

Primjena bakteriofaga u liječenju infekcija uzrokovanih višestruko rezistentnim bakterijama

Zagorac, Aleksandar

Undergraduate thesis / Završni rad

2023

Degree Grantor / Ustanova koja je dodijelila akademski / stručni stupanj: **University of Split, Faculty of Science / Sveučilište u Splitu, Prirodoslovno-matematički fakultet**

Permanent link / Trajna poveznica: <https://urn.nsk.hr/urn:nbn:hr:166:016637>

Rights / Prava: [In copyright](#) / [Zaštićeno autorskim pravom.](#)

Download date / Datum preuzimanja: **2024-08-04**

Repository / Repozitorij:

[Repository of Faculty of Science](#)



UNIVERSITY OF SPLIT



DIGITALNI AKADEMSKI ARHIVI I REPOZITORIJ

Sveučilište u Splitu

Prirodoslovno-matematički fakultet

Odjel za biologiju

Aleksandar Zagorac

**PRIMJENA BAKTERIOFAGA U LIJEČENJU
INFEKCIJA UZROKOVANIH VIŠESTRUKO
REZISTENTNIM BAKTERIJAMA**

Završni rad

Split, 2023

TEMELJNA DOKUMENTACIJSKA KARTICA

Sveučilište u Splitu
Prirodoslovno-matematički fakultet
Odjel za biologiju

Završni rad

PRIMJENA BAKTERIOFAGA U LIJEČENJU INFEKCIJA UZROKOVANIH VIŠESTRUKO REZISTENTNIM BAKTERIJAMA

Aleksandar Zagorac

SAŽETAK

Od svog otkrića 1915., bakteriofagi se koriste za liječenje bakterijskih infekcija kod životinja i ljudi zbog njihove jedinstvene sposobnosti da zaraze svoje specifične bakterijske domaćine bez utjecaja na druge bakterijske populacije u tijelu. Istraživanja na ovom području tijekom 20. stoljeća, uglavnom u Gruziji, dijelu SSSR-a i Poljskoj, doveli su do uspostavljanja protokola fagne terapije. Međutim, otkriće penicilina i sulfonamidnih antibiotika u zapadnom svijetu tijekom 1930-ih bilo je korak nazad u razvoju terapije faga. Pretjerana upotreba antibiotika dovela je do povećanja bakterijske rezistencije na antibiotike i globalne prijetnje javnom zdravlju, zbog čega su upravo bakteriofagi, kao alternativa antibioticima, vraćeni u interes znanstvene i stručne javnosti. Nedavna istraživanja su pokazala da se bakteriofagi mogu uspješno koristiti neizravno za otkrivanje patogenih bakterija ili izravno u cilju biokontrole. Istraživanja su također pokazala obećavajuće rezultate u liječenju oportunističkih patogenih bakterija poput *Escherichia coli*, *Proteus* spp. i *Klebsiella pneumoniae* posebno kod infekcija mokraćnog sustava i kontrole stvaranja biofilma. Štoviše, mogu se koristiti za razvoj novih molekula za kliničku primjenu, proizvodnju cjepiva, dizajn novih lijekova te u području nanomedicine.

Ključne riječi: bakteriofag, fag, fagoterapija, *Escherichia coli*, *Proteus* spp., *Klebsiella pneumoniae*

Rad sadrži: 34 stranicu, 3 grafička prikaza, 55 literaturnih navoda. Izvornik je na hrvatskom jeziku.

Mentor: Izv. prof. dr. sc. Ana Maravić, Prirodoslovno-matematički fakultet u Splitu

Ocjenjivači: izv. prof. dr. sc. Ana Maravić, *Prirodoslovno-matematički fakultet u Splitu*
izv. prof. dr. sc. Željana Fredotović, *Prirodoslovno-matematički fakultet u Splitu*
Mia Dželalija, mag. educ. biol. et chem., *Prirodoslovno-matematički fakultet u Splitu*

Rad prihvaćen: 15. rujna, 2023.

BASIC DOCUMENTATION CARD

University of Split
Faculty of Science
Department of Biology

Undergraduate Thesis

USE OF BACTERIOPHAGES IN THE TREATMENT OF INFECTIONS CAUSED BY MULTIPLE RESISTANT BACTERIA

Aleksandar Zagorac

Abstract

Since their discovery in 1915, bacteriophages have been used to treat bacterial infections in animals and humans due to their unique ability to infect specific bacterial hosts without affecting other bacterial populations. Research in this area, mainly in Georgia, part of USSR, and Poland, led to the introduction of phage therapy protocols in the 20th century. However, the discovery of penicillin and sulfonamide antibiotics in the Western world in the 1930s was a step backward in the development of phage therapy. The overuse of antibiotics has led to an increase in bacterial resistance to antibiotics and a global threat to public health, so bacteriophages have returned to the attention of the scientific and professional community as an alternative to antibiotics. Recent research has shown that bacteriophages can be successfully used indirectly to detect pathogenic bacteria or directly for biocontrol. Research has also shown promising results in the treatment of pathogenic bacteria such as *Escherichia coli*, *Proteus* spp. and *Klebsiella pneumoniae*, particularly regarding urinary tract infections and control of biofilm formation. In addition, they can be used for the development of new molecules for clinical use, the production of vaccines, drug design as well as in the field of nanomedicine.

Keywords: bacteriophage, phage, phage therapy, *Escherichia coli*, *Proteus* spp., *Klebsiella pneumoniae*

Work contains: 34 pages, 3 figures, 55 references. Original language: Croatian

Supervisor: Ana Maravić, PhD, Assoc. Prof., *Faculty of Science University of Split*

Reviewers: Ana Maravić, PhD, Assoc. Prof., *Faculty of Science University of Split*
Željana Fredotović, PhD, Assoc. Prof., *Faculty of Science University of Split*
Mia Dželalija, mag. educ. biol. et chem., *Faculty of Science University of Split*

Thesis accepted: September 15, 2023.

Ovaj rad, izrađen u Splitu, pod vodstvom izv. prof. dr. sc. Ane Maravić, predan je na ocjenu Odjelu za biologiju Prirodoslovno-matematičkog fakulteta Sveučilišta u Splitu radi stjecanja zvanja „prvostupnik biologije“.

IZJAVA

kojom izjavljujem s punom materijalnom i moralnom odgovornošću da sam završni rad pod naslovom PRIMJENA BAKTERIOFAGA U LIJEČENJU INFEKCIJA UZROKOVANIH VIŠESTRUKO REZISTENTNIM BAKTERIJAMA izradio samostalno pod voditeljstvom izv. prof. dr. sc. Ane Maravić. U radu sam primjenio metodologiju znanstveno-istraživačkog rada i koristio literaturu koja je navedena na kraju završnog rada. Tuđe spoznaje, stavove, zaključke, teorije i zakonitosti koje sam izravno ili parafrizirajući naveo u završnom radu na uobičajen, standardan način citirao sam i povezao fusnotama s korištenim bibliografskim jedinicama. Rad je pisan u duhu hrvatskog jezika.

Student:

Aleksandar Zagorac

SADRŽAJ

1. UVOD.....	1
2. POVIJESNI PREGLED	2
3. FIZIOLOGIJA BAKTERIOFAGA.....	5
3.1. Prijanjanje i penetracija	6
3.2. Sinteza proteina i nukleinske kiseline	7
3.3. Sastavljanje viriona	7
3.4. Otpuštanje viriona	8
4. DJELOVANJE NA BAKTERIJU <i>Escherichia coli</i>	9
5. DJELOVANJE NA BAKTERIJU <i>Proteus</i> spp.	12
6. DJELOVANJE NA BAKTERIJU <i>Klebsiella pneumoniae</i>	15
7. KORISTI TERAPIJE BAKTERIOFAGIMA.....	17
8. OGRANIČENJA	18
9. ZAKLJUČAK	19
10. LITERATURA	20

POPIS KRATICA:

DNA – deoksiribonukleinska kiselina

RNA – ribonukleinska kiselina

mRNA – glasnička ribonukleinska kiselina

ATP – adenzin trifosfat

IMS – infekcija mokraćnog sustava

UPEC – uropatogena *Escherichia coli*

1. UVOD

Terapija fagom, terapija virusnim fagom ili fagoterapija je terapijska uporaba bakteriofaga za liječenje patogenih bakterijskih infekcija. Ovaj terapijski pristup pojavio se početkom 20. stoljeća, ali je postupno zamijenjen upotrebom antibiotika u većem dijelu svijeta nakon Drugog svjetskog rata.

Iako antibiotski lijekovi imaju veliku važnost u liječenju infektivnih bolesti, njihova prekomjerna upotreba dovela je do pojave i širenja rezistencije na antibiotike što značajno kompromitira uspjeh terapijskog liječenja infekcija, povećavajući stope morbiditeta i mortaliteta te ekonomski trošak. Infekcije uzrokovane mikroorganizmima su po najnovijim zbirnim izvješćima, u 2019. bili drugi najčešći uzročnik smrti na svijetu, odmah iza koronarnih bolesti, uzrokujući smrt 7.7 milijuna ljudi [1]. Otprilike 4.95 milijuna ljudi umrlo je od posljedica infekcija uzrokovanih višestruko rezistentnim bakterijama [2].

