

Nové perspektivy fágové terapie

New perspectives of the phage therapy

L. Eyer, R. Pantůček, V. Růžicková, J. Doškař

Oddělení genetiky a molekulární biologie, Ústav experimentální biologie,
Přírodovědecká fakulta, Masarykova univerzita, Kotlářská 2, 611 37 Brno

Typ sdělení: přehledový článek

Korespondující autor:

Jiří Doškař

Oddělení genetiky a molekulární biologie, Ústav experimentální biologie,
Přírodovědecká fakulta, Masarykova univerzita, Kotlářská 2, 611 37 Brno

e-mail: doskar@sci.muni.cz

tel.: + 420 549 493 557

fax.: +420 549 492 570

Celá jména autorů:

Mgr. Luděk Eyer,

doc. RNDr. Roman Pantůček, Ph.D.,

doc. RNDr. Vladislava Růžicková, CSc.,

prof. RNDr. Jiří Doškař, CSc.

Hlavní autor:

Luděk Eyer

tel: +420 549 492 577

fax: +420 549 492 570

e-mail: EyerL@seznam.cz

rodné číslo: 791214/4471

bankovní spojení: 0-1843936063/0800 Česká spořitelna, a.s.

Potvrzuji, že zasláný text je určen pro otištění v časopise *Klinická mikrobiologie a infekční lékařství* a nebyl ani nebude jinde publikován.

Klíčová slova: fágová terapie, bakteriofág, bakteriální infekce, antimikrobiální agens
Keywords: phage therapy, bacteriophage, bacterial infection, antimicrobial agens

Souhrn

Problém zvyšujícího se množství bakteriálních kmenů rezistentních na antibiotika může být řešen zavedením racionální fágové terapie. Bakteriofágy byly již v minulosti hojně užívány k léčbě a prevenci infekcí a ve srovnání s antibiotikovou terapií nevedla jejich aplikace ve většině případů k závažným vedlejším účinkům. Zatímco dříve byly pro fágovou terapii využívány preparáty obsahující celé fágové částice, v současnosti otevírá nové možnosti v boji proti obtížně léčitelným infekcím izolace dobře charakterizovaných purifikovaných fágových komponent s antimikrobiálními vlastnostmi. Dnes je fágová terapie rozvíjena zejména u infekcí vyvolaných bakteriálními rody *Staphylococcus*, *Streptococcus*, *Pseudomonas*, *Proteus*, *Klebsiella*, *Shigella*, *Salmonella*, *Escherichia*, *Enterococcus* a *Listeria*. Vedle humánní a veterinární medicíny nacházejí principy fágové terapie uplatnění také v zemědělství a potravinářství.

Summary

The problem of increasing number of antibiotic-resistant bacterial strains can be solved by introduction of the racional phage therapy. In the past, bacteriophages were used for disease treatment and prevention often, and phage application caused mostly no serious side effects in comparison with the antibiotic therapy. In the former times, several preparations containing whole phage particles were used for the phage therapy. Presently, the isolation of well characterised and purified phage components as antibacterials opens up new opportunities in the fight against intractable infections, caused especially by the bacterial genera *Staphylococcus*, *Streptococcus*, *Pseudomonas*, *Proteus*, *Klebsiella*, *Shigella*, *Salmonella*, *Escherichia*, *Enterococcus* and *Listeria*. In addition to the human and veterinary medicine, the phage therapy principles find use also in the agriculture and food industry.

Úvod

Fágovou terapií rozumíme použití bakteriofágů (fágů) k léčbě bakteriálních infekcí. V dnešní době se stále častěji setkáváme s kmeny patogenních bakterií rezistentních na širokou škálu antibiotik. Jelikož je značně obtížné získávat nová účinná antibiotika, prochází fágová terapie svou renesancí. Bezpečné využití bakteriofágů jako alternativního antimikrobiálního agens musí být dnes postaveno na přísně racionálních základech podložených studiemi biologických vlastností fágů, především možných interakcí fágových virionů a proteinů kódovaných fágy s buňkami makroorganismu, a dále

detailními informacemi o fágových genomech a proteomech. Je třeba vyloučit nežádoucí imunogenní vliv fágových proteinů i možný přenos genů pro bakteriální toxiny a faktory virulence. Stále častěji se setkáváme s tendencemi nevyužívat pro fágovou terapii kompletní fágové částice, jejichž schopnost přežívat v prostředí makroorganismu je omezená, nýbrž pouze jejich purifikované složky, jako jsou lytické enzymy nebo proteiny inhibující bakteriální metabolismus. Fágy nacházejí uplatnění rovněž při konzervaci a uchovávání potravin, testování jejich případné kontaminace patogeny a při výrobě krmiv pro hospodářská zvířata [1,2].

