

Received: 2016.02.09
Accepted: 2016.08.11
Published: 2016.09.26

Bakteriofagi w walce z infekcjami pokarmowymi wywołanymi zanieczyszczeniem żywności bakteriami z rodzaju *Campylobacter*

Bacteriophages to combat foodborne infections caused by food contamination by bacteria of the *Campylobacter* genus

Magdalena Myga-Nowak¹, Agnieszka Godela¹, Tomasz Głąb¹, Monika Lewańska¹, Janusz Boratyński^{1,2}

¹Katedra Nauk Biomedycznych, Instytut Chemii, Ochrony Środowiska i Biotechnologii, Akademia im. Jana Długosza w Częstochowie

²Laboratorium Chemii Biomedycznej „Neolek”, Instytut Immunologii i Terapii Doświadczalnej im. Ludwika Hirszfelda, Polska Akademia Nauk, Wrocław

Streszczenie

Szacuje się, że każdego roku ponad 2 mln ludzi cierpi z powodu biegunek, wynikających ze spożycia zanieczyszczonego mięsa. Najczęściej za infekcje pokarmowe odpowiadają małe Gram-ujemne laseczki *Campylobacter*. Ich gospodarzami są głównie ptaki, u których wchodzą w skład prawidłowej flory jelitowej. W czasie przemysłowego uboju istnieje prawdopodobieństwo kontaminacji tusz przez bakterie obecne w treści jelitowej. W Europie, aż do 90% stad drobiu może być rezerwuarem patogenu. Zgodnie z raportem Europejskiego Urzędu ds. Bezpieczeństwa Żywności z 2015 r. liczba zgłoszonych i potwierdzonych przypadków ludzkiej kamylobakteriozy przekracza 200 tys. rocznie i utrzymuje się od kilku lat na stałym poziomie. Zjawisko narastającej antybiotykooporności bakterii wymusza ograniczenie stosowania antybiotyków w hodowli zwierząt. W związku z tym w Unii Europejskiej na farmach dopuszcza się tylko zaostrzone zabiegi prewencyjne i higieniczne. Wyhodowanie kurczaków wolnych od *Campylobacter* z użyciem tych metod jest możliwe, jednak trudne w realizacji i kosztowne. Wykorzystanie wirusów bakteryjnych – bakteriofagów może być metodą zapewniającą higieniczne warunki hodowli drobiu i przetwarzania żywności. Preparaty stosowane w ochronie żywności powinny zawierać bakteriofagi ściśle lityczne, apirogenne oraz długo zachowujące aktywność biologiczną. Obecnie na rynku dostępne są komercyjne preparaty bakteriofagowe stosowane w rolnictwie, jednak żaden nie zawiera fagów przeciw *Campylobacter*. Niemniej jednak w ciągu ostatnich lat opublikowano wyniki badań dotyczące zastosowania bakteriofagów przeciw *Campylobacter* u kur i w produktach drobiowych. Zgodnie z szacunkami redukcja *Campylobacter* w tuszach drobiowych o dwie jednostki logarytmiczne przyczyni się do 30-krotnego zmniejszenia częstości kamylobakteriozy u ludzi. Badania nad bakteriofagami przeciw *Campylobacter* mają znaczenie poznawcze i gospodarcze. W opracowaniu przedstawiono aktualny stan badań nad bakteriofagami skierowanymi przeciw *Campylobacter*.

Słowa kluczowe: antybiotykooporność • bakteriofagi • *Campylobacter* • drób • infekcje pokarmowe • kamylobakterioza

Summary

It is estimated that each year more than 2 million people suffer from diarrheal diseases, resulting from the consumption of contaminated meat. Foodborne infections are most frequently caused by small Gram-negative rods *Campylobacter*. The hosts of these bacteria are mainly birds wherein they are part of the normal intestinal flora. During the commercial slaughter, there is a likelihood of contamination of carcasses by the bacteria found in the intestinal content. In Europe, up to 90% of poultry flocks can be a reservoir of the pathogen. According to the European Food Safety Authority report from 2015, the number of reported and confirmed cases of human campylobacteriosis exceeds 200 thousands per year, and such trend remains at constant level for several years. The occurrence of growing antibiotic resistance in bacteria forces the limitation of antibiotic use in the animal production. Therefore, the European Union allows only using stringent preventive and hygienic treatment on farms. Achieving *Campylobacter* free chickens using these methods is possible, but difficult to implement and expensive. Utilization of bacterial viruses – bacteriophages, can be a path to provide the hygienic conditions of poultry production and food processing. Formulations applied in the food protection should contain strictly lytic bacteriophages, be non-pyrogenic and retain long lasting biological activity. Currently, on the market there are available commercial bacteriophage preparations for agricultural use, but neither includes phages against *Campylobacter*. However, papers on the application of bacteriophages against *Campylobacter* in chickens and poultry products were published in the last few years. In accordance with the estimates, 2-logarithm reduction of *Campylobacter* in poultry carcasses will contribute to the 30-fold reduction in the incidence of campylobacteriosis in humans. Research on bacteriophages against *Campylobacter* have cognitive and economic importance. The paper presents current state of research on bacteriophages targeted against *Campylobacter*.

Keywords: antibiotic resistance • bacteriophages • *Campylobacter* • poultry • foodborne infections • campylobacteriosis

Full-text PDF: <http://www.phmd.pl/fulltxt.php?ICID=1220084>

Word count: 4724
Tables: 1
Figures: 2
References: 67

Adres autorki: dr Magdalena Myga-Nowak, Instytut Chemii, Ochrony Środowiska i Biotechnologii, Wydział Matematyczno-Przyrodniczy, Akademia im. Jana Długosza w Częstochowie, Al. Armii Krajowej 13/15, 42-200 Częstochowa; e-mail: magdalena_myga@yahoo.com

WSTĘP

Historia odkryć bakteriofagów sięga początku 1896 r., w którym Ernest Hanbury Hankin, skojarzył obniżenie zapadalności na cholera z rytualną kąpielą oraz picie wody Gangesu i Jamuny [1]. Zjawisko wyjaśnił Félix d’Hérelle, franko-kanadyjski mikrobiolog, który odkrył w wodzie wirusy degradujące bakterie, a w 1917 r. skutecznie zastosował bakteriofagi w leczeniu czwórki pacjentów chorych na czerwonkę bakteryjną [40,59]. Prace Alexandra Fleminga prowadzące do odkrycia penicyliny spowodowały na wiele lat badania nad bakteriofagami. Sukces terapeutyczny penicylin spowodował rozwój badań nad innymi grupami antybiotyków doprowadzając do ich masowego wykorzystania [40].

Antybiotyki powszechnie stosowane w hodowli zwierząt rzeźnych, jako stymulatory wzrostu (antybiotykowe stymulatory wzrostu – ASW) miały pełnić funkcję profilaktyczną, pobudzającą wzrost i zwiększającą wydajność produkcji. Działanie stymulacyjne zostało osiągnięte przez zwalczanie patogenów, które wywołują przewlekły nieżyt jelit u zwierząt. Ich stosowanie zwiększa wchłanianie składników pokarmowych i obniża koszty zużycia paszy. Nadmierne wykorzystanie ASW jest jednak przyczyną przedostawania się antybiotyków do środowiska, w wyniku czego zwiększa się pula genów antybiotykooporności [67]. Zjawisko jest obecnie szeroko rozpowszechnione wśród patogenów, takich jak np. *Campylobacter jejuni*, *Escherichia coli* czy *Salmonella* [46].



Obawy dotyczące wykorzystania chemicznych dodatków w produkcji żywności doprowadziły do wydania przez Unię Europejską zakazu stosowania wielu antybiotyków oraz stymulatorów wzrostu w hodowli drobiu. Nakaz ograniczający wykorzystanie antybiotyków może spowodować obniżenie jakości produkcji, rentowności oraz bezpieczeństwa mikrobiologicznego. Czynnikiem, który dodatkowo powoduje wzrost ryzyka zanieczyszczenia mikrobiologicznego jest ograniczenie wykorzystania chloru podczas przeprowadzania zabiegów chemicznych w rzeźniach [6]. Natomiast w przypadku metod fizycznych, takich jak para wodna, suche ciepło i promieniowanie UV pojawiają się problemy związane z akceptowalnością pogarszających się właściwości organoleptycznych żywności [22].

Komisja Europejska nie zatwierdza zabiegów odkażających, ponieważ istnieje obawa, że mogą maskować niehigieniczne praktyki uboju lub doprowadzić do powstania oporności na środki antymikrobiologiczne [35]. Środki interwencyjne skupiają się natomiast na zapobieganiu kolonizacji i zmniejszaniu jej stopnia podczas hodowli oraz odkażaniu tusz drobiowych po uboju [18]. Dostatecznie skuteczną jest kontrola pracowników gospodarstw na wejściu, mycie i odkażanie rąk oraz zmiana butów i odzieży wierzchniej przed wejściem [56]. Znaczną poprawą bezpieczeństwa biologicznego na fermach drobiu może być bardzo kosztowna i trudna do utrzymania. Powoduje to wzrost zainteresowania poszukiwaniami w pełni akceptowalnych oraz opłacalnych sposobów zapobiegania zakażeniom drobiu. Wykorzystanie bakteriofagów jest jedną z możliwości osiągnięcia tego celu. Zastąpienie antybiotyków przez wyselekcjonowane szczepionki bakteriofagowe może pozwolić na uzyskanie podobnego wyniku stymulacyjnego z jednoczesnym ograniczeniem zagrożenia narastania antybiooporności w środowisku [6]. Obserwowany rozwój badań nad bakteriofagami charakteryzuje się szerokim zakresem działań: od przedsięwzięć inżynierii genetycznej po próby terapii zakażeń [31]. Zastosowanie bakteriofagów może rozwiązać wiele wyzwań stawianych obecnej medycynie i biotechnologii, umożliwiając m.in. wykrywanie i eliminację patogenów z żywności, ale działając również jako środki przeciwrakowe, nośniki leków i szczepionki. Ważnym obszarem zastosowań bakteriofagów jest ich wykorzystanie do zwalczania zanieczyszczeń mikrobiologicznych w technologii żywności [28,31].

