

Bakteriofagi w terapii chorób bakteryjnych ludzi i zwierząt

ZDZISŁAW GLIŃSKI, JAN BUCZEK*, KRZYSZTOF KOSTRO, KRZYSZTOF BUCZEK

Katedra Epizootologii i Klinika Chorób Zakaźnych Wydziału Medycyny Weterynaryjnej AR, ul. Akademicka 12, 20-033 Lublin

*Zakład Mikrobiologii Uniwersytetu w Białymstoku, ul. Świerkowa 20B, 15-950 Białystok

Gliński Z., Buczek J., Kostro K., Buczek K.

Bacteriophages in bacterial infection therapy for people and animals

Summary

The idea of using bacteriophages to treat bacterial infections is not new. Bacteriophages were discovered more than 80 years ago but the success of antibiotic therapy superseded their potential application. However, the increasing incidence of antibiotic and/or multi-drug-resistant bacteria, and a deficit in the development of new chemotherapeutics to counteract bacteria have prompted interest in alternatives to conventional drugs. One option was to use bacteriophages as antibacterial agents. Clinical studies of the effectiveness of phage treatment were carried out. Bacteriophages appeared to be effective for infections untreatable by antibiotics. Phage therapy reduces the emergence of antibiotic resistant strains and by killing only the target bacteria it does not affect the normal flora of the treated patients. The use of genetic engineering techniques may lead to the generation of more-effective phages. Recently bacteriophage enzymes were used to combat the bacterial cells from the outside.

Keywords: bacteriophages, therapy, antibiotic resistant bacteria

Bakteriofagi były wykorzystywane z powodzeniem w leczeniu różnorodnych infekcji bakteryjnych przed erą antybiotyków. Zostały one następnie niemal całkowicie wyparte z lecznictwa przez antybiotyki, które okazały się skuteczniejsze i prostsze w użyciu. Na początku ery antybiotykoterapii tylko pojedyncze szczepy bakterii wykazywały oporność na antybiotyki i nie przypuszczano, że antybiotykkooporność bakterii stanie się poważnym problemem w leczeniu zakażeń bakteryjnych. Po przeszło 80 latach od pierwszego zastosowania bakteriofagów w medycynie ludzkiej, jakim było wyleczenie 4 osób ciężko chorych na czerwonkę, obserwuje się nawrót do ich wykorzystania jako skutecznej broni przeciwko bakteriom (16).

Renesans badań nad bakteriofagami jest wynikiem użycia bakteriofagów jako modeli w badaniach nad strukturą wirusów i genetyką bakterii, użycia typowania fagami (lizotypia) w identyfikacji serologicznie lub biochemicznie identycznych trudnych do odróżnienia szczepów bakterii, co odgrywa ważną rolę w dochodzeniach epidemiologicznych w celu ustalenia źródła zakażenia i dróg szerzenia się infekcji. W powrocie do terapii przy użyciu fagów istotne znaczenie odegrało pojawienie się szczepów bakteryjnych opornych na wiele, niekiedy na wszystkie, znane antybiotyki. Coraz częściej pojawiają się infekcje dróg moczowych, dróg żółciowych, posocznice narządów jamy miednicznej, infekcje pooperacyjne wywołane przez enterokoki oporne na wankomycynę (VRE – Vancomycin Resistant Enterococci) i szczepy *Staphylococcus aureus* oporne na metycylinę (MRSA). MRSA z łatwością nabywają oporność na wankomycynę, uważaną za „lek ostatniego ratunku”. Wybór skutecznych leków przeciwbakteryjnych ma szczególnie istotne znaczenie w lecznictwie zamkniętym, gdzie selekcja opornych i zjadliwych bakterii zachodzi szczególnie łatwo. Działanie immunosupresyjne wielu anty-

biotyków, zwłaszcza w przypadku pacjentów z wrodzoną lub nabytą immunosupresją (immunosupresja polekowa, napromieniowanie promieniami jonizującymi, AIDS), wyklucza lub w dużym zakresie ogranicza ich stosowanie w leczeniu.