Počátky fágové terapie

Myšlenka využít bakteriofágy jako přirozené bakteriální parazity k léčbě infekcí se zrodila již na počátku 20. století, krátce po jejich objevu. Avšak pro nejednoznačnost dosažených výsledků, omezené znalosti biologie fágů a jejich interakcí s hostitelskou buňkou a později kvůli objevu antibiotik se od výzkumů fágové terapie na Západě postupně upustilo. Veškeré klinické studie pak probíhaly převážně ve východní Evropě – v bývalém Sovětském svazu, Polsku a Československu [3]. V těchto zemích bylo používání fágových preparátů poměrně rozšířené a většina poznatků o jejich aplikaci, možnostech využití, výhodách a rizicích vycházela převážně z empirických zkušeností.

Bakteriofágy byly poprvé použity k terapeutickým účelům v Paříži v roce 1919 F. d'Herellem. U pacientů s dyzentérií docházelo k postupnému mizení příznaků a k celkovému zlepšování zdravotního stavu [4].

V roce 1923 byl v gruzínském Tbilisi bakteriologem G. Eliavou zřízen institut, zaměřený na vývoj preparátů obsahujících terapeutické bakteriofágy, které byly používány proti infekcím vyvolaných rody *Staphylococcus*, *Pseudomonas*, *Proteus* a dalšími enterobakteriemi. Eliavův institut se postupně stal centrem fágové terapie. V 60. letech byly v Gruzii testovány fágové přípravky pro prevenci dyzentérie. Klinické rozbory prokázaly výskyt této choroby 3,8krát vyšší u skupiny lidí, kterým přípravek nebyl podáván ve srovnání se skupinou, která pravidelně dostávala dávky preparátů obsahujících terapeutické fágy. Podobné výsledky byly získány při potlačování stafylokokových infekcí plic, infekcí vyvolaných druhem *Pseudomonas aeruginosa* u pacientů s cystickou fibrózou, neonatálních sepsí, infekcí močových cest a infekcí popálenin [5].

Rozsáhlé výzkumy na poli fágové terapie byly uskutečněny rovněž v Polsku. Roku 1952 byl ve Wroclawi zřízen Hirszfeldův institut imunologie a experimentální terapie, kde se bakteriofágy používaly k prevenci pooperačních infekcí a k léčbě zánětů. Slopek aj. [6]

užívali fagy k potlačení infekcí vyvolaných rody *Staphylococcus*, *Klebsiella* a *Salmonella*, včetně kmenů rezistentních na mnoho druhů antibiotik. Fágové preparáty byly podávány orálně nebo aplikovány přímo do rány či kapány do oka, středního ucha a do nosu. Úspěšnost fágové terapie činila průměrně 92% a byla dokonce ještě vyšší u skupiny pacientů, u nichž byla neúčinná léčba antibiotiky. Bylo též prokázáno, že aplikace fágových přípravků podporuje činnost imunitního systému, především normalizuje hladinu tumor-nekrotizujícího faktoru (TNF) α a interferonu 6.

Během minulých desetiletí probíhal vývoj fágových preparátů také na Biofyzikálním ústavu AV v ČR pod vedením J. Pillicha. Výrobu preparátu, označovaného Stafal, později převzala Sevapharma Praha (www.sevapharma.cz). Stafal je antistafylokokový fágový lyzát pro lokální použití, který obsahuje vysoce účinné virulentní fágové částice se silným a rychlým lytickým a polyvalentním účinkem. Slouží k destrukci stafylokokových buněk v místě probíhající infekce a působí rovněž jako imunomodulátor [7,8].

Studie na zvířecích modelech

Studium terapeutického účinku fágů na zvířecích modelech přineslo hodnotné výsledky především díky cíleně plánovaným experimentům, zahrnujícím inokulaci laboratorního zvířete bakteriálním kmenem a následnou aplikaci fága. Byl sledován rovněž protektivní vliv fága při studiích prevence onemocnění [9].

Intramuskulární aplikace virulentních bakteriofágů skupině myší infikovaných *E. coli* K1 vedla k nižší mortalitě a k rychlé redukci počtu bakteriálních buněk v tkáních. Fágová terapie byla efektivnější než opakovaná aplikace antimikrobiálních látek [10].

Berchieri aj. [11] úspěšně využili bakteriofagy k prevenci salmonelóz u drůbeže. K orální inokulaci ptáků byla použita *Salmonella typhimurium* s následnou aplikací různých fágů izolovaných z odpadních vod. Jen některé bakteriofagy vykazovaly protektivní efekt a k jeho dosažení bylo třeba použít vysoké titry fágů.