CAMPYLOBACTER JAKO ŹRÓDŁO ZAKAŻEŃ PRZEWODU POKARMOWEGO

Laseczki z rodzaju *Campylobacter* (poznanych jest 25 gatunków) należą do gromady *Proteobacteria*, klasy ϵ -*Proteobacteria*, rzędu *Campylobacterales*, rodziny *Campylobacteraceae* [29,48,56,66].

Nazwa *Campylobacter* pochodzi od greckiego słowa „kam-pylos”, co oznacza „zakrzywiona” [33]. Uważa się, że pierwszym doniesieniem dotyczącym *Campylobacter* było opisanie przez Theodora Eschericha w 1886 r. niedających się hodować spiralnych bakterii. Po raz pierwszy zostały zidentyfikowane w 1906 r. przez brytyjskich

weterynarzy – McFadyeana i Stockmana u ciężarnej owcy, natomiast klasyfikację do rodzaju *Campylobacter* zaproponowali w 1963 r. Sebald i Véron [56].

Campylobacter to Gram-ujemne, cienkie, małe (0,2-0,8 $\mu\text{m} \times 0,5 \mu\text{m}$), spiralnie zakrzywione nieprzetwarzające laseczki. Dwie lub więcej komórek może się układać w kształt przypominający literę S lub V, czy też skrzydło mewy. Większość gatunków wykazuje ruch koziółkowy, z powodu obecności pojedynczej biegunowo usytuowanej rzęski na jednym lub dwóch końcach komórki [56]. Bakterie rosną najlepiej w atmosferze mikroaerofilnej (5% O_2 , 10% CO_2 , 85% N_2), ale mogą przetrwać także w warunkach tlenowych i beztlenowych [23,29]. Większość gatunków z rodzaju *Campylobacter* wzrasta w temperaturze 37-42°C, ale niektóre mogą rosnąć w temperaturze poniżej 30°C. Optymalna temperatura wzrostu wynosi 41,5-42°C, a pH mieści się w przedziale 6,5-7,5 (*C. jejuni* nie może przetrwać w pH poniżej 4,9 i powyżej 9,0) [29,56]. Bakterie nie fermentują ani nie utleniają węglowodanów, a głównym źródłem energii są dla nich aminokwasy lub pośrednie produkty cyklu Krebsa. Prawie wszystkie gatunki charakteryzują się obecnością oksydazy. *C. jejuni* wykazuje zdolność hydrolizy hipuranu, octanu indoksyli i redukcji azotanów [56]. Większość szczepów jest oporna na cefalotynę i coraz częściej na fluorochinolony [14,56]. *C. jejuni* i *C. coli* wykazują również oporność na tetracyklinę i zmniejszoną wrażliwość na erytromycynę [65]. Wykazano, że zamrażanie i rozmrażanie zmniejsza liczebność bakterii z rodzaju *Campylobacter*. Czyste kultury są zazwyczaj inaktywowane podczas przechowywania w temperaturze -15°C w przeciągu trzech dni. Zamrażanie nie eliminuje jednak patogenów podczas przechowywania żywności [56]. Bakterie z rodzaju *Campylobacter* tworzą biofilmy w celu przewyżyczenia niekorzystnych warunków środowiskowych, takich jak obecność tlenu, wysuszenie, ogrzewanie, środki dezynfekujące czy kwaśne środowisko często spotykane w procesie obróbki żywności [55]. W niekorzystnych warunkach bakterie mogą tworzyć postacie niedające się hodować (viable but non-culturable, VBNC) [44].

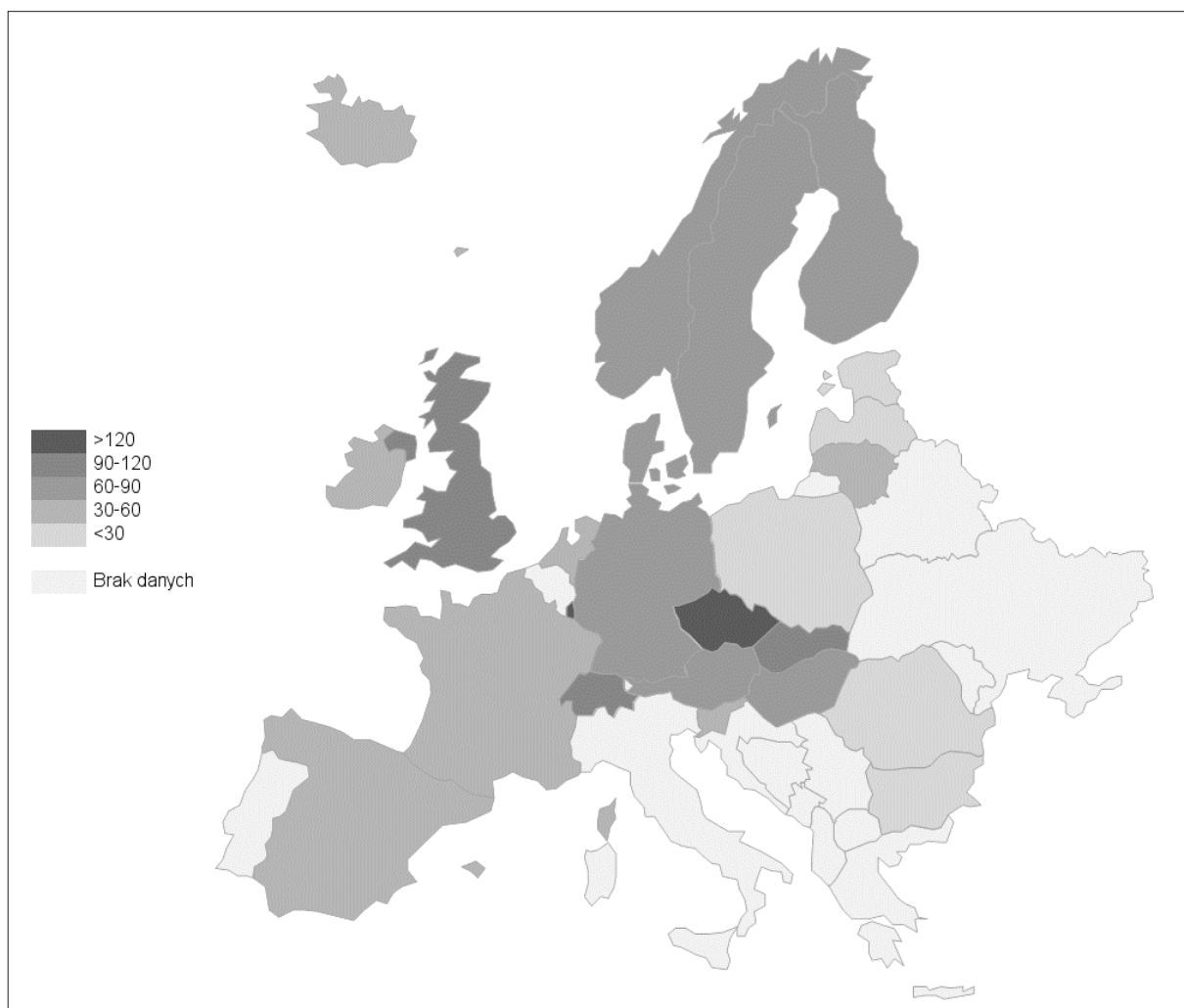
Campylobacter jest mikroorganizmem zdolnym do przetrwania w wielu różnych środowiskach, jednym z rezerwuarów są wody powierzchniowe [33]. Jednak bakterie *Campylobacter* są głównie komensalnymi organizmami występującymi zazwyczaj u bydła, świń i ptaków. Ze względu na wyższą temperaturę ciała, ptaki są ich najczęstszymi gospodarzami [56]. Badania przeprowadzone w Europie wykazały, że procent stad drobiu, u których wykryto obecność *Campylobacter* waha się w przedziale 18-90. Kraje wysunięte najbardziej na północ charakteryzują się znacznie mniejszymi wartościami niż te na południu, co może być spowodowane ciepłolubnością *Campylobacter* [12]. Gatunki z rodzaju *Campylobacter* są wykrywane już u 2-3-tygodniowych kurczaków, a docelowym miejscem kolonizacji jest jelito ślepe, cienkie, grube i stek [37]. Namnażanie i kolonizacja przewodu pokarmowego drobiu przez *Campylobacter* zachodzi

szybko, a źródłami zakażenia są zanieczyszczenia ze środowiska i koprofagia [12]. Skolonizowane kurczaki mogą przenosić *C. jejuni* – ludzki patogen, jako część swojej prawidłowej flory jelitowej [58].

