

# Bacteriofaagtherapie

Sake van Wageningen

P-UB-2001-03

**Wetenschapswinkel Biologie**

*Leerstoelgroep Microbiologie, Universiteit Utrecht*

# Bacteriofaagtherapie

*Het gebruik van virussen tegen bacteriële infecties*

Sake van Wageningen

*Wetenschapswinkel Biologie*

*Leerstoelgroep Microbiologie, Universiteit Utrecht*

**Juni 2001**

*P-UB-2001-03*

*Rapportnummer:* P-UB-2001-03  
*ISBN:* 90-5209-112-9  
*Prijs:* f 15,00 / € 6,90  
*Verschenen:* juni 2001  
*Druk:* eerste  
*Titel:* **Bacteriofaagtherapie**  
Het gebruik van virussen tegen bacteriële infecties  
*Auteur:* Sake van Wageningen  
*Uitgever:* Wetenschapswinkel Biologie, Universiteit Utrecht  
*Begeleider:* Dr. W. Bitter, Microbiologie, Universiteit Utrecht  
*Projectcoördinator:* Drs. S. Verheijen, Wetenschapswinkel Biologie, Universiteit Utrecht  
*Opdrachtgever:* Stichting Bacteriofagen  
*Illustratie omslag:* Sake van Wageningen  
*Vormgeving:* Marjolein Kortbeek, Beeldverwerking en Vormgeving, Universiteit Utrecht  
*Reproductie:* Repro FSB, Universiteit Utrecht

Doubts enfeebled him. Perhaps the X principle would develop only in the test-tube; perhaps it had no large value for human healing. He wanted to know - to *know*.

*Arrowsmith* in de gelijknamige roman van Sinclair Lewis.

## Reincultuur

Waar bleef van u het laatste om te zijn;  
aangrijpingspunt voor de gedachten,  
opdat een wet u zou betrachten,  
al was het dan voorlopig in het klein;

uw wezen overheersen, uw kern  
bereiken en u iemand achten  
om op een afspraak te verwachten,  
of werden u partikelen te fijn?

Werkhypothese aan uw komst besteed...  
Ik heb laboratoria gereed.  
In reïnculturen reageert gij wel.

Is het de schuld van deze dove uren,  
dat gij de krachten niet kunt overduren,  
die in de kolven kloppen als een bel?

Gerrit Achterberg

# Inhoudsopgave

	<b>Voorwoord</b>	<b>7</b>
	<b>Samenvatting</b>	<b>9</b>
<b>1</b>	<b>Inleiding</b>	<b>10</b>
1.1	Algemene inleiding en leeswijzer	10
1.2	Geschiedenis van het bacteriofaag onderzoek	10
<b>2</b>	<b>De bacteriofaag</b>	<b>14</b>
2.1	Uiterlijk en levenscyclus van een virus	14
2.2	Bacteriofaag morfologie	17
2.3	Lysogenie	18
2.4	Resistentie	18
<b>3</b>	<b>Faagtherapie bij dieren</b>	<b>19</b>
<b>4</b>	<b>Faagtherapie bij mensen</b>	<b>28</b>
<b>5</b>	<b>Faagtherapie bij planten</b>	<b>32</b>
<b>6</b>	<b>Theoretische analyse</b>	<b>33</b>
<b>7</b>	<b>Discussie</b>	<b>35</b>
7.1	Waarom stopt onderzoek naar faagtherapie rond 1940?	35
7.2	Waarom komt onderzoek naar bacteriofagen terug?	35
7.3	Hoe stevig is de wetenschappelijke basis voor het slagen van faagtherapie?	36
7.4	Faagpreparaten, verleden en toekomst	37
7.5	Voordelen en beperkingen bij het gebruik van bacteriofagen als medicijn	37
7.6	Selectie- en modificatiecriteria van de superfaag	38
7.7	Onderzoek en toepassingen	38
	<b>Literatuur</b>	<b>40</b>
	<b>Begrippenlijst</b>	<b>44</b>



# Voorwoord

Dit rapport dient meerdere heren. Het is een afstudeerscriptie binnen de opleiding Biologie van de Universiteit Utrecht. Maar zonder de vraag vanuit de Stichting Bacteriofagen had ze het levenslicht niet aanschouwd. Laat staan als ik de blijvende interesse van Wilma Plooij -mijn contactpersoon bij deze stichting- had moeten missen.

De Wetenschapswinkel Biologie diende als thuishaven met als vaste steun en toeverlaat Sonja Verheijen.

Volgende dank ben ik verschuldigd aan mijn inhoudelijk begeleider dr. W. Bitter. Net zoals dr. E. Schippers van het Academisch Ziekenhuis Leiden, met wie ik een ochtend hartelijk mocht discussiëren over faagtherapie en superfagen.

Tot slot gaat mijn bijzondere dank naar dr. Beata Weber-Dabrowska die bereid was mij te ontvangen op haar instituut in Wroclaw, Polen.

Utrecht, lente 2001

Sake van Wageningen





# Samenvatting

Rond 1920 wordt in Parijs een mysterieuze factor ontdekt. Wanneer deze factor in het laboratorium toegevoegd wordt aan kolven met daarin bacterieculturen worden de bacteriën vernietigd. Zeer spoedig na deze ontdekking proberen onderzoekers deze factor te gebruiken om bacteriële infecties te bestrijden. De therapie blijkt echter niet altijd succes op te leveren. Na gemengde resultaten en de opkomst van de antibiotica verdwijnt de interesse in deze therapie.

Pas na 1940 wordt onomstotelijk duidelijk dat de mysterieuze factor een virus is. Dit virus behoudt de naam die het rond 1920 kreeg: de bacteriofaag. Eén van de redenen dat bacteriofaagtherapie niet slaagde was het gebrek aan inzicht in de eigenschappen van het virus. Een tweede reden was dat in het meeste onderzoek de controlegroep ontbrak. Het bleef onduidelijk of bacteriofaagtherapie effectief zou kunnen zijn. Op dit moment zijn er vele bacteriesoorten die resistent zijn tegen meerdere, of bijna alle antibiotica. Deze resistentie levert soms levensbedreigende situaties op. Recent onderzoek in diermodellen toont aan dat bacteriofaagtherapie een alternatief bij de behandeling van bacteriële infecties zou kunnen zijn. Alhoewel de experimentele data beperkt zijn, wordt in verschillende studies aangetoond dat de toediening van bacteriofagen aan dieren die experimenteel geïnfecteerd zijn met een bekende bacteriële ziekteverwekker een effectief middel is tegen ziekte-ontwikkeling. Soms is de bacteriofaagtherapie zelfs succesvoller dan verschillende antibioticatherapieën. Daarnaast zijn in de literatuur studies te vinden die aangeven hoe de effectiviteit van bacteriofaagtherapie nog verbeterd zou kunnen worden.

Toepassing van bacteriofaagtherapie bij mensen wordt alleen beschreven in een serie artikelen uit Oost-Europa. Deze geven alle een positief beeld van deze therapie, alhoewel de wetenschappelijke hardheid (controle experimenten, gebruikte dosis) van deze artikelen te wensen over laat. De conclusie van dit literatuuronderzoek is dat bacteriofaagtherapie ter bestrijding van microbiële infecties zeker mogelijkheden biedt. De verwachte toepassingen liggen echter niet direct in de grootschalige productie van kant-en-klare preparaten voor de consument; antibiotica blijven de eerste keuze voor de behandeling van bacteriële infecties vanwege hun brede werkingspectrum en hun effectiviteit. Het gebruik van bacteriofagen zou wel een goede rol kunnen spelen bij de behandeling van bacteriële infecties in het ziekenhuis die niet, of moeilijk, te bestrijden zijn met antibiotica.

# Inleiding

## 10 1.1 Algemene inleiding en leeswijzer

Dit rapport is geschreven in opdracht van de Stichting Bacteriofagen. De stichting heeft de Wetenschapswinkel Biologie benaderd voor een inventariserend onderzoek naar de mogelijkheden van bacteriofagen als medische toepassing. De stichting hoopt met het onderzoek meer bekendheid te geven aan de mogelijkheden van het gebruik van bacteriofagen.