W okresie od 1917 do 1956 r. ukazało się ponad 800 prac naukowych poświęconych wykorzystaniu fagów w terapii chorób bakteryjnych ludzi i zwierząt (1). Często leczenie kończyło się jednak niepowodzeniem, ponieważ tylko w niewielkim stopniu znano właściwości bakteriofagów, zwłaszcza sposoby ich przechowywania bez utraty aktywności przeciwbakteryjnej (17). Przyczyną niepowodzeń było też użycie jednego typu fagów w infekcjach mieszanych wywołanych przez kilka gatunków bakterii, fagów różniących się zjadliwością, a także inaktywacja fagów przez płyny ustrojowe pacjenta. Istotny wkład do leczenia przy użyciu bakteriofagów wniosły wieloletnie badania Ślopka i wsp. z Instytutu Immunologii i Terapii Eksperymentalnej PAN we Wrocławiu (22) oraz Sulakvelidze i wsp. z Akademii Nauk w Tyflisie (17).

Struktura i właściwości bakteriofagów

Współczesne badania wirusologiczne dotyczące wirusów bakterii uwidoczniły ich zróżnicowanie zarówno pod względem budowy wirionu jak i materiału genetycznego. W 1994 r. Międzynarodowy Komitet Klasyfikacji Wirusów wyodrębnił 12 rodzin bakteriofagów posiadających w większości jako materiał genetyczny dwuniciowy DNA, ale zidentyfikowano bakteriofagi, których genom jest zbudowany z jednoniciowego DNA, a także fagi z genomem RNA. Podstawową cechą bakteriofagów, podobnie jak wszystkich wirusów jest zakaźność i obecność tylko jednego kwasu nukleinowego jako materialnego podłoża informacji genetycznej oraz białka jako osłonki (kapsyd) chroniącej kwas nukleinowy za-

warty we wnętrzu. Kapsyd poza funkcją ochronną dla materiału genetycznego zarazka jest nośnikiem właściwości antygenowych faga. Za pośrednictwem kwasu nukleinowego informacja genetyczna zawarta w kwasie nukleinowym jest transportowana do cytozolu komórki bakteryjnej, podczas gdy kapsyd pozostaje na zewnątrz zakażonej bakterii. Życiowy cykl lityczny bakteriofaga obejmuje kilka faz. Zaczyna się, jako następstwo przypadkowej kolizji, adsorpcją bakteriofaga do ściany komórki bakteryjnej. Adsorpcja jest możliwa na skutek oddziaływania białka faga ze specyficznymi receptorami dla określonych fagów na powierzchni ściany komórki bakteryjnej. Penetracja kwasu nukleinowego faga do wnętrza bakterii stanowi kolejny etap cyklu replikacji. Niektóre fagi zawierają w ogonku lizozym, który rozkładając wiązania endo- β (1-4) pomiędzy N-acetyloglukozaminą i kwasem N-acetylomuraminowym w mukopolisacharydzie lub mukopeptydzie ściany komórki bakteryjnej, co ułatwia wprowadzenie własnego materiału genetycznego do wnętrza bakterii. Pod wpływem informacji genetycznej zawartej w genomie faga, zakażona komórka bakteryjna zostaje „poinformowana i zmuszona do syntezy białka swoistego dla wirusa”. Następuje okres wewnątrzkomórkowego rozwoju faga, zwany także fazą eklipsy, który obejmuje replikację kwasu nukleinowego faga (przy zahamowaniu replikacji kwasu DNA i RNA bakterii) oraz białek regulatorowych i strukturalnych budujących kapsyd wirusa. W fazie dojrzewania zachodzi formowanie i dojrzewanie faga. W końcowym etapie rozwoju – fazie uwalniania – poprzez mechanizm lizy następuje zniszczenie komórki bakteryjnej. Długość fazy eklipsy wynosi od kilkunastu do kilkudziesięciu minut. Potomne bakteriofagi, które powstają w jednym cyklu litycznym atakują kolejne bakterie. Zakładając, że w pierwszym cyklu litycznym zostanie wyprodukowanych 200 fagów oraz, że każdy z nich zakazi i zabije jedną bakterię, pod koniec 2 cyklu będzie 40 tys. zaś pod koniec 3 cyklu aż 8 mln bakteriofagów (7). Liza bakterii pod działaniem litycznego faga jest procesem składającym się z kaskady następujących po sobie zjawisk kontrolowanych przez geny strukturalne i geny regulatorowe. Udało się zidentyfikować i sklonować gen faga odpowiedzialny za jego działanie na *Salmonella enterica* serovar *Typhimurium*.

