

Bakteriofagi i fagoterapia

ROMUALD GRYKO, SYLWIA PARASION, LIDIA MIZAK

Wojskowy Instytut Higieny i Epidemiologii. Ośrodek Diagnostyki i Zwalczania Zagrożeń Biologicznych,
ul. Lubelska 2, 24-100 Puławy

Gryko R., Parasion S., Mizak L.

Bacteriophages and phage therapy

Summary

The article presents the biology of bacteriophages and their diagnostic and therapeutic applications, including recombinants with the use of the phage display method. Clinical efficacy of phage therapy, especially in cases of antibiotic-resistant infections, including those complicated by MRSA strains, are underlined. The article also discusses the results of experimental studies, which can provide directions for future investigations and therapeutic applications of bacteriophages.

Keywords: bacteriophages, phage therapy

Bakteriofagi (fagi) są to wirusy, które infekują bakterie. Nie atakują one komórek eukariotycznych i nie mogą replikować się poza komórkami bakteryjnymi (11). Są najbardziej rozpowszechnioną „formą życia” na naszej planecie (11) i z powodu różnorodności stanowią niewiarygodnie duży zasób genów mogących wpływać na ewolucję bakterii. Bytują we wszystkich środowiskach, w których obecne są bakterie (17). Ostatnio opisano także archeofagi, tj. fagi specyficzne dla *Archaea* (27).

Taksonomia bakteriofagów opiera się na ich morfologii i rodzaju materiału genetycznego. Wyróżnia się 13 rodzin, przy czym większość należy do trzech z nich: *Siphoviridae*, *Myoviridae* i *Podoviridae*, zawierających łącznie 15 rodzajów. Wszystkie one posiadają w kapsydzie podwójną nić DNA. Pozostałe 10 rodzin skupiają nieliczne gatunki (11, 23).

Infekcja fagowa

W zależności od losów faga i infekowanej komórki podzielono bakteriofagi na dwie zasadnicze grupy: lityczne i lizogeniczne. Te pierwsze po zainfekowaniu bakterii zapobiegają jej podziałowi i „zmuszają” do syntezy fagowego kwasu nukleinowego i białek, a następnie formowania wirusowych cząstek. W końcowym etapie tego cyklu następuje synteza enzymów litycznych, które degradują ścianę komórkową bakterii, powodując uwolnienie się do środowiska nowych fagów. W cyklu lizogenicznym, po wnikięciu fagowego materiału genetycznego do komórki bakteryjnej następuje synteza integraz i represora transkrypcji wirusowego DNA oraz jego insercja do genomu bakterii. Zintegrowany fagowy DNA (profag) jest następnie replikowany jako część bakteryjnego DNA (11). Stan lizogenii

jest rodzajem specyficznej symbiozy, w której komórka gospodarza chroniona jest przed ponownym zakażeniem takim samym rodzajem faga, zabezpieczając zarazem możliwość powielania fagowego DNA. Wyróżnia się także trzecią grupę tzw. fagów filamentarnych, które po namnożeniu uwalniane są z komórki gospodarza bez powodowania jej lizy (23).

Receptory fagowe i oporność na infekcje

Receptorami fagowymi mogą być otoczki bakteryjne, lipopolisacharydy (LPS), rzęski, fimbrie i różne inne białka powierzchniowe bakterii. Fagi mogą także dla osiągnięcia receptorów na powierzchni ściany komórkowej wykorzystywać enzymy (hydrolazy) w celu depolimeryzacji otoczki bakterii, której utrata uwrażliwia bakterię na działanie układu immunologicznego gospodarza (21). Poprzez utratę receptora fagowego komórka staje się oporna na faga, co często wiąże się z redukcją innych cech życiowych i spadkiem wirulencji (15). Oporność bakterii na infekcję fagową może być także następstwem lizogenii lub horyzontalnego nabycia systemu restrykcyjno-modyfikującego powodującego degradację fagowego kwasu nukleinowego, lub mutacji genów istotnych dla replikacji czy powstawania nowych cząstek fagowych (27).