Stoga se veliki naponi i financijska sredstva ulažu u znanstvena istraživanja koja bi mogla ponuditi alternativu postojećim antibioticima.

Bakteriofagi, poznati kao fagi, oblik su virusa koji se veže za bakterijske stanice nakon čega ubrizgavaju svoj genom u stanicu. Metodologija se temelji na činjenici da nakon ulaska virusne nukleinske kiseline u stanicu, bakterijska proizvodnja virusnog genoma ometa njenu sposobnost funkcioniranja, zaustavljajući pritom bakterijsku infekciju. Bakterijska stanica se više ne može razmnožavati i umjesto toga proizvodi dodatne fage. Istraživanja su pokazala da su fagi vrlo selektivni prema sojevima bakterija protiv kojih pokazuju učinkovitost. Stoga se fagoterapija trenutno koristi za liječenje infekcija uzrokovanih bakterijama koje ne odgovaraju na konvencionalni tretman antibioticima. Time predstavlja veliki potencijal i moguću revoluciju u mikrobiologiji.

Cilj ovog završnog rada je stoga dati uvid u povijesni razvoj i najnovija saznanja o korištenju bakteriofaga u liječenju infekcija uzrokovanih višestruko rezistentnim bakterijama, s posebnim osvrtom na njihovu učinkovitost protiv nekih od najčešćih patogena današnjice, poput *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae*, i *Proteus* spp.

2. POVIJESNI PREGLED

Zanimljivo opažanje Fredericka W. Tworta 1915. godine obično se smatra početkom današnjeg istraživanja faga. Međutim, tek je kasnije, nakon Felixa d'Herellea, Twortovo izvješće prepoznato kao proučavanje bakteriofaga. Twort je bio učenik Williama Bullocha, poznatog britanskog bakteriologa koji je radio na Brown-ovom Institutu (veterinarskoj bolnici) u Londonu. Dok je pokušavao uzgojiti virus *Vaccinia* na hranjivoj podlozi u nedostatku živih stanica, Twort je primijetio da su izrasle mnoge kolonije mikrokoka, a te je kolonije protumačio kao bakterijsku kontaminaciju. Njegovo zanimljivo zapažanje bilo je da su neke kolonije izgledale sluzavo, vodenasto ili "staklasto". Ova "staklasta transformacija" može se inducirati u drugim kolonijama inokulacijom svježe kolonije s malo materijala iz vodene kolonije. Ova se transformacija može propagirati unedogled. Kad je Twort pregledao staklene kolonije pod mikroskopom, primijetio je da su bakterije degenerirale u male "granule" koje su obojene crveno bojenjem po Giemsi. Twort zaključuje da je sasvim moguće da je uzročnik takvih formacija niže klasifikacije od bakterije ili amebe. Također govori da se ne smiju isključiti mogućnosti žive protoplazme ili enzima sa sposobnošću rasta, a dodatno smatra to akutnom zaraznom bolešću.

Sasvim neovisno, i iz sasvim drugih razloga, Felix d'Herelle (francuski mikrobiolog, radio na institutu „Pasteur“) 917. godine otkrio je mikroorganizam koji je bio "antagonist" bakterijama i koji je rezultirao njihovom lizom u tekućoj kulturi i smrću u diskretnim mrljama, koje je kasnije nazvao plakovima, na površini agara zasijanog bakterijama. D'Herelle je te nevidljive mikroorganizme zamislio kao "ultraviruse" koji napadaju bakterije i razmnožavaju se na njihov račun pa ih je nazvao bakteriofagima [3]. 'Herelle je radio na Institutu Pasteur u Parizu u ratnim uvjetima gdje je pozvan da istraži izbijanje bacilarne dizenterije u skupini francuskih vojnika. Uz svoje kliničke dužnosti, nastavio je svoj istraživački interes za pitanje o tome zašto su crijevne bakterije ponekad patogene, a ponekad ne. D'Herelle je ispitao filtrirane uzorke dizenterije na nevidljive viruse koji bi mogli promijeniti rast i patogenost bakterija kod pacijenata s dizenterijom. Na svoje iznenađenje, primijetio je lizu u tekućoj kulturi i stvaranje čistih mrlja, kasnije ih je nazvao taches vierges "djevičanske mrlje", u bakterijskoj kulturi na agaru. Budući da je tražio nevidljivi mikroorganizam, njegova koncepcija bakteriofaga kao parazita bakterija bila je sasvim logična. Njegova su istraživanja polazila od te pretpostavke i primijetio je da se nevidljivi agens

množi beskonačno, da su mu za razmnožavanje potrebne žive stanice te da je liza stanica izgleda potrebna za proces razmnožavanja [4]. D'Herelle je shvatio da brojanje ploča pruža način za nabrojanje tih nevidljivih agenasa, koje je on zamislio kao čestice. Uspio je pokazati da se fag razmnožava u valovima ili koracima, što je protumačio kao predstavljanje ciklusa infekcije, umnožavanja, oslobađanja i ponovne infekcije. D'Herelle je bio pionir u dva važna područja istraživanja faga. Jedan se temeljio na njegovom otkriću da su titri faga porasli kod pacijenata sa zaraznim bolestima upravo u trenutku oporavka. Na temelju tih zapažanja zaključio je da fagi predstavljaju prirodne agense otpornosti na zarazne bolesti, te je nastavio zagovarati fage kao terapijske agense prije otkrića antibiotika. Međutim, njegov koncept faga kao virusa bakterija nije bio široko prihvaćen. Kako bi se suprotstavio svojim kritičarima d'Herelleov drugi istraživački program ispitivao je biološku prirodu bakteriofaga. Svi njegovi dokazi upućivali su na koncepciju faga kao organiziranih infektivnih agenasa koji su obvezni intracelularni paraziti. Otkrio je da su antigenska svojstva i specifičnost raspona domaćina faga karakteristični za određene "rase" faga. Stoga je od početka bilo naznaka da bi fagi mogli biti plodni organizmi za genetsko proučavanje [5]. D'Herelle je vjerovao da su fagi odgovorni za veći dio oporavka od zaraznih bolesti. Budući da je uočio povećanje titra faga tijekom oporavka od dizenterije i tifusa, zaključio je da je mehanizam oporavka postupna prilagodba litičkog faga na specifične patogene, njihovo naknadno umnožavanje i liza patogena. On je fage nazvao egzogenim uzročnicima imuniteta.

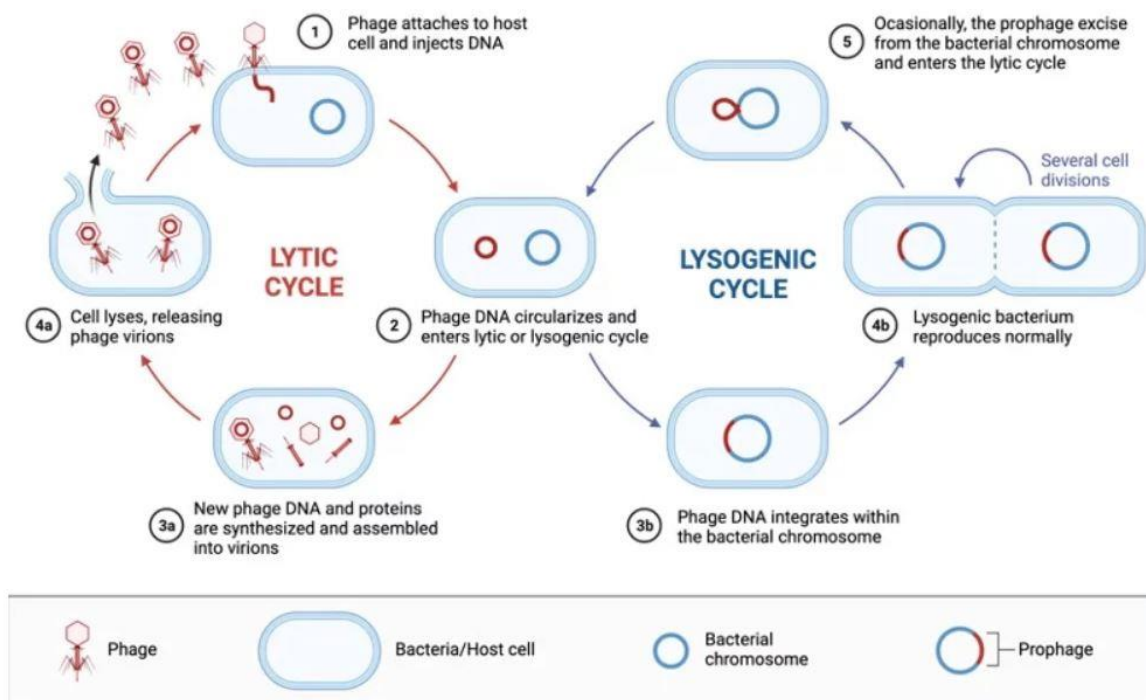
George Eliava, gruzijsko – sovjetski mikrobiolog, otputovao je na Pasteurov institut u Parizu, gdje je upoznao d'Hérellea. Zajedno radili na bakteriofagima te na njihovoj primjeni u medicini. 1923. osnovao je Institut George Eliava u Tbilisiju, Gruzija, posvećen razvoju terapije fagom. Rane upotrebe terapije fagom često su bile nepouzidane zato što su se tek skupljale informacije o njihovoj biologiji.