Dit rapport probeert antwoord te geven op de vragen wat de potentie van bacteriofagen als therapeuticum is en waarom deze potentie nog niet ten volle is uitgebuit. Het hoopt een volledige inventarisatie te zijn van de Engelstalige publicaties die de afgelopen dertig jaar over bacteriofaagtherapie verschenen zijn. Tevens worden enkele reviews behandeld van de oudere literatuur en uit het Pools en Russisch vertaalde artikelen.

Dit rapport begint met het verhaal van de ontdekking en de ontdekker van de bacteriofaag. In hoofdstuk 2 wordt ingegaan op wat een bacteriofaag/virus is en bevat voor de geïnteresseerde een intermezzo waarin wordt ingegaan op de moleculaire biologie van een virus. Hoofdstuk 3, 4 en 5 zijn een inventarisatie van de wetenschappelijke publicaties die verschenen zijn over onderzoek naar bacteriofaagtherapie bij dieren, mensen en planten en zijn naar auteur en jaartal gerangschikt. Hoofdstuk 6 geeft een samenvatting van een tweetal theoretische analyses van bacteriofaagtherapie. Hoofdstuk 7 is een discussie over het waarom van het verdwijnen van bacteriofaagtherapie, het terugkomen van onderzoek en de potentie van bacteriofaagtherapie. Achter in dit rapport bevindt zich een literatuur- en begrippenlijst.

## 1.2 Geschiedenis van het bacteriofaag onderzoek

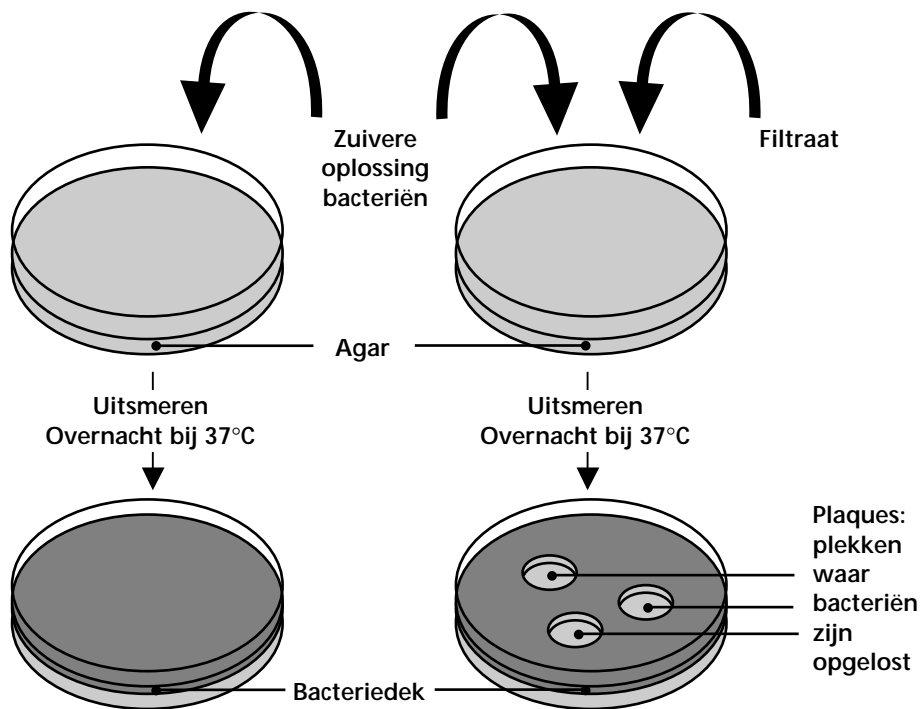
Eén naam markeert het beginpunt van het onderzoek naar bacteriofagen: Felix d'Herelle (1873-1949), een arts/microbioloog die met zijn ontdekking een fundament heeft gelegd voor één van de meest bloeiende takken van de natuurwetenschappen: de moleculaire biologie.

D'Herelle wordt geboren in Montreal. Een biografie over zijn wetenschappelijke leven is geschreven door Summers [1998]. Felix d'Herelles vader is Frans-Canadees en zijn moeder Nederlands. Naast dit internationale genenpakket zou ook zijn leefomgeving bestaan uit zeer veel verschillende plekken op de wereld.

Zijn vroege scholing bestaat zover bekend uit chemie en medicijnen, maar hij behaalt geen officiële artsen-status. Zijn carrière begint in Mexico. Hij houdt zich, in opdracht van de regering, bezig met de epidemieën die het land teisterden. Naast deze betrekking doet hij verschillend biologisch onderzoek. Eerste

ervaring als microbioloog doet hij op als producent van 'bananenwhisky'. Hij isoleert zelf de gisten om de bananen om te zetten in alcohol en richt zich als wetenschapper op dit proces van fermentatie. Hij wekt interesse op bij de wetenschappelijke wereld wanneer hij een insectenplaag weet te bestrijden met behulp van een bacterie.

Nu hij langzamerhand naam maakt als microbioloog krijgt d'Herelle een plek aangeboden op het Pasteur Instituut in Parijs. Het instituut richt zich op vaccinatie en infectieziektes. D'Herelle doet onderzoek naar dysenterie. Het vermoeden bestaat dat de *Shigella* bacterie, die in de feces van alle patiënten te vinden is, de ziekte veroorzaakt. Er bestaat echter twijfel of er niet nog een onafhankelijke, onzichtbare factor is die voor de ziekteverschijnselen verantwoordelijk is. De aanwezigheid van de *Shigella* bacterie zou wellicht slechts correleren met die onzichtbare factor. D'Herelle, met een gezonde dosis wetenschappelijke scepsis, doet het volgende experiment:



**Figuur 1.1** plaques.

Hij filtreert de bacteriesuspensies met filters die gaatjes bevatten te klein voor de bacterie om doorheen te gaan. Vervolgens spuit hij proefdieren in met of het filtraat, dat wat door de filter is gegaan, of het filtraat + de bacterie. Ter controle kweekt hij de bacterie-oplossing in petrischalen op agar. Agar is een vaste voedingsbodem voor bacteriën; wanneer men 's avonds een petrischaal ent met een oplossing van de bacterie zal de plaat 's ochtends helemaal bedekt zijn met een dunne laag bacteriën. Tot zijn verbazing ziet d'Herelle wanneer hij zijn platen uit de verwarmingsstoof haalt dat op de platen waar *en* de bacteriën *en* het filtraat is gegoten er zich ronde, open plekken in het bacteriedek bevinden (figuur 1.1). Hij realiseert zich dat het filtraat een ontdekking bevat; een factor met antimicrobiële werking [d'Herelle 1917].

Volgende experimenten moeten uitwijzen wat er zich in die open plekken -plaques genaamd- bevindt. In een eerste experiment voegt hij filtraat toe aan een buis met een bacterie-oplossing. De volgende dag ziet hij dat de troebele bacteriesuspensie helemaal helder is geworden. Alle bacteriën zijn verdwenen. In een ander experiment scheidt hij een plaque van de plaat en verdunt deze in een waterige oplossing. Wanneer hij deze oplossing opnieuw uitplaat met nieuwe bacteriën, zelfs na vele malen verdunnen, ontstaan er opnieuw

meerdere plaques. Dit steeds overzetten van zijn antimicrobiële factor op nieuwe platen kan hij honderden malen herhalen. Hij concludeert dat de factor zich reproduceert. Op basis van dit argument en op de vorm van de plaques concludeert hij dat de antimicrobiële factor een onzichtbare microbe is. Hij noemt het: de bacteriofaag (-naar het woord φαγειν / phagein; eten, of beter nog; ontwikkelen ten koste van).