Infekcje spowodowane przez *Campylobacter* należą do najczęstszych bakteryjnych infekcji pokarmowych na świecie [29]. *Campylobacteriozę* u ludzi wywołują głównie termotolerancyjne szczepy *Campylobacter*. Gatunki, które są związane z zakażeniem u ludzi to *C. jejuni*, *C. coli*, *C. lari*, lecz inne gatunki *Campylobacter* łącznie z nietermofilnym *C. fetus* mogą również sporadycznie wywoływać zakażenia [16]. Podaje się, że około 90% przypadków *Campylobacteriozy* jest spowodowane zakażeniem *C. jejuni*, a pozostałe 10% jest wywołane głównie przez *C. coli* [54]; dawka zakaźna jest na ogół niska [16]. Niektórzy autorzy podają, że bardzo zakaźne szczepy *C. jejuni* mogą wywołać chorobę już przy dawce zakażającej około 800 komórek [62]. Średni okres inkubacji u ludzi wynosi 2-5 dni. Przebieg zakażenia może być łagodny lub ciężki. Do typowych objawów klinicznych należą: wodnista lub krwawa biegunka, ból brzucha, gorączka, ból głowy, skurcze oraz

młodości. Przeważnie zakażenie ustępuje samoistnie w przeciągu kilku dni, jednak w niektórych przypadkach mogą wystąpić powikłania, takie jak: infekcje jelitowe, reaktywne zapalenie stawów, zaburzenia neurologiczne oraz zespół Guillaina-Barrégo (w tym wariant Millera Fishera) [16,20,34,35]. *C. jejuni* stał się najczęstszą przyczyną zespołu Guillaina-Barrégo – podobnej do *poliomyelitis* postaci paraliżu, która może doprowadzić do niewydolności oddechowej, ciężkich zaburzeń neurologicznych, a nawet śmierci [16,35]. W Unii Europejskiej *Campylobacterioza* jest najczęściej zgłaszaną zoonozą i główną przyczyną bakteryjnego nieżytu żołądka i jelit u ludzi [56,58]. Według EFSA (Europejskiego Urzędu ds. Bezpieczeństwa Żywności) trend ten utrzymuje się od 2005 r. Liczba zgłoszonych i potwierdzonych przypadków ludzkiej *Campylobacteriozy* w 2013 r. przekroczyła 200 tys. (ryc. 1). Mimo dużej liczby przypadków *Campylobacteriozy* u ludzi oraz ciężkiego przebiegu zgłaszanych przypadków śmiertelność jest niska (0,05%) [17].

Najwyższe wskaźniki powiadomień na 100 000 o zakażeniu *Campylobacter* w 2013 r. stwierdzono w Czechach



Ryc. 1. Wskaźniki powiadomień o *Campylobacteriozie* na 100 000 w krajach Unii Europejskiej i europejskiego obszaru gospodarczego w 2013 r. [17]



(173,7), Luksemburgu (125,7), Słowacji (108,0) i Wielkiej Brytanii (104,0). Natomiast najniższe wskaźniki powiadomień podaje się na Łotwie, w Rumunii, Polsce i Bułgarii (<2,0) [17]. Od 2012 r. w Polsce każdy przypadek kamylobakteriozy podlega obowiązkowej rejestracji [48]. WHO (Światowa Organizacja Zdrowia) szacuje, że ponad 2 mln ludzi corocznie umiera z powodu biegunek, przeważnie spowodowanych spożyciem zanieczyszczonego mięsa [56]. Głównym źródłem infekcji *Campylobacter* jest mięso drobiowe. Pozostałe źródła to surowe mięso innego pochodzenia, niepasteryzowane mleko czy zanieczyszczona woda [32]. Do głównych czynników ryzyka transmisji *Campylobacter* zalicza się spożywanie niedogotowanego mięsa drobiowego oraz zanieczyszczenia przenoszone na inne produkty podczas przetwarzania [18,37]. Ze względu na największe spożycie, ryzyko jest najwyższe w przypadku kurczaków [56]. Bakterie z rodzaju *Campylobacter* dość dobrze radzą sobie w środowisku pakowania próżniowego, modyfikowanej atmosferze i warunkach chłodniczych, dlatego izoluje się je również z pakowanych wyrobów z kurczaka [45]. Kolonizacja broilerów przez jelitowy patogen *C. jejuni* jest szeroko rozpowszechniona i trudno jej zapobiec. Doustne infekcje tym patogenem stały się najczęstszą przyczyną chorób przenoszonych drogą pokarmową w krajach uprzemysłowionych, co przekłada się na 20-30% ludzkich przypadków kamylobakteriozy, podczas gdy 50-80% można powiązać z całym rezerwuarem kurzym [22,56].

Szacowana liczba przypadków kamylobakteriozy występujących na świecie rocznie przekłada się na koszty ponoszone przez gospodarke. Na straty finansowe składają się utracone zarobki, koszty medyczne, sądowe, wycofania produktów i inne koszty pośrednie [56]. Panel ds. Zagrożeń Biologicznych EFSA uważa redukcję na poziomie farm za najbardziej korzystną dla zdrowia publicznego [34]. Konieczne jest zatem ograniczenie narażenia ludzi na zakażenie *Campylobacter* przez zmniejszenie częstości jego występowania u kurczaków w czasie hodowli oraz w tuszach podczas uboju i środowiska przetwarzania [35]. Poprawa bezpieczeństwa biologicznego na farmach spowodowała uwolnienie kurczaków od *Campylobacter*, jednak w ubojniach może nadal dochodzić do zakażenia krzyżowego [37].

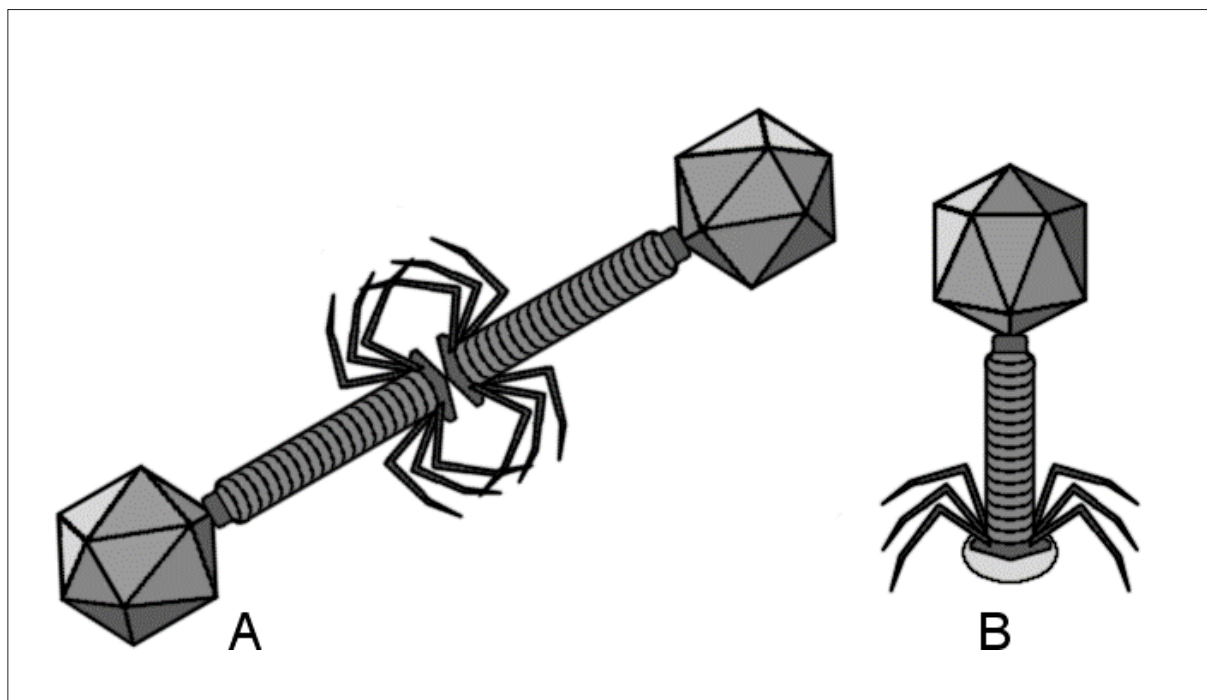
OGÓLNA CHAKERTYSKA BAKTERIOFAGÓW

Bakteriofagi (fagi) są relatywnie prostymi (genetycznie i strukturalnie), wirusowymi pasożytami bakteryjnymi [46], których cykl życiowy trwa 20-60 min [46]. Ich niewielkie wymiary (20-200 nanometrów) sprawiają, że są przeciętnie około stukrotnie mniejsze niż większość komórek bakteryjnych [32]. Fagi infekują ponad 140 rodzajów bakterii, lecz mimo to są swoiste wobec określonych szczepów – jedne atakują tylko jeden lub kilka podobnych szczepów, podczas gdy inne mogą infekować szczepy spośród różnych gatunków [21,36]. Nie poznano jeszcze fagów zdolnych do infekowania jednocześnie bakterii Gram-dodatnich i Gram-ujemnych

[36]. Bakteriofagi nie są zdolne do infekowania komórek innych niż prokariotyczne. Ludzki układ immunologiczny postrzega je jak każde inne cząstki wirusowe, co powoduje ich wychwyty przez układ siateczkowo-śródbłonkowy, a przez to ich akumulację w wątrobie i śledzionie. Jednak badania wykazują, że mimo to fagi mogą przetrwać w organizmie do kilku dni od ich podania [50].

