

Potencjalne możliwości wykorzystania bakteriofagów w leczeniu zakażeń bakteryjnych zwierząt^{*)}

BEATA WEBER-DĄBROWSKA, ANDRZEJ GÓRSKI, MICHAŁ ZIMECKI,
MARZANNA ŁUSIAK-SZELACHOWSKA, MIROŚLAW GRZĘDA*, MAŁGORZATA LIS*,
RYSZARD MIĘDZYBRODZKI, WOJCIECH FORTUNA, ANDRZEJ DUBIEL**,
KINGA ŚWITAŁA-JELEŃ, JANUSZ BORATYŃSKI

Instytut Immunologii i Terapii Doświadczalnej PAN, ul. R. Weigla 12, 53-114 Wrocław

*Biowet Puławy Sp. z o.o., ul. Arciucha 2, 24-100 Puławy

**Katedra i Klinika Rozrodu, Chorób Przeżuwaczy oraz Ochrony Zdrowia Zwierząt Wydziału Medycyny Weterynaryjnej AR, pl. Grunwaldzki 49, 50-366 Wrocław

Weber-Dąbrowska B., Górski A., Zimecki M., Łusiak-Szelachowska M., Grzęda M., Lis M.,
Międzybrodzki R., Fortuna W., Dubiel A., Światała-Jeleń K., Boratyński J.

Potential application of bacteriophages in bacterial infections in animals

Summary

Antibiotic-resistant bacterial infections have caused serious therapeutic problem in medicine and veterinary practice. Resistance to antibiotics is currently increasing, which is related to, among other factors, the capability of bacteria to produce specific enzymes rendering them resistant to most available antibiotics. Renewed interest in the possibilities of using bacteriophages, viruses that can attack and destroy bacterial cells, in antibacterial therapy in humans and animals has been observed in many countries. Phage therapy of bacterial infections in humans has been conducted by our Institute since 1980. The most successful results were obtained in cases of meningitis, furunculosis, otitis media, cancer, and septicemia (100% of patients). Experimental phage therapy in animals is provided by many centers. Successful therapeutic and protective phage therapy has been observed in calves, piglets, lambs, chickens and mice. Our results on the phage treatment of colibacteriosis in foxes, piglets and balanoposithis in bears have demonstrated its high effectiveness. A study on phage prepreparates for their use in bovine mastitis is currently underway.

Keywords: bacterial infections, bacteriophages, phage therapy

Zakażenia bakteryjne różnych tkanek i narządów wywołane przez lekooporne formy bakterii stwarzają w praktyce medycznej poważne problemy terapeutyczne (3, 13, 17). Wiązą się one ze stałym pojawianiem się szczepów bakteryjnych, opornych na antybiotyki, w tym na antybiotyki tzw. ostatniej szansy – wankomycynę. W piśmiennictwie coraz częściej używa się stwierdzenia, że wchodzimy w erę przedantybiotyko-
wą (13).

Antybiotykooporność bakterii

Jednym z najważniejszych mechanizmów oporności bakterii na najczęściej stosowane antybiotyki beta-laktamowe jest ich zdolność do wytwarzania beta-laktamaz – enzymów zdolnych do zablokowania działania antybiotyków tej grupy. Enzymy te posiadają zdolność rozbijania pierścienia beta-laktamowego antybiotyku, co całkowicie blokuje jego aktywność biologiczną (9).

Zjawisko powszechnej antybiotykooporności bakterii stwarza poważne problemy terapeutyczne. Poważny niepokój budzi także fakt pojawienia się w ostatnich latach szczepów enterokoków opornych na wankomycynę, a także ostatnio na linezolid.

Oporność bakterii na antybiotyki, jak również ich nadmierne i nie zawsze w pełni uzasadnione stosowanie, wyjaśnia z jednej strony zjawisko występowania zakażeń wywołanych przez antybiotykooporne bakterie, a z drugiej strony stwarza konieczność zastosowania innych czynników zdolnych do opanowywania tych zakażeń.