Oprócz litycznego cyklu życiowego, który prowadzi do lizy zakażonej komórki bakteryjnej, występuje cykl lizogeniczny i związane z nim zjawisko lizogenii. W tym cyklu materiał genetyczny faga zostaje zintegrowany z chromosomem bakterii (profaga) i replikacja faga zostaje zablokowana. Jednak z chwilą przejścia profaga w faga litycznego uzyskuje on możliwość replikacji i w efekcie zainfekowana komórka ulega lizie. Lizogenia często chroni bakterie przed działaniem litycznym innych niepokrewnych fagów. Często bakterie lizogenne cechują się właściwościami, których nie posiada bakteria nielizogenna. Na przykład lizogenne komórki *Corynebacterium diphtheriae* są patogenne, ponieważ mają zdolność produkowania toksyny dyfterytowej, szczepy lizogenne *Clostridium novyi* typ A i B produkują śmiertelną toksynę.

Wykorzystanie bakteriofagów w leczeniu chorób człowieka i zwierząt

Badania nad skutecznością leczniczą i „profilem bezpieczeństwa” terapii fagowej pozwalają na ocenę jej przydatności leczniczej, a także uzmysławiają zalety i ograniczenia z jakimi należy się liczyć podczas leczenia bakteriofagami. Ważną zaletą jest wybiórcze działanie bakteriofagów na określony gatunek, a nawet typ fagowy zarazka przy braku niepożądanego wpływu na komórkę leczonego organizmu. Niepożądane efekty w przypadku antybiotyków różnią się, co do charakteru i ciężkości, w zależności od rodzaju antybiotyku powodując działania od niewielkich do zagrażających życiu. Dzięki wybiórczemu działaniu fagów na określony gatunek bakterii, terapia fagowa nie uszkadza fizjologicznej flory bakteryjnej przewodu pokarmowego, układu oddechowego, układu moczowo-płciowego leczonych pacjentów. Tym samym, nie mogą rozwijać się infekcje wywołane przez zarazki względnie chorobotwórcze jak np. *Clostridium difficile*, *Candida*, co często obserwuje się w przypadku likwidacji flory bakteryjnej przez antybiotyki o szerokim spektrum działania. Co więcej, może zachodzić zjawisko obniżenia zjadliwości bakterii, ponieważ fagi często absorbują się do struktur komórki bakteryjnej odpowiedzialnych za tę cechę (7).

Istnieje możliwość szybkiego uzyskania poziomu terapeutycznego bakteriofagów i utrzymywania się tego stężenia przez dłuższy czas w leczonym organizmie. Wraz z upływem czasu zwiększa się stężenie bakteriofagów na skutek ich replikacji w zaatakowanych komórkach bakteryjnych. Następnie bakteriofagi są eliminowane z organizmu z chwilą zniszczenia bakterii docelowego działania. Stężenie antybiotyków we krwi osiąga natomiast poziom leczniczy po dłuższym okresie czasu, niekiedy dopiero po kilku dniach. Zaobserwowano, że bakteriofagi replikujące się w organizmie leczonych zwierząt mogą rozprzestrzenić się na nieleczone zwierzęta będące w kontakcie z osobnikami poddanymi terapii fagowej, co w dużym stopniu ułatwia zapobieganie i leczenie zakażeń bakteryjnych (2, 15, 16).

W terapii fagami duże znaczenie odgrywa fakt, że mutacje bakterii w kierunku oporności na określonego faga zachodzą rzadziej niżeli na antybiotyki. Prawdopodobieństwo pojawienia się jednej komórki bakteryjnej odpornej na bakteriofaga przypada na 10^7 podziałów komórkowych, podczas gdy jedna mutacja w kierunku oporności na antybiotyk przypada na 10^6 podziałów komórkowych. Godny uwagi jest fakt braku oporności krzyżowej na fagi i na bakterie. Tym samym, w przypadku pojawienia się szczepów bakteryjnych opornych na faga, można w leczeniu stosować antybiotyk. Natomiast prawdopodobieństwo równoczesnej mutacji w kierunku oporności na faga i na antybiotyk jest bardzo małe. Teoretycznie może ono przypadać na 10^{17} podziałów bakteryjnych. Jednym z wyjść w przypadku fagooporności jest stosowanie w terapii kompozycji dwóch fagów, z których jeden będzie działał litycznie na pojawiające się mutanty odporne fagi. Alternatywą jest zastosowanie w