W przyrodzie bakteriofagi znajdują się w równowadze z bakteriami hamując ich niekontrolowany rozwój. Liczbę bakterii w środowisku szacuje się na 46×10^{30} komórek, natomiast bakteriofagów na 10^{31} cząstek [26,64]. Utrzymanie liczebności bakteriofagów na tak wysokim poziomie jest związane z masowym infekowaniem gospodarzy bakteryjnych. Szacuje się, że zabijanych jest 20-50% populacji bakterii. Nie obniża to jednak gwałtownie liczebności bakterii na świecie, ale dowodzi, że wciąż trwający między bakteriofagami i bakteriami „wyścig zbrojeń” jest główną siłą napędową ich ewolucji i pozwala im współistnieć w tych samych środowiskach [42]. Fagi występują powszechnie w glebie, kanalizacji, ściekach gospodarczych i przetwórczych, odchodach i produktach żywnościowych, także w wodzie morskiej i środowiskach słodkowodnych [3,31]. Nawet gdyby z ostrożnością podejść do szacunków mówiących o zawartości $1,5 \times 10^8$ bakteriofagów w 1 g gleby [3], to w tak dużej populacji różnorodnych nanocząstek jest duże prawdopodobieństwo wykrycia, wyizolowania i scharakteryzowania bakteriofagów o oczekiwanych właściwościach.

Bakteriofagi cechuje zdolność do szybkiej replikacji i samoistnego zanikania. Zastosowany fag będzie się namnażał tak długo, jak długo w jego otoczeniu będą występować komórki bakterii, które może atakować [55]. Bakteriofagi dzieli się na ściśle lityczne i lizogeniczne (łagodne), choć wyróżnia się czasem także pseudofagodne, pozostające w cytoplazmie w postaci plazmidów [21]. Fagi zawierają w białkowym płaszczu DNA lub RNA, lecz większość prac dotyczących fagów litycznych opisuje fagi ogonkowe z dsDNA, które są najczęściej izolowane (około 96%) [21,46]. Fagi ściśle lityczne mają tylko jeden cykl lityczny, polegający na zarażeniu komórki, przeprogramowaniu jej i uwolnieniu potomnych fagów przez lizę po ustalonym, krótkim czasie [36]. Końce ogonków mogą się przyłączać do określonych receptorów na powierzchni ściany komórkowej bakterii w sposób bardzo swoisty [36,55]. Przyłączenie jest pierwszym etapem infekcji faga [21,58]. Następnie fagowe DNA przechodzi przez ogonek do cytoplazmy [36]. Kolejnymi etapami są transkrypcja genów fagowych oraz replikacja genomu [21]. Materiał genetyczny faga tworzy szablon nowego DNA wirusa i dostarcza informacji niezbędnej do przekształcenia komórki w „fabrykę” nowych wirionów [36]. Następnie syntezie ulegają białka, które składają się na główki (kapsydy) i ogonki (fagi ogonkowe). Do kapsydów pakowany jest materiał genetyczny i tak powstają nowe wiriony [21]. Ostatnim krokiem w cyklu litycznym jest liza komórki. Pośredniczą w niej dwa składniki: holina i endolizyna (lizyna). Holina tworzy pory w błonie



Ryc. 2. Schemat budowy morfologicznej dwóch grup myowirusów przeciw *Campylobacter*. Bakteriofagi należące do grupy II (A) charakteryzują się dłuższymi ogonkami i często występują parami połączone przez splecione włókienka. Fagi grupy III (B) nie wyróżniają się poza tym, że końcówki ogonków bywają przyczepione do kulistych pęcherzyków pochodzących najprawdopodobniej od bakterii (wg [30] zmodyfikowano)

cytoplazmatycznej, a lizyna, zyskuje dostęp do peptydoglikanu i hydrolizuje go [21,52]. W wyniku uwolnienia do otoczenia powiela się liczba bakteriofagów, zdolnych do infekowania bakterii [41]. Alternatywnie w ciągu kilku minut po wstrzyknięciu DNA, bakteriofag może wbudować swoje DNA do chromosomu bakterii (w zależności od jej kondycji metabolicznej) [21]. Wbudowany fag nazywany jest profagiem i ulega replikacji wraz z genomem bakteryjnym [21,46]. Fagowe białko represorowe utrzymuje większość jego genów w stanie bezczynności [36]. Taki mechanizm wykazują fagi łagodne, które w odpowiednich warunkach mogą jednak aktywować uśpiony potencjał lityczny [41]. Do tego procesu może dojść spontanicznie lub w wyniku działania np. promieniowania UV, mitomycyny czy zmiany środowiska [36]. Komórka bakteryjna, która zawiera przynajmniej jednego profaga jest w zasadzie odporna na infekcje przez inne fagi tej samej grupy [21].

Cechy bakteriofagów nie wykluczają możliwości powstania u bakterii nowych cech patogenności indukowanych ich obecnością [39]. Bakteriofagi (profagi) niekiedy mogą działać, jako wektory niepożądanych cech – genów antybiotykooporności i wirulencji, które mogą być przenoszone horyzontalnie z jednej bakterii do drugiej w wyniku transdukcji [22,46]. Fagi łagodne pośredniczą w konwersji lizogenicznej [22]. W wielu przypadkach lizogenizacja przyczynia się do zwiększania patogenności szczepów bakteryjnych, np. u *Staphylococcus aureus*,

E. coli, *Salmonella enterica* i *Streptococcus pyogenes* [21,39]. Nie wiadomo jaki procent bakteriofagów litycznych jest zdolnych do indukowania lizogenezy [27]. Wiadomo natomiast, że wzrost patogenności po lizogenizacji nadaje nowych właściwości, które zapewniają bakteriom większe szanse przetrwania w nowo zasiedlonej niszy ekologicznej [39]. W cyklu lizogenicznym właściwości te zapewnia ekspresja dodatkowych genów pochodzących z genomów fagowych – moronów (more-extra DNA) [21,39]. Niedawne postępy w badaniach sprawiają, że możliwe staje się zrozumienie przepływu genów u fagów oraz ich gospodarzy. Potencjalnie szkodliwych bakteriofagów można unikać lub przeprojektować je na takie, które nie będą przenosić niepożądanych cech lub jakichkolwiek systemów rozpowszechniania genów [22].

BAKTERIOFAGI W ZWALCZANIU ZANIECZYSZCZEŃ ŻYWNOSCI

Produkcji wyrobów spożywczych zagrażają dwa główne źródła zanieczyszczenia: pierwsze dotyczy surowców, które mogą zawierać bakterie chorobotwórcze dla ludzi, a drugie samych ludzi, którzy mogą skażić produkty w czasie ich przetwarzania [42]. Na powierzchniach urządzeń bezpośrednio kontaktujących się z żywnością, zwłaszcza tych, których utrzymanie w czystości jest kłopotliwe, mogą przetrwać trudno usuwalne biofilmy tworzone przez chorobotwórcze bakterie [55]. Do zanieczyszczenia żywności może dochodzić podczas uboju, udoju, fermentacji, przetwarzania, przechowywania, czy



też pakowania [22]. Bakterie, takie jak *Campylobacter*, *Salmonella*, *E. coli* i *Listeria monocytogenes* to główne przyczyny występowania infekcji pokarmowych u ludzi na świecie, są zatem odpowiedzialne za duże wydatki finansowe przemysłu spożywczego i służby zdrowia [52]. Pomimo rosnącej świadomości i poprawy warunków higienicznych w większości państw zachodnich, liczba ognisk zakażeń pokarmowych nie ulega zmianie lub nawet wzrasta [52]. Stało się oczywiste, że antybiotykooporne szczepy patogennych bakterii pochodzące z sektora rolniczego i hodowlanego mogą być z łatwością przenoszone na człowieka przez łańcuch pokarmowy. W związku z tym zarówno rośliny uprawne, jak i zwierzęta konsumpcyjne stanowią potencjalny rezerwuuar niebezpiecznych bakterii przyczyniających się corocznie do zakażeń ludzi na świecie [25]. Zmniejszenie liczby zatruc pokarmowych przez wykorzystanie szybkich i powszechnie dostępnych metod detekcji oraz kontroli liczebności patogenów jest przedmiotem wielu badań [8]. Idealne techniki dekontaminacji nie powinny w żaden sposób zmieniać właściwości organoleptycznych i odżywczych żywności. Powinny być bezpieczne, niedrogie i powszechnie akceptowalne w społeczeństwie. Spełnienie tych wszystkich kryteriów jest trudne i dlatego wciąż poszukuje się nowych i funkcjonalnych rozwiązań [37]. Zrealizowanie celu być może stanie się realne dzięki zastosowaniu bakteriofagów [25]. Wirusy te cechuje duża swoistość, co ogranicza straty naturalnej pożytecznej mikroflory oraz stosunkowo niewielka toksyczność w porównaniu do chemioterapeutyków, co wynika z ich nieskomplikowanej budowy. W związku z tym nie jest konieczne usuwanie preparatów z miejsc, w których działają [55]. W celu osiągnięcia właściwego działania fagów, dobrym rozwiązaniem jest izolacja z tego samego siedliska czy niszy co gospodarze, gdyż wtedy będą lepiej przystosowane do replikacji i przeżywania w wymaganych warunkach [22]. Bakteriofagi izolowano z różnorodnych produktów spożywczych, m.in. z mięsa (wołowina, kurczak), produktów fermentowanych (sery, jogurty), owoców morza (ostrygi, małże), czy nawet gotowych przetworzonych produktów, takich jak placki, ciasta, a nawet z pieczonego drobiu [55]. Fagi są tanie, łatwe do pozyskania i wytrzymałe na warunki występujące podczas przetwórstwa żywności [52,55]. Charakteryzuje je mała wrażliwość na zmiany temperatury i pH oraz rozpuszczalniki organiczne czy proteazy [52].