D'Herelle is niet de eerste die over plaques schrijft. In 1915 noemde Frederick Twort dit fenomeen eenmalig in een artikel [Twort 1915]. Na de publicaties van d'Herelle komt de discussie over de ware aard van de bacteriofaag echter pas goed op gang. Een aantal wetenschappers meent dat de antimicrobiële factor geen levend organisme is. De factor zou een enzym, een molecuul, zijn dat door de bacterie zelf geproduceerd wordt. Deze discussie duurt tot de begin jaren veertig van de vorige eeuw en de komst van de elektronenmicroscopie. Deze uitvinding die fagen zichtbaar kan maken, en de komst van betere scheidingsmethoden waarmee de fagen en de elementen waaruit ze zijn opgebouwd onderzocht kunnen worden, leggen pas de ware aard van de faag bloot (zie hoofdstuk 2).

D'Herelle breekt zijn hoofd niet over de precieze vorm van de faag. Op het moment dat hij bacteriën in zijn experimentele opstellingen als sneeuw voor de zon ziet verdwijnen, weet hij een middel te hebben gevonden tegen de epidemieën die de mensheid plagen.

Op het moment van deze ontdekking heerst er een bacterieplaag (avian typhosis) onder de kippen in een plaatsje, niet ver bij d'Herelles laboratorium vandaan. Een uitstekende kans om zijn bacteriofaagtherapie uit te proberen. Van gezonde kippen weet hij fagen te isoleren die op de petrischalen plaques veroorzaken. Na de kippen te hebben geïnjecteerd met de fagen schrijft hij: "de abrupte stilstand van de epidemie op dezelfde dag als de toediening van de bacteriofaag bevestigt op een onomstotelijke manier de rol van deze microbe als de oorzaak van de immuniteit" [d'Herelle 1919].

Nu acht hij de tijd rijp om zijn therapie op mensen uit te proberen. Wanneer hij met zijn ideeën aankomt in een Parijs kinderziekenhuis moet hij aantonen dat zijn oplossing niet gevaarlijk is. Om dit te bewijzen drinkt d'Herelle in bijzijn van de artsen honderd maal de hoeveelheid fagen die hij aan de patiënten wil geven. De volgende dag is hij nog volledig gezond en krijgt hij toestemming voor zijn therapie.

12



**Figuur 1.2** Felix d'Herelle, staand in het midden (bron: Summers 1998).

De eerste patiënt is een jongetje dat lijdt aan dysenterie. Op de dag dat hij naar d'Herelle komt heeft hij 12 bloederige ontlastingen. De patiënt krijgt een injectie met faagoplossing. De volgende dag is zijn stoelgang weer volledig normaal.

Fagen tegen specifieke ziektekiemen zijn te vinden bij mensen die aan het verbeteren zijn. D'Herelle vermoedt dat de faag de hoofdrol speelt bij de algemene immuniteit van mens en dier. Een extra argument vindt hij wanneer hij op zoek is naar een faag tegen cholera. Van cholera-patiënten weet hij geen fagen te isoleren. De eerste fagen worden geïsoleerd van ratten, dragers van de cholera-bacterie, maar zelf ongevoelig voor de ziekte. Dit idee werd echter snel door andere wetenschappers verworpen.

Via verblijf en onderzoek van een aantal jaren in Egypte en Nederland komt d'Herelle in 1926 terecht in Brits-India om verder te werken aan cholera. Een groots opgezet onderzoek naar faagtherapie voor cholera -the Bacteriophage Inquiry- stuit op grote problemen. Door de politieke onrust van dat moment is het erg moeilijk om voor medisch onderzoek controle te houden over grote groepen mensen. Binnen het medisch onderzoek is het moeilijk controlegroepen te organiseren die niet van de nieuwe therapie mogen genieten. De uitkomsten van deze onderzoeken leiden tot debat over de effectiviteit van faagtherapie. Na dit debat gaat D'Herelle een samenwerking aan met een laboratorium in Georgië. Opnieuw wordt het onderzoek verstoord door politieke onrust. In 1937 wordt het hoofd van het lab geëxecuteerd door Stalin. D'Herelle keert terug naar Parijs.

Tijdens de Tweede Wereldoorlog weigert d'Herelle zijn wetenschappelijke kennis en kunde te delen met de Duitsers. Hij wordt opgepakt en vastgezet. Na de oorlog blijft d'Herelle pleiten voor de toepassing van zijn ontdekking. Hij sterft in Parijs in 1949.

Onderzoek naar bacteriofaagtherapie blijft in Rusland bestaan. In de rest van de wereld verdwijnt, met de opkomst van antibiotica, onderzoek naar bacteriofaagtherapie. Nu, met de steeds sterkere opmars van antibiotica-resistente bacteriën, komt de interesse geleidelijk terug.

# De bacteriofaag

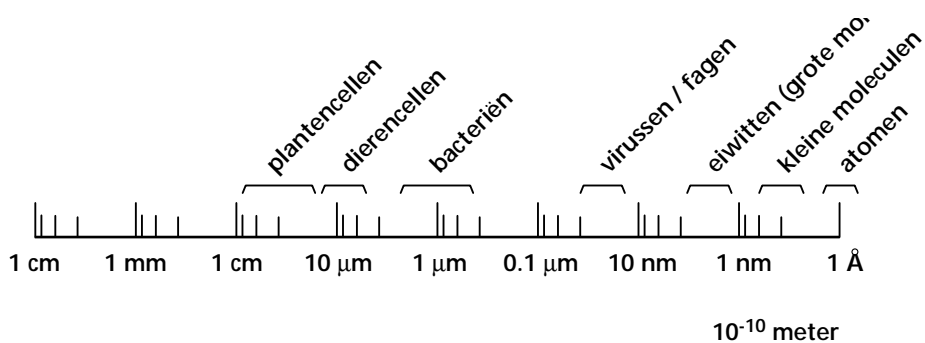
14

## 2.1 Uiterlijk en levenscyclus van een virus

Binnen de biologie wordt nog steeds bediscussieerd of virussen levende organismen zijn. Een virus zonder dier, plant of bacterie om te parasiteren is namelijk een levenloos pakketje moleculen. Maar, een virus in zijn gastheercel is een vitaal, zichzelf reproducerende entiteit, die goed in staat is om te evolueren tot nieuwe vormen.

Plantencellen, dierencellen en bacteriën hebben allen hun eigen virussen. Een plantenvirus kan geen bacterie infecteren en een bacterievirus geen plantencel. Het rijk der bacteriën bestaat uit vele verschillende soorten bacteriën. Ook deze verschillende soorten hebben elk specifieke virussen. De bacterievirussen worden bacteriofagen of gewoon fagen genoemd. Fagen zijn niet zichtbaar met het blote oog, wel zijn ze te visualiseren met de elektronenmicroscop. De wereld van de bacteriën werd al in het begin van de 18<sup>e</sup> eeuw zichtbaar gemaakt door Antoni van Leeuwenhoek, met de lichtmicroscop. Figuur 2.1 toont de relatieve grootte van verschillende organismen en moleculen.

Een virus is altijd opgebouwd uit minimaal twee soorten moleculen. Ten eerste het erfelijk materiaal dat zowel DNA als RNA kan zijn en ten tweede verschillende eiwitten. Dit zijn ook de hoofdcomponenten van alle soorten cellen (dier, plant, bacterie). In de jaren vijftig van de vorige eeuw leidde onderzoek naar de eigenschappen van deze componenten tot ons huidige begrip van informatie-overdracht en erfelijkheid. Voor dit onderzoek werden voornamelijk fagen gebruikt, om hun in het laboratorium praktische toegankelijkheid. Felix d'Herelle stelt in een publicatie van 1923: 'Bacteriofagen zijn de bouwstenen van al het andere leven, begrip van de natuur van de faag zal de structuur van cellen en de oorsprong van het leven zelf verklaren.' Hij gokte hiermee in de goede richting.



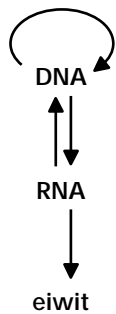
**Figuur 2.1** Diameter van cellen, virussen en moleculen.