Barrow aj. [12] sledovali protektivní vliv fágů vůči infekci vyvolané *E. coli* K1. Při současné aplikaci fága a bakterie byla u kuřat a telat pozorována snížená mortalita. Fagy podané kuřatům dva dny před bakteriální inokulací navozovaly preventivní účinek.

Soothill [13] prováděl podobné studie na myších modelech. K testům byly použity fagy specifické k *Acinetobacter baumannii* nebo *P. aeruginosa*. Bakterie byly aplikovány do popálenin. Bylo pozorováno, že relativně nízké titry fágů *A. baumannii*, nepřesahující

10^2 fágových částic (pfu), mohou působit preventivně, zatímco k ochraně proti infekci *P. aeruginosa* byl vyžadován vyšší titr fágů ($10^7 - 10^8$ pfu).

Strom a Paranjpye [14] studovali terapeutický efekt fágů na myších inokulovaných kmeny *Vibrio vulnificus*, vyvolávajících infekce kůže a septikémii. Injekce fágů současně s bakteriemi vedla k prevenci onemocnění.

Výhody fágové terapie oproti léčbě antibiotiky

Jak ukázaly studie z minulých let, fágová terapie vykazuje v některých případech větší efektivnost v léčbě bakteriálních infekcí než běžná antibiotika [15]. Přednosti fágové terapie lze shrnout do následujících bodů:

1. Bakteriofágy jsou na rozdíl od antibiotik vysoce specifické k cílovému kmeni hostitele a tudíž nejsou nebezpečné pro přirozenou mikroflóru pacienta. Specifita fága však vyžaduje velmi přesnou diagnostiku patogena a stanovení jeho citlivosti k danému fagu. Proto je výhodné používat polyvalentní fágy nebo jejich směsi, které jsou schopné lyzovat většinu patogenních kmenů daného druhu podílejícího se na vzniku infekce [16].
2. Bakteriofágy jsou schopny pomnožit se v místě infekce, proto je možné podat pacientovi malou jednorázovou dávku preparátu. Naproti tomu antibiotika jsou metabolizována a eliminována z organismu a nekonzentrují se v místě infekce, což vyžaduje opakované dávky [10].
3. U bakteriofágových preparátů nebyly – až na několik výjimek - dosud pozorovány závažné vedlejší účinky, s nimiž se v hojné míře setkáváme u antibiotik. Některé studie však uvádějí možnost uvolnění endotoxinů do organismu pacienta v důsledku lyze bakteriálních buněk. S takovým jevem se však lze setkat i v případě užívání antibiotik [2].
4. Případný vznik rezistence na určitého fága je často spjat se ztrátou patogenity příslušného bakteriálního kmene. To je způsobeno tím, že povrchové buněčné komponenty sloužící jako fágové receptory bývají spojené s bakteriální virulencí a jejich mutace vede současně ke ztrátě obou uvedených funkcí. Naproti tomu kmeny rezistentní na antibiotika si uchovávají vlastnosti virulence [17].
5. Vývoj nových antibiotik je zdoluhavý a nákladný. Vyhledání nového terapeutického fága proti rezistentnímu bakteriálnímu kmeni je rychlejší a levnější proces [18].

Interakce bakteriofágů s makroorganismem

Vzhledem k tomu, že bakteriofágy jsou běžně rozšířeny v nejrůznějších typech prostředí, jsou vyšší organismy permanentně vystaveny interakcím s nimi. Bakteriofágy byly vyizolovány z člověka a zvířat (sliny, fekálie, kůže), kde se pomnožují v symbiotických nebo patogenních bakteriích. Jsou běžně přítomny v gastrointestinálním traktu, kde spolu se svými bakteriálními hostiteli tvoří důležitou složku přirozené střevní mikroflóry [19]. Na úspěšné použití bakteriofágů pro terapeutické účely má významný vliv jejich schopnost přežít ve fyziologickém prostředí makroorganismu. Nízké pH uvnitř žaludku může fágy inaktivovat (fágy přežívají při pH 3 – 7). Je proto vhodné před podáním dávky fágového preparátu orální cestou žaludeční kyseliny zneutralizovat [20]. Aktivita bakteriofágů může být negativně ovlivněna specifickými protilátkami i složkami nespecifické imunity, což vede k jejich rychlé eliminaci z organismu. Bakteriofágy mohou též přímo interagovat s eukaryotickými buňkami a dokonce ovlivňovat průběh některých chorob nevyvolaných bakteriemi [19].