Od ranog 20. stoljeća također su bila u tijeku istraživanja razvoja održivih terapijskih antibiotika, a do 1942. antibiotik penicilin je uspješno pročišćen i doživio je upotrebu tijekom Drugog svjetskog rata [6]. Lijek se pokazao iznimno učinkovitim u liječenju ozlijeđenih savezničkih vojnika čije su rane postale inficirane. Do 1944. godine omogućena je velika proizvodnja penicilina, a 1945. postao je javno dostupan u ljekarnama. Zbog uspjeha lijeka, široko se plasirao na tržište SAD-a i Europe, što je dovelo do toga da zapadni znanstvenici na neko vrijeme uglavnom izgube interes za daljnju upotrebu i proučavanje terapije fagom [6]. Izolirani

od zapadnog napretka u proizvodnji antibiotika 1940-ih, ruski znanstvenici nastavili su razvijati već uspješnu terapiju fagom za liječenje rana vojnika u poljskim bolnicama. Tijekom Drugog svjetskog rata, Sovjetski Savez je koristio bakteriofage za liječenje vojnika zaraženih raznim bakterijskim bolestima, poput dizenterije i gangrene. Ruski istraživači nastavili su razvijati i usavršavati svoje tretmane te objavljivati svoja istraživanja i rezultate. Međutim, zbog znanstvenih prepreka Hladnog rata, ovo znanje nije prevedeno i nije se proširilo svijetom. Sažetak ovih publikacija objavljen je na engleskom jeziku 2009. u "A Literature Review of the Practical Application of Bacteriophage Research". Postoji opsežna knjižnica i istraživački centar na Institutu George Eliava u Tbilisiju, Gruzija. Terapija fagom i danas je raširen oblik liječenja u toj regiji [7].

3. FIZIOLOGIJA BAKTERIOFAGA

Životni ciklus bakteriofaga može biti litički ili lizogeni ciklus (Slika 1). Osim toga, neki fagi pokazuju pseudolizogeno ponašanje [8]. Kod litičkih faga kao što je fag T4, bakterijske stanice se otvaraju (liziraju) i uništavaju nakon trenutne replikacije viriona (Slika 2). Čim se stanica uništi, novi fagi mogu pronaći nove domaćine za zarazu [8]. Litički fagi su prikladniji za fagoterapiju. Neki litički fagi podliježu fenomenu poznatom kao inhibicija lize, gdje dovršeno potomstvo faga neće odmah lizirati iz stanice ako su izvanstanične koncentracije faga visoke. Ovaj mehanizam nije identičan onom kod umjerenog faga koji je u stanju mirovanja i obično je privremen. Nasuprot tome, lizogeni ciklus ne rezultira trenutnom lizom stanice domaćina. Njihov virusni genom će se integrirati s DNA domaćina i replicirati zajedno s njom ili se čak može uspostaviti kao plazmid (Slika 1). Virus ostaje u stanju mirovanja sve dok se uvjeti domaćina ne pogoršaju, možda zbog iscrpljivanja hranjivih tvari, tada endogeni fagi postaju aktivni. U ovoj točki oni započinju reproduktivni ciklus, što rezultira lizom stanice domaćina. Kako lizogeni ciklus omogućuje stanici domaćinu da nastavi preživljavati i razmnožavati se, virus se replicira u svim potomcima stanice. Primjer bakteriofaga za koji se zna da slijedi lizogeni i litički ciklus je fag lambda *E. coli*. Ponekad profagi mogu pružiti korist bakteriji domaćinu dok su u stanju mirovanja dodavanjem novih funkcija bakterijskom genomu, u fenomenu koji se naziva lizogena konverzija. Primjeri su konverzija bezopasnih sojeva *Corynebacterium diphtheriae* ili *Vibrio cholerae* pomoću bakteriofaga u visoko virulentne koji uzrokuju difteriju odnosno koleru [9]. Predložene su strategije za borbu protiv određenih bakterijskih infekcija ciljanjem na te profage koji kodiraju toksine [10].



Slika 1: Litički i lizogeni ciklus bakteriofaga

Izvor: <https://researchtweet.com/lysogenic-cycle-definition-steps-examples/>

3.1. Prianjanje i penetracija

Bakterijske stanice zaštićene su staničnom stijenkom od polisaharida, koji su važni čimbenici virulencije koji štite bakterijske stanice i od imunološkog sustava domaćina i od antibiotika. Da bi ušli u stanicu domaćina, bakteriofagi se vežu na specifične receptore na površini bakterija, uključujući lipopolisaharide, teikoične kiseline, proteine ili čak flagele. Ova specifičnost znači da bakteriofag može zaraziti samo određene bakterije koje nose receptore na koje se mogu vezati, što zauzvrat određuje raspon domaćina faga. Uvjeti rasta domaćina također utječu na sposobnost faga da se pričvrsti i napadne ih. Budući da se virioni faga ne kreću neovisno, moraju se oslanjati na nasumične susrete s ispravnim receptorima kada su u otopini, kao što su krv, limfna cirkulacija, navodnjavanje, voda u tlu i slično. Miovirusni bakteriofagi koriste hipodermalni pokret poput injekcije za ubrizgavanje svog genetskog materijala u stanicu. Nakon kontakta s odgovarajućim receptorom, repna vlakna se savijaju

kako bi približila baznu ploču površini stanice. Ovo je poznato kao reverzibilno vezanje. Nakon što se potpuno pričvrsti, započinje ireverzibilno vezanje i rep se skuplja, vjerojatno uz pomoć ATP-a prisutnog u repu, ubrizgavajući genetski materijal kroz bakterijsku membranu.

3.2. Sinteza proteina i nukleinske kiseline

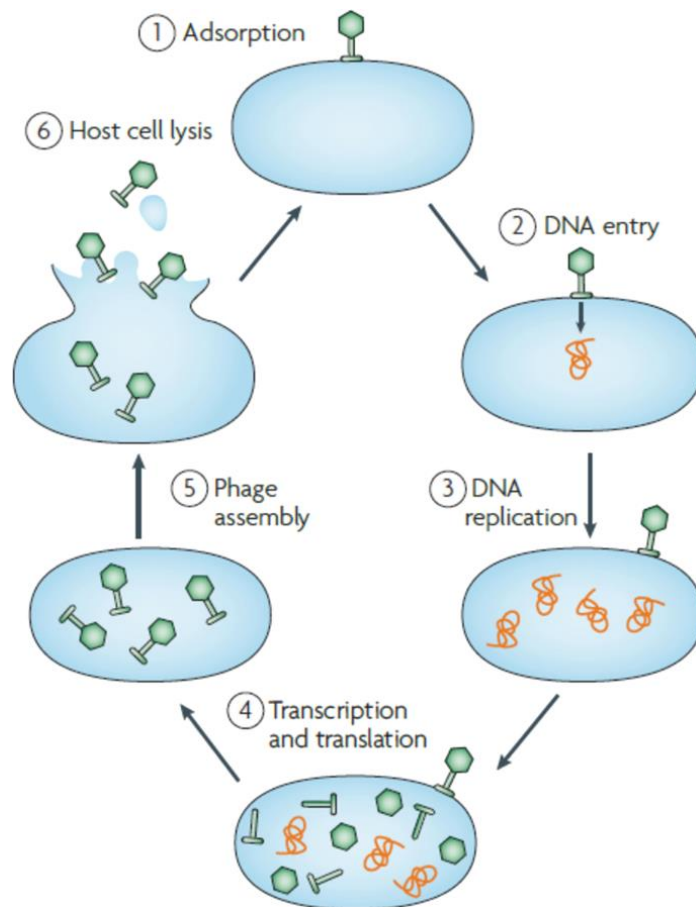
Za nekoliko minuta bakterijski ribosomi počinju prevoditi virusnu mRNA u protein. Za fage temeljene na RNA, RNA replikaza se sintetizira rano u procesu. Proteini modificiraju bakterijsku RNA polimerazu tako da preferirano transkribira virusnu mRNA. Domaćinova normalna sinteza proteina i nukleinskih kiselina je poremećena i on je umjesto toga prisiljen proizvoditi virusne produkte. Ovi produkti postaju dio novih viriona unutar stanice, proteina pomoćnika koji pridonose skupljanju novih viriona ili proteina uključenih u lizu stanice. Godine 1972. Walter Fiers (Sveučilište u Gentu, Belgija) prvi je ustanovio potpunu nukleotidnu sekvencu gena, a 1976. i virusni genom bakteriofaga MS2 [11] [12].

3.3. Sastavljanje viriona

U slučaju T4 faga, konstrukcija novih čestica virusa uključuje pomoćne proteine koji djeluju katalitički tijekom morfogeneze faga [13]. Najprije se sastavljaju osnovne ploče, a zatim se na njih nadograđuju repovi. Kapside glave, izgrađene zasebno, spontano će se spojiti s repovima. Tijekom sastavljanja viriona faga T4, morfogenetski proteini koje kodiraju geni faga međusobno djeluju u karakterističnom nizu. Čini se da je održavanje odgovarajuće ravnoteže u količinama svakog od ovih proteina proizvedenih tijekom virusne infekcije kritično za normalnu morfogenezu faga T4. DNA je učinkovito upakovana unutar glava. Cijeli proces traje oko 15 minuta [14].