Diagnostyka i terapia

Powiązane swoiście poprzez swoją aktywność z określonym gatunkiem czy nawet szczepem bakteryjnym są potencjalnie precyzyjnym narzędziem diagnostycznym i terapeutycznym. Wysoka swoistość działania bakteriofagów pozwoliła na wykorzystanie ich zarówno do różnicowania szczepów bakteryjnych w obrębie tego samego gatunku, jak i do określenia przynależności

gatunkowej tych mikroorganizmów. Opisano wiele zestawów fagów typujących (typing phages), które pozwalają na różnicowanie bakterii na podstawie ich wzoru fagowego i stopnia lizy (13). Typowanie gronkowców zostało opisane w latach 40. dwudziestego wieku i przez wiele lat było z powodzeniem stosowane (międzynarodowy zestaw 23 bakteriofagów), co pozwoliło także na kontrolowanie rozprzestrzeniania się szczepów MRSA (Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*) (19).

W systemach detekcji bakterii zastosowanie znalazły także fagi rekombinowane, szczególnie znakowane kasetami tzw. genów reporterowych np. lucyferazy *Vibrio harvei* lub kodujących białka zielonej fluorescencji meduzy *Aequorea victoria*. Ekspresja tych genów w zainfekowanych komórkach bakteryjnych daje światło widzialne i możliwość jego pomiaru z dużą czułością (13). Znalazło to zastosowanie w detekcji *E. coli* 0157 oraz bakterii z rodzajów *Listeria*, *Salmonella* i *Mycobacterium* (13). Wprowadzenie do genomu bakteriofaga określonej sekwencji DNA prowadzi do ekspresji kodowanego przez nią białka na jego powierzchni (4). Jest to metoda phage display, zapoczątkowana eksperymentami Georga P. Smitha (28) z wykorzystaniem fagów nitkowatych (filamentarnych) *E. coli* do produkcji antygenów. Dzięki swojej prostocie i łatwości modyfikacji metoda phage display jest stosowana nie tylko w biologii molekularnej i biochemii. Technika ta znalazła zastosowanie w identyfikacji epitopów wiążących przeciwciała, poszukiwaniu ligandów, identyfikacji nowych receptorów znanych ligandów oraz w poszukiwaniu nowych leków, szczepionek przeciwnowotworowych i przeciwbakteryjnych (13). Rekombinowane fagi filamentarne mogą być stosowane do wprowadzania do bakterii substancji bakteriobójczych np. endonukleaz restrykcyjnych. W takim przypadku wiriony nie prowadzą do lizy komórek, działają zaś jako transportery DNA kodującego te bakteriobójcze substancje (34).

Metoda phage display ma coraz większe zastosowanie w onkologii, gdyż pozwala na otrzymanie rekombinowanych przeciwciał o działaniu przeciwnowotworowym; uzyskane dzięki tej metodzie peptydy wiążące się do komórek nowotworowych lub komórek śródbłonka, mogą same powodować działanie przeciwnowotworowe lub dostarczać do guza inne środki terapeutyczne (4). Metodą phage display można blokować angiogenezę nowotworową lub znamienne zmniejszać liczbę przerzutów, wykorzystując m.in. peptydomimetyki węglowodanów biorących udział w ich powstawaniu (4).

Fagi są także proponowane jako potencjalne wektory w terapii genowej. Ponieważ ich kapsydy zabezpieczają DNA przed degradacją po iniekcji, a umieszczone na powierzchni metodą phage display odpowiednie molekuly pozwalają na dotarcie do komórek docelowych, zakładać można dużą efektywność takiego postępowania (7).

Odkrycie fagów nasunęło przede wszystkim myśl ich wykorzystania jako naturalnych czynników antybakte-