Bakteriofagi – wirusy niszczące bakterie

Bakteriofagi (fagi) należą do grupy szeroko rozpowszechnionych w przyrodzie wirusów, których cykl życiowy związany jest wyłącznie z komórką bakteryjną (1). Opisano dotąd ponad 5000 fagów aktywnych wobec wielu znanych gatunków bakterii. Są wszechobecne – izoluje się je ze wszystkich środowisk naturalnych – wód słodkich i słonych (także z gorących źródeł) i gleby oraz z organizmów ludzi i zwierząt.

^{*)} Badania finansowane ze środków Ministra Nauki w latach 2003-2006 jako projekt badawczy zamawiany (grant nr PBZ-MIN-007/P04/33) oraz jako granty KBN – nr 5P06K 00518 i nr 3P06K 01125.

Występują także w produktach spożywczych pochodzenia zwierzęcego.

Jak wspomniano, cykl życiowy bakteriofagów związany jest z komórką bakteryjną, przy czym możliwe są dwa różne typy oddziaływania faga na gospodarza. Cykl lityczny (wirulentny), prowadzi do całkowitego zniszczenia komórki bakteryjnej, a bakteriofagi zostają uwolnione do środowiska w procesie lizy komórki bakteryjnej, m.in. z udziałem fagowych enzymów litycznych. W cyklu lizogenicznym (łagodnym) materiał genetyczny faga po wnikięciu do komórki bakteryjnej ulega wbudowaniu w chromosom bakteryjny (tzw. profag) i jest przekazywany komórkom potomnym podczas podziału komórki. Proces namnażania fagów zachodzi zarówno w warunkach *in vitro*, jak i *in vivo*.

Praktyczne zastosowanie bakteriofagów. Swoistość gatunkowa fagów i lizotypia bakterii

Większość bakteriofagów cechuje wysoka swoistość działania. Oznacza to, iż ich aktywność lityczna związana jest zwykle z jednym gatunkiem drobnoustroju. I właśnie ta cecha pozwoliła, z jednej strony, na wykorzystanie bakteriofagów do określania przynależności gatunkowej bakterii, a z drugiej strony, na zróżnicowanie szczepów bakteryjnych w obrębie tego samego gatunku. Opracowano wiele zestawów fagów typujących, umożliwiających różnicowanie bakterii na podstawie ich reakcji z fagami typującymi (tzw. lizotypia) (1).

Wykorzystanie bakteriofagów w terapii zakażeń bakteryjnych

Jak wspomniano, zakażenia bakteryjne wywołane lekoopornymi szczepami bakterii, stanowią poważny problem wymagający poszukiwań nowych terapii do walki z patogennymi drobnoustrojami. Krótko po odkryciu bakteriofagów podjęto pierwsze próby ich zastosowania w terapii antybakteryjnej u ludzi. W ciągu ostatnich kilku lat opublikowano wiele prac postulujących celowość rozszerzenia badań nad wykorzystaniem bakteriofagów w terapii antybakteryjnej (3, 5, 17), co również potwierdzają wyniki uzyskane w tej dziedzinie przez Instytut Immunologii i Terapii Doświadczalnej PAN (1, 17).

Badania własne wykazały wysoką skuteczność terapii fagowej w grupie 2000 chorych w zakażeniach lekoopornymi szczepami bakteryjnymi, zarówno w zakażeniach jednorodnych, jak i mieszanych, bez względu na rodzaj schorzenia, wiek pacjenta czy wcześniej prowadzoną antybiotykoterapię (19). Szczególnie wysoką skuteczność fagoterapii (85%) obserwowano u chorych z posocznicą, a pełny efekt terapeutyczny uzyskano u 20 chorych, u których zakażenia bakteryjne wystąpiły w przebiegu procesu nowotworowego. Na szczególne podkreślenie zasługuje fakt, iż w czasie prowadzonej fagoterapii nie obserwowano istotnych objawów ubocznych.