Bakteriofagi stosowane w ochronie żywności powinny spełniać wiele wymogów, a głównym z nich jest ich ścisła lityczność. Preparaty fagowe powinny być oczyszczone, pozbawione elementów pochodzących z bakterii, apirogenne oraz długo zachowywać aktywność biologiczną [29]. Nie można wykluczyć, że zanieczyszczenia obecne w takich preparatach mogą wpływać na wyniki badań. Biotechnologiczne metody oczyszczania biologicznych makrocząstek nie mogą być bezkrytycznie adaptowane do oczyszczania bakteriofagów [60]. W bakteriofagach namnażanych w bakteriach Gram-ujemnych (m.in. *Campylobacter*) istotnym zanieczyszczeniem jest obecność pirogenów (głównie lipopolisacharydu) [38]. Zróżnicowanie elementów budulcowych – wiele

rodzajów białek i kwas nukleinowy, nadaje nanocząstkom fagowym wiele zmiennych właściwości fizykochemicznych w różnych obszarach bakteriofaga [15,19]. Z tego powodu stosowanie popularnych chromatografii jonowymiennych znajduje ograniczone zastosowanie przekładające się na niskie wydajności izolacji bakteriofagów [9]. Obecnie są dostępne także inne metody usuwania pirogenów. Bakteriofagi mogą być oczyszczane przez precypitację glikolem polietylenowym w obecności niejonowego detergentu [10]. Innym rozwiązaniem jest wykorzystanie powinowactwa białek fagowych do endotoksyn, czego przykładem jest złoże EndoTrap [43]. Zastosowano również układy heterofazowe wykorzystujące logarytmiczne różnice współczynników podziału endotoksyn między fazą wodną a fazą niemieszających się z wodą rozpuszczalników organicznych [61].

Zastosowanie bakteriofagów przed rozpoczęciem procesu produkcyjnego może znacznie zmniejszyć prawdopodobieństwo skażenia obecnego w surowcu wyjściowym, a w czasie dalszej obróbki zapobiec wtórnemu zanieczyszczeniu produktu końcowego [42]. Zasadne jest stosowanie terapii fagowej w celu zmniejszenia liczby patogenów kolonizujących organizmy zwierząt konsumpcyjnych. Taką strategię powinno się stosować w produkcji podstawowej tuż przed ubojem lub w okresie wzrostu zwierząt, aby zmniejszyć prawdopodobieństwo zakażenia krzyżowego odchodami podczas przetwarzania żywności [49]. Niektóre bakteriofagi mogą być stosowane jako środki konserwacji żywności, ze względu na możliwość lizy komórek bakterii nawet w niskich temperaturach (1°C). Ogranicza to rozwój chorobotwórczych i gnilnych bakterii rozwijających się w żywności przechowywanej w lodówce, natomiast po przeniesieniu żywności do temperatury pokojowej fagi mogą limitować namnażanie bakterii [55]. Bardzo ważnym w wykorzystaniu fagów do zwalczania biologicznego patogenów było zatwierdzenie przez FDA (Agencję Żywności i Leków) i Unię Europejską mieszanki sześciu fagów oznaczonej jako LMP-102 do stosowania w „gotowym do spożycia” mięsie w celu ograniczenia zanieczyszczenia *L. monocytogenes* [36,46]. Następnym preparatem zatwierdzonym przez FDA jest produkt o nazwie Listex P100 [11]. W USA zastosowanie fagów ma charakter komercyjny. Firma Omnilytics dystrybuuje koktajle, np. produkt AgriPhage, który został zatwierdzony przez EPA (Agencję Ochrony Środowiska) i OMRI (Instytut Badań Materiałów Organicznych) do zwalczania bakteryjnych infekcji spowodowanych przez *Xanthomonas campestris* pv. *Vesicatoria* i plamistości pomidorów wywoływanej przez *Pseudomonas syringae* pv. *Tomatoe*, jako naturalny, bezpieczny i skuteczny [46]. Ważnym wykorzystaniem fagów wydaje się ich immobilizacja na modyfikowanych matrycach celulozowych stosowanych jako materiał opakowaniowy mający na celu redukcję mikroorganizmów z powierzchni żywności [2].

Stosowanie preparatów bakteriofagowych w ochronie żywności według niektórych badaczy niesie jednak pewne zagrożenia (m.in. sekwencje moronowe) [27].

W przypadku próby zwalczania biofilmów należy liczyć się z utrudnieniem w postaci różnorodności gatunkowej bakterii wchodzących w ich skład, a tym samym z koniecznością doboru kompetentnych bakteriofagów [55]. Ogólne przekonanie dotyczące bezpieczeństwa stosowania wirusów w celu ochrony produktów spożywczych, może się stać problemem w ich komercyjnym zastosowaniu. Wprawdzie bakteriofagi są wszechobecne w środowisku i nie zakażają kręgowców, nieporozumienia podobne do tych z wykorzystania napromieniowania żywności, mogą stanowić istotny problem w powszechnym stosowaniu do konserwacji produktów spożywczych [27].

FAGI PRZECIWKO *CAMPYLOBACTER*

Bakteriofagi swoiste wobec gatunków znanych obecnie, jako *C. coli* i *C. fetus* wyizolowano już w latach 60 XX w. od bydła i świń [14]. W przypadku naturalnych fagów przeciw *Campylobacter* u drobiu i w produktach drobiowych ich izolacja możliwa jest z 3-51% przebadanych próbek [20]. Większość fagów wyizolowano przez naniesienie na murawę szczepu *Campylobacter* na podłożu soft agar, przefiltrowanej zawiesiny. Po inkubacji możliwa jest obserwacja łyśinek. Miano bakteriofagów określa się w jednostkach tworzących łyśinki – PFU (plaque forming unit) na jednostkę objętości, masy, powierzchni itd. [14].

Fagi mogą kontrolować liczebność *Campylobacter*, nawet przy braku wzrostu bakteryjnego gospodarza, co może być tłumaczone zdolnością adsorpcji na powierzchni komórki i replikacji dopiero w chwili wzrostu aktywności metabolicznej bakterii [12]. Jednak w razie nadmiaru bakteriofagów wobec bakteryjnego gospodarza, duża liczba cząstek fagowych może doprowadzić do naruszenia ściany komórkowej, pęcznienia, a następnie dezintegracji komórki. Zjawisko to zwane jest „lizą z zewnątrz” [14]. Zastosowanie fagów w zwalczaniu zakażeń *C. jejuni* może być skuteczne tylko wtedy, jeśli fagi będą zdolne do infekowania różnorodnych populacji szczepów *C. jejuni* w jelitach drobiu oraz zanieczyszczonym mięsie [58]. Terapeutyczne fagi, które znajdują zastosowanie u drobiu muszą mieć cechy umożliwiające im przeżycie, takie jak stabilność w wyższych temperaturach (42°C – temperatura fizjologiczna kur), czy przy niskich wartościach pH (w zakresie 2-4) [29]. Wrażliwość na niskie pH wynika z białkowego charakteru kapsydu, dlatego podawanie bakteriofagów kurom jest możliwe dopiero dzięki zmieszaniu z antacydem (np. CaCO₃) [14]. Bakteriofagi mogą być podawane bezpośrednio albo jako dodatek do wody pitnej lub paszy w przypadku kontroli liczebności *Campylobacter* u drobiu [55].

Pojawienie się mutantów niewrażliwych na bakteriofagi długo było głównym powodem ograniczającym zastosowanie terapii fagowej [6]. Istnieją obawy, że terapia fagowa przeciw *Campylobacter* również przestanie być skuteczna [18]. W odróżnieniu od substancji chemioterapeutycznych (np. antybiotyki), fagi podlegają ciągłej ewolucji, aby zwalczać mechanizmy obronne ich gospodarzy [6].

Mimo że bakterie dość szybko nabywają oporności na właściwe im bakteriofagi, to cały proces osłabia ich adaptację środowiskową, co oznacza, że odporne na fagi bakterie mają zmniejszoną zdolność do kolonizowania przewodu pokarmowego [55]. Rozwój oporności na faga u *C. jejuni* jest związany ze zmianami w polisacharydach otoczkowych albo utratą ruchliwości, wskazując, że rzęski i polisacharydy otoczki mogą być głównymi receptorami fagów infekujących te bakterie [58]. Zjawisko można ograniczyć przez wykorzystanie preparatów zawierających koktajle z bakteriofagami, które działają na różne receptory na powierzchni bakterii [14]. Skuteczność takich mieszanin w opóźnianiu powstawania opornych szczepów wykazano w badaniach *in vitro* [42]. Niemniej jednak, jak do tej pory nie ma możliwości całkowitego zapobiegania powstawaniu opornych bakterii, w związku z tym wrażliwość na bakteriofagi powinna być ściśle monitorowana podczas każdorazowego stosowania preparatów fagowych [42].

