen. Behandeling met bacteriofagen is hierdoor in hoge mate gepersonaliseerd. Door de complexiteit van het bereidingsproces van faagpreparaten zijn deze ongeschikt voor het behandelen van acute infecties. Bacteriofaagtherapie voor chronische infecties lijkt dan uitkomst te bieden, hoewel feitelijke documentatie van succesvolle brede toepassing op dit moment ontbreekt.

Voor de toepassing van bacteriofagen als antibacterieel middel moeten nog een aantal barrières worden geslecht. Ten eerste is er te weinig kennis over de precieze werking van bacteriofagen in het lichaam, en hoe bacteriofagen geïdentificeerd en gekarakteriseerd kunnen worden. Ook is niet duidelijk hoe bacteriofagen zich gedragen bij verschillende toedieningsvormen, welke aantallen nodig zijn, en wat de mogelijke bijwerkingen zijn, en te verwachten werkzaamheid is bij behandeling van verschillende soorten infecties (huidinfecties, gastro-intestinaal, systemisch, sepsis). Om dichterbij therapeutische toepassing van bacteriofagen te komen is meer onderzoek naar deze vragen nodig. Hieruit kan opgemaakt worden dat voor de directe behandeling van een infectie bacteriofaagtherapie niet direct als alternatief gezien kan worden.

Een tweede voornaam struikelblok is regelgeving rond registratie. Momenteel moeten medicijnen in Europa voldoen aan EU Directive 2001/83/EC om toegelaten te mogen worden tot de markt. Toelating vereist de nodige (pre)klinische studies, die voor bacteriofaagtherapie nog niet zijn gedaan. Daarnaast is het vanwege de hoge mate van personalisering van bacteriofaagtherapie niet duidelijk in hoeverre bacteriofaagtherapieën onder de EU-regels voor medicijnen vallen. Bacteriofaagbanken, waaruit bacteriofagen voor behandeling geselecteerd worden, moeten voor toelating ook voldoen aan productie eisen (GMP-eisen). Dit is niet makkelijk realiseerbaar. Individuele

patiënten kunnen nu in onderzoekssettings faagtherapie ondergaan in het kader van experimentele behandelingen. Voor grootschalige toelating tot de markt zijn echter nog aanvullingen op de huidige regelgeving rond registratie nodig, iets wat in een recente workshop georganiseerd door de European Medicines Agency ook geconcludeerd werd.

Er is een duidelijk verschil tussen toelatingseisen nodig voor humane toepassingen en die van voedsel en veterinaire toepassingen. Dit komt door de hogere eisen die gesteld worden aan de kracht van bewijsvoering voor werkzaamheid en complexiteit van onderzoek noodzakelijk om aan de regelgeving voor toelating te voldoen. Vooralsnog is werkzaamheid van de inzet van fagen bij de voedselproducerende industrie slechts gebaseerd op *in vitro* studies.

Verantwoording

Dit informatiedocument is samengesteld in opdracht van het Ministerie van VWS door het RIVM met dank aan leden van de werkgroep bacteriofagen.

Leden van de werkgroep zijn: Albert Vollaard, Bettie Voordouw, Cecile van der Vlugt, Harry Vennema, Heddy de Wijs, Hinke ten Hulscher, Ingrid Hegger, Manon Haverkate, Paul Bijkerk, Sabiena Feenstra, Silke David (vz).

Het document is samengesteld onder eindredactie van: Silke David, Paul Bijkerk, Berend Beishuizen, Cecile van der Vlugt.

Literatuur

Allende, A., Bolton, D., Chemaly, M., Davies, R., Escamez, P. S. F., Girones, R., ... & Ricci, A. Evaluation of the safety and efficacy of Listex (TM) P100 for reduction of pathogens on different ready-to-eat (RTE) food products. EFSA Panel on Biological Hazards (BIOHAZ). *EFSA JOURNAL*, 2016; 14: 8.

Álvarez B, EG Biosca. Bacteriophage-Based Bacterial Wilt Biocontrol for an Environmentally Sustainable Agriculture. *Frontiers in Plant Science*. 2017; 8: 1218. doi:10.3389/fpls.2017.01218.

Brüssow H, E Kutter. Phage ecology. In: Kutter E, Sulakvelidze A, editors. Bacteriophages biology and applications. Boca Raton: Crc Press; 2005. p. 128–63.

Campden BRI. Systematic and critical review on the potential use of bacteriophage on foods. 2016.
<https://www.food.gov.uk/sites/default/files/fs102079finalreport.pdf>

Fauconnier, A., Regulating phage therapy: the biological master file concept could help to overcome regulatory challenge of personalized medicines. *EMBO reports*, 2017; 18: 2, p. 198-200.

Fernández L, S Escobedo, D Gutiérrez, S Portilla, B Martínez, P García, A Rodríguez. Bacteriophages in the Dairy Environment: From Enemies to Allies. *Antibiotics*. 2017; 6: 27. doi:10.3390/antibiotics6040027

Fish R, Kutter E, Wheat G, Blasdel B, Kutateladze M, Kuhl S. Bacteriophage treatment of intransigent diabetic toe ulcers: a case series. *J Wound Care*. 2016 Jul 1; 25(Sup7):S27-S33. doi: 10.12968/jowc.2016.25.Sup7.S27

Gill JJ en P Hyman. Phage Choice, Isolation, and Preparation for Phage Therapy. *Current Pharmaceutical Biotechnology*. 2010; 11: 2-14. doi: 10.2174/138920110790725311.