leczeniu enzymów produkowanych przez bakteriofagi zamiast całych bakteriofagów. Takie postępowanie zdało egzamin w leczeniu infekcji spowodowanych przez patogenne dla człowieka paciorkowce z grupy A, które wywołują szkarlatynę, zapalenia płuc, ostre zapalenie nerek, toksyczny szok, chorobę reumatyczną. Innym rozwiązaniem jest stosowanie terapii fagowej łącznie z podawaniem pacjentom antybiotyku. Istnieje jednak pogląd (8), że takie postępowanie obniży skuteczność działania bakteriofagów i że antybiotyk może przyczynić się do selekcji genów zjadliwości przekazywanych łącznie z genami lekooporności.

Istnieje możliwość wyprodukowania tzw. koktajlów fagowych cechujących się szerszym spektrum działania przeciwbakteryjnego, a także uzyskania na drodze inżynierii genetycznej, „superbakteriofaga”, który charakteryzuje się selektywnym niszczeniem równocześnie kilku różnych gatunków i szczepów bakteryjnych. Rekombinant ScFv-faga M13 niszczy *Helicobacter pylori* reagując z powierzchniowym monometrycznym białkiem tego zarazka o masie 30 kDa (6). Na korzyść leczenia fagami przemawia brak doniesień o występowaniu odczynów alergicznych po ich stosowaniu. Dlatego terapia fagowa może być alternatywą u pacjentów z alergią na antybiotyki.

Badania na modelach zwierzęcych okazały się bardzo przydatne do oceny efektywności stosowania fagów w leczeniu pojedynczych i mieszanych infekcji bakteryjnych i stworzyły podstawę do wprowadzenia bakteriofagów do lecznictwa. Podanie fagów likwidowało infekcję u śmiertelnie chorych szczurów na zakażenia układowe wywołane przez *E. coli* (14), u kurcząt zakażonych *Salmonella typhimurium* i królików zakażonych *Pseudomonas aeruginosa* (16). Zastosowanie bakteriofagów obniżyło śmiertelność wśród zakażonych *S. typhimurium* kurcząt z 60% do 3%. Stwierdzono, że jedna dawka faga wystarcza do likwidacji eksperymentalnego domięśniowego zakażenia szczura *E. coli*. Taki efekt można było uzyskać dopiero po kilkakrotnych iniekcjach antybiotyków. Duże osiągnięcia zanotowano w leczeniu eksperymentalnych biegunek cieląt wywołanych przez *E. coli* 09 : K30, K99. Po zastosowaniu fagów u 6 cieląt chorych po 1 godz. po zakażeniu biegunka występowała u 3 i 1 cielę padło. Zastosowanie terapii fagowej po 8 godz. po zakażeniu zapobiegło biegunce i padaniu cieląt (2). Jedna iniekcja dootrzewnowa 3×10^8 jfł (jednostek tworzących łyśinki) bakteriofaga podana po 45 min. po zakażeniu dootrzewnowym 10^9 jtk (jednostek tworzących kolonie) *Enterococcus faecium* opornym na wankomycynę, chroniła myszki przed śmiercią. Nielezione zwierzęta padły w ciągu 48 godz. (3). Skuteczność specyficznej terapii fagowej odnotowano także w doświadczalnych zakażeniach myszy silnie zjadliwym dla zwierząt szczepem K2 5055 *Klebsiella pneumoniae*. Najbardziej skuteczną okazała się terapia rozpoczynana w dwa dni po zakażeniu zwierząt i podawanie preparatu zawierającego bakteriofaga dootrzewnowo przez 15-20 dni (4).

Przekonywujący dowód na skuteczność leczenia fagami uzyskano u myszek, u których rozwinęło się śmier-

telne zapalenie mózgu i opon mózgowych po eksperymentalnym zakażeniu domózgowym 10^6 jtk *Shigella dysenteriae*. W ciągu 2-5 dni wszystkie z 8 zakażonych myszek padły. Natomiast przy jednoczesnym zakażeniu i podaniu zawiesiny 10^9 jfł padło 2 z 8 zakażonych myszek, a po zastosowaniu zawiesiny faga zawierającej 10^5 jfł padło 6 z 8 zakażonych myszek (2). Badania przeprowadzone u ryb hodowlanych wskazują na możliwość i celowość użycia bakteriofagów, w stosunku do silnie patogennej bakterii *Pseudomonas plecoglossicida* powodującej masowe zachorowania i upadki. Wyosobnione szczepy bakteriofagów i podawane w karmie kontrolowały skutecznie przebieg schorzenia (10).