Większość (95%) zbadanych fagów należy do jednego z trzech morfotypów: *Siphoviridae* (z długimi i często elastycznymi ogonkami), *Podoviridae* (o przysadzistych ogonkach) oraz *Myoviridae* (przytwierdzone do podstawki ogonki zbudowane z wewnętrznej rurki i zewnętrznego kurczliwego płaszczka) [36]. Fagi przeciw *Campylobacter* należą głównie do rodziny *Myoviridae*; charakteryzują się ikosaedralnymi główkami (penta- i heksagonalne kapsydy) oraz kurczliwymi ogonkami. Mają szyjki, lecz nie zawierają kołnierzyków i wyraźnej podstawki, a włókienka są cienkie i krótkie [18,30]. W Wielkiej Brytanii przebadano 16 fagów przeciw *Campylobacter* należących do rodziny *Myoviridae* i podzielono na trzy grupy, co stanowi podstawę ich obecnej klasyfikacji (tab.1) [51]. Największą różnicą między fagami grupy II i III jest długość ogonka, choć występują także niewidoczne różnice (ryc.2) [30]. Doniesienia z Rosji opisują także bakteriofagi należące do *Siphoviridae* i *Podoviridae*, ale charakterystyka tych fagów jest mało znana [14].

Mimo że kilka przedsiębiorstw zadeklarowało opracowanie produktów opartych o fagi przeciw *Campylobacter* (wliczając w to Intralytix, GangaGen i Microos), to do 2013 r. produkty takie nie pojawiły się jeszcze na rynku [29] i wciąż nie znajdują się w ofercie handlowej. Niemniej jednak w ostatnich latach opublikowano badania dotyczące zastosowania bakteriofagów przeciw bakteriom z rodzaju *Campylobacter* (zwłaszcza *C. jejuni*) [4,7,12,18,20,24,34,37,47,57,63].

Szacuje się, że redukcja *Campylobacter* w tuszach drobiowych o dwie jednostki logarytmiczne jest wystarczająca do 30-krotnego zmniejszenia częstości występowania kamylobakteriozy u ludzi [18]. Atterbury i wsp. stosowali fagi w celu zmniejszenia liczebności *C. jejuni* na skórze kurczaka w temperaturze 4 i -20°C. W badaniach tych najwyższe miano faga (10⁷ PFU/ml) dało najbardziej obiecujące wyniki. Uzyskano redukcję bakterii o 1 jednostkę logarytmiczną w próbkach przechowywanych w temp. 4°C i o 2,5 jednostki logarytmicznej w próbkach



Tabela 1. Klasyfikacja fagów przeciw *Campylobacter*

Grupa	Średnia wielkość genomu (kbp)	Średnia średnica główki (nm)	Bakteriofag	Źródło
I	320	143	CP220	[18]
			phiCcolBB35	
II	184	99	phiCcolBB37	[12]
			phiCcolBB12	
			NCTC 12684	[47]
			NCTC 12672	[20,34,51]
			NCTC 12673	[20,24,34,51]
			NCTC 12674 (φ2)	[4,5,20,34,51]
			NCTC 12678	[20,34,51]
III	138	100	NCTC 12669	[51,63]
			NCTC 12671	
			CP8	[37,57]
			CP34	[37]
			CP30	[53,57]
			CP81	[47]

Podział według rozmiaru genomu i średnicy główki [51]; zgodnie z tą klasyfikacją podzielono fagi użyte w badaniach redukcji *Campylobacter*

przechowywanych przy -20°C [4]. W innych badaniach zaszczepienie skóry kurczaka *C. jejuni* o mianie 10^4 CFU/ml i późniejsze podanie faga (10^6 PFU/cm² powierzchni) spowodowało 95% redukcję liczby *C. jejuni* [24]. W badaniach prowadzonych przez Wagenaara i wsp., fagi podawano przez 6 dni, zaczynając od 5 dnia po kolonizacji bakteryjnej. Wstępnie wyniki wskazywały na redukcję liczby *Campylobacter* w jelicie ślepym o 3 jednostki logarytmiczne, która po 5 dniach ustabilizowała się do redukcji o 1 jednostkę logarytmiczną [63]. Badania prowadzone przez Loc Carrillo i wsp. opisywały redukcję liczebności *C. jejuni* w zawartości kątnicy w grupie brojlerów leczonych fagami przez 5 dni o 5 jednostek logarytmicznych. Wyizolowano odporne bakterie, które po przeprowadzeniu analizy powróciły do wrażliwego fenotypu [37]. El-Shibiny i wsp. zbadali działanie faga należącego do grupy II. Po 24 h od podania dawki 10^7 PFU bakteriofagów w 1 ml zaobserwowano redukcję liczby *C. jejuni* w jelicie ślepym oraz dolnych i górnych jelitach prawie o 2 jednostki logarytmiczne. W celu osiągnięcia podobnej redukcji *C. coli* używając tego samego faga niezbędne było zastosowanie dawki 10^9 PFU/ml. Częstość występowania oporności na fagi u *C. jejuni* po zastosowaniu dawki 10^9 PFU/ml oszacowano na 2% [18]. Koktajl fagowy zastosowany przez Carvalho i wsp. zmniejszył miano *C. coli* i *C. jejuni* również prawie o 2 jednostki logarytmiczne przy podawaniu przez zgłębnik i w paszy. Redukcja nastąpiła szybciej po podaniu w paszy, co wskazuje, że taki sposób podania jest skuteczniejszy. Niestety odporne szczepy, których częstość występowania wyniosła 13%, nie wykazywały zmniejszonej zdolności do kolonizowania kurzych jelit ani nie powróciły do wrażliwego fenotypu [12]. Badania dotyczące wyko-

rzystania bakteriofagów były prowadzone nie tylko na drobiu. Bigwood i wsp. badali wpływ bakteriofagów na zanieczyszczenie gotowanej i surowej wołowiny m.in. przez *C. jejuni*. Mięso inkubowano w temp. 5 i 24°C symulując w ten sposób warunki przechowywania w lodówce i temperaturze pokojowej. Po 24 h inkubacji stwierdzono redukcję bakterii o ponad 2 jednostki logarytmiczne na 1 cm² powierzchni zarówno w mięsie gotowanym jak i surowym. Użyty przeciw *C. jejuni* fag miał jednak za mały zakres gospodarzy, by mógł samodzielnie znaleźć potencjalne zastosowanie do kontroli liczebności patogenów [7]. Przeprowadzono również badania z zastosowaniem bakteriofagów, które miały na celu sprawdzenie ich skuteczności w biofilmach. Stwierdzono, że zoptymalizowanie warunków umożliwiła opłacalną redukcję bakterii, umożliwiając zastosowanie bakteriofagów w procesie biosanitacji powierzchni w przemyśle spożywczym. Badane fagi zmniejszyły liczbę *Campylobacter* w warunkach mikroaerofilnych o 1-3 jednostki logarytmiczne. Jednak wśród bakterii, które przeżyły 84% wykazywało oporność na fagi zastosowane w tym badaniu [57]. Niemniej jednak nie wszystkie próby zastosowania bakteriofagów w walce z *Campylobacter* okazują się udane. Orquera i wsp. używali dwóch fagów przeciw *Campylobacter* należących odpowiednio do grupy II i III. W temperaturze 37°C uzyskano redukcję *Campylobacter* o 1-2 jednostek logarytmicznych, lecz w 4°C fagi nie zredukowały liczby bakterii [47].

Badania przeprowadzone na grupie 88 kur, którym podawano pojedynczego faga lub koktajl czterech fagów dowiodły, że zastosowanie koktajlu było tylko nieznacznie lepsze od pojedynczego faga, lecz opóźniło

pojawienie się oporności. Obecność fagów w poszczególnych stadach średnio zmniejszyła liczbę *Campylobacter* o 1,8 jednostki logarytmicznej [20]. Pierwsze szeroko zakrojone badania w warunkach *in vivo* przeprowadzili Kittler i wsp. na trzech komercyjnych fermach kurzych. Koktajl fagowy podawano w wodzie pitnej. Po jednym dniu od podania fagów, liczebność *Campylobacter* w próbkach odchodów w jednej z grup spadła poniżej granicy wykrywalności. Po uboju uzyskano redukcję bakterii w zawartości jelita ślepego o 3,2 jednostki logarytmiczne [34]. Badania prowadzone w Wielkiej Brytanii przez grupę Iana Franka Connerton na dezynfekcję artykułów spożywczych z wykorzystaniem bakteriofagów (CP8 i CP34) skierowanych przeciwko *Campylobacter* zaowocowały patentem PL/EP 1662888. Uzyskano spadek liczebności bakterii o 2-5 jednostek logarytmicznych w zależności od zastosowanego bakteriofaga, jego miana oraz analizowanego odcinka przewodu pokarmowego kur [13].