3.4. Otpuštanje viriona

Fagi se mogu osloboditi putem stanične lize, ekstruzijom ili, u nekoliko slučajeva, pupanjem. Liza repnim fagima postiže enzim zvan endolizin, koji napada i razgrađuje peptidoglikan stanične stijenke. Potpuno drugačiji tip faga, filamentozni fag, tjera stanicu domaćina da neprestano izlučuje nove virusne čestice. Oslobođeni virioni opisuju se kao slobodni i, osim ako nisu oštećeni, sposobni su zaraziti novu bakteriju. Pupanje je povezano s određenim fagima mikoplazme. Za razliku od oslobađanja viriona, fagi koji pokazuju lizogeni ciklus ne ubijaju domaćina i umjesto toga postaju dugoročni stanovnici kao profagi.



Slika 2: Faze lize stanice posredovane bakteriofagom

Izvor: <https://www.technologynetworks.com/immunology/articles/understanding-the-lytic-cycle-what-are-the-steps-310621>

4. DJELOVANJE NA BAKTERIJU *Escherichia coli*

Escherichia coli je jedan od najčešćih ljudskih patogena i izaziva infekciju u različitim organima tijela uključujući enteritis, septikemiju, neonatalni meningitis i infekcija mokraćnog sustava (IMS) [15] [16]. Najčešća izvancrijevna infekcija *E. coli* je IMS, a najčešći patogen koji ju uzrokuje je uropatogena *Escherichia coli* (UPEC) [17]. Štoviše, rastuća učestalost višestruko rezistentnih UPEC sojeva zakomplicirala je liječenje IMS-a i dovela do povećanja troškova i produljenog boravka u bolnici [18].

Danas se fagoterapija smatra potencijalnim izborom za liječenje infekcija povezanih sa UPEC sojevima rezistentnim na konvencionalne antibiotike [19]. U tom kontekstu, fag VB_ecoS-Golestan se navodi kao alternativni tretman za inhibiciju UPEC-a. Među istraživanim izolatima 78,8% bilo je višestruko rezistentno na antibiotike, od čega je 56% pokazalo osjetljivost na litičku aktivnost ovog faga. Ovaj fag pokazuje velika specifičnost prema domaćinima a osim toga niti jedan od gena lizogenog ciklusa nije pronađen u ovom genomu faga. Terapija ovim fagom mogla bi biti obećavajući pristup liječenju višestruko rezistentnih sojeva *E. coli*. Međutim, visoka specifičnost prema *E. coli* može biti ograničavajuća u primjeni faga kod liječenja infekcija uzrokovanih drugim bakterijskim vrstama koje uzrokuju IMS [21].

Biofilmovi su jedan od većih problema kod infekcija pa je sve veća potreba za učinkovitim tretmanima skrenula pozornost na bakteriofage kao učinkoviti tretman za prodiranje u strukturu biofilma i uništavanje istog. [20]. vB_EcoP-EG1 (porodica *Podoviridae* slična T7) se karakterizira velikom eksplozijom stanice, bez toksičnih proteina, vrlo kratkim litičkim ciklusom i širim rasponom domaćina na sojevima UPEC. Ovaj fag donosi obećavajući ishod jer može zaraziti 10 od 21 višestruko rezistentnih UPEC sojeva. Osim toga, ovaj fag uspješno lizira ove sojeve i smanjuje biomasu biofilma. U medicinskim uvjetima biofilm izaziva destruktivna oštećenja tijekom akutnih i kroničnih infekcija kao što je IMS povezana s kateterom, a fag može imati potencijal za liječenje IMS-a kod pacijenata kod kojih se pojavljuje biofilm [22]. U drugom istraživanju, autori su izvijestili o tri faga s djelovanjem na biofilm kojeg stvaraju UPEC sojevi. Svi su fagi uzrokovali smanjenje biomase biofilma u usporedbi s netretiranom skupinom pri niskim i višim koncentracijama nakon 8 sati inkubacije. Ovi rezultati pokazuju da fagi djeluju na način koji ne ovisi o dozi, što ide u njihovu korist kada se primjenjuju u *in vivo* uvjetima kako bi se

inhibirao biofilm. S druge strane, postoje dokazi da se biofilm počinje ponovno uspostavljati nakon 24 sata. Ovaj fenomen mogao bi se povezati s razvojem otpornosti na fage kod bakterija [23]. Ti se izazovi mogu prevladati korištenjem koktela faga i kombinirane terapije faga i antibiotika. Već je pokazano da kombinirana terapija ne samo da smanjuje broj bakterija, već nam također pomaže kontrolirati količinu bakterija otpornih na fage [24]. Moradpour i suradnici istraživali su zajednički učinak faga i ampicilina na IMS uzrokovanu *E. coli* O157. Soj *E. coli* korišten u ovom istraživanju bio je otporan na ampicilin i imao je srednju osjetljivost na amoksisicilin-klavulansku kiselinu. Primjena faga rezultirala je održavanjem inhibicijskih zona izvanredno čistim na disk-testu ampicilina i amoksisicilin-klavulanske kiseline, smanjila ukupni rast bakterija i ukazala na osjetljivost rezistentnog fenotipa u inhibicijskim zonama. Nadalje, modificirani test mikrodilucije bujona potvrdio je sinergiju faga i antibiotika [25]. Ovaj sinergistički učinak može proizaći iz stimulacije rasta litičkih faga u prisutnosti beta-laktamskih antibiotika. Zapravo, bakterijske stanice neuspješno dijele i stvaraju vrlo duge filamente u prisutnosti beta-laktama, a ta stanična filamentacija pridonosi mnogo bržem okupljanju faga zbog jednostavnije lize stanice. Filamentacija izaziva poremećaje u sloju peptidoglikana koji mogu uzrokovati veću osjetljivost na aktivnosti faga [25] [26]. Osim toga, napad faga mogao bi promijeniti aktivnost efluksne pumpe, uzrokujući povećanu osjetljivost na više klasa antibiotika [27]. Dakle, rezultati istraživanja pokazali su značajno poboljšanje baktericidnog efekta u kombiniranoj terapiji, u usporedbi sa svakim tretmanom zasebno.

Slično tome, nedavna istraživanja bila su usmjerena na učinke kombinirane uporabe faga i antibiotika na soj *E. coli* ATCC 13706 koji je otporan na različite antibiotike. Fag ECA2 i antibiotici su kombinirani i naknadno korišteni za procjenu inaktivacije *E. coli*. Kombinacija faga i ciprofloksacina u subletalnoj koncentraciji značajno je smanjila razinu bakterija u usporedbi s uporabom svakog pojedinačno. Osim toga, prisutnost antibiotika u subletalnim koncentracijama može kontrolirati stvaranje soja otpornog na fage. Međutim, sinergijski učinak u subletalnim dozama antibiotika moguće je postići samo kada su bakterije osjetljive na korištene antibiotike. Važno je napomenuti da ciprofloksacin koči enzim topoizomerazu II (DNA girazu) bakterija i, posljedično, ometa sintezu nukleinske kiseline, čime utječe na ciklus replikacije faga u bakterijama domaćinima. Stoga, pri dozi minimalne inhibitorne koncentracije ovog antibiotika ne može doći do sinergističkog učinka. Štoviše, primjena kombinirane terapije u kombinaciji s bakteriostatskim antibioticima nije dovela do sinergističkog učinka jer su ovi antibiotici samo inhibirali rast

bakterija, a nisu smanjili broj bakterija osim što su spriječili replikaciju faga. Dakle, ukupna učinkovitost kombinirane terapije faga i antibiotika ovisi o osjetljivosti ispitivanih bakterija na korišteni antibiotik i samoj vrsti antibiotika [24] [28].