Po orální, rektální, intranasální, intravaginální a intrauterinní aplikaci a dále po intraperitoneální injekci byl prokázán průnik bakteriofágů do krevního oběhu. Titr fága v krvi bývá obecně nejvyšší krátce po aplikaci fágového preparátu. Fágy byly pozorovány též v krevních sérech některých zvířat. Tento jev je pravděpodobně výsledkem fyziologické virémie (tzv. fágemie) [21]. Z krevního řečiště pronikají fágy dále do tkání vnitřních orgánů. Titry fágů byly detekovány v plicích, ledvinách, slezině a játrech několik hodin po aplikaci, byly však mnohem nižší než titry fágů v krvi. Nález bakteriofágů v mozku pokusných zvířat svědčí o tom, že fágy jsou schopny překonat hematoencefalickou bariéru. Doba, po kterou fágy perzistují v krvi či tkáních makroorganismu, závisí také na přítomnosti či absenci hostitelských bakterií [22].

Bakteriofágy jsou schopny indukovat humorální imunitu: protilátky neutralizující fágy byly detekovány v séru různých živočišných druhů včetně člověka a též v bovinním kolostru. Schopnost fágů indukovat tvorbu protilátek závisí na četnosti přirozeného kontaktu člověka nebo zvířete s různými fágovými druhy. Kontakt s bakteriofágy může souviset s předchozí infekcí hostitelským kmenem bakterie. Různé typy fágů mohou indukovat tvorbu různých druhů protilátek, neboť obsahují odlišné typy antigenů. Reakce bakteriofága s protilátkou může mít za následek neutralizaci (inaktivaci) fága. Tento jev je závislý na době expozice fága protilátkám a na koncentraci protilátky v séru [23]. Protilátky proti fágům se proto jeví jako faktor komplikující fágovou terapii. Avšak

podávání větších dávek terapeutických fágů může kompenzovat ztráty způsobené inaktivací protilátkami.

Zajímavé jsou zejména interakce bakteriofágů s nádorovými buňkami. Bylo pozorováno, že fágy se mohou akumulovat v nádorové tkáni a inhibovat růst a metastázování tumorů (např. melanomu B16). Byla prokázána jejich schopnost vázat se k povrchu nádorových buněk a zprostředkovávat jejich kontakt s plazmatickou membránou lymfocytů. Interakce fága T4 s eukaryotickými buňkami je umožněna přítomností specifického sekvenčního motivu, který je součástí kapsidového proteinu a který je zároveň ligandem pro buněčné integriny [24].

Fágové lytické enzymy

Jak je uvedeno výše, přežití bakteriofágů v organismu pacienta může být do jisté míry omezeno. Proto se jeví vhodným používat místo celých fágů purifikované fágové proteiny s baktericidním účinkem. Takovými jsou např. fágové lytické enzymy [25]. Ty působí jednak při iniciaci infekce, přičemž vytvářejí v bakteriální buněčné stěně drobné léze, kterými se dovnitř buňky dostává fágový genom. Lytické enzymy tohoto typu se vyskytují jako komponenty fágových částic. Druhá skupina fágových lytických enzymů – endolyziny a spolupůsobící holiny – se uplatňuje na konci reprodukčního cyklu fága, kdy se fágové potomstvo uvolňuje z hostitelské buňky. Tyto enzymy mají za následek rozsáhlou degradaci buněčné stěny. Výhodou lytických enzymů při využití ve fágové terapii je jejich vysoká specifita a fakt, že opakované vystavení bakterií nízkým dávkám enzymu nevede k získání rezistentních kmenů [26].

Příkladem je endolysin fága K, který lyzuje široké spektrum kmenů v rámci rodu *Staphylococcus* izolovaných z lidských a bovinních infekcí, včetně kmenů rezistentních na meticilin (MRSA), vankomycin a teikoplanin [27]. Také u fága P68 byl identifikován muralytický enzym jako složka fágového virionu, který je aktivní proti širokému spektru klinických izolátů *Staphylococcus aureus* [28]. Lytický protein fága ϕ KMV *P. aeruginosa* je vysoce termostabilní lysozym, rezistentní na teploty do 100 °C. Taková termostabilita nebyla dosud u ostatních fágových lysozymů popsána. Pravděpodobně má silnou renaturační schopnost, což může souviset s procesem změny konformace během infekce. Pro tyto svoje vlastnosti je vhodným kandidátem pro využití v technologiích konzervace potravin [29]. Mezi další úspěšně izolované lytické enzymy patří např. lyzin fága Φ 1, který účinně usmrcuje kmeny *Enterococcus faecalis* a *Enterococcus faecium* (včetně kmenů

rezistentních na vankomycin) [30] nebo lyzin fága γ usmrcující vegetativní buňky i spóry *Bacillus anthracis* [31].