PODSUMOWANIE

Wzrost liczby zachorowań w wyniku zakażeń bakteriami z rodzaju *Campylobacter* oraz ograniczenia nakładane przez Unię Europejską dotyczące masowego stosowania antybiotyków spowodowały konieczność znalezienia alternatywnej i bezpiecznej metody ograniczenia liczebności patogenów w żywności. Bakteriofagi spełniały wszystkie kryteria, jednak nastanie ery antybiotyków i wygoda ich stosowania na wiele lat wstrzymała badania nad terapią fagową. Obecnie, gdy większość antybiotyków powoduje masowe pojawianie się szczepów opornych powraca się do fagów. Fagi, jako naturalne i wszechobecne w środowisku „drapieżniki”

bakterii, które charakteryzują się unikalnymi zaletami w porównaniu do antybiotyków i replikują się tylko w wybranej grupie bakterii, nie naruszają naturalnej równowagi flory jelitowej, a ich liczba ulega samoograniczeniu w zależności od liczebności bakterii. Koncepcja zwalczania patogenów w żywności za pomocą fagów może być wprowadzona na wszystkich etapach produkcji w tzw. klasycznym podejściu „od pola do stołu”. Bakteriofagi są korzystne, gdyż zapobiegają namnażaniu lub zmniejszają liczebność bakterii patogennych kolonizujących organizmy zwierząt hodowlanych. Jednak stosowanie bakteriofagów na terenie Unii Europejskiej wiąże się z koniecznością rozróżnienia schematu ich wykorzystania między niedozwolonymi dodatkami do żywności a dozwolonymi preparatami pomocnymi w procesie jej przetwarzania. Na szczególną uwagę zasługują fagi przeciw *Campylobacter*, ze względu na ich duże powinowactwo do przewodu pokarmowego drobiu. Bakteriofagi są wykorzystywane do odkażania tusz i innych surowych produktów, dezynfekcji powierzchni, przedłużania okresu trwałości łatwo psujących się produktów spożywczych oraz jako naturalne konserwanty. Dostępne są już komercyjne preparaty fagowe stosowane w rolnictwie i przetwórstwie żywności. Jednak mimo obiecujących wyników badań, jeszcze nie wprowadzono preparatów do zwalczania *Campylobacter* opartych o fagi.

PODZIĘKOWANIA

Dziękujemy kierownikowi Zakładu Mikrobiologii Klinicznej Wojewódzkiego Szpitala Specjalistycznego im. NMP w Częstochowie, Pani Elżbiecie Maćkowiak za udzielone wsparcie merytoryczne.

PIŚMIENNICTWO

- [1] Abedon S.T., Thomas-Abedon C., Thomas A., Mazure H.: Bacteriophage prehistory: is or is not Hankin, 1896, a phage reference? *Bacteriophage*, 2011; 1: 174-178
- [2] Anany H., Chen W., Pelton r., Griffiths M.W.: Biocontrol of *Listeria monocytogenes* and *Escherichia coli* O157:H7 in meat by using phages immobilized on modified cellulose membranes. *Appl. Environ. Microbiol.*, 2011; 77: 6379-6387
- [3] Ashelford K.E., Day M.J., Fry J.C.: Elevated abundance of bacteriophage infecting bacteria in soil. *Appl. Environ. Microbiol.*, 2003; 69: 285-289
- [4] Atterbury r.J., Connerton P.L., Dodd C.E., Rees C.E., Connerton I.F.: Application of host-specific bacteriophages to the surface of chicken skin leads to a reduction in recovery of *Campylobacter jejuni*. *Appl. Environ. Microbiol.*, 2003; 69: 6302-6306
- [5] Atterbury r.J., Connerton P.L., Dodd C.E., Rees C.E., Connerton I.F.: Isolation and characterization of *Campylobacter* bacteriophages from retail poultry. *J. Appl. Microbiol.*, 2003; 69: 4511-4518
- [6] Atterbury r.J., Van Bergen M.A., Ortiz F., Lovell M.A., Harris J.A., De Boer A., Wagenaar J.A., Allen V.M., Barrow P.A.: Bacteriophage therapy to reduce *Salmonella* colonization of broiler chickens. *Appl. Environ. Microbiol.*, 2007; 73: 4543-4549
- [7] Bigwood T., Hudson J.A., Billington C., Carey-Smith G.V., Heine-mann J.A.: Phage inactivation of foodborne pathogens on cooked and raw meat. *Food Microbiol.*, 2008; 25: 400-406
- [8] Billington C., Hudson J.A., D'Sa E.: Prevention of bacterial food-borne disease using nanobiotechnology. *Nanotechnol. Sci. Appl.*, 2014; 7: 73-83
- [9] Boratyński J., Syper D., Weber-Dąbrowska B., Łusiak-Szelachowska M., Poźniak G., Górski A.: Preparation of endotoxin-free bacteriophages. *Cell. Mol. Biol. Lett.*, 2004; 9: 253-259
- [10] Branston S.D., Wright J., Keshavarz-Moore E.: A non-chromatographic method for the removal of endotoxins from bacteriophages. *Biotechnol. Bioeng.*, 2015; 112: 1714-1719
- [11] Carlton r.M., Noordman W.H., Biswas B., de Meester E.D., Loessner M.J.: Bacteriophage P100 for control of *Listeria monocytogenes* in foods: genome sequence, bioinformatic analyses, oral toxicity study, and application. *Regul. Toxicol. Pharmacol.*, 2005; 43: 301-312
- [12] Carvalho C.M., Gannon B.W., Halfhide D.E., Santos S.B., Hayes C.M., Roe J.M., Azeredo J.: The *in vivo* efficacy of two administration routes of a phage cocktail to reduce numbers of *Campylobacter coli* and *Campylobacter jejuni* in chickens. *BMC Microbiol.*, 2010; 10: 232
- [13] Connerton I.F.: Dezynfekcja artykułów spożywczych. PL/EP