5. DJELOVANJE NA BAKTERIJU *Proteus* spp.

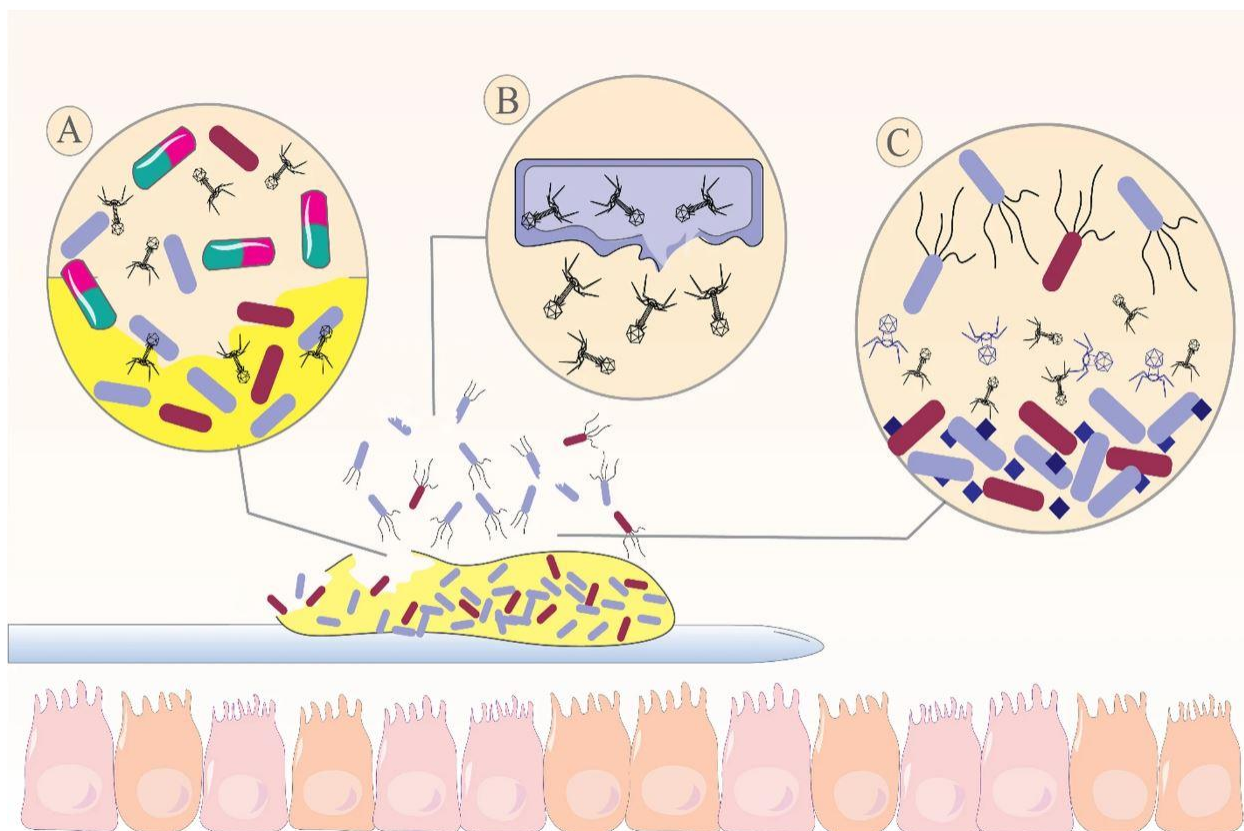
Oportunističke patogene bakterije iz roda *Proteus* također uzrokuju IMS, a infekcije uzrokovane ovim patogenima dijelimo u dvije vrste: hematogene infekcije, gdje spadaju sistemske infekcije, te uzlazne infekcije potpomognute bakterijama koje koloniziraju urinarni trakt i na kraju dospiju u bubrege [29] [30]. Nadalje, podaci ukazuju da se IMS povezane s korištenjem katetera javljaju u 50% svih pacijenata koji su kateterizirani 7 dana ili više, a *Proteus mirabilis* je prevladavajući mikroorganizam u 44% takvih kliničkih slučajeva [31] [32] [33]. Iako je liječenje antibioticima učinkovito u liječenju većine slučajeva, porast rezistencije na antibiotike među bakterijama koje uzrokuju IMS povezane s korištenjem katetera, uključujući *P. mirabilis*, otežava njihovo liječenje, produžavajući hospitalizaciju i smanjujući učinkovitost terapije. Upravo iz tog razloga važno je uvođenje novih metoda liječenja, među kojima fagoterapije. [34] [35]. Wang J-T, Chen P-C i sur. u svom radu „Antimicrobial susceptibilities of *Proteus mirabilis*“ su predstavili dva nova virulentna faga uključujući vB_PmiP_5460 i 5461 koji pripadaju porodicama *Podoviridae* i *Myoviridae*. Ti se fagi koriste za oblaganje katetera pa se koriste za procjenu mogućeg inhibitornog učinka na biofilm u usporedbi s kateterima koji nisu obloženi fagom. Uočeno je smanjenje populacije biofilma u kateterima obloženim fagom. Štoviše, taj koktel faga dovodi do značajnog smanjenja stvaranja biofilma u 96 i 168 sati nakon kateterizacije. Ovi su učinci su obećavajući budući da su urinarni kateteri dugo ostali u mjehuru pacijenata, a najveća učinkovitost katetera obloženih fagom trajala je 7 dana. [36].

Štoviše, u drugom istraživanju zabilježeni su različiti stupnjevi osjetljivosti na 13 faga u 50 izolata uropatogenog *P. mirabilis*. Među 13 faga, 39APmC32, 65APm2833 (*Myoviridae*) i 72APm5211 (*Siphoviridae*) fagi odabrani su kao komponente koktela. Ti su fagi pokazali snažnu aktivnost protiv biofilma a imali su bolji potencijal za inhibiciju stvaranja biofilma nego za uklanjanje zrelog biofilma [37]. Čini se da fagi mogu odgoditi stvaranje biofilma ili čak spriječiti njegovo stvaranje inhibicijom rasta *P. mirabilis* (Slika 3). Još jedno dobro svojstvo faga 39 i 72 A protiv biofilma je proizvodnja polisaharidne depolimeraze, što pokazuje stvaranje aureole oko plakova. Osim toga, ovi fagi uništavaju više od 50% biofilmova u ispitivanim sojevima. Na taj način polisaharid depolimeraza kodirana fagom razgrađuje bakterijski egzopolisaharid koji je glavna komponenta matriksa biofilma. Zanimljivo je da aureolu stvaraju bakterije viškom enzima faga koji se oslobađa tijekom lize zaraženih stanica iz kojih je egzopolisaharid uklonjen [38] [39].

Nadalje, primjena koktela faga koji sadrže nekoliko faga se čini razumnim rješenjem za fage s uskim spektrom domaćina. Na sličan način, u ovom istraživanju, fag 65 A ima nizak potencijal za uništavanje biofilma, ali ga karakterizira najširi raspon domaćina. Autori preporučuju da bi dodavanje navedenog faga pripravku koktela faga moglo dovesti do povećanja broja bakterija osjetljivih na koktel u usporedbi s pripravcima koji sadrže pojedinačne fage. Tako fagi 72 i 39 A proizvode polisaharidne depolimeraze koje potiču prodiranje faga 65 A u dublji sloj biofilma [38].

U istraživanjima u kojima se fag koristio za liječenje utvrđene infekcije, upotreba koktela faga s jednom dozom značajno je (3 puta) produžila vrijeme potrebno za začepljenje katetera. Međutim, primjena iste doze faga u ranoj fazi infekcije dovela je do potpune inhibicije začepljenja katetera i iskorjenjivanja infekcije. Ono što je istaknuto ovim istraživanjem je važnost korištenja faga u ranoj fazi infekcije, što dovodi do potpune prevencije začepljenja. [40] [41]. Nadalje, druga studija je izvijestila o pet faga sa izvanrednom sposobnošću da poremete prethodno formirane biofilmove višestruko rezistentnog *P. mirabilis*, smanjujući tako broj živih stanica za 99,9% [42]. Značajno je da je kombinacija faga i antibiotika imala najveći učinak na uklanjanje biofilma nakon 24 sata, što je pokazalo superiornost kombinirane terapije u odnosu na svaku od pojedinačnih terapija po učinkovitosti. Osim toga, ovaj bi tretman mogao inhibirati razvoj višestruko rezistentnih sojeva koji se javlja pri izlaganju svakom od faga ili antibiotika [43].

Poseban problem kod liječenja infekcija uzrokovanih *P. mirabilis* je činjenica da se kod 30% kamenaca u mokraćnom sustavu stvaraju biofilmovi kristalnog oblika *P. mirabilis* u mokraćnim kanalima. Protok kroz katetere se tako stalno blokira ovim kristalnim strukturama i tada bakterije ugrađene u kristalne biofilmove postaju neosjetljive na djelovanje komponenti imunološkog sustava, kao i na rutinski korištene antibiotike [44] [45]. Kao što je objavljeno u spomenutim istraživanjima, fagi mogu imati izvrsnu inhibitorsku učinkovitost protiv biofilma *P. mirabilis*, iako su potrebna daljnja istraživanja kako bi se utvrdilo kako se mogu koristiti za maksimalnu učinkovitost. Osim toga, uporaba koktela faga može ciljano utjecati na širi raspon mikroorganizama, a uporaba kombinacije faga s antibioticima povećava šanse za iskorjenjivanje infekcije.