Fágové inhibitory bakteriálního růstu

Fágové proteiny, které jsou toxické pro bakteriální buňku, mohou rovněž sloužit jako antimikrobiální agens. Je známo několik fágových proteinů ovlivňujících bakteriální metabolismus. Protein gp2 fága T7 inhibuje transkripci vazbou k RNA-polymeráze *E. coli* [32]. Protein AsiA fága T4 inhibuje transkripční faktor $\sigma 70$, čímž dojde k uvolnění jádra bakteriální RNA-polymerázy, která tak může snadněji interagovat s T4-specifickými σ -faktory [33]. Protein P fága λ a protein B fága P2 se vážou na helikázu *E. coli*, a tím indukují její vazbu k fágovým počátkům replikace [34,35]. Belley aj. [36] charakterizovali baktericidní mechanismus polypeptidů ORF 168 a ORF 240 stafylokokových fágů Twort, resp. G1, které se vážou na posuvnou β -svorku a brání její interakci s DNA-polymerázou a templátovým řetězcem, čímž inhibují replikaci bakteriální DNA.

Bakteriofágy představují rezervoár genetických zdrojů, jejichž funkce dosud nejsou dostatečně prostudovány. U fágů *S. aureus* bylo identifikováno 31 nových polypeptidových rodin, které inhibují růst buněk *S. aureus* během exprese fágových genů uvnitř buňky a jejichž cílovými molekulami jsou esenciální komponenty bakteriálních replikačních a transkripčních mechanismů [1]. Byla studována interakce prototypového páru ORF 104 fága 77 a jeho cílového proteinu DnaI (protein vázající helikázu k řetězci DNA, nezbytný pro tvorbu primozomu během iniciace replikace stafylokokové DNA). Pro terapeutickou aplikaci je vhodné nahradit tyto proteiny syntetickými nízkomolekulárními látkami imitujícími aktivní místo fágových inhibitorů, schopnými – narozdíl od fágových proteinů - snadno pronikat dovnitř bakteriálních buněk. Navržené sloučeniny nejsou signifikantně cytotoxické pro lidské primární hepatocyty a jiné lidské buněčné typy.

Fágová terapie stafylokokových infekcí

Stafylokokové infekce způsobené multirezistentními kmeny jsou příkladem, kde je v současnosti fágová terapie intenzivně rozvíjena. O tom svědčí četné recentní práce:

Matsuzaki aj. [37] studovali protektivní efekt virulentního fága ϕ MR11 u myší, které byly infikovány různými kmeny *S. aureus* včetně kmenů MRSA. Následná intraperitoneální aplikace purifikovaného fága suprimovala letalitu vyvolanou kmeny *S. aureus*. Inokulace vysokou dávkou ϕ MR11 nevede k nežádoucím účinkům a je spjata

s významnou hladinou fága v krevním oběhu, která se udržuje až do eradikace patogenních bakterií.

Pro léčbu nehojících se ran a žilních vředů, které jsou často infikované bakteriálními kmeny rezistentními na běžná antimikrobiální agens, byl na bázi fágové terapie vyvinut nový přípravek „PhagoBioDerm“. Sestává z biodegradovatelného polymeru impregnovaného antibiotiky (ciprofloxacin), analgetiky (benzokain), α -chymotripsinem, bikarbonátem sodným a směsí lytických bakteriofágů („PyoPhage“). Lyofilizovaná fágová směs působí lyticky na bakterie *P. aeruginosa*, *E. coli*, *S. aureus*, *Streptococcus* a *Proteus*. Rány nebo vředy byly úplně vyléčeny u 70% z 96 testovaných pacientů. Ve 22 případech, u nichž byla k dispozici mikrobiologická data, byla léčba spojena s eliminací nebo redukcí patogenních bakterií ve vředu. Výsledky ukazují na bezpečnost použití tohoto biodegradovatelného polymeru při léčbě nehojících se ran [38,39].

Fágy lze využít také jako vhodné nosiče terapeutických látek, např. fotosenzitizérů, které po ozáření světlem vhodné vlnové délky generují reaktivní (singletový) kyslík a volné radikály a vykazují tak antimikrobiální vlastnosti. Aby se zlepšila efektivita léčby těmito látkami a předešlo se poškození hostitelské tkáně, je vhodné fotosenzitizér cíleně distribuovat k buňkám patogena za použití bakteriofágů. Fotosenzitizér tin(IV) chlorin e6 (SnCe6), kovalentně vázán na fága 75, vykazuje schopnost usmrcovat různé kmeny *S. aureus* po následné expozici červeným světlem již při nízké koncentraci konjugátu a nízké dávce záření. Za podmínek *in vitro* nebyla ovlivněna životaschopnost lidských epitelálních buněk. Konjugát vykazoval vyšší bakteriocidní účinek než nekonjugovaný SnCe6. Letální efekt není závislý na růstové fázi bakteriální buňky. Vzhledem k tomu, že všechny stafylofágy využívají stejný typ receptoru, jsou schopny cíleně distribuovat fotosenzitizér i na necitlivé kmeny [40].