Goering RV. Mims' medical microbiology 5th edition. Edinburgh: Elsevier Saunders. 2012

Goodridge, L, M Griffiths. Reporter bacteriophage assays as a means to detect foodborne pathogenic bacteria. *Food Research International*. 2002; 35: 863-870.

Greer, GG. Bacteriophage control of foodborne bacteria. *Journal of Food Protection*. 2005; 68: 1102-1111.

Jassim, SAA, RG Limoges, H El-Cheikh. *World J Microbiol Biotechnol*. 2016; 32: 70. doi:10.1007/s11274-016-2028-1.

Jennes S, Merabishvili M, Soentjens P, Pang KW, Rose T, Keersebilck E, Soete O, François PM, Teodorescu S, Verween G, Verbeken G, De Vos D,

- Pirnay JP. Use of bacteriophages in the treatment of colistin-only-sensitive *Pseudomonas aeruginosa* septicaemia in a patient with acute kidney injury-a case report. *Crit Care*. 2017 Jun 4;21(1):129. doi: 10.1186/s13054-017-1709-y.
- Jones, JB, LE Jackson, B Balogh, A Obradovic, FB Iriarte, MT Momol. Bacteriophages for Plant Disease Control. *Annu. Rev. Phytopathol.* 2007; 45: 245-262.
- Keary R, M Sanz-Gaitero, MJ van Raaij, J O' Mahony, M Fenton, O McAuliffe, C Hill, RP Ross, A Coffey. Characterization of a Bacteriophage-Derived Murein Peptidase for Elimination of Antibiotic-Resistant *Staphylococcus aureus*. *Current Protein & Peptide Science*. 2016; 17: 183-190. doi:10.2174/1389203716666151102105515.
- Kutter E, D de Vos, G Gvasalia, Z Alavidze, L Gogokhia, S Kuhl, ST Abedon. Phage Therapy in Clinical Practice: Treatment of Human Infections. *Current Pharmaceutical Biotechnology*. 2010; 11: 69-86. doi:10.2174/138920110790725401.
- Loessner, M J, CED Rees, GSAB Stewart, S Scherer. Construction of luciferase reporter bacteriophage A511::luxAB for rapid and sensitive detection of viable *Listeria* cells. *Applied and Environmental Microbiology*. 1996; 62: 1133-1140.
- Loc-Carrillo C, Abedon ST. Pros and cons of phage therapy. *Bacteriophage*. 2011; 1: 111-114. doi:10.4161/bact.1.2.14590.
- Mills S, RP Ross, C Hill. Bacteriocins and bacteriophage; a narrow-minded approach to food and gut microbiology. *FEMS Microbiology Reviews*. 2017; 41: S129–S153. doi: 10.1093/femsre/fux022
- Oechslin F, Piccardi P, Mancini M, Gabard J, Moreillon P, Entenza JM, Resch G, and Que Y. Synergistic Interaction Between Phage Therapy and Antibiotics Clears *Pseudomonas Aeruginosa* Infection in Endocarditis and Reduces Virulence. *J Infect Dis*. 2017 Mar 1; 215(5): 703–712. doi: 10.1093/infdis/jiw632
- Pelfrene E, Willebrand E, Cavaleiro Sanches A, Sebris Z, Cavaleri M. Bacteriophage therapy: a regulatory perspective. *Antimicrob Chemother*. 2016 Aug; 71(8):2071-4. doi: 10.1093/jac/dkw083.
- Pirnay, J. P., Blasdel, B. G., Bretaudeau, L., Buckling, A., Chanishvili, N., Clark, J. R., ... & Gabard, J. (2015). Quality and safety requirements for sustainable phage therapy products. *Pharmaceutical research*, 32(7), 2173-2179.
- Salmond GPC, Fineran PC. A century of the phage: past, present and future. *Nat Rev Microbiol*. 2015; 13 (12): 777-786
- Schooley RT, Biswas B, Gill JJ, Hernandez-Morales A, Lancaster J, Lessor L, ... & Hamilton T. Development and Use of Personalized Bacteriophage-Based Therapeutic Cocktails To Treat a Patient with a Disseminated Resistant *Acinetobacter baumannii* Infection. *Antimicrob Agents*

Chemother. 2017 Sep 22;61(10). pii: e00954-17. doi: 10.1128/AAC.00954-17.

Sybesma, W., Rohde, C., Bardy, P., Pirnay, J. P., Cooper, I., Caplin, J., ... & McCallin, S. (2018). Silk Route to the Acceptance and Re-Implementation of Bacteriophage Therapy—Part II. *Antibiotics (Basel, Switzerland)*, 7(2).

Van der Vlugt RAA, Verbeek M. Bacteriophages: Therapeutics and alternative Applications. 2008.
<http://cogem.net/index.cfm/nl/publicaties/publicatie/bacteriophages-therapeutics-and-alternative-applications?order=relevance&q=cgm+2008-03&category=onderzoeksrapporten&from=30-09-1998&to=05-01-2018&sc=fullcontent>

Withey S, Cartmell E, Avery LM, Stephenson T. Bacteriophages-potential for application in wastewater treatment processes. *Sci Total Environ.* 2005; 339(1–3):1–18.

WMA. Declaration of Helsinki. 2013. <https://www.wma.net/policies-post/wma-declaration-of-helsinki-ethical-principles-for-medical-research-involving-human-subjects/>

Yoong, P, R Schuch, D Nelson, VA Fischetti. Identification of a broadly active phage lytic enzyme with lethal activity against antibiotic-resistant *Enterococcus faecalis* and *Enterococcus faecium*. *Journal of Bacteriology.* 2004; 186: 4808-4812.

RIVM

De zorg voor morgen begint vandaag