In 1952 doen Chase en Hershey het volgende experiment waarmee wordt aangetoond dat DNA alleen voldoende is om complete virussen te maken:

Bacteriën worden geïnfecteerd met virussen. Na de hechting van het virus aan de bacteriewand injecteert het virus zijn nucleïnezuur (= DNA) in de cel. In het experiment wordt het virus-eiwit van de cel afgehaald. Ondanks de afwezigheid van het eiwit bevinden zich een half uur later een veelvoud complete virussen in de cel.

—————**Intermezzo: de moleculaire biologie van een virus**—————

Na uitvoerig onderzoek en de beschrijving van Watson en Crick van de structuur van DNA, ontstaat het dogma van de moleculaire biologie



**Figuur I** Centraal dogma

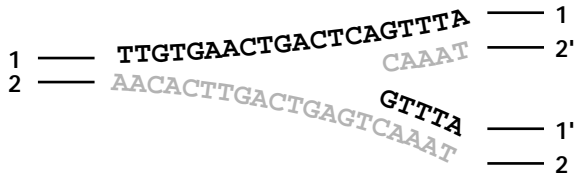
DNA is een lang molecuul dat bestaat uit 4 verschillende bouwstenen. Deze bouwstenen worden aangeduid met 4 letters: A, T, C, G. Deze 'nucleotiden' zijn als lange kraalkettingen gerangschikt. DNA bestaat uit twee rond elkaar gedraaide kettingen (de dubbele helix). De A van de éne ketting paart hierbij met de T van de andere ketting en de C paart met de G.



**Figuur II** De dubbele helix van Watson en Crick

Het bijzondere van de DNA-structuur is dat het, doordat het uit twee complementaire strengen bestaat, op een relatief eenvoudige wijze gekopieerd kan worden.

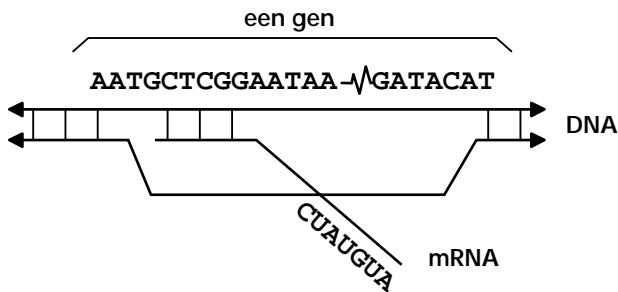




**Figuur III** DNA replicatie

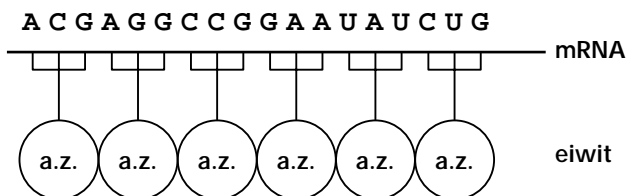
Voor deze replicatie gebruikt de cel een aantal complexe enzymen die een virus niet bezit. Een virus gebruikt voor zijn replicatie de enzymen van de gastheer. Ook voor het volgende proces, het aflezen van het DNA, gebruikt een virus de machinerie van de cel. Aflezen van DNA gebeurt in 2 stappen. De eerste stap is transcriptie. Van het DNA wordt een kopie gemaakt, soortgelijk als bij replicatie. Nu echter wordt maar een klein gedeelte van één DNA- streng afgelezen. Zo'n begrensd deel op het DNA is een gen. Het kopietje dat zich vrij door de cel kan bewegen is messenger RNA (mRNA). In RNA is de T vervangen door een U. De U is net als de T complementair aan de A.

16



**Figuur IV** Transcriptie

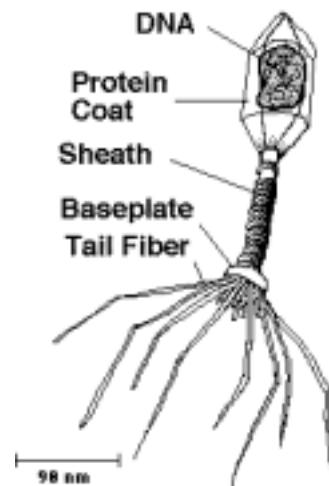
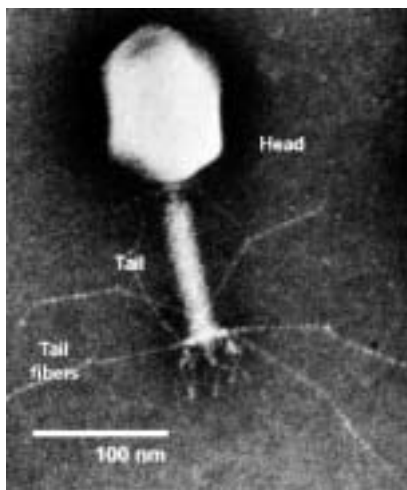
De tweede stap is translatie. Opnieuw maakt het virus gebruik van de vele moleculen van de translatiemachinerie van de gastheercel. Drie opéénvolgende letters op het RNA coderen voor een aminozuur (a.z.). Lange aaneengesloten ritsen van aminozuren vormen het eindproduct van het proces, een eiwit.



**Figuur V** Translatie

Op dit moment zijn alle onderdelen aanwezig om nieuwe virussen te maken. De eiwitten vouwen zich in hun goede configuratie. Meerdere eiwitten haken in één om een mantel te vormen. Elke mantel sluit een DNA molecuul in. In een geïnfecteerde bacterie worden op deze manier in een half uur honderden virussen gemaakt. Aan het eind van de infectie barst de bacterie open (lysis) en laat de virussen vrij om nieuwe cellen te infecteren.

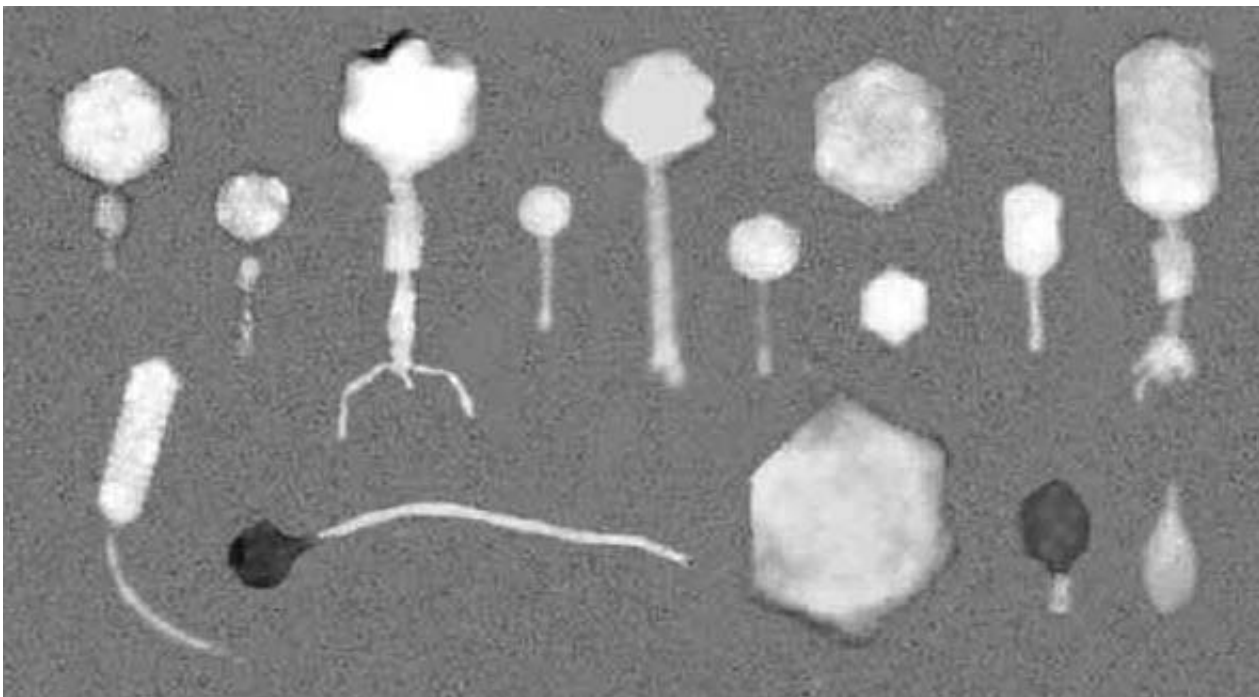
-----Einde intermezzo-----



**Figuur 2.2** Elektronenmicroscopische en schematische voorstelling van een bacteriofaag (bron: [www.phage.org](http://www.phage.org)).