1662888. Europejski Biuletyn Patentowy 2012/35

- [14] Connerton P.L., Timms A.R., Connerton I.F.: *Campylobacter* bacteriophages and bacteriophage therapy. *J. Appl. Microbiol.*, 2011; 111: 255-265
- [15] Dąbrowska K., Miernikiewicz P., Piotrowicz A., Hodyra K., Owczarek B., Lecion D., Kaźmierczak Z., Letarov A., Górski A.: Immunogenicity studies of proteins forming the T4 phage head surface. *J. Virol.*, 2014; 88: 12551-12557
- [16] EFSA, ECDC: The European Union summary report on trends and sources of zoonoses, zoonotic agents and food-borne outbreaks in 2012. *EFSA J.*, 2014; 12: 3547
- [17] EFSA, ECDC: The European Union summary report on trends and sources of zoonoses, zoonotic agents and food-borne outbreaks in 2013. *EFSA J.*, 2015; 13: 3991
- [18] El-Shibiny A., Scott A., Timms A., Metawea Y., Connerton P., Connerton I.: Application of a group II *Campylobacter* bacteriophage to reduce strains of *Campylobacter jejuni* and *Campylobacter coli* colonizing broiler chickens. *J. Food Prot.*, 2009; 72: 733-740
- [19] Figura G., Budynek P., Dąbrowska K.: Bakteriofag T4: molekularne aspekty infekcji komórki bakteryjnej, rola białek kapsydowych. *Postępy Hig. Med. Dośw.*, 2010; 64: 251-261
- [20] Fischer S., Kittler S., Klein G., Glünder G.: Impact of a single phage and a phage cocktail application in broilers on reduction of *Campylobacter jejuni* and development of resistance. *PLoS One*, 2013; 8: e78543
- [21] Fortier L.C., Sekulovic O.: Importance of prophages to evolution and virulence of bacterial pathogens. *Virulence*, 2013; 4: 354-365
- [22] Garcia P., Martinez B., Obeso J.M., Rodriguez A.: Bacteriophages and their application in food safety. *Lett. Appl. Microbiol.*, 2008; 47: 479-485
- [23] Garénaux A., Jugiau F., Rama F., de Jonge r., Denis M., Federighi M., Ritz M.: Survival of *Campylobacter jejuni* strains from different origins under oxidative stress conditions: effect of temperature. *Curr. Microbiol.*, 2008; 56: 293-297
- [24] Goode D., Allen V.M., Barrow, P.A.: Reduction of experimental *Salmonella* and *Campylobacter* contamination of chicken skin by application of lytic bacteriophages. *Appl. Environ. Microbiol.*, 2003; 69: 5032-5036
- [25] Goodridge L.D.: Bacteriophage biocontrol of plant pathogens: fact or fiction? *Trends Biotechnol.*, 2004; 22: 384-385
- [26] Hagens S., Loessner M.J.: Phages of *Listeria* offer novel tools for diagnostics and biocontrol. *Front. Microbiol.*, 2014; 5: 159
- [27] Higgins J.P., Higgins S.E., Guenther K.L., Huff W., Donoghue A.M., Donoghue D.J., Hargis B.M.: Use of a specific bacteriophage treatment to reduce *Salmonella* in poultry products. *Poult. Sci.*, 2005; 84: 1141-1145
- [28] Hodyra K., Dąbrowska K.: Molecular and chemical engineering of bacteriophages for potential medical applications. *Arch. Immunol. Ther. Exp.*, 2015; 63: 117-127
- [29] Janež N., Loc-Carrillo C.: Use of phages to control *Campylobacter* spp. *J. Microbiol. Methods*, 2013; 95: 68-75
- [30] Javed M.A., Ackermann H.W., Azeredo J., Carvalho C.M., Connerton I., Evoy S., Hammerl J.A., Hertwig S., Lavigne r., Singh A., Szymanski C.M., Timms A., Kropinski A.M.: A suggested classification for two groups of *Campylobacter* myoviruses. *Arch. Virol.*, 2014; 159: 181-190
- [31] Jordan K., Dalmaso M., Zentek J., Mader A., Bruggeman G., Wallace J., De Medici D., Fiore A., Prukner-Radovic E., Lukac M., Axelsson L., Holck A., Ingmer H., Malakauskas M.: Microbes versus microbes: control of pathogens in the food chain. *J. Sci. Food Agric.*, 2014; 94: 3079-3089
- [32] Kalkan S., Ünal E., Erginkaya Z.: Bio-control of some food-borne pathogenic bacteria by bacteriophage. *J. Food Eng.*, 2001; 1: 237-244
- [33] Keener K.M., Bashor M.P., Curtis P.A., Sheldon B.W., Kathariou S.: Comprehensive review of *Campylobacter* and poultry processing. *Compr. Rev. Food Sci. Food Saf.*, 2004; 3: 105-116
- [34] Kittler S., Fischer S., Abdulmawjood A., Glünder G., Klein G.: Effect of bacteriophage application on *Campylobacter jejuni* loads in commercial broiler flocks. *Appl. Environ. Microbiol.*, 2013; 79: 7525-7533
- [35] Koolman L., Whyte P., Meade J., Lyng J., Bolton D.: Use of chemical treatments applied alone and in combination to reduce *Campylobacter* on raw poultry. *Food Contr.*, 2014; 46: 299-303
- [36] Kutter E.M., Gvasalia G., Alavidze Z., Brewster E.: Phage therapy. W: *Biotherapy - History, principles and practice: a practical guide to the diagnosis and treatment of disease using living organisms*, red.: M. Grassberger, Springer, 2013, 191-231
- [37] 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
- [38] Lodowska J., Wolny D., Węglarz L., Dzierżewicz Z.: Heterogenność strukturalna lipidu A bakterii Gram-ujemnych. *Postępy Hig. Med. Dośw.*, 2007; 61: 106-121
- [39] Małek W., Wdowiak-Wróbel S., Kalita M., Święcicka I., Studzińska B.: Wpływ produktów kodowanych przez sekwencje moronowe fagów na wirulencję bakterii powszechnie izolowanych z materiałów klinicznych. *Postępy Mikrobiol.*, 2005; 44: 329-339
- [40] Mandal S.M., Roy A., Ghosh A.K., Hazra T.K., Basak A., Franco O.L.: Challenges and future prospects of antibiotic therapy: from peptides to phages utilization. *Front. Pharmacol.*, 2014; 5: 1-12
- [41] Martinez-Castillo A., Muniesa M.: Implications of free Shiga toxin-converting bacteriophages occurring outsider bacteria for the evolution and the detection of Shiga toxin-producing *Escherichia coli*. *Front. Cell. Infect. Microbiol.*, 2014; 4: 46
- [42] Maura D., Debarbieux L.: Bacteriophages as twenty-first century antibacterial tools for food and medicine. *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 2011; 90: 851-859
- [43] Miernikiewicz P., Owczarek B., Piotrowicz A., Boczkowska B., Rzewucka K., Figura G., Letarov A., Kulikov E., Kopciuch A., Światała-Jeleń K., Oślizło A., Hodyra K., Gubernator J., Dąbrowska K.: Recombinant expression and purification of T4 phage Hoc, Soc, gp23, gp24 proteins in native conformations with stability studies. *PLoS One*, 2012; 7: e38902
- [44] Murphy C., Carroll C., Jordan K.N.: Environmental survival mechanisms of the foodborne pathogen *Campylobacter jejuni*. *J. Appl. Microbiol.*, 2006; 100: 623-632
- [45] Nur Ilida M., Faridah M.S.: Prevalence of *Campylobacter jejuni* in chicken meat and chicken-based products. *J. Trop. Agric. Food Sci.*, 2012; 40: 63-69
- [46] O'Flaherty S., Ross r.P., Coffey A.: Bacteriophage and their lysins for elimination of infectious bacteria. *FEMS Microbiol. Rev.*, 2009; 33: 801-819
- [47] Orquera S., Gözl G., Hertwig S., Hammerl J., Sparborth D., Joldic A., Alter T.: Control of *Campylobacter* spp. and *Yersinia enterocolitica* by virulent bacteriophages. *J. Mol. Genet. Med.*, 2012; 6: 273-278
- [48] Rokosz N., Rastawicki W., Wołkiewicz T.: Mikrobiologiczna diagnostyka zakażeń wywołanych przez pałeczki *Campylobacter jejuni* i *Campylobacter coli* u ludzi. *Postępy Hig. Med. Dośw.*, 2014; 68: 48-56
- [49] Rosenquist H., Nielsen N.L., Sommer H.M., Nørrung B., Christensen B.B.: Quantitative risk assessment of human campylobacteriosis associated with thermophilic *Campylobacter* species in chickens. *Int. J. Food Microbiol.*, 2003; 83: 87-103
- [50] Roszniowski B., Łątka A., Drulis-Kawa Z.: Zastosowanie bioinformatyki w fagoterapii – jak uczynić terapię fagową bezpieczną? *Laboratorium*, 2015; 9-10: 50-55

- [51] Sails A.D., Wareing D.R., Bolton F.J., Fox A.J., Curry A.: Characterisation of 16 *Campylobacter jejuni* and *C. coli* typing bacteriophages. *J. Med. Microbiol.*, 1998; 47: 123-128
- [52] Schmelcher M., Loessner M.J.: Application of bacteriophages for detection of foodborne pathogens. *Bacteriophage*, 2014; 4: e28137
- [53] Scott A.E., Timms A.R., Connerton P.L., El-Shibiny A., Connerton I.F.: Bacteriophage influence *Campylobacter jejuni* types populating broiler chickens. *Environ. Microbiol.*, 2007; 9: 2341-2353
- [54] Sheppard S.K., Jolley K.A., Maiden M.C.: A gene-by-gene approach to bacterial population genomics: whole genome MLST of *Campylobacter*. *Genes*, 2012; 3: 261-277
- [55] Sillankorva S.M., Oliveira H., Azeredo J.: Bacteriophages and their role in food safety. *Int. J. Microbiol.*, 2012; 2012: 863945
- [56] Silva J., Leite D., Fernandes M., Mena C., Gibbs P.A., Teixeira P.: *Campylobacter* spp. as a foodborne pathogen: a review. *Front. Microbiol.*, 2011; 2: 200
- [57] Siringan P., Connerton P.L., Payne r.J., Connerton I.F.: Bacteriophage-mediated dispersal of *Campylobacter jejuni* biofilms. *Appl. Environ. Microbiol.*, 2011; 77: 3320-3326
- [58] Sørensen M.C., Gencay Y.E., Birk T., Baldvinsson S.B., Jäckel C., Hammerl J.A., Vegge C.S., Neve H., Brøndsted L.: Primary isolation strain determines both phage type and receptors recognised by *Campylobacter jejuni* bacteriophages. *PLoS One*, 2015; 10: e0116287
- [59] Sulakvelidze A., Alavidze Z., Morris J.G.Jr.: Bacteriophage therapy. *Antimicrob. Agents Chemother.*, 2001; 45: 649-659
- [60] Szermer-Olearnik B., Boratyński J.: Bakteriofagi – nanocząstki o szerokich zastosowaniach. *Chemik*, 2014; 68: 761-765
- [61] Szermer-Olearnik B., Boratyński J.: Removal of endotoxins from bacteriophage preparations by extraction with organic solvents. *PLoS One*, 2015; 10: e0122672
- [62] Tang J.Y., Mohamad Ghazali F., Saleha A.A., Nishibuchi M., Son r.: Comparison of thermophilic *Campylobacter* spp. occurrence in two types of retail chicken samples. *Int. Food Res. J.*, 2009; 16: 277-288
- [63] Wagenaar J.A., Van Bergen M.A., Mueller M.A., Wassenaar T.M., Carlton r.M.: Phage therapy reduces *Campylobacter jejuni* colonization in broilers. *Vet. Microbiol.*, 2005; 109: 275-283
- [64] Whitman W.B., Coleman D.C., Wiebe W.J.: Prokaryotes: the unseen majority. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 1998; 95: 6578-6583
- [65] Woźniak A., Wieliczko A.: Tetracycline, erythromycin, and gentamicin resistance of *Campylobacter jejuni* and *Campylobacter coli* isolated from poultry in Poland. *Bull. Vet. Inst. Pulawy*, 2011; 55: 51-54
- [66] Yun J., Jeon B., Barton Y.W., Plummer P., Zhang Q., Ryu S.: Role of the DksA-like protein in the pathogenesis and diverse metabolic activity of *Campylobacter jejuni*. *J. Bacteriol.*, 2008; 190: 4512-4520
- [67] Zabłotni A., Jaworski A.: Źródła antybiotyków w środowiskach naturalnych i ich rola biologiczna. *Postępy Hig. Med. Dośw.*, 2014; 68: 1040-1049

Autorzy deklarują brak potencjalnych konfliktów interesów.