ryjnych i stąd liczne próby ich stosowania jako leku w zakażeniach bakteryjnych ludzi i zwierząt, ale także w ochronie roślin i jako środków antybakteryjnych przy produkcji żywności czy do dezynfekcji np. szpitali (12). Z uwagi na dramatyczny wzrost ilości szczepów bakterii opornych na stosowane powszechnie antybiotyki, fagi lityczne skupiają na sobie ostatnio coraz większą uwagę badaczy (8, 10, 23, 33). Odkrycie i wprowadzenie do praktyki antybiotyków (1940 r.) zahamowało na długie lata zarówno prace badawcze, jak i kliniczne w tej dziedzinie (szczególnie w krajach Europy Zachodniej i Ameryki Północnej) i dopiero wzrastająca liczba bakteryjnych szczepów opornych na stosowane antybiotyki spowodowała powtórne zainteresowanie się fagoterapią. Badania dotyczące możliwości stosowania bakteriofagów w terapii prowadzone były głównie w byłym Związku Radzieckim oraz w Polsce. Niektóre ośrodki naukowe w tych krajach (Wrocław, Tbilisi, Odessa) mają w tej dziedzinie duże doświadczenie.

Badania dotyczyły fagów aktywnych litycznie w stosunku do wielu patogenów, szczególnie jednak w stosunku do gatunków z narastającą gwałtownie liczbą szczepów antybiotykoopornych i sprawiających przez to poważne kłopoty terapeutyczne. Nie bez znaczenia jest fakt aktywności litycznej w stosunku do MRSA, VRE (oporne na wankomycynę enterokoki), wieloopornych szczepów *Pseudomonas aeruginosa* czy *Escherichia coli* wytwarzających β -laktamazy o rozszerzonym spektrum substratowym (ESBL) (2, 17, 31, 32). Wyizolowano wiele fagów lizujących bakterie występujące w zakażeniach ropnych (rany, komplikacje dermatologiczne), ale także w zapaleniach dróg moczowych czy oddechowych. Opracowano nawet mieszanki fagów, zwane pyofagami, litycznych w stosunku do *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus* spp., *Pseudomonas aeruginosa*, *Proteus* spp. i *E. coli* (14). W zakażeniach pokarmowych stosuje się mieszanki fagowe zwane intestifagami, składające się z bakteriofagów litycznych w stosunku do *Shigella* spp., *Salmonella* (*paratyphi* A i B, *typhimurium*, *enteritidis*, *cholerasuis*, *oraneiburg*), *Proteus* (*vulgaris*, *mirabilis*), *Staphylococcus* spp., *Pseudomonas* spp. oraz różnych serotypów enteropatogennych *E. coli*.

Szczególnie zakażenia gronkowcowe były przedmiotem badań i klinicznego stosowania fagoterapii. W Instytucie Bakteriofagowym w Tbilisi przeciwgronkowcowe preparaty fagowe osiągały aktywność lityczną w stosunku do 91,1% szczepów (95,4% wrażliwych szczepów *S. aureus* i 83,2% koagulazo-ujemnych gronkowców), a w przypadku dzieci wrażliwość izolowanych od nich szczepów *S. aureus* sięgała 98%. Doświadczenia kliniczne z użyciem fagów w przypadku seps gronkowcowych wyraźnie wskazują na wysoką efektywność takiego sposobu leczenia, z wyraźną wskazówką do stosowania kojarzenia fag-antybiotyków (14). Szczególnie szeroko rozpowszechniona wielooporność szczepów *S. aureus*, w tym MRSA (oporne na działanie metycyliny), skłaniają do poszukiwania alternatywnych

w stosunku do antybiotyków sposobów leczenia zakażeń tymi bakteriami (6, 17, 20). W badaniach eksperymentalnych na modelu myszy, przy dożylnym podaniu 10^8 jtk *S. aureus* i jednoczesnym podaniu 10^9 pfu aktywnego faga, 97% zwierząt wyzdrowiało (śmiertelność w grupie kontrolnej wynosiła 100%). Myszy zakażone małą dawką tego patogenu 5×10^6 jtk, którym po 10 dniach podawano 10^9 pfu aktywnego faga, nie wykazywały obecności *S. aureus* w narządach (śledziona, nerki, serce) pobieranych 20 dni po zakażeniu, podczas gdy w grupie kontrolnej narządy te były w 100% zainfekowane (6).

Równie wysoką efektywność fagoterapii uzyskano w przypadku zakażenia myszy wankomycynoopornymi *Enterococcus faecies* (VRE). Pojedyncza dootrzewnowa iniekcja 3×10^8 pfu aktywnego faga w 45 min. po podaniu 10^9 jtk VRE była wystarczająca do uzdrowienia 100% badanych myszy. Nawet jeżeli faga podawano z opóźnieniem, w stanie bliskim śmierci, ok. 50% myszy także powracało do zdrowia (2).