## 2.2 Bacteriofaag morfologie

Er zijn ongeveer 4500 verschillende bacteriofagen beschreven [Ackerman 1996]. Deze fagen zijn geordend naar hun uiterlijk en hun gastheren in 12 families. Het merendeel (96%) heeft een staart. Andere fagen zijn kubisch, filamenteus of pleiomorf (figuur 2.3). Het nucleïnezuur is of dubbel strengs DNA (een dubbele helix), enkelstrengs DNA, dubbelstrengs RNA of enkelstrengs RNA. Tijdens hun infectiecyclus kennen alle bacteriofagen een stadium waar hun nucleïnezuur dubbelstrengs DNA is.



**Figuur 2.3** Elektronenmicroscopische opname van verschillende bacteriofagen (bron: D.Bird, [www.phage.org](http://www.phage.org))

## 2.3 Lysogenie

Wanneer een faag een bacterie infecteert leidt dit niet altijd tot reproductie van het virus. Van sommige fagen kruipt het DNA in het DNA van de gastheercel. Een bacterie die op deze manier geïnfecteerd is met een virus wordt *lysogeen* genoemd. Een virus dat direct tot reproductie overgaat is *lytisch*. Een lytisch virus maakt vele kopieën van zichzelf en lyseert vervolgens de bacterie, wat betekent dat de bacterie open barst.

De infectie in een lysogene bacterie is een soort slapende infectie. Het virus zorgt ervoor dat er geen infectie met nieuwe virussen plaatsvindt of het virus zorgt ervoor dat er geen transcriptie van faag-genen plaatsvindt. Dit doet hij door middel van het aanmaken van één eiwit dat transcriptie van de andere genen van de faag voorkomt. Wanneer de bacterie door nog een faag geïnfecteerd wordt zal dus, door de actie van dit eiwit, deze faag zich ook niet kunnen reproduceren. Slechts in tijden van stress, voor de bacterie, snijdt het virus-DNA zich uit het gastheer-DNA en begint de lytische cyclus. Wanneer een bacterie in zijn DNA een slapend virus meedraagt geeft hij dit door aan al zijn dochtercellen die na deling ontstaan.

Een gevaar van lysogene fagen is dat zij DNA tussen bacteriën kunnen vervoeren. Dit verkeer is beperkt tot de typen bacterie die één soort faag kan infecteren. Sommige fagen dragen informatie voor antibioticaresistentie of toxiciteit met zich mee. Deze fagen kunnen 'vriendelijke' bacteriën veranderen in pathogene, antibioticaresistente bacteriën. Een bekend voorbeeld hiervan is de CTX faag. Deze faag kan de cholera bacterie infecteren. De faag draagt het gen bij zich voor productie van het cholera-toxine. Wanneer de cholera bacterie geïnfecteerd is met deze faag kan hij bij mensen de gevaarlijke ziekte cholera veroorzaken.

Lytische fagen kunnen ook DNA vervoeren. Wanneer een bacterie tijdens de lytische cyclus van een faag wordt afgebroken worden soms willekeurige stukjes DNA van de bacterie door het virus meegenomen. De kans dat deze bij een nieuwe infectie bij een andere bacterie worden ingebouwd is echter klein, omdat een nieuwe lytische infectie ervoor zal zorgen dat de bacterie wordt vernietigd.

## 2.4 Resistentie

Bacteriën zijn veranderlijke of evoluerende organismen. Veranderingen (mutaties) in het DNA die ontstaan door invloeden van buitenaf of door fouten van de DNA-replicatiemachinerie leiden tot verandering in eiwitten. Deze veranderingen kunnen gevolgen hebben voor de bacterie, maar ook voor het virus. Zo herkent een faag de juiste gastheer door specifiek aan een eiwit aan de buitenkant van de bacterie te binden. Mutaties kunnen er toe leiden dat de faag het eiwit niet meer herkent en zich daarom niet meer aan de bacterie kan hechten. Door voortdurend hun eiwitten van het oppervlak te veranderen kunnen de bacteriën resistent worden tegen bacteriofagen. De faag zelf echter ontspringt ook uit DNA. Fouten bij de replicatie van het DNA leiden tot voortdurend nieuwe, mee-evoluerende virussen. Dit proces van met elkaar mee veranderen heet co-evolutie.

Een tweede vorm van resistentie is *restrictie en modificatie*. Dit systeem, dat waarschijnlijk in alle bacteriesoorten voorkomt, herkent het DNA van een faag als vreemd, niet eigen DNA. Het DNA van de bacterie is gemodificeerd, er zijn methylgroepen -kleine moleculen- aan gebonden. Virus-DNA mist deze modificatie. Speciale enzymen, restrictie-enzymen, in de bacteriecel binden aan ongemodificeerd DNA en knippen het kapot. Dit systeem werkt niet optimaal. Soms vinden de modificatie enzymen het vreemde DNA in plaats van de restrictie enzymen. Na modificatie van het faag-DNA, door binding van dezelfde methylgroepen, is de faag weer in staat de bacterie te parasiteren.

# Faagtherapie bij dieren

*Smith and Huggins 1982*

19

Begin jaren tachtig van de 20e eeuw beginnen Smith en Huggins een onderzoek om duidelijkheid te brengen in de discussie of faagtherapie nu deugt of niet. Na positieve bevindingen breiden ze het onderzoek uit en de eerste resultaten worden in 1982 gepubliceerd.

Het onderzoek bevat vier spelers. Ten eerste de bacterie, *Escherichia coli* (*E. coli*), geïsoleerd uit een baby met hersenvliesontsteking. *E. coli* is een bacterie die voorkomt in de darmen van ieder persoon, sommige stammen kunnen echter ziekte veroorzaken. De tweede speler is de bacteriofaag. Uit rioolwater isoleren ze een faag die *in vitro*-in de petrischalen- zeer actief de bacterie lyseert. De derde speler is het proefdier, in dit geval de muis. Als vierde worden antibiotica gebruikt om de effectiviteit van faagtherapie mee te vergelijken.

In de eerste proef worden tien muizen in een spier geïnoculeerd met  $3 \times 10^7$  bacteriën. Na zestien uur zijn alle muizen zichtbaar onwel. Na één dag is de helft dood en na tien dagen zijn ze allemaal dood. Wanneer tien andere muizen tegelijkertijd bacteriën in één spier en  $3 \times 10^4$  of meer fagen in een andere spier krijgen geïnjecteerd wordt geen van de muizen onwel, op een wond op de plek van injectie na, en na tien dagen leven alle muizen nog. De fagen die voor dit resultaat zorgden worden ook in de volgende proeven gebruikt.

In de tweede proef worden fagen niet tegelijkertijd, maar acht uur of zestien uur later geïnjecteerd. De muizen die na acht uur worden behandeld overleven het allen. Wanneer muizen na zestien uur worden behandeld gaan er acht van de tien dood.

**Tabel 3.1** Effectiviteit van faagtherapie tegenover antibiotica. Per experiment worden 30 muizen geïnjecteerd met bacteriën, bacteriën en fagen of bacteriën en antibiotica, in verschillende spieren [Smith en Huggins 1982].