Gill aj. [41] studovali vliv mléčných proteinů na inhibici interakce fág-patogen. Cílem této *in vitro* studie bylo posoudit možnost použití fága K pro léčbu bovinních mastitid vyvolaných *S. aureus*. Mléčné proteiny různou měrou inhibovaly fágovou adsorpci. Zahřátím mléka, použitím proteáz a ultrafiltrací inhibiční aktivita mizí. Inhibiční mléčné proteiny pravděpodobně stericky blokují místa fágové adsorpce na buněčném povrchu.

Z široké škály dalších stafylokokových fágů potenciálně použitelných pro účely fágové terapie jmenujme polyvalentního bakteriofága 812. Pro terapeutické využití jsou vhodné zejména mutanty v rozmezí hostitele, z nichž některé jsou schopny lyzovat až o

11% více stafylokokových kmenů než standardní typ fága [42]. Současné analýzy si kladou za cíl důsledně prostudovat genom a proteom fága 812, jeho mutant v rozmezí hostitele a příbuzných fágů a vyloučit riziko výskytu genů a proteinů s nežádoucími vlastnostmi [43,44].

Využití bakteriofágů v zemědělství a potravinářství

Příkladem úspěšného využití principů fágové terapie v oblasti zemědělství a potravinářství a jejich zavedení do praxe, je ochrana proti patogenním bakteriím kontaminujícím rybí maso. Výhodou je možnost aplikace terapeutických fágů ve vodném médiu, kde dochází k těsnějšímu a kontinuálnímu kontaktu fága s hostitelem (bakteriemi na povrchu nebo uvnitř těl ulovených ryb, korýšů a měkkýšů) [45]. V chovech ryb slouží fágy rovněž k prevenci a léčbě chorob vyvolaných bakteriemi *Lactococcus garvieae* a *Pseudomonas plecoglossicida* [46].

Fágy je též možno využívat pro účely dezinfekce a čištění prostor chlévů a farem. V krmivářství se využívají při produkci siláže. Při její výrobě dochází často ke kontaminaci klostridiemi, které zvyšují pH rozkládající se biomasy, čímž tento proces zpomalují. Navíc produkují spektrum nežádoucích metabolitů, které krmivo znehodnocují a z nichž mnohé jsou toxické. Bakteriofágy jsou tu využívány pro likvidaci klostridií ze siláže [47].

Zajímavá je zejména myšlenka aplikace bakteriofágů jako detektorů kontaminace potravin. Specifický transfer a exprese genů bakteriální luciferázy prostřednictvím bakteriofágů může sloužit jako způsob detekce živých hostitelských buněk [48]. Bakteriofág A511 byl použit k vytvoření rekombinantního fága A511::*luxAB* nesoucího gen pro fúzní protein LuxAB *Vibrio harvey* začleněný těsně za gen kódující hlavní kapsidový protein (*cps*). Transkripce tohoto genu je regulována silným *cps*-promotorem a je zahajována 15 – 20 min po iniciaci infekce. Místně specifického začlenění luciferázového genu do genomu fága bylo dosaženo homologní rekombinací v infikovaných buňkách mezi plazmidem nesoucím DNA fága A511 obklopující gen *luxAB* a fágovou DNA. Rekombinanty byly snadno identifikovatelné prostřednictvím bioluminiscentního fenotypu, který rekombinantní fágy udělovaly nově infikovaným buňkám. Výše uvedená metoda dosahuje značné citlivosti a je ji možno použít k rutinní detekci listeriových buněk v potravinách.

Závěr

Pro bezpečné a účinné využití bakteriofágů při léčbě infekcí je v současné době nezbytné směřovat výzkum do oblasti interakcí fága s makroorganismem, možnosti přenosu genů virulence a alergenních proteinů a využití purifikovaných fágových komponent, které jsou ve fyziologických podmínkách stabilnější než nativní fágové částice. Dokonalá znalost biologie nových terapeutických fágů, založená na studiu genomu a proteomu, však nadále zůstává nezbytným předpokladem úspěšnosti moderní bakteriofágové terapie.

Práce byla podpořena granty MŠMT MSM 0021622415 a EU LSHM-CT-2006-019064.