Jednym z warunków, który rokuje pomyślne efekty po zastosowaniu bakteriofagów jest środowisko, które umożliwi szybki kontakt fagów z bakteriami. U zwierząt i ludzi jest nim płyn mózgowo-rdzeniowy, krew, śluzówka przewodu pokarmowego, skóra. Tym też można w pewnym stopniu tłumaczyć dobre efekty terapii fagowej posocznicy i zapaleń opon mózgowych u ludzi, infekcji wywołanych przez *Pasteurella* i gronkowcowych zapaleń gruczołu mlekowego u zwierząt, infekcji bakteryjnych skóry u ludzi i zwierząt, infekcji przewodu pokarmowego wywołanych przez enterotoksynogenne szczepy *E. coli* oraz przez *Vibrio cholerae*. Gorsze efekty uzyskiwano w przypadku zakażeń przewodu pokarmowego wywołanych przez drobnoustroje z rodzaju *Salmonella* i *Shigella* i w zakażeniach wywołanych przez bakterie, które rozmnażają się we wnętrzu komórek zainfekowanego organizmu gospodarza (17).

Stosowanie fagów zdało egzamin w leczeniu długotrwałych ropnych zakażeń, z których większość nie poddawała się terapii antybiotykowej wywołanych przez *Staphylococcus aureus*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Klebsiella pneumoniae* i *Escherichia coli*. Wyleczenia uzyskano w 90% przypadków. Za kryterium wyleczenia przyjmowano likwidację procesu zapalnego, likwidację ran i przetok (13). Bakteriofagi podawano *per os* po uprzednim podaniu preparatów zobojętniających kwas solny lub preparatów osłaniających (żelatyna), co chroniło fagi przed szkodliwym wpływem kwasu solnego żołądka. Przy tej drodze podania fagi przedostawały się do krwioobiegu po 2-4 godz. i za jego pośrednictwem po około 10 godz. do narządów wewnętrznych i uszkodzonych tkanek. W leczeniu zakażeń przewodu pokarmowego czas trwania leczenia wynosił średnio 5,3 tyg., podczas gdy znacznie dłuższy czas trwało leczenie bakteriofagami zapalenia płuc z przetokami do jamy opłucnowej i bakteryjnego zapalenia stawów (17, 19).

Obecnie u ludzi fagi są stosowane *per os* w formie tabletek lub zawiesiny zawierających od 10^5 do 10^{11} jfł/ml, *per rectum*, miejscowo do worka spojówkowego, ucha, śluzówki jamy nosowej, w postaci tamponów, kremów, aerozoli, iniekcji dootrzewnowych i dożylnych. Wprowadza się też do leczenia i zapobiegania zakażeniom bakteryjnym materiały opatrunkowe ulegające biodegradacji zbudowane z nietoksycznych polimerów zawierające bakteriofagi (18).

Ograniczenia terapii z użyciem bakteriofagów

Celem fagoterapii nie jest wyeliminowanie antybiotyków i chemioterapeutyków przeciwbakteryjnych w tych sytuacjach, kiedy przynoszą one zadawalające efekty. Bakteriofagi będą najprawdopodobniej „lekiem ostatniego ratunku” w infekcjach wywołanych przez bakterie odporne na znane leki przeciwbakteryjne. Będą one stosowane w leczeniu zwierząt tam, gdzie przy skuteczności przeciwbakteryjnej równej antybiotekom, zaistnieje konieczność wyeliminowania okresu karencji, który obowiązuje w stosunku do środków spożywczych zwierzęcego pochodzenia od zwierząt leczonych antybiotykami. Odpadnie też w przypadku fagoterapii konieczność kosztownego oznaczania pozostałości antybiotyków i produktów ich biotransformacji w tkankach zwierząt przeznaczonych do konsumpcji.