Eksperymentalna fagoterapia zakażeń bakteryjnych u zwierząt

Zakażenia bakteryjne wywołane przez lekooporne bakterie stwarzają poważne problemy terapeutyczne w praktyce weterynaryjnej. Stałe pojawianie się wieloopornych szczepów gronkowców, enterokoków, paciorkowców i bakterii z rodzajów *Escherichia*, *Salmonella*, *Pseudomonas* oraz *Campylobacter* stanowi zagrożenie dla zdrowia i życia zwierząt hodowlanych (4, 6, 7). Badania nad możliwością wykorzystania bakteriofagów w terapii antybakteryjnej są prowadzone na zwierzętach doświadczalnych od kilkudziesięciu lat (4-8, 10-12, 14, 15, 18). W 1943 r. Dubos i wsp. (8) wykazali m.in. skuteczne działanie fagów podanych dootrzewnowo myszom z zapaleniem opon mózgowo-rdzeniowych wywołanym letalną, domózgową dawką *Shigella dysenteriae*. Bardzo interesujące wyniki eksperymentalnego zastosowania fagów przedstawili Smith i wsp. (14-16). Autorzy ci wykazali skuteczne, terapeutyczne działanie fagów w biegunce doświadczalnie wywołanej enteropatogennym szczepem *Escherichia coli* u cieląt, prosiąt i jagniąt (15). W badaniach tych uzyskano skuteczniejsze działanie fagów w porównaniu do antybiotyków. Podane bakteriofagi w 1 do 8 godzin przed zakażeniem wykazywały działanie ochronne. W kolejnych badaniach autorzy ci wykazali również ochronne działanie fagów *Escherichia coli* u zwierząt trzymanyh w pomieszczeniach, w których uprzednio przebywały zwierzęta leczone fagami lub fagi były w nich rozprowadzone (16). Autorzy wykazali także zdolność fagów do namnażania się *in vivo*, a także wpływ różnych czynników zewnętrznych na przeżycie bakteriofagów w środowisku. Podobnie skuteczne działanie fagów w przebiegu posocznicy i zapalenia opon mózgowo-rdzeniowych u cieląt i drobiu wykazali Barrow i wsp. (5). Izolowany ze ścieków fag *E. coli R* wykazywał działanie lityczne szczepu *E. coli K1*. Jednoczesne domięśniowe podanie faga i bakterii całkowicie chroniło zwierzęta przed rozwojem zakażenia. Autorzy ci wykazali także, że u kurcząt zakażonych drogą doczaszkową fagi przechodzą barierę krew-mózg.

Interesujące wyniki zostały przedstawione przez zespół W. E. Huffa i wsp. (10, 11). W wielokierunkowych badaniach autorzy wykazali zarówno ochronne, jak i terapeutyczne działanie fagów w eksperymentalnym zakażeniu dróg oddechowych u drobiu, wywołanym przez patogenny szczep *E. coli O2*. Badano skuteczność fagów w zależności od drogi podania (domięśniowo, wziewnie), od jednoczesnego lub opóźnionego podania faga w stosunku do zakażenia, od wielokrotności podawanych dawek faga oraz od faga podanego bez jednoczesnego użycia antybiotyku lub z antybiotykiem. Wykazano większą skuteczność terapii fagowej przy domięśniowym podaniu faga oraz statystycznie istotne lepsze wyniki terapii fagowej skojarzonej z podaniem antybiotyku. Także wyniki przed-

stawione przez innych autorów wskazują na skuteczną fagoterapię eksperymentalnie wywołanej posocznicy u myszy po dootrzewnym podaniu letalnej dawki wankomycynoopornego szczepu *Enterococcus faecium* (6), natomiast Atterbury i wsp. (4) wskazują na możliwość skutecznego zastosowania bakteriofagów do eliminacji szczepów *Campylobacter* kolonizujących skórę kurcząt, co mogłoby w przyszłości prowadzić do wykorzystania bakteriofagów do celów terapeutycznych.