Ostatnio zwraca się uwagę na możliwość zastosowania fagoterapii w zapaleniach układu moczowego. Wstępne badania kliniczne u chorych z zakażeniami *E. coli*, *Pseudomonas*, *Klebsiella*, *Enterobacter* i *S. aureus* wskazują na dużą efektywność leczenia fagami podawanymi doustnie (10).

Szeroko rozprzestrzeniające się zakażenia wieloopornymi szczepami *Pseudomonas aeruginosa* skłoniły do przeprowadzenia badań przedklinicznych z użyciem preparatów fagowych (mieszanki wirulentnych klonów bakteriofagów). Wykazano aktywność takich mieszanek *in vitro* w stosunku do 99,5% szczepów na 206 przebadanych, a skuteczność terapeutyczna w badaniach na białych myszach wahała się w granicach 80-100% i była wyższa od skuteczności stosowania ciprofloksacyny (50-80%). Połączenie stosowania antybiotyku i fagów dawało 100% skuteczność terapeutyczną (9).

Posocznica wywoływana przez *Pseudomonas aeruginosa* u myszy była skutecznie leczona (100% efektywności) litycznymi, wyizolowanymi ze ścieków bakteriofagami, przy podaniu ich 45 min. po zakażeniu bakteriami. Opóźnione podanie fagów w pojedynczej iniekcji w stanie klinicznym bliskim śmierci zwierząt, leczyło ok. 50% ich populacji (30). Również stosowanie fagów u myszy z ranami oparzeniowymi i zakażonych dodatkowo podskórnie *Pseudomonas aeruginosa* przyniosło dobre efekty lecznicze, zależne w dużej mierze od drogi podania faga. Podanie dootrzewnowe (jednorazowe) okazało się najbardziej efektywne (87%) przy zakażeniu uogólnionym. Podanie domięśniowe i podskórne dało w rezultacie skromniejsze efekty (28% i 22%). Należy nadmienić, że schorzenie w tym doświadczeniu miało przebieg ostry, co zdarza się rzadko w zakażeniach ran w warunkach naturalnych (18).

Podjęmowano również próby wyeliminowania lub ograniczenia przy pomocy fagów nosicielstwa bakterii patogennych przez zwierzęta gospodarskie. Ma to

ogromne znaczenie w higienie żywności zwierzęcego pochodzenia. W przypadku nosicielstwa enterokrowotocznych *Escherichia coli* wyniki nie były jednoznaczne (22, 25, 26). W jednym przypadku (29) autorzy nie dopatryli się wpływu zastosowania bakteriofagów na nosicielstwo *E. coli* O157:H7 u owiec, a w innym ich stosowanie powodowało redukcję nosicielstwa o dwa rzędy wielkości (25).

Kurczęta zakażane szczepem otoczkowym K1 *E. coli* i traktowane następnie litycznymi bakteriofagami były zabezpieczane przed rozwojem posocznicy i zapaleniem mózgu czy opon mózgowych, natomiast pozbawione siary cielęta podobnie chronione były przed kolibakteriozą (1). Badano również możliwość redukcji stopnia kolonizacji kurcząt – broilerów przez *Campylobacter jejuni*, stosując doustnie bakteriofagi w różnych dawkach i w różnym czasie po eksperymentalnym zakażeniu zwierząt. Podawanie fagów zmniejszało liczbę bakterii w jelitach ślepych od 0,5 do 5 \log_{10} i zależało to głównie od rodzaju bakteriofagów, ale także od ich ilości i czasu podania (16).