Slika 3. IMS povezane s korištenjem katetera i različiti aspekti terapije bakteriofagima za inhibiciju biofilma. A) Primjena bakteriofaga u kombiniranoj terapiji može povećati prodor antibiotika u dublje slojeve biofilma. B) Bakteriofagi mogu kontrolirati IMS ubijanjem bakterija i inhibiranjem njihovih faktora virulencije kao što je kapsula. C) Korištenje koktela bakteriofaga može biti učinkovito za inhibiciju polimikrobnih biofilmova kod IMS

Izvor: <https://ann-clinmicrob.biomedcentral.com/>

6. DJELOVANJE NA BAKTERIJU *Klebsiella pneumoniae*

Klebsiella pneumoniae je jedan od glavnih oportunističkih patogena sa sposobnošću da uzrokuje različiti spektar infekcija, od infekcija dišnog sustava, sepse pa do IMS posebno kod starijih osoba, novorođenčadi i osoba s oslabljenim imunitetom [46]. Globalni porast rezistencije ove patogene bakterije na antibiotike, osobito na karbapeneme, fluorokinolone i kolistin, je već sada javnozdravstvena prijetnja jer ostaje samo nekoliko preostalih terapijskih opcija za liječenje infekcija uzrokovanih višestruko rezistentnom *K. pneumoniae*. Štoviše, širenje panrezistentnih bolničkih sojeva *K. pneumoniae* diljem svijeta prijeti modernoj medicini da se vrati u doba prije antibiotika [47] [48]. Stoga je jedna od mogućih opcija za inhibiciju ovih patogena korištenje faga zbog njihovih dobro definiranih ciljnih spektara i specifičnosti raspona domaćina [49]. Sybesma i sur. izolirali su devet sojeva *K. pneumoniae* iz urinarnih kultura različitih pacijenata s IMS i istražili *in vitro* njihovu osjetljivost na fage. Značajno je da su svi ovi litički fagi pripremljeni iz kolekcije faga George Eliava instituta za fage i korišteni su u testu lize bakterijskih stanica. Autori su izvijestili da v_BR–KpS10 može lizirati sve sojeve *K. pneumoniae*, što ukazuje na činjenicu da se komercijalno dostupni fagi mogu učinkovito koristiti u liječenju infekcija uzrokovanih višestruko rezistentnom *K. pneumoniae*. Nadalje, podaci u ovom istraživanju pokazuju da osjetljivost/otpornost na fage i antibiotike nisu međusobno povezani i iako je postojala rezistencija na različite antibiotike kod sojeva *K. pneumoniae*, sve su lizirane od strane faga [50].

U drugom istraživanju, litički fag KPO1K2 izoliran je iz otpadne vode i istražena njegova mogućnost inhibicije *K. pneumoniae*. Fag pripada porodici *Podoviridae* sa specifikacijama sličnim T7 i dokazano je stabilan u širokom pH rasponu od 4 do 11. Nadalje, kinetika faga za njegovu *in vivo* stabilnost provedena je na laboratorijskim miševima. Nakon intraperitonealne injekcije miševima, titri KPO1K2 u mokraćnom mjehuru i bubrezima jasno su pokazali da je došlo do nakupljanja faga pri višim koncentracijama u ova dva organa. Značajno je da je uz *K. pneumoniae*, KPO1K2 zarazio i *E. coli*. Budući da su te bakterije poznate kao česti uzročnici IMS, zanimljivo je da su obje osjetljive na jedan te isti fag [51].

U sličnom istraživanju Zhanga i suradnici izolirali su novi fag vB_KpnP_IME279 iz bolničke kanalizacije i testirali ga na lizu višestruko rezistentne *K. pneumoniae* izolirane iz urina. Ovaj fag pripada *Podoviridae* i stabilan je u širokom pH rasponu između 3 i 11 te temperaturnom rasponu

između 40 i 60 °C. Treba napomenuti da vB_KpnP_IME279 ima litičke funkcije protiv nekoliko testiranih *K. pneumoniae*. Nadalje, analiza genoma faga otkrila je da ispitivani fag ne sadrži gen za toksin, što daje jamstvo sigurnosti za daljnje kliničko testiranje ovog faga [52]. Osim toga, spomenuti fagi nisu izgubili svoju aktivnost čak ni pri ekstremnim pH vrijednostima pa se čini da imaju veću i dužu stabilnost u mokraćnom mjehuru i bubrezima. U tom kontekstu, ta su istraživanja preporučila terapiju fagom kao prikladnog kandidata i strategiju biokontrole za liječenje IMS-a povezane s višestruko rezistentnom *K. pneumoniae*.

Nadalje, nedavna istraživanja izvijestila su o kapsuli i biofilmu *K. pneumoniae* kao najvažnijim čimbenicima virulencije obzirom da imaju višestruke funkcije poput prijanjanja na različite površine i zaštite bakterije od smrtonosnih komponenti seruma, imunološkog čišćenja i čimbenika okoliša [47] [53]. Stoga je izolacija i identifikacija faga koji mogu inhibirati i uništiti te čimbenike virulencije bakterija neophodna za kontrolu IMS. U nedavnoj publikaciji, Fag 117 i Fag 31 su izolirani, i ispitan je njihov raspon domaćina i litički potencijal protiv devet hipermukoviskoznih i karbapenemaza-producirajućih izolata *K. pneumoniae* kod starijih pacijenata s IMS. Korištenje svakog faga zasebno dalo je potencijal za lizu sojeva *K. pneumoniae*. Naknadni eksperimenti s kulturom urina s fagom 117 pokazali su isprva jaku litičku aktivnost faga. Ipak, opažanje brzog ponovnog rasta nakon početne lize sugerira da su mutanti otporni na fage. S druge strane, koktel faga (117 + 31) imao je značajno veću antimikrobnu aktivnost od samog faga 117. Stoga, koktel faga mogao bi djelovati kao obećavajući izbor za terapiju fagom za kontrolu *K. pneumoniae* zbog njegove potencijalne sposobnosti da inficira mutante otporne na fage i tako odgodi razvoj bakterijske rezistencije.

Čini se također da se fagi i rekombinantna depolimeraza mogu koristiti kao terapijske strategije za kontrolu IMS uzrokovanih *K. pneumoniae*, s obzirom na to da fagi mogu spriječiti ili uništiti najvažnije čimbenike virulencije ove bakterije kao što je kapsula i biofilmovi putem depolimeraze specifične za polisaharid kapsule. Treba napomenuti da je ovaj enzim potreban za razgradnju kapsule i adsorpciju na stanicu domaćina. Posljedično, nakon razgradnje kapsule, došlo je do izlaganja komponenti vanjske membrane radi bolje dostupnosti fagu. Stoga se fagi mogu koristiti u kombinaciji s drugim fagima u koktelima faga i s antibioticima za suzbijanje *K. pneumoniae* kod IMS.

7. KORISTI TERAPIJE BAKTERIOFAGIMA

Dosadašnja istraživanja pokazala su da liječenje bakteriofagom ili koktelom faga nudi moguću alternativu konvencionalnim antibiotskim tretmanima za liječenje širokog spektra bakterijskih infekcija.

Zanimljivo je da, iako bakterije mogu razviti otpornost na fage, tu otpornost bi moglo biti lakše prevladati nego što je to slučaj kod otpornosti na antibiotike. Virusi, baš kao i bakterije, mogu razviti otpornost na različite tretmane. Bakteriofagi su u odnosu na antibiotike vrlo specifični, ciljaju samo na jedan ili tek nekoliko sojeva bakterija. S druge strane, tradicionalni antibiotici imaju širi učinak, ubijajući i štetne i korisne bakterije, poput crijevnih komenzala narušavajući tako ravnotežu crijevne mikroflore što može dalje rezultirati razvojem drugih bolesti. Specifičnost vrste i soja bakteriofaga stoga čini malo vjerojatnim da će druge bakterije, među kojima one korisne za ljudski organizam, biti uništene tijekom trajanja terapije bakteriofagom.

Vezano za buduća istraživanja na ovom polju, nekoliko istraživačkih skupina trenutno razvija fage šireg spektra domaćina kao i one koji bi se mogli koristiti kod različitih tretmana poput inhibicije meticilin-rezistentnog *Staphylococcus aureus* (MRSA) sojeva razvojem impregniranih zavoja za rane, preventivnog tretmana kod opekлина te konce impregnirane fagom.

Nadalje, istraživačke skupine sa Sveučilišta Rockefeller u SAD-u razvijaju enzibiotike kao eksperimentalnu antibakterijsku terapiju. Pojam je izveden iz kombinacije riječi "enzim" i "antibiotici" te označava spojeve, odnosno enzime, izolirane iz faga koji su vrlo učinkoviti u kontroli bakterijskih stanica. Enzimi se intenzivno koriste zbog svojih antibakterijskih i antimikrobnih svojstava. Proteolitički enzimi zvani endolizini pokazali su posebnu učinkovitost u borbi protiv niza bakterija i osnova su za istraživanje enzibiotika. Pročišćeni enzimi rekombinantnog faga mogu se koristiti kao zasebni antibakterijski agensi [54]. Terapija fagom također ima potencijal spriječiti ili liječiti zarazne bolesti koralja. To bi moglo ublažiti globalno opadanje populacije koralja i zaštititi koraljne grebene [55].

8. OGRANIČENJA

Jedno od glavnih ograničenja korištenja bakteriofaga u terapijske svrhe jest uniformnost protokola za njihovo korištenje. Naime, visoka specifičnost faga prema određenom bakterijskom soju može potencirati upotrebu različitih koktela faga za liječenje jedne te iste infekcije, budući da se bakterijske komponente kod takvih bolesti mogu razlikovati od regije do regije ili čak od osobe do osobe.

Osim toga, to znači da se "banke" koje čuvaju fage moraju moći kontrolirati i po potrebi revidirati, te redovito upotpunjavati novim fagima i njihovim karakteristikama.