Fagi w weterynarii – badania własne

Pierwsze próby zastosowania bakteriofagów były prowadzone przez nasz Instytut już w latach 1970-1979 w przypadkach kolibakteriozy u lisów (18) i prosiąt (12). Bakteriofagi zastosowano u 175 lisów z objawami ostrego zapalenia błony śluzowej jelit, wywołanego zakażeniem pałeczką *Escherichia coli*. Bakteriofagi (o mianie 10^5 czf/ml) podano doustnie (dwukrotnie w odstępach dwudniowych), uzyskując pełne wyleczenie 173 zwierząt. Skuteczna także okazała się terapia fagowa kolibakteriozy 1213 prosiąt. Po zastosowaniu swoistego bakteriofaga *E. coli* odsetek wyleczonych zwierząt wynosił 95,6%, co dawało korzystniejszy wynik w porównaniu do grupy kontrolnej leczonej chemioterapeutykami.

W związku z problemem niepłodności występującej u knurów, związanej z zapaleniem błony śluzowej prącia i napletka (*balanoposthitis*), wywołanym zakażeniem *Pseudomonas*, w ramach wspólnie realizowanego grantu KBN z Akademią Rolniczą we Wrocławiu, bakteriofagi zastosowano u 15 knurów z różnych stacji unasienniania. Poliwalentny preparat fagowy został przygotowany w oparciu o określenie wrażliwości na swoiste bakteriofagi 50 szczepów *Pseudomonas*. U wszystkich zwierząt uzyskano całkowite ustąpienie objawów zakażenia po 2 tygodniach doustnej i miejscowej fagoterapii. Uzyskany efekt terapeutyczny okazał się trwały – w kilkukrotnych badaniach bakteriologicznych nie wykazano obecności pałeczek *Pseudomonas*. Wykazano także statystycznie istotny wpływ fagoterapii na przeżywalność plemników (o 230%) (7).

Zapalenie gruczołu mlekowego u krów (*mastitis*) stanowi poważny, o światowym wymiarze problem terapeutyczny (2). Organizmy bakteryjne będące przyczyną *mastitis* to głównie szczepy z rodzaju *Streptococcus* i *Staphylococcus*. Stosowane dotąd metody terapii antybakteryjnych w *mastitis* z użyciem antybiotyków i szczepionek nie przynoszą zadowalających rezultatów. W ramach realizowanego przez Instytut wspólnie ze spółką „Biowet Puławy” grantu zamawianego prowadzone są m.in. badania zmierzające do opracowania preparatów bakteriofagowych, swoistych dla szczepów bakteryjnych będących najczęstszą przyczyną zapalenia gruczołu mlekowego u bydła. Zgromadzono blisko 200 szczepów gronkowca złocistego izolowanego z mleka krów, pochodzących z okolic

Puław, Kielc oraz województwa warmińsko-mazurskiego. Określono profil wrażliwości szczepów na antybiotyki oraz na poliwalentne bakteriofagi *Staphylococcus aureus*, co będzie podstawą do przygotowania preparatów fagowych dla potrzeb terapeutycznych.

Zjawisko oporności bakterii na aktualnie dostępne chemioterapeutyki stwarza konieczność opracowania nowych strategii do walki z lekoopornymi drobnoustrojami. Uzyskane dotąd wyniki badań nad terapeutycznym zastosowaniem bakteriofagów w leczeniu zakażeń bakteryjnych u ludzi i zwierząt uzasadniają celowość ich kontynuowania. Opracowanie preparatów fagowych o działaniu zarówno terapeutycznym, jak i profilaktycznym może okazać się w przyszłości jedną z najskuteczniejszych metod do walki z bakteriami patogennymi dla ludzi i zwierząt.