Literatura

1. Liu J, Dehbi M, Moeck G, et al. Antimicrobial drug discovery through bacteriophage genomics. *Nat Biotechnol.* 2004;22(2):185-191.
2. Inal JM. Phage therapy: a reappraisal of bacteriophages as antibiotics. *Arch Immunol Ther Exp (Warsz).* 2003;51(4):237-244.
3. Alisky J, Iczkowski K, Rapoport A, Troitsky N. Bacteriophages show promise as antimicrobial agents. *J Infect.* 1998;36(1):5-15.
4. Summers, WC. Felix d'Herelle and the origins of molecular biology. *New Haven, Conn: Yale University Press;* 1999.
5. Sulakvelidze A, Alavidze Z, Morris JG Jr. Bacteriophage therapy. *Antimicrob Agents Chemother.* 2001;45(3):649-659.
6. Slopek S, Durlakowa I, Weber-Dabrowska B, et al. Results of bacteriophage treatment of suppurative bacterial infections. I. General evaluation of the results. *Arch Immunol Ther Exp.* 1983;31(3):267-291.
7. Pillich J, Výmola F, Buda J. Assumptions for successful therapy using staphylococcal phage lysates. *Zentralbl Bakteriol Orig.* 1969;210(3):377-381.
8. Pillich J, Továrek J, Fait M. Contribution to the treatment of acute haematogenous and chronic secondary osteomyelitis in children. *Z Orthop Ihre Grenzgeb.* 1978;116(1):40-46.
9. Duckworth DH, Gulig PA. Bacteriophages: potential treatment for bacterial infections. *BioDrugs.* 2002;16(1):57-62.
10. Smith HW, Huggins MB. Successful treatment of experimental *Escherichia coli* infections in mice using phage: its general superiority over antibiotics. *J Gen Microbiol.* 1982;128(2):307-318.
11. Berchieri A Jr, Lovell MA, Barrow PA. The activity in the chicken alimentary tract of bacteriophages lytic for *Salmonella typhimurium*. *Res Microbiol.* 1991;142(5):541-549.
12. Barrow P, 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(3):294-298.
13. Soothill JS. Treatment of experimental infections of mice with bacteriophages. *J Med Microbiol.* 1992;37(4):258-261.
14. Strom MS, Paranjpye RN. Epidemiology and pathogenesis of *Vibrio vulnificus*. *Microbes Infect.* 2000;2(2):177-188.

15. Meladze GD, Mebuke MG, Chkhetiia NSh, Kiknadze NIa, Koguashvili GG. Efficacy of staphylococcal bacteriophage in the treatment of purulent lung and pleural diseases. *Grudn Khir.* 1982;(1):53-56.
16. Chernomordik AB. Bacteriophages and their therapeutic-prophylactic use. *Med Sestra.* 1989;48(6):44-47.
17. Barrow PA, Soothill, JS. Bacteriophage therapy and prophylaxis: rediscovery and renewed assessment of potential. *Trends Microbiol.* 1997;5(7):268-271.
18. Silver LL, Bostian KA. Discovery and development of new antibiotics: the problem of antibiotic resistance. *Antimicrob Agents Chemother.* 1993;37(3):377-383.
19. Dabrowska K, Switala-Jelen K, Opolski A, Weber-Dabrowska B, Gorski A. Bacteriophage penetration in vertebrates. *J Appl Microbiol.* 2005;98(1):7-13.
20. Smith HW, Huggins MB, Shaw KM. Factors influencing the survival and multiplication of bacteriophages in calves and in their environment. *J Gen Microbiol.* 1987;133(5):1127-1135.
21. Bogovazova GG, Voroshilova NN, Bondarenko VM. The efficacy of Klebsiella pneumoniae bacteriophage in the therapy of experimental Klebsiella infection. *Zh Mikrobiol Epidemiol Immunobiol.* 1991;4(4):5-8.
22. Barrow P, 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(3):294-298.
23. Carlton RM. Phage therapy: past history and future prospects. *Arch Immunol Ther Exp (Warsz).* 1999;47(5):267-274.
24. Gorski A, Dabrowska K, Switala-Jelen K, et al. New insights into the possible role of bacteriophages in host defense and disease. *Med Immunol.* 2003;2(1):2
25. Fischetti VA, Nelson D, Schuch R. Reinventing phage therapy: are the parts greater than the sum? *Nat Biotechnol.* 2006;24(12):1508-1511.
26. Lehnher H, Hansen AM, Ilyina T. Penetration of the bacterial cell wall: a family of lytic transglycosylases in bacteriophages and conjugative plasmids. *Mol Microbiol.* 1998;30(2):454-457.
27. O'Flaherty S, Coffey A, Meaney W, Fitzgerald GF, Ross RP. The recombinant phage lysin LysK has a broad spectrum of lytic activity against clinically relevant staphylococci, including methicillin-resistant Staphylococcus aureus. *J Bacteriol.* 2005;187(20):7161-7164.
28. Takáč M, Bläsi U. Phage P68 virion-associated protein 17 displays activity against clinical isolates of Staphylococcus aureus. *Antimicrob Agents Chemother.* 2005;49(7):2934-2940.