Nadalje, bakterije mogu razviti različite receptore prije ili tijekom liječenja. To može spriječiti fage da ih potpuno iskorijene. Potreba za bankama faga čini regulatorno testiranje sigurnosti težim i skupljim prema trenutnim pravilima u većini zemalja. Takav proces bi otežao široku upotrebu terapije fagima.

Dodatno, problemi s patentima (posebno na živim organizmima) mogu zakomplicirati distribuciju za farmaceutske tvrtke koje žele imati ekskluzivna prava nad svojim "izumom", što bi obeshrabrilo komercijalnu korporaciju od ulaganja kapitala u istraživanje faga.

S druge strane, još uvijek traje identifikacija faga kod uzročnika čestih zaraznih bolesti. Primjerice, poznato je već najmanje trideset godina da mikobakterije poput *Mycobacterium tuberculosis*, uzročnika tuberkuloze, imaju svoje specifične bakteriofage, ali još nije otkriven litički fag za *Clostridium difficile*, koji je odgovoran za bolničke infekcije, ali neki umjereni fagi (integrirani u genom, također nazvani lizogeni) poznati su za ovu vrstu.

Negativna javna percepcija virusa također može igrati ulogu u teškom prihvatanju terapije fagima.

9. ZAKLJUČAK

Terapija fagom postala je terapijska opcija koja sve više obećava u borbi protiv bakterijskih infekcija. Danas se uspješno koristi za liječenje širokog spektra infekcija, uključujući one uzrokovane oportunističkim patogenim bakterijama rezistentnima na više lijekova.

U odnosu na konvencionalne antibiotike, terapija fagom ima potencijal pružiti ciljaniji pristup inhibiciji patogena u cilju suzbijanja pojave same infekcije kao i liječenja infekcije nakon izbijanja te nema značajnog utjecaja na osobu koja prima terapiju.

Nadalje, terapija fagom ima potencijal smanjiti pojavu i daljnje širenje bakterijske rezistencije na antibiotike, što je glavni problem kod tradicionalnih antibiotika.

Međutim važno je napomenuti da je glavni nedostatak terapije fagom nedostatak istraživanja samih bakterija i faga te njihovo međusobno djelovanje.

Također je važno napomenuti da još uvijek postoje neki izazovi povezani s terapijom fagima, kao što su poteškoće u dobivanju faga koji su specifični za ciljane bakterije, potreba za daljnjim istraživanjem kako bi se poboljšala učinkovitost i sigurnost faga te ograničena dostupnost fagoterapija u kliničkim uvjetima.

Unatoč ovim izazovima, vjerojatno je da će terapija fagom igrati važnu ulogu u liječenju bakterijskih infekcija te će nam pružiti perspektivnu i sigurniju budućnost.

10. LITERATURA

1. Ikuta, K.S., Swetschinski, L.R., Robles Aguilar, G., Sharara, F., Mestrovic, T., Gray, 581 A.P., Davis Weaver, N., Wool, E.E., Han, C. et. al, 2022. Global mortality 582 associated with 33 bacterial pathogens in 2019: a systematic analysis for the 583 Global Burden of Disease Study 2019. Lancet. 400, 2221–2248
2. Murray, C.J., Ikuta, K.S., Sharara, F., Swetschinski, L., Aguilar, G.R., Gray, A., et al., 2022. Global burden of bacterial antimicrobial resistance in 2019: a systematic analysis. Lancet 399 (10325), 629–655
3. Shaul M Shasha , Nehama Sharon, Michael Inbar: Bacteriophages as antibacterial agents; 2004 Feb;143(2):121-5, 166.
URL: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/15143702/>
4. Elizabeth Kutter 1, Daniel De Vos, Guram Gvasalia, Zemphira Alavidze, Lasha Gogokhia, Sarah Kuhl, Stephen T Abedon: Phage therapy in clinical practice: treatment of human infections; 2010 Jan;11(1):69-86.
URL: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/20214609/>
5. Geoffrey William Hanlon: Bacteriophages: an appraisal of their role in the treatment of bacterial infections; 2007 Aug;30(2):118-28.
URL: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/17566713/>
6. William C. Summers: The strange history of phage therapy; 2012 Apr 1; 2(2): 130–133.
URL: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3442826/>
7. William C. Summers: Bacteriophage Therapy, Annual Review of Microbiology; October 2001
URL: <https://www.annualreviews.org/doi/10.1146/annurev.micro.55.1.437>
8. Medeea Popescu, Jonas D. Van Belleghem, Arya Khosravi and Paul L. Bollyky: Bacteriophages and the Immune System
Annual Review of Virology; September 2021
URL: <https://www.annualreviews.org/doi/10.1146/annurev-virology-091919-074551>
9. Igor Mokrousov: Corynebacterium diphtheriae: Genome diversity, population structure and genotyping perspectives; January 2009
URL: <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S1567134808001810?via%3Dihub>

10. Eric C. Keen: Paradigms of pathogenesis: targeting the mobile genetic elements of disease; 2012; 2: 161.
URL: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3522046/>
11. W Fiers, R Contreras, F Duerinck, G Haegeman, D Iserentant, J Merregaert, W Min Jou, F Molemans, A Raeymaekers, A Van den Berghe, G Volckaert, M Ysebaert: Complete nucleotide sequence of bacteriophage MS2 RNA: primary and secondary structure of the replicase gene; 1976 Apr 8;260(5551):500-7.
URL: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/1264203/>
12. Carolina M. Mizuno, Charlotte Guyomar, Simon Roux, Régis Lavigne, Francisco Rodriguez-Valera, Matthew B. Sullivan, Reynald Gillet, Patrick Forterre, and Mart Krupovic: Numerous cultivated and uncultivated viruses encode ribosomal proteins; 2019 feb 14; 10: 752.
URL: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC6375957/>
13. D.Peter Snustad: Dominance interactions in Escherichia coli cells mixedly infected with bacteriophage T4D wild-type and amber mutants and their possible implications as to type of gene-product function: Catalytic vs. stoichiometric; August 1968
URL: <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/0042682268902857?via%3Dihub>
14. Erik Floor: Interaction of morphogenetic genes of bacteriophage T4; 14 February 1970
URL: <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/0022283670903037?via%3Dihub>
15. Yoon SH, Jeong H, Kwon S-K, Kim JF. Genomics, biological features, and biotechnological applications of Escherichia coli B: “Is B for better?!”. In Systems biology and biotechnology of *Escherichia coli*. Springer; 2009: 1–17.
16. Allocati N, Masulli M, Alexeyev MF, Di Ilio C. Escherichia coli in Europe: an overview. Int J Environ Res Public Health. 2013;10:6235–54.
URL: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/24287850/>
17. Kaper JB, Nataro JP, Mobley HL. Pathogenic escherichia coli. Nature reviews microbiology. 2004;2:123–40.
URL: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Abstract&list_uids=15040260
18. Ochoa SA, Cruz-Córdova A, Luna-Pineda VM, Reyes-Grajeda JP, Cázares-Domínguez V, Escalona G, Sepúlveda-González M, López-Montiel F, Arellano-Galindo J, López-Martínez B: Multidrug-and extensively drug-resistant uropathogenic Escherichia coli

clinical strains: phylogenetic groups widely associated with integrons maintain high genetic diversity. *Front Microbiol* 2016;7:2042.

URL:

http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Abstract&list_uids=28066364

19. Moghadam MT, Amirmozafari N, Shariati A, Hallajzadeh M, Mirkalantari S, Khoshbayan A, Jazi FM. How phages overcome the challenges of drug resistant bacteria in clinical infections. *Infection drug resistance*. 2020;13:45.

URL: <https://doi.org/10.2147%2FIDR.S234353>

20. Pires DP, Melo LD, Boas DV, Sillankorva S, Azeredo J. Phage therapy as an alternative or complementary strategy to prevent and control biofilm-related infections. *Curr Opin Microbiol*. 2017;39:48–56.

URL:

http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Abstract&list_uids=28964986

21. Yazdi M, Bouzari M, Ghaemi EA, Shahin K. Isolation, characterization and genomic analysis of a novel bacteriophage VB_EcoS-Golestan infecting multidrug-resistant *Escherichia coli* isolated from urinary tract infection. *Sci Rep*. 2020;10:1–13.

URL: <https://doi.org/10.1038%2Fs41598-020-63048-x>

22. Gu Y, Xu Y, Xu J, Yu X, Huang X, Liu G, Liu X. Identification of novel bacteriophage vB_EcoP-EG1 with lytic activity against planktonic and biofilm forms of uropathogenic *Escherichia coli*. *Appl Microbiol Biotechnol*. 2019;103:315–26.

URL:

http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Abstract&list_uids=30397766

23. Chibeu A, Lingohr EJ, Masson L, Manges A, Harel J, Ackermann H-W, Kropinski AM, Boerlin P. Bacteriophages with the ability to degrade uropathogenic *Escherichia coli* biofilms. *Viruses*. 2012;4:471–87.