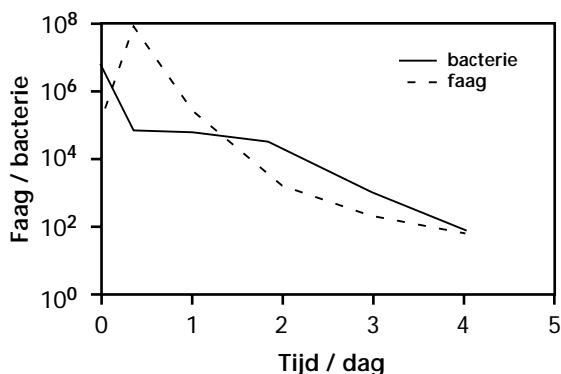
bacteriën op t=0 uur	behandeling	dood op t=240 uur
$3 \times 10^7$	geen behandeling	28/30
$3 \times 10^7$	$3 \times 10^8$ fagen op t=8 uur	2/30
$3 \times 10^7$	streptomycine 1 maal op t=8 uur	29/30
$3 \times 10^7$	streptomycine 8 maal om de 12 uur	3/30
$3 \times 10^7$	tetracycline 1 maal op t=8 uur	23/30
$3 \times 10^7$	tetracycline 8 maal om de 12 uur	13/30

In een volgende proef wordt faagtherapie vergeleken met antibiotica. De resultaten van deze proef staan in tabel 3.1 (zie pag. 19). Het eenmaal toedienen van fagen blijkt effectiever te zijn dan het toedienen van de antibiotica streptomycine en tetracycline. Andere antibiotica -ampiciline, chloramphenicol, trimethoprim and sulphafurazole- geven alle geen beter resultaat dan geen behandeling.

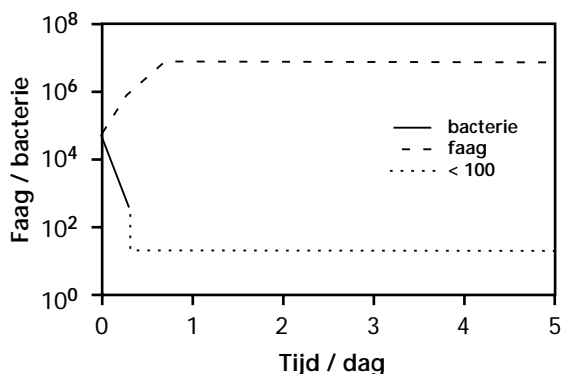
In volgende experimenten kijken Smith en Huggins naar de verspreiding van de bacteriën en fagen door het lichaam. Vijf minuten na inoculatie in een spier zijn bacteriën terug te vinden in het bloed, de milt, lever en -in een laag aantal- in de hersenen.

Fagen verspreiden zich ook snel door het lichaam naar bloed, lever, milt en hersenen. Zonder bacteriën om te parasiteren reproduceren ze zich niet en hun aantal neemt snel af in alle weefsels, behalve in de milt waar fagen na weken nog te vinden zijn. Deze resultaten zijn ook gevonden door Geier [1973].

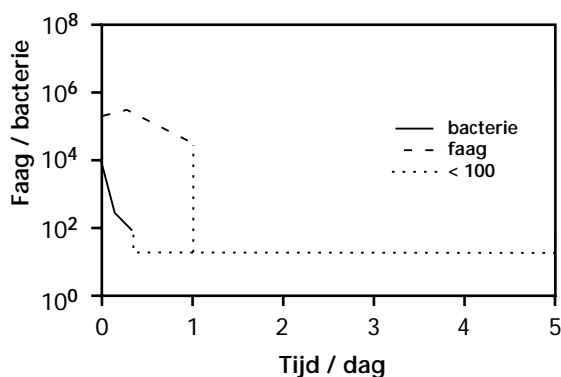
Wanneer nu muizen met zowel fagen als bacteriën worden geïnfecteerd ontstaan er interessante dynamische processen (figuur 3.1, 3.2 en 3.3).



**Figuur 3.1** Aantallen bacteriën en fagen in een met bacterie geïnjecteerde spier. Bacterie en faag werden tegelijkertijd geïnjecteerd in verschillende spieren [Smith en Huggins 1982].



**Figuur 3.2** Aantallen bacteriën en fagen in de milt. Bacterie en faag werden tegelijkertijd geïnjecteerd in verschillende spieren [Smith en Huggins 1982].



**Figuur 3.3** Aantallen bacteriën en fagen in het bloed. Bacterie en faag werden tegelijkertijd geïnjecteerd in verschillende spieren [Smith en Huggins 1982].

In een met bacterie geïnfecteerde spier, van een met faag behandeld dier, neemt het aantal bacteriën binnen vier dagen af tot onder de honderd per gram weefsel. De faag heeft een paar uur nodig om bij de bacteriën te komen en zich te reproducere. Na een halve dag zijn er een factor honderd meer actieve fagen (fagen die plaques veroorzaken *in vitro*) dan bacteriën. Het aantal fagen neemt daarna geleidelijk met de hoeveelheid bacteriën af. De verspreiding en reproductie van bacteriën in de milt (figuur 3.2) en in het bloed (figuur 3.3) valt na een halve dag stil, terwijl fagen een dag in het bloed blijven. Actieve fagen zijn na vier dagen nog in de milt te vinden.

Wanneer Smith en Huggins de bacteriofagen niet direct, maar acht uur na infectie met de bacterie inspuiten zien zij dezelfde resultaten, alleen acht uur vertraagd.

Wanneer de bacteriën in de hersenen worden ingespoten en de faag in de spier, zien zij eerst de hoeveelheid bacteriën in het hersenweefsel toenemen en later de hoeveelheid fagen. Na een week verdwijnen beiden.

Geen van de muizen, tegelijkertijd behandeld met faag en bacterie, gaat dood. Van de muizen die gedood worden voor het tellen van bacteriën en fagen blijken er echter tien van de 36 ook bacteriën te bevatten die resistent zijn tegen de fagen. Van de 36 muizen worden 360 bacteriën geïsoleerd waarvan er vijftien resistent zijn tegen de faag. Deze resistente bacteriën veroorzaken klaarblijkelijk geen problemen voor de muis.

Smith en Huggins doen nog een proef. Ze spuiten de faag in bij twintig muizen en pas 21 dagen later infecteren ze de muizen met de bacterie en behandelen alsnog met faag. Vijftien van de twintig muizen gaan dood. Waarschijnlijk komt dit, omdat het immuunsysteem van het dier de faag nu herkent en direct opruimt, waardoor de bacterie vrij spel krijgt.

Een belangrijke conclusie van dit onderzoek is dat fagen niet alleen actief *in vitro* zijn, maar ook *in vivo*, en in dit geval zelfs effectiever dan antibiotica. Een tweede conclusie is dat resistentie niet altijd een probleem hoeft te zijn. Mogelijk zijn de resistente bacteriestammen minder virulent of is het afweersysteem van in staat de bacteriën op te ruimen voor dat deze grote aantallen kunnen bereiken.

Opgemerkt moet dat er grote hoeveelheden fagen worden gebruikt, minimaal  $10^4$  fagen tegen  $10^7$  bacteriën. In de meeste experimenten worden zelfs meer fagen dan bacteriën gebruikt.

Een probleem van dit onderzoek is dat de bacterie en faag tegelijkertijd worden toegevoegd (al is het ziekteverloop ook erg snel). Ten tweede blijkt herhaalde behandeling met fagen niet mogelijk. Na één keer geïntroduceerd te zijn aan het lichaam wordt de volgende 'faag infectie' direct opgeruimd.

*Smith and Huggins 1983*

In een tweede publicatie over faagtherapie beschrijven Smith en Huggins experimenten met kalveren. Het onderzoek is gericht op een geheel andere infectie dan hun eerdere onderzoek bij muizen. De bacterie is wederom een *E.coli*, maar deze stam -B44- veroorzaakt infectie van het spijsverteringskanaal. De kalveren krijgen diarree, drogen uit en gaan dood.