29. Lavigne R, Briers Y, Hertveldt K, Robben J, Volckaert G. Identification and characterization of a highly thermostable bacteriophage lysozyme. *Cell Mol Life Sci.* 2004;61(21):2753-2759.
30. Yoong P, Schuch R, Nelson D, Fischetti VA. Identification of a broadly active phage lytic enzyme with lethal activity against antibiotic-resistant *Enterococcus faecalis* and *Enterococcus faecium*. *J Bacteriol.* 2004;186(14):4808-4812.
31. Schuch R, Nelson D, Fischetti VA. A bacteriolytic agent that detects and kills *Bacillus anthracis*. *Nature.* 2002;418(6900):884-889.
32. Nechaev S, Severinov K. Inhibition of *Escherichia coli* RNA polymerase by bacteriophage T7 gene 2 protein. *J Mol Biol.* 1999;289(4):815-826.
33. Orsini G, Ouhammouch M, Le Caer JP, Brody EN. The *asiA* gene of bacteriophage T4 codes for the anti-sigma 70 protein. *J Bacteriol.* 1993;175(1):85-93.
34. Mallory JB, Alfano C, McMacken R. Host virus interactions in the initiation of bacteriophage lambda DNA replication. Recruitment of *Escherichia coli* DnaB helicase by lambda P replication protein. *J Biol Chem.* 1990;265(22):13297-13307.
35. Odegrip R, Schoen S, Haggard-Ljungquist E, Park K, Chattoraj DK. The interaction of bacteriophage P2 B protein with *Escherichia coli* DnaB helicase. *J Virol.* 2000;74(9):4057-4063.
36. Belley A, Callejo M, Arhin F, et al. Competition of bacteriophage polypeptides with native replicase proteins for binding to the DNA sliding clamp reveals a novel mechanism for DNA replication arrest in *Staphylococcus aureus*. *Mol Microbiol.* 2006;62(4):1132-1143.
37. Matsuzaki S, Yasuda M, Nishikawa H, et al. Experimental protection of mice against lethal *Staphylococcus aureus* infection by novel bacteriophage phi MR11. *J Infect Dis.* 2003;187(4):613-624.
38. Markoishvili K, Tsitlanadze G, Katsarava R, Morris JG, Sulakvelidze A. A novel sustained-release matrix based on biodegradable poly(ester amide)s and impregnated with bacteriophages and an antibiotic shows promise in management of infected venous stasis ulcers and other poorly healing wounds. *Int J Dermatol.* 2002;41(7):453-458.
39. Jikia D, Chkhaidze N, Imedashvili E, et al. The use of a novel biodegradable preparation capable of the sustained release of bacteriophages and ciprofloxacin, in the complex treatment of multidrug-resistant *Staphylococcus aureus*-infected local radiation injuries caused by exposure to Sr90. *Clin Exp Dermatol.* 2005;30(1):23-26.
40. Embleton ML, Nair SP, Heywood W, et al. Development of a novel targeting system for lethal photosensitization of antibiotic-resistant strains of *Staphylococcus aureus*. *Antimicrob Agents Chemother.* 2005;49(9):3690-3696.

41. Gill JJ, Sabour PM, Leslie KE, Griffiths MW. Bovine whey proteins inhibit the interaction of *Staphylococcus aureus* and bacteriophage K. *J Appl Microbiol.* 2006;101(2):377-386.
42. Pantůček R, Rosypalová A, Doškař J, et al. The polyvalent staphylococcal phage phi 812: its host-range mutants and related phages. *Virology.* 1998 ;246(2):241-252.
43. Eyer L, Pantůček R, Zdráhal Z, et al. Structural protein analysis of the polyvalent staphylococcal bacteriophage 812. *Proteomics.* 2007;7(1):64-72.
44. Kašpárek P, Pantůček R, Kahánková J, et al. Genome rearrangements in host-range mutants of the polyvalent staphylococcal bacteriophage 812. *Folia Microbiol.* 2007; v tisku.
45. Park SC, Shimamura I, Fukunaga M, Mori KI, Nakai T. Isolation of bacteriophages specific to a fish pathogen, *Pseudomonas plecoglossicida*, as a candidate for disease control. *Appl Environ Microbiol.* 2000;66(4):1416-1422.
46. Nakai T, Park SC. Bacteriophage therapy of infectious diseases in aquaculture. *Res Microbiol.* 2002;153(1):13-18.
47. Driehuis F, Oude Elferink SJ. The impact of the quality of silage on animal health and food safety. *Vet Q.* 2000;22(4):212-216.
48. Loessner MJ, Rudolf M, Scherer S. Evaluation of luciferase reporter bacteriophage A511::luxAB for detection of *Listeria monocytogenes* in contaminated foods. *Appl Environ Microbiol.* 1997;63(8):2961-2965.