Fagi jako terapeutyk posiadają wiele zalet. Działają one tylko na wybrane patogenne bakterie, nie naruszając normalnej mikroflory np. przewodu pokarmowego, a mechanizm ich działania jest różny od mechanizmu działania znanych antybiotyków. Są zatem efektywne w stosunku do wieloopornych bakterii. Mutacje w kierunku antybiotykooporności nie powodują oporności na fagi (i *vice versa*) (24). Fagi, w odróżnieniu od antybiotyków, namnażają się we wrażliwych komórkach bakteryjnych, niszcząc je i atakując następne. Fenomen wykładniczego narastania liczby cząstek fagowych stanowi m.in. o przewadze terapeutycznej nad chemioterapeutykami. W dotychczasowych doświadczeniach klinicznych nie zauważono poważnych objawów ubocznych czy reakcji alergicznych po stosowaniu fagoterapii, chociaż u 23% pacjentów poddanych leczeniu fagami stwierdzano skierowane przeciwko nim przeciwciała (12). Produkcja bakteriofagów jest tania i stosunkowo łatwa (11). Współczesne środowiska medyczne i weterynaryjne są w pełni świadome, że znakomita większość bakterii żyjących w organizmach ludzi i zwierząt to mikroorganizmy ze wszech miar pożyteczne i nieszkodliwe. Są one, niestety, niszczone przez antybiotyki, a pozbawione ich organizmy eksponowane na kolonizację przez bakterie potencjalnie chorobotwórcze. Stąd też właściwość selektywnego niszczenia wybranych patogenów przez bakteriofagi, to ich niewątpliwa, terapeutyczna przewaga nad antybiotykami (12).

Istnieje jednak sporo zastrzeżeń odnośnie do bezpieczeństwa fagoterapii i zarazem warunków, jakim muszą odpowiadać stosowane w tym celu fagi. Podstawowym warunkiem jest brak lizogeniczności faga oraz brak w jego genomie genów kodujących cechy antybiotykooporności czy toksynogenezy. W przypadku posiadania takich cech mogłyby wyposażać one np. stosunkowo niegroźne bakterie w dodatkowe markery chorobotwórczości. Wąskie spektrum aktywności bak-

teriofagów, mimo że jest to niewątpliwa korzyść terapeutyczna, może być także problemem. Konieczna jest szybka i dokładna identyfikacja patogenu, szczególnie w aspekcie jego fagowrażliwości. Alternatywne mieszanki fagów, działające na wiele gatunków bakterii, bywają rozwiązaniem efektywnym, chociaż częściowo pozbawiającym tę terapię korzyści z pierwotnego założenia (5).

Bakteriofagi są z organizmu dość szybko usuwane i często efektywność ich stosowania jest mniejsza od spodziewanej. Częściowe rozwiązanie tego problemu stanowi tzw. seryjne pasażowanie zmierzające do wyizolowania klonów długo utrzymujących się i posiadających znacznie wyższą aktywność niż ich dzikie odpowiedniki (24). Lizaty fagowe zawierają różne komponenty bakterii, w tym endotoksyny, stąd wpływa konieczność pozbycia się lub znacznego obniżenia ilości tych elementów (15). Trudno założyć, że bakteriofagi podane *in vivo* są w stanie zlizować wszystkie komórki wrażliwego szczepu patogenego bytujące w organizmie. Niektórzy autorzy sugerują, że celem terapii fagowej jest takie obniżenie liczby komórek patogenu, przy której siły obronne organizmu doprowadzą do całkowitego wyleczenia (15).

Istnieją także próby zastosowania bakteriofagów w higienie żywności. W 2006 roku FDA (Amerykańska Agencja ds. Żywności i Leków) dopuściła do stosowania pierwszy preparat zawierający sześć różnych bakteriofagów aktywnych litycznie w stosunku do *Listeria monocytogenes* jako dodatek do żywności (3).

Jeżeli bakteriofagi, jako wirusy niosące informację genetyczną, budzą pewne obawy niektórych środowisk w kwestii stosowania ich jako leku, to obaw takich pozbawione są perspektywy zastosowania w terapii enzymów fagowych odpowiedzialnych za lizę komórek bakteryjnych (lizyny bakteriofagowe) i destrukcję otoczek bakteryjnych (depolimerazy) (12).

Zainteresowanie środowisk naukowych oraz firm farmaceutycznych bakteriofagami i enzymami fagowymi, gwałtownie wzrasta. Może to świadczyć, że nieco zapomniane, znów wracają na scenę.