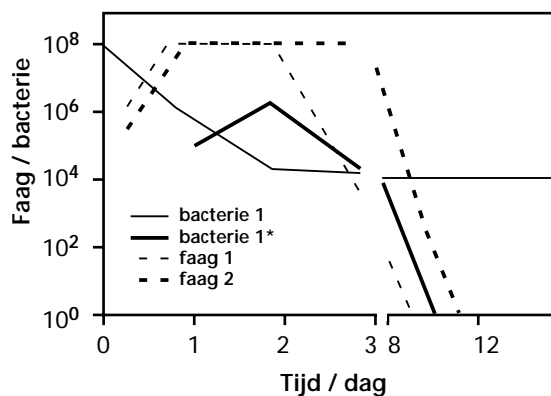
**Tabel 3.2** Faagtherapie bij kalveren. Bacterie en/of faag (drie verschillende genummerd 1,2 en 3) werden oraal toegevoegd aan kalveren. Wanneer dood optrad was dit meestal binnen 2 dagen [Smith en Huggins 1983].

bacteriën op t=0 uur	behandeling	dood
$3 \times 10^9$	geen fagen	13/13
$3 \times 10^9$	faag 1 en 2, $3 \times 10^{11}$ op t=8 uur	0/9
$3 \times 10^9$	faag 1 en 2 bij begin diarree	14/21
$3 \times 10^9$	faag 1 en 3 bij begin diarree	2/13

Smith en Huggins isoleren drie fagen -1, 2 en 3- uit rioolwater die virulent zijn voor de bacterie *in vitro*. In het eerste experiment onderzoeken ze de effectiviteit van de fagen (tabel 3.2). De resultaten laten zien dat een mix van twee fagen, toegediend snel na de inoculatie met bacteriën, volledige bescherming oplevert. Wanneer de ziekte in een verder gevorderd stadium is neemt de effectiviteit van faagtherapie af.

Het gebruik van twee verschillende fagen moet voorkomen dat de infectie doorzet vanwege het ontstaan van bacteriën die resistent zijn tegen één van de fagen. Het ontstaan van resistente bacteriën en de populatiedynamiek van faag en bacterie bestuderen de onderzoekers door het tellen van faag en bacterie in de feces van de kalveren. Figuur 3.4 laat het verloop zien. De aantallen van de pathogene *E.coli* nemen snel af. In de controles (hier niet in een figuur opgenomen) blijven deze aantallen hoog. De afname is voornamelijk te danken aan de snelle toename in aantal van faag 1. Na een dag ontstaat er een bacterie die resistent is tegen faag 1. Faag 2 kan deze bacterie nog steeds infecteren en blijft daardoor waarschijnlijk langer in het systeem aanwezig en roept de reproductie van de resistente bacterie een halt toe.

22



**Figuur 3.4** Aantallen bacteriën en fagen in de feces. Bacterie en faag werden oraal toegediend. Fagen werden toegediend bij het begin van diarree. Bacterie 1\* verscheen spontaan en was resistent tegen faag 1 [Smith en Huggins 1983].

In dit experiment nemen de aantallen fagen af voordat de bacterie volledig verdwenen is. In een aantal kalveren die ze infecteren met bacterie en faag tegelijkertijd wordt de bacterie nog na 41 tot 163 dagen later teruggevonden. De fagen werden nog na 189 tot 365 dagen in de feces teruggevonden.

Behalve voor het bestuderen van de populatiedynamiek gebruiken ze de feces van geïnfecteerde kalveren voor een tweede experiment. Ze verwerken de feces in het voedsel voor gezonde kalveren. Kalveren worden gevoerd met feces van kalveren die wel geïnfecteerd waren met de bacterie en niet met faag waren behandeld. De kalveren gevoerd met deze feces gaan dood. Wanneer de feces van kalveren die met bacterie en faag behandeld zijn gebruikt wordt, onafhankelijk of ze wel of niet diarree hebben, blijkt geen van de feces gevoederde kalveren ziek te worden. De dieren zijn niet langer besmettelijk.

Smith en Huggins testen ook de effectiviteit van faagtherapie voor infectie van biggen en lammeren met een soortgelijke *E.coli*. Bepaalde fagen blijken ook bij deze dieren ziekte te voorkomen, terwijl dieren uit de controlegroep ernstig ziek worden of dood gaan.

Een negatief resultaat van deze studie is het feit dat de effectiviteit van faagtherapie, met de tijd dat de infectie woedt, afneemt. De ziekte lijkt een point of no return te kennen waarna faagtherapie geen soelaas meer biedt.

Interessant is dat faagtherapie, in vergelijking tot antibiotica, werkzaam is na één dosis en dat wanneer er resistente bacteriën ontstaan deze minder -of niet- virulent zijn dan hun voorloper en tevens dat door gebruik te maken van verschillende fagen resistentie omzeild kan worden.

Het meest interessante resultaat is dat dieren die met fagen zijn behandeld niet meer besmettelijk zijn.

### *Smith, Huggins and Shaw 1987(1)*

In de volgende jaren gaan Smith *et al.* op zoek naar een faag die virulent is tegen een breed scala van pathogene *E.coli*-enteropathogene bacteriën. Ze vinden deze niet. Wel vinden ze een groot aantal fagen die met elkaar virulent zijn voor een breed scala aan enteropathogenen.

In hun publicatie uit 1987 beschrijven ze experimenten met zeven pathogene bacteriën en zeven specifieke fagen. Ze ondervinden dat de virulentie *in vitro* een goede leidraad is voor virulentie *in vivo*, maar niet alles bepalend. Bij het gebruik van *in vivo* zeer virulente fagen zijn 100 fagen genoeg om een infectie ( $10^9$  bacteriën op  $t=0$ ) op te lossen, wanneer de faag tussen  $t=-6$  tot  $t=12$  (uur) wordt toegediend.

In dit artikel worden een aantal nieuwe vormen van toediening beschreven van bacterie en faag. Kalveren worden van fagen voorzien door middel van toediening aan hun voedsel of door het plaatsen in een 'vieze' stal (een stal waar eerder met bacterie en faag besmette kalveren hebben gestaan). Een derde manier is het sprayen van een faagsuspensie over het stro. Alle methoden hebben een positief effect wanneer de dieren, een aantal uur na zulk een contact met de fagen, geïnfecteerd worden met pathogene bacteriën.

Kalveren worden in dit artikel ook geïnfecteerd met zeven pathogene bacteriën tegelijkertijd. Dieren die geen therapie genieten gaan alle dood (8/8). Dieren die met zeven verschillende fagen behandeld worden zijn een stuk minder symptomatisch. Bij orale toediening gaat één van de acht dood. Verrassend is dat kalveren die in een met zeven fagen gesprayde stal staan het alle overleven (0/7 dood).

23

Positieve resultaten van dit onderzoek zijn dat van de juiste faag maar een klein aantal nodig is voor een goed resultaat en het feit dat fagen makkelijk op verschillende manieren toe te dienen zijn.

Bij verschillende dieren ontstaan resistente bacteriën. Deze bacteriën hebben hun zogenaamde K-antigen verloren. De onderzoekers claimen dat de bacteriën hierbij ook hun virulentie hebben verloren, al wordt dit niet experimenteel onderzocht (men zou in een experiment gezonde kalveren met deze resistente bacteriën kunnen infecteren).

Ook ontstaan er resistente bacteriën die nog wel het K-antigen bezitten en die dus een andere mutatie hebben. Deze zijn nog wel virulent. Door *in vitro* deze bacteriën te kweken en door toediening van veel fagen aan deze culturen weten de onderzoekers fagen te isoleren die ook deze resistente bacterie kunnen parasiteren.

### *Smith, Huggins and Shaw 1987(2)*

In een aansluitend artikel beschrijven Smith *et al.* een aantal factoren die invloed hebben op het overleven van een bacteriofaag in kalveren en hun omgeving.

De eerste factor is de zuurgraad van de maag en het spijsverteringskanaal. *In vitro* blijkt een zuurgraad lager dan 3 ( $\text{pH} < 3$ ) fagen bijna direct te inactiveren. *In vivo* is dit probleem goed te overkomen door  $\text{CaCO}_3$  aan het dieet toe te voegen. Dit verhoogt de pH van het spijsverteringskanaal en het blijkt dat dit een positief effect op fagen heeft.