Piśmiennictwo

1. Ackermann H. W., Dubow M. S.: Viruses of Prokaryotes I. General Properties of Bacteriophages. CRC Press. Boca Raton FL. 1987, 1-172.
2. Adesiyun A. A.: Characteristic of *Staphylococcus aureus* strains isolated from bovine mastitic milk: bacteriophage and antimicrobial agent susceptibility and enterotoxigenicity. J. Vet. Med. B. 1994, 42, 129-139.
3. Alisky J., Iczkowski K., Rapoport A., Troitsky N.: Bacteriophage show promise as antimicrobial agents. J. Infect. 1998, 36, 5-15.
4. Atterbury R. J., Connerton P. L., Dodd C. E., Rees C. E., Connerton J. F.: Application of host specific bacteriophages to the surface of chicken skin leads to a reduction in recovery of *Campylobacter jejuni*. Appl. Environ. Microbiol. 2003, 69, 6302-6306.
5. Barrow P. A., Lovell M., Berchieri A. Jr.: Use of lytic bacteriophage for control of experimental *Escherichia coli* septicemia and meningitis in chickens and calves. Clin. Diagn. Lab. Immunol. 1998, 5, 294-298.
6. Biswas B., Adhya S., Washard B.: Bacteriophage therapy rescues mice bacteremic from a clinical isolate of vancomycin-resistant *Enterococcus faecium*. Infect. Immun. 2002, 70, 204-210.
7. Dubiel A., Kozdrowski R., Bielas W., Siemieniuch M., Weber-Dąbrowska B., Mulczyk M.: Wpływ swoistych bakteriofagów na właściwości nasienia knurów zakażonych pałeczką ropy błękitnej. Med. Vet. 2005, 4(2), 33-40.
8. Dubos R. J., Straus J. H., Pierce C.: The multiplication of bacteriophage in vivo and its protective effect against an experimental infection with *Shigella dysenteriae*. J. Exp. Med. 1943, 20, 161-168.
9. Dzierżanowska D.: Mechanizmy bakteryjnej oporności na chemioterapeutyki oraz znaczenie kliniczne tego zjawiska. Medycyna po Dyplomie, wydanie specjalne wrzesień 1995, 3-15.
10. Huff W. E., Huff G. R., Rath N. C., Balong J. M., Donoghue A. M.: Prevention of *Escherichia coli* infection in broiler chicken with a bacteriophage aerosol spray. Poultry Sci. 2002, 81, 1486-1491.
11. Huff W. E., Huff G. R., Rath N. C., Balong J. M., Donoghue A. M.: Evaluation of aerosol spray and intramuscular injection of bacteriophage to treat an *Escherichia coli* respiratory infection. Poultry Sci. 2003, 82, 1108-1112.
12. Kaszubkiewicz Cz., Kucharewicz-Krukowska A., Michalski Z., Bocianowski M., Soltysiak Z., Durlak J.: Próba zastosowania bakteriofagów w leczeniu kolibakteriozy prosiąt. Medycyna Wet. 1982, 38, 281-282.
13. Merril C. R., Biswas B., Carlton R.: Long-circulating bacteriophage as antimicrobial agents. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 1996, 93, 3188-3192.
14. Smith H. W., Huggins M. B.: Successful treatment of experimental *Escherichia coli* infection in mice using phage: its general superiority over antibiotics. J. Gen. Microbiol. 1982, 129, 307-318.
15. Smith H. W., Huggins M. B.: Effectiveness of phages in treating experimental *Escherichia coli* diarrhoea in calves piglets and lambs. J. Gen. Microbiol. 1983, 129, 2659-2675.
16. 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.
17. Sulakvelidze A., Alavidze Z., Morris J. G. Jr.: Bacteriophage therapy. Antimicrob. Agents Chemother. 2001, 45, 649-659.
18. Ślopek S., Kucharewicz-Krukowska A., Kotz J., Michalski Z., Soltysiak Z.: Próba leczenia bakteriofagami kolibakteriozy u lisów. Medycyna Wet. 1979, 34, 672-673.
19. Weber-Dąbrowska B., Mulczyk M., Górski A.: Bacteriophage therapy of bacterial infections: an update of our Institute's experience. Arch. Immunol. Ther. Exp. 2000, 48, 547-551.

Adres autora: dr Beata Weber-Dąbrowska, ul. R. Weigla 12, 53-114 Wrocław; e-mail: weber@iitd.pan.wroc.pl