Piśmiennictwo

- Barrow O., Lovell M., Berchieri A. jr.: Use of Lytic Bacteriophage for Control of Experimental *Escherichia coli* Septicemia and Meningitis in Chicken and Calves. *Clin. Diagn. Lab. Immunol.* 1998, 5, 294.
- Biswas B., Adhya S., Washart P., Paul B., Trostel A. N., Powell 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.
- Borysowski J., Górski A.: Is phage therapy acceptable in the immunocompromised host?. *Int. J. Infect. Dis.* 2008, 12, 466-471.
- Borysowski J., Górski A.: Zastosowanie metody phage display w eksperymentalnej terapii onkologicznej. *Postepy Hig. Med. Dośw.* 2004, 58, 100-107.
- Cairns B. J., Payne R. J. H.: Bacteriophage Therapy and the Mutant Selection Window. *Antimicrob. Agents Chemother.* 2008, 52, 4344-4350.
- Capparelli R., Parlato M., Borriello G., Salvatore P., Iannelli D.: Experimental Phage Therapy against *Staphylococcus aureus* in Mice. *Antimicrob. Agents Chemother.* 2007, 51, 2765-2773.
- Clark J. R., March J. B.: Bacteriophages and biotechnology: vaccines, gene therapy and antibacterials. *Trends Biotechnology.* 2006, 24, 212-218.
- Dąbrowska K., Świtata-Jeleń K., Weber-Dąbrowska B., Górski A.: Bacteriophage penetration in vertebrates. *J. Appl. Microbiol.* 2005, 98, 7-13.
- Dzuliashvili M., Gabitashvili K., Golidjashvili A., Hoyle N., Gachechiladze K.: Study of therapeutic potential of the experimental pseudomonas bacteriophage preparation. *Georgian Med. News.* 2007, 147, 81-88.
- Górski A., Weber-Dąbrowska B., Międzybrodzki R., Fortuna W., Hanecki R.: Perspektywy terapii fagowej w urologii. *Przegl. Urol.* 2004, 4/5, 8-10.
- Hanlon G. W.: Bacteriophages: an appraisal of their role in the treatment of bacterial infections. *Int. J. Antimicrobial Agents.* 2007, 30, 118-128.
- Hermoso J. A., Garcia J. L., Garcia P.: Taking aim on bacterial pathogens: from phage therapy to enzybiotics. *Curr. Op. Microbiol.* 2007, 10, 1-12.
- Kropinski A. M.: Phage therapy – Everything old is new again. *Can. J. Infect. Dis. Med. Microbiol.* 2006, 17, 297-306.
- Kutateladze M., Adamia R.: Phage therapy experience at the Eliava Institute. *Med. Maladies Infect.* 2008, 38, 426-430.
- Levin B. R., Bull J. J.: Population and evolutionary dynamics of phage therapy. *Nat. Rev. Microbiol.* 2004, 2, 166-173.
- Loc Carrillo C., Atterbury R. J., El-Shibiny A., Connerton P. L., Dillon E., Scott A., Connerton I. F.: Bacteriophage Therapy To Reduce *Campylobacter jejuni* Colonization of Broiler Chickens. *Appl. Environ. Microbiol.* 2005, 71, 6554-6563.
- Matsuzaki S., Yasuda M., Nishikawa H., Kuroda M., Ujihara T., Shuin T., Shen Y., Jin Z., Fujimoto S., Nasimuzzaman M. D., Wakiguchi H., Shige-yoshi S., Sugiura T., Koda S., Muraoka A., Imai S.: Experimental protection of mice against lethal *Staphylococcus aureus* infection by novel bacteriophage FMR11. *J. Inf. Dis.* 2003, 187, 613-624.
- McVay C. S., Velásquez M., Fralick J. A.: Phage Therapy of *Pseudomonas aeruginosa* Infection in a Mouse Burn Wound Model. *Antimicrob. Agents Chemother.* 2007, 51, 1934-1938.
- Międzybrodzki J., Malachowa N., Markiewski T., Bialecka A., Kasprovicz A.: Różnicowanie izolatów *Staphylococcus aureus* w oparciu o cechy fenotypowe. *Post. Hig. Med. Dośw.* 2008, 62, 322-327.