Podjęmowane w ostatnich latach wysiłki coraz szerszego wprowadzenia terapii fagowej na co wskazują publikacje zebrane w pracach przeglądowych, zwracają uwagę także na szereg ograniczeń, jakie mogą mieć miejsce w przypadku terapii bakteriofagami (7, 9, 17). Nie można, bowiem wykluczyć możliwości replikacji bakteriofagów w komórkach ssaków i ewentualnego ich niekorzystnego działania na zainfekowane komórki. Ograniczeniem terapii z użyciem bakteriofagów jest możliwość negatywnego wpływu fagów na efekty uodparniania szczepionkami, które zawierają w swoim składzie żywe atenuowane drobnoustroje. Ważnym ograniczeniem jest możliwość wystąpienia zjawiska transdukcji ogólnej lub ograniczonej, w której ma miejsce przekazanie genów między komórkami bakteryjnymi przy udziale bakteriofagów. Dotyczy to głównie bakterii z rodziny *Enterobacteriaceae*, *Pseudomonas* i *sp.*, i *Bacillus* *sp.* (5). W ten sposób mogą być przekazane takie cechy jak lekooporność, zjadliwość i inwazyjność. Ograniczeniem jest indukcja w leczonym organizmie przeciwciał skierowanych przeciwko bakteriofagom. Pojawiają się one u człowieka i zwierząt po kilku tygodniach i mogą interferować z fagami w przypadku terapii fagowej trwającej kilka-kilkanaście tygodni, lub przy jej powtórzeniu z użyciem tych samych typów serologicznych bakteriofagów (12). Wyjściem jest stosowanie dużych dawek bakteriofagów, co zapobiegnie neutralizacji wszystkich podanych bakteriofagów. Z terapii muszą być wykluczone bakteriofagi, które posiadają geny o dużym stopniu homologii ze znanymi genami lekooporności bakterii, geny kodujące toksyny lub czynniki wirulencji, a także te szczepy bakteriofagów, na których działanie bakterie stają się niepodatne, ponieważ z łatwością występuje u nich zjawisko lizogenii (2). Do niepożądanych objawów leczenia fagami należały występujące czasami i trwające kilka godzin bóle wątroby oraz przejściowy wzrost temperatury spowodowane uwalnianiem się endotoksyn ze zlizowanych przez fagi bakterii (11). Także zachodzące pomiędzy bakteriofagami interakcje mogą w efekcie prowadzić do mobilizacji genów wirulencji z następowym ich przekazaniem komórce bakteryjnej (5).

Perspektywy wykorzystania bakteriofagów

Możliwości wykorzystania bakteriofagów są wielorakie. Wydaje się, że do najważniejszych, oprócz lecze-

nia zakażeń bakteryjnych człowieka i zwierząt, można zaliczyć użycie bakteriofagów w hodowli roślin, w przemyśle spożywczym i w transplantologii. Bakteriofagi są wykorzystywane coraz powszechniej w zwalczaniu infekcji roślin wywołanych przez fitopatogenne bakterie. Zarysowała się możliwość wykorzystania bakteriofagów do niszczenia flory bakteryjnej zakażającej przeszczepy tkanek i narządów (2). Zastosowanie antybiotyków w tych przypadkach nie zawsze przynosi zadawalające efekty. Bakteriofagi mogą być wykorzystane w przemyśle spożywczym do walki z drobnoustrojami z rodzaju *Salmonella* i *Escherichia coli* w produktach mięsnych i drobiowych. W niektórych sytuacjach obecność bakteriofagów jest niepożądana. Są one przyczyną dużych strat w przemyśle serowarskim, mleczarskim, ponieważ niszczą bakterie zaangażowane w procesy fermentacji. Duże nadzieje rokują badania nad wykorzystaniem bakteriofagów w leczeniu gruźlicy odpornej na znane chemioterapeutyki.