URL:

http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Abstract&list_uids=22590682

24. Valério N, Oliveira C, Jesus V, Branco T, Pereira C, Moreirinha C, Almeida A. Effects of single and combined use of bacteriophages and antibiotics to inactivate *Escherichia coli*. *Virus Res.* 2017;240:8–17.
URL:
http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Abstract&list_uids=28746884
25. Moradpour Z, Yousefi N, Sadeghi D, Ghasemian A. Synergistic bactericidal activity of a naturally isolated phage and ampicillin against urinary tract infecting *Escherichia coli* O157. *Iran J Basic Med Sci.* 2020;23:257.
URL:
http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Abstract&list_uids=32405370
26. Comeau AM, Tétart F, Trojet SN, Prere M-F, Krisch H. Phage-antibiotic synergy (PAS): β -lactam and quinolone antibiotics stimulate virulent phage growth. *Plos ONE.* 2007;2:e799.
URL:
http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Abstract&list_uids=17726529
27. Chan BK, Siström M, Wertz JE, Kortright KE, Narayan D, Turner PE. Phage selection restores antibiotic sensitivity in VIŠESTRUKO REZISTENTNI *Pseudomonas aeruginosa*. *Sci Rep.* 2016;6:26717.
URL:
http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Abstract&list_uids=27225966
28. Wishart DS, Knox C, Guo AC, Shrivastava S, Hassanali M, Stothard P, Chang Z, Woolsey J. DrugBank: a comprehensive resource for in silico drug discovery and exploration. *Nucleic Acids Res.* 2006;34:D668-72.
URL:
http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Abstract&list_uids=16381955
29. Rózalski A, Sidorczyk Z, Kotelko K. Potential virulence factors of *Proteus bacilli*. *Microbiol Mol Biol Rev.* 1997;61:65–89.
URL:
http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Abstract&list_uids=9106365

30. Rubin R, Tolkoff-Rubin N, Cotran R. Urinary tract infection, pyelonephritis, and reflux nephropathy. *The kidney*. 1986;2:1085–141.

URL:

http://scholar.google.com/scholar_lookup?&title=Urinary%20tract%20infection%2C%20pyelonephritis%2C%20and%20reflux%20nephropathy&journal=The%20kidney&volume=2&pages=1085-141&publication_year=1986&author=Rubin%2CR&author=Tolkoff-Rubin%2CN&author=Cotran%2CR

31. Armbruster CE, Smith SN, Johnson AO, DeOrnellas V, Eaton KA, Yep A, Mody L, Wu W, Mobley HL. The pathogenic potential of *Proteus mirabilis* is enhanced by other uropathogens during polymicrobial urinary tract infection. *Infect Immun*. 2017;85:e00808.

[PubMed](#)

32. Hooton TM, Bradley SF, Cardenas DD, Colgan R, Geerlings SE, Rice JC, Saint S, Schaeffer AJ, Tambayh PA, Tenke P. Diagnosis, prevention, and treatment of catheter-associated urinary tract infection in adults: 2009 International Clinical Practice Guidelines from the Infectious Diseases Society of America. *Clin Infect Dis*. 2010;50:625–63.

[PubMed](#)

33. Jacobsen S, Stickler D, Mobley H, Shirliff M. Complicated catheter-associated urinary tract infections due to *Escherichia coli* and *Proteus mirabilis*. *Clin Microbiol Rev*. 2008;21:26–59.

[PubMed](#)

34. Wang J-T, Chen P-C, Chang S-C, Shiau Y-R, Wang H-Y, Lai J-F, Huang I-W, Tan M-C, Lauderdale T-LY. Antimicrobial susceptibilities of *Proteus mirabilis*: a longitudinal nationwide study from the Taiwan surveillance of antimicrobial resistance (TSAR) program. *BMC Infect Dis*. 2014;14:486.

[PubMed](#)

35. Viertel TM, Ritter K, Horz H-P. Viruses versus bacteria—novel approaches to phage therapy as a tool against multidrug-resistant pathogens. *J Antimicrob Chemother*. 2014;69:2326–36.

[PubMed](#)

36. Melo LD, Veiga P, Cerca N, Kropinski AM, Almeida C, Azeredo J, Sillankorva S. Development of a phage cocktail to control *Proteus mirabilis* catheter-associated urinary tract infections. *Front Microbiol*. 2016;7:1024.

[PubMed](#)

37. Maszewska A, Zygmunt M, Grzejdzia I, Różalski A. Use of polyvalent bacteriophages to combat biofilm of *Proteus mirabilis* causing catheter-associated urinary tract infections. J Appl Microbiol. 2018;125:1253–65.
[PubMed](#)
38. Tait K, Skillman L, Sutherland IW. The efficacy of bacteriophage as a method of biofilm eradication. Biofouling. 2002;18:305–11.
[Article](#)
39. Sutherland IW, Hughes KA, Skillman LC, Tait K. The interaction of phage and biofilms. FEMS Microbiol Lett. 2004;232:1–6.
[PubMed](#)
40. Nzakizwanayo J, Hanin A, Alves DR, McCutcheon B, Dedi C, Salvage J, Knox K, Stewart B, Metcalfe A, Clark J. Bacteriophage can prevent encrustation and blockage of urinary catheters by *Proteus mirabilis*. Antimicrob Agents Chemother. 2016;60:1530–6.
[PubMed Central](#)
41. Fu W, Forster T, Mayer O, Curtin JJ, Lehman SM, Donlan RM. Bacteriophage cocktail for the prevention of biofilm formation by *Pseudomonas aeruginosa* on catheters in an in vitro model system. Antimicrob Agents Chemother. 2010;54:397–404.
[PubMed](#)
42. Gomaa S, Serry F, Abdellatif H, Abbas H. Elimination of multidrug-resistant *Proteus mirabilis* biofilms using bacteriophages. Arch Virol. 2019;164:2265–75.
[PubMed](#)
43. Yazdi M, Bouzari M, Ghaemi EA. Isolation and characterization of a lytic bacteriophage (vB_PmiS-TH) and its application in combination with ampicillin against planktonic and biofilm forms of *Proteus mirabilis* isolated from urinary tract infection. J Mol Microbiol Biotechnol. 2018;28:37–46.
[PubMed](#)
44. Broomfield RJ, Morgan SD, Khan A, Stickler DJ. Crystalline bacterial biofilm formation on urinary catheters by urease-producing urinary tract pathogens: a simple method of control. J Med Microbiol. 2009;58:1367–75.
[PubMed](#)
45. Wasfi R, Hamed SM, Amer MA, Fahmy LI. *Proteus mirabilis* biofilm: development and therapeutic strategies. Front Cell Infect Microbiol. 2020;10:414–4.
[PubMed](#)

46. Bahramian A, Shariati A, Azimi T, Sharahi JY, Bostanghadiri N, Gachkar L, Ghalavand Z, Chirani AS, Erfanimanesh S, Hashemi A. First report of New Delhi metallo- β -lactamase-6 (NDM-6) among *Klebsiella pneumoniae* ST147 strains isolated from dialysis patients in Iran. *Infect Genet Evol.* 2019;69:142–5.
[PubMed](#)
47. Tabassum R, Shafique M, Khawaja KA, Alvi IA, Rehman Y, Sheik CS, Abbas Z, ur Rehman S. Complete genome analysis of a Siphoviridae phage TSK1 showing biofilm removal potential against *Klebsiella pneumoniae*. *Sci Rep.* 2018;8:1–11.
[Article](#)
48. Moghadam M, Shariati A, Mirkalantari S, Karmostaji A. The complex genetic region conferring transferable antibiotic resistance in multidrug-resistant and extremely drug-resistant *Klebsiella pneumoniae* clinical isolates. *New Microb New Infections* 2020, 36:100693
[Article](#)
49. Horváth M, Kovács T, Koderivalappil S, Ábrahám H, Rákhely G, Schneider G. Identification of a newly isolated lytic bacteriophage against K24 capsular type, carbapenem resistant *Klebsiella pneumoniae* isolates. *Sci Rep.* 2020;10:1–11.
[Article](#)
50. Sybesma W, Zbinden R, Chanishvili N, Kutateladze M, Chkhotua A, Ujmajuridze A, Mehnert U, Kessler TM. Bacteriophages as potential treatment for urinary tract infections. *Front Microbiol.* 2016;7:465.
[PubMed](#)
51. Verma V, Harjai K, Chhibber S. Characterization of a T7-like lytic bacteriophage of *Klebsiella pneumoniae* B5055: a potential therapeutic agent. *Current microbiology.* 2009;59:274–81.
[PubMed](#)
52. Zhang R, Zhao F, Wang J, Pei G, Fan H, Zhangxiang L, Mi Z, Shi T, Liu H, Tong Y. Biological characteristics and genome analysis of a novel phage vB_KpnP_IME279 infecting *Klebsiella pneumoniae*. *Folia Microbiologica* 2020;65:1–12.
[Article](#)
53. Ko KS. The contribution of capsule polysaccharide genes to virulence of *Klebsiella pneumoniae*. *Virulence.* 2017;8:485.
[PubMed](#)

54. Jan Borysowski, Beata Weber-Dąbrowska, and Andrzej Górski: Bacteriophage Endolysins as a Novel Class of Antibacterial Agents; April 2006
<https://journals.sagepub.com/doi/10.1177/153537020623100402>

55. Rotem Efrony, Ilil Atad, Eugene Rosenberg: Phage therapy of coral white plague disease: properties of phage BA3; 2009 Feb;58(2):139-45

URL: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/18923867/>