- Międzybrodzki R., Fortuna W., Weber-Dąbrowska B., Górski A.: Phage therapy of staphylococcal infections (including MRSA) may be less expensive than antibiotic treatment. *Post. Hig. Med. Dośw.* 2007, 61, 461-465.
- Mushtaq N., Redpath M. B., Luzio J. P., Taylor P. W.: Treatment of experimental *Escherichia coli* infection with recombinant bacteriophage-derived capsule depolymerase. *J. Antimicrob. Chemother.* 2005, 56, 160-165.
- O'Flynn G., Ross R. P., Fitzgerald G. F., Coffey A.: Evaluation of a Cocktail of Three Bacteriophages for Biocontrol of *Escherichia coli* O157:H7. *Appl. Environ. Microbiol.* 2004, 70, 3417-3424.
- Parisen A., Allain B., Zhang J., Mandeville R., Lan C. Q.: Novel alternatives to antibiotics: bacteriophages, bacterial cell wall hydrolases, and antimicrobial peptides. *J. Appl. Microbiol.* 2008, 104, 1-13.
- Pirisi A.: Phage therapy – advantages over antibiotics? *Lancet* 2000, 356, 1418.
- Raya R. R., Varey P., Oot R. A., Dyen M. R., Callaway T. R., Edrington T. S., Kutter E. M., Brabban A. D.: Isolation and characterization of a new T-even bacteriophage, CEV1, and determination of its potential to reduce *Escherichia coli* O157:H7 levels in sheep. *Appl. Environ. Microbiol.* 2006, 72, 6405-6410.
- Sheng H., Knecht H. J., Kudva I. T., Hovde C. J.: Application of bacteriophages to control intestinal *Escherichia coli* O157:H7 levels in ruminants. *Appl. Environ. Microbiol.* 2006, 72, 5359-5366.
- Skurnik M., Strauch E.: Phage therapy: Facts and fiction. *Int. J. Med. Microbiol.* 2006, 296, 5-14.
- Smith G. P., Petrenko V. A.: Phage display. *Chem. Rev.* 1997, 97, 391-410.
- Vaca S., Arce J., Oliver G., Arenas D., Arguello F.: FIZ15 bacteriophage increases the adhesion of *Pseudomonas aeruginosa* to human buccal epithelial cells. *Rev. Lat. Am. Microbiol.* 1989, 31, 1-5.
- Vinodkumar C. S., Kalsurmath S., Neelagund Y. F.: Utility of lytic bacteriophage in the treatment of multidrug-resistant *Pseudomonas aeruginosa* septicemia in mice. *Indian J. Path. Microbiol.* 2008, 51, 360-366.
- Wang J., Hu B., Xu M., Yan Q., Liu S., Zhu X., Sun Z., Reed E., Ding L., Gong J., Li Q. Q., Hu J.: Use of bacteriophage in the treatment of experimental animal bacteremia from imipenem-resistant *Pseudomonas aeruginosa*. *Int. J. Mol. Med.* 2006, 17, 309-317.
- Wang J., Hu B., Xu M., Yan Q., Liu S., Zhu X., Sun Z., Tao D., Ding L., Reed E., Gong J., Li Q. Q., Hu J.: Therapeutic effectiveness of bacteriophages in the rescue of mice with extended spectrum beta-lactamase-producing *Escherichia coli* bacteremia. *Int. J. Mol. Med.* 2006, 17, 347-355.
- Weber-Dąbrowska B., Górski A., Zimecki M., Lusiak-Szelachowska M., Grzęda M., Lis M., Międzybrodzki R., Fortuna W., Dubiel A., Świtata-Jeleń K., Boratyński J.: Potencjalne możliwości wykorzystania bakteriofagów w leczeniu zakażeń bakteryjnych zwierząt. *Medycyna Wet.* 2006, 62, 1219-1221.
- Westwater C., Kasman L. M., Schofield D. A., Werner P. A., Dolan J. W., Schmidt M. G., Norris J. S.: Use of genetically engineered phage to deliver antimicrobial agents to bacteria: an alternative therapy for treatment of bacterial infections. *Antimicrob. Agents Chemother.* 2003, 47, 1301-1307.