Piśmiennictwo

1. Ackerman H. W., Dubow M.: Viruses of Prokaryotes. I. General properties of bacteriophages. CRC Press, Boca Raton, Florida 1987.
2. Barrow P. A., Soothill J. S.: Bacteriophage therapy and prophylaxis: rediscovery and renewed assessment of potential. Trends Microbiol. 1997, 5, 268-271.
3. Biswas B., Adhya S., Washart P., Paul B., Trostel A. N., Pawell B., Carlton R., Merril C. R.: Bacteriophage therapy rescues mice bacteremic from a clinical isolate of vancomycin resistant *Enterococcus faecium*. Infect. Immun. 2002, 70, 204-210.
4. Bogovazova G. G., Voroshilova N. N., Bondarenko V. M.: The efficacy of *Klebsiella pneumoniae* bacteriophage in the therapy of experimental *Klebsiella* infection. Z. Mikrobiol. Epidemiol. Immunobiol. 1991, 4, 5-8.
5. Boyd E. F., Davis B. M., Hochhut B.: Bacteriophage - bacteriophage interactions in the evolution of pathogenic bacteria. Trends Microbiol. 2001, 9, 137-144.
6. Cao J., Sun Y., Berglind T., Mellgard B., Li Z., Mardh B., Mardh S.: Helicobacter pylori-antigen-binding fragments expressed on the filamentous M13 phage bacterial growth. Biochem. Biophys. Acta. 2000, 1474, 107-113.
7. Carlton M.: Phage therapy: past history and present prospects. Arch. Immunol. Ther. Exp. 1999, 47, 267-274.
8. Coleman D. C., Sullivan D. J., Russel R. J., Arbuthnot J. P., Carey B. F., Pomeroy H. M.: Staphylococcus aureus bacteriophages mediating the simultaneous lysogenic conversion of beta-lysin, staphylokinase and enterotoxin A. Molecular mechanism of triple conversion. J. Gen. Microbiol. 1989, 135, 1679-1697.
9. Lorch A.: Bacteriophages an alternative to antibodies. Biotech. Devel. Monitor 1999, 39, 14-17.
10. Park Se-Chang, Shimamura I., Fukunaga M., Mori-Ki, Nakai T., Parc S. C.: Isolation of bacteriophages specific to a fish pathogen, *Pseudomonas plecoglossicida*, as a candidate for disease control. Appl. Environ. Microbiol. 2000, 66, 1416-1422.
11. Słopek S., Dulakova I., Weber-Dąbrowska B., Kucharewicz-Krukowska A., Dąbrowski M., Bisikiewicz R.: Results of bacteriophage treatment of suppurative bacterial infections. II. Detailed evaluation of the results. Arch. Immunol. Ther. Exp. 1981, 31, 267-291.
12. Słopek S., Kucharewicz-Krukowska A.: Immunogenic effect of bacteriophage in patients subjected to phage therapy. Arch. Immunol. Ther. Exp. 1987, 35, 553-561.
13. Słopek S., Weber-Dąbrowska B., Dąbrowski M., Kucharewicz-Krukowska A.: Results of bacteriophage treatment of suppurative bacterial infections in the years 1981-1986. Arch. Immunol. Ther. Exp. 1987, 35, 569-583.
14. Smith H., Huggins R. B.: Successful treatment of experimental *E. coli* infections in mice using phage: its general superiority over antibiotics. J. Gen. Microbiol. 1982, 128, 307-318.
15. Smith H. W., Huggins M. B., Shaw K. M.: Factors influencing the survival and multiplication of bacteriophages in calves and in their environment. J. Gen. Microbiol. 1987, 133, 1127-1135.
16. Soothill J. S.: Treatment of experimental infections of mice by bacteriophages. Med. Microbiol. 1992, 37, 258-261.
17. Sulakvelidze A., Alavidze Z., Morris J. G. Jr.: Bacteriophage therapy. Antimicrob. Agents Chemother. 2001, 45, 649-659.
18. Tsitlanadze G., Khosruashvili T., Nadirashvili N., Meipariani A., Alavidze Z., Goderdzishvili M., Kvatadze N., Dgebuadze Sh., Katsarawa R.: Phage Bio-Derm: new prospects for treatment of wounds and trophic ulcers. Exp. Clin. Med. 1999, 2, 83-84.
19. Weber-Dąbrowska B., Dąbrowski M., Słopek S.: Studies on bacteriophage penetration in patients subjected to phage therapy. Arch. Immunol. Ther. Exp. 1987, 35, 563-568.
20. Weber-Dąbrowska M., Mulczyk M., Górski A.: Bacteriophage therapy of bacterial infection: an update of our Institute's experiments. Arch. Immunol. Ther. Exp. 2000, 48, 547-551.

Adres autora: prof. zw. dr hab. mgr Zdzisław Gliński, ul. Akademicka 12, 20-033 Lublin; e-mail: gliński@agros.ar.lublin.pl