De tweede factor is antilichamen. Antilichamen zijn moleculen die door het immuunsysteem worden aangemaakt en helpen indringers te herkennen en te elimineren. Smith *et al.* onderzoeken een aantal bloedmonsters van mensen, varkens en koeien op aanwezigheid van antilichamen tegen een aantal willekeurig gekozen fagen. Het blijkt dat een laag percentage van de monsters antilichamen bevat tegen een aantal fagen. Wanneer deze antilichamen in een experiment aan het dieet worden toegevoegd blijkt de bijhorende faag ook uitgeschakeld te worden. In natuurlijke situaties is dit probleem minder groot omdat de aanwezigheid van lage concentraties antilichaam in het bloed niet direct leidt tot grote getallen antilichamen in de darm, de plaats van infectie. Op het moment dat een antilichaam zich duidelijk profileert in een populatie kan er overgegaan worden op een andere faag.

De derde factor is desinfecterende middelen. In high-disease-risk omgevingen worden vaak antimicrobiële middelen gespoten. Smith *et al.* schrijven dat sommige middelen, zoals formaldehyde en sodiumhypochlorite, ook schadelijk zijn voor fagen. Andere stoffen als fenol en chloroxylenol hebben echter weinig tot geen effect op fagen.



De vierde factor is de temperatuur. Verschillende fagen hebben hun maximale activiteit bij verschillende temperaturen. Bij het kiezen van een faag voor therapie zou naar de lichaamstemperatuur op de plek van infectie gekeken moeten worden.

*Soothill, Lawrence and Ayliffe 1988*

*Pseudomonas aeruginosa* is een opportunistische bacterie en komt veel voor bij brandwonden. Soothill *et al.* onderzoeken of fagen de afbraak van huid door deze *Pseudomonaden* kunnen voorkomen. Hiervoor gebruiken ze een *in vitro* model. Ze nemen varkenshuid; vier cirkels met een diameter van 2,5 cm en ze leggen deze op elkaar in een petrischaal. Zestien van zulke petrischalen worden met *Ps. Aeruginosa* geïmpregneerd ( $10^5$ ) en acht daarvan eveneens met faag ( $10^6$ ). In de met faag behandelde petrischalen vindt, op het oog, geen afbraak van de huid plaats. In zeven van de acht niet met faag behandelde schalen vindt afbraak van de huid plaats.

Bij het tellen van de schalen blijkt dat er in drie van de behandelde schalen bacteriën terug te vinden zijn. De fagen zijn terug te vinden tot in de onderste laag huid en de petrischalen.

Deze resultaten tonen aan dat faagtherapie bij specifieke infecties van de huid zou helpen, mede door het feit dat fagen de huid kunnen penetreren

24

*Soothill 1994*

In deze publicatie breidt Soothill het vorige onderzoek uit met een *in vivo* model. Hij snijdt kleine stukken huid van een levende cavia af, behandelt deze, brengt het stuk huid terug op de cavia en kijkt of het heelt.

Stukken huid die niet met faag of bacterie worden behandeld helen alle (4 uit 4 cavia's). Stukken huid die met  $10^6$  of  $10^5$  *Pseudomonas* bacteriën worden behandeld helen geen van allen. (respectievelijk 0/4 en 0/7). Van de stukken huid die met  $10^5$  bacteriën en  $10^7$  fagen worden behandeld helen er zes van de zeven.

Dit resultaat toont dat fagen mogelijk als profylaxis zouden kunnen werken wanneer patiënten, bijvoorbeeld met een brandwond, nieuwe huid krijgen. Voor een optimaal resultaat zou er een goeie mix van fagen tegen de verschillende pathogene *Ps. aeruginosa* stammen gezocht moeten worden.

*Soothill 1992*

In een kleine studie toont Soothill aan dat muizen met een experimentele *Acinetobacter baumannii* of *Pseudomonas aeruginosa* infectie gebaat zijn bij faagtherapie. Het tegelijk inspuiten van bacteriën (5 maal LD50) en  $10^2$  anti-*A. baumannii* fagen of  $10^7$  anti-*Ps. aeruginosa* beschermt de muizen tegen ziekte en dood. Een faag ( $\phi 131$ ) die hij krijgt uit het instituut voor immunologie in Polen (zie hoofdstuk 4) beschermt de muizen niet tegen een experimentele *Staphylococcus aureus* infectie. Dit wordt mogelijk verklaard door het feit dat deze faag ook weinig activiteit *in vitro* vertoont.

*Berchieri, Lovell and Barrow 1991*

Berchieri *et al.* beschrijven experimenten die ze gedaan hebben met *Salmonella thyphimurium*, een bacterie die veel kippen bij zich dragen en vaak de oorzaak is van voedselvergiftiging. Alhoewel kippen tegen de bacterie zijn opgewassen sterven kuikens soms aan infectie.

Wanneer 31 kuikens besmet worden met  $10^8$  bacteriën gaat 53% dood. Wanneer de kuikens tegelijkertijd met de beste faag ( $10^{12}$ ), geïsoleerd uit het riool, geïnoculeerd worden gaat 16% dood.

Dit zijn minder goede resultaten dan Smith en Huggins vonden. De oorzaak lijkt dat deze faag minder lang in het organisme aanwezig blijft. Fagen worden nog tot een aantal weken na inoculatie in het onderzochte deel van het spijsverteringskanaal, het caecum, teruggevonden. Bacteriën zijn, wel in afnemende getallen, langer in het spijsverteringskanaal aanwezig. Om het faag-aantal weer omhoog te helpen spuiten ze een extra

portie bacteriën in, in de veronderstelling dat de faag te weinig gastheren had om zich te vermenigvuldigen. Dit heeft echter geen effect. Het omgekeerde experiment, extra faag toedienen doen ze niet.

Er worden in de met faag en bacterie behandelde kuikens geen antilichamen of resistente bacteriën gevonden.

Hun verklaring voor het feit dat de faagpopulatie geen stand houdt is dat deze de weefsels niet heeft gepenetreerd. Het feit dat geen antilichamen worden gevonden pleit hier ook voor.

Ondanks de beperkte resultaten zou er een toepassing voor deze fagen kunnen zijn. Toediening van fagen aan kippen, een aantal dagen voor de slacht, zou de hoeveelheid *Salmonella* bacteriën in aantal doen afnemen. Dit zou de voedselveiligheid voor mensen ten goede komen.

*Merril CR, Biswas B, Carlton R, Jensen NC, Creed GJ, Zullo S, Adhya S 1996*

Merril *et al.* zien dat er twee belangrijke factoren zijn die faagtherapie in de weg staan. Het eerste is het gebruik van faagpreparaten die toxische bacteriële resten bevatten en het tweede is het reticuloendothelial system (RES), een belangrijk onderdeel van de dierlijke en menselijke afweer tegen bacteriën en virussen.

Het eerste probleem weten ze op te lossen door faaglysaten niet alleen te filtreren, maar ook te centrifugeren. Ze zien dat preparaten die verkregen zijn door simpele filtratie soms ziekte en zelfs soms dood veroorzaken, afhankelijk van de bacterie die gebruikt is voor vermenigvuldiging. Door de preparaten te ontdoen van bacteriële toxische moleculen (endotoxinen) veroorzaken ze geen ziekte meer in de proefdieren.

Het RES is een groep van cellen die zich in allerlei weefsels -o.a. longen en lever- van het lichaam bevindt. Deze cellen herkennen en vernietigen bacteriën, virussen en gifstoffen. Ook bacteriofagen worden door dit systeem snel herkend en opgeruimd. Merrill *et al.* onderzoeken of ze fagen kunnen verkrijgen die niet zo snel herkend worden door dit systeem. Zij doen dit door fagen in te spuiten in het bloed van muizen. Zeven uur later halen ze de fagen die nog niet opgeruimd zijn uit het bloed en kweken deze weer in kolven op de bijhorende bacterie. Faaglysaten worden gezuiverd en opnieuw ingespoten in muizen en dit werd negen maal herhaald. Op deze manier selecteren ze fagen die het RES kunnen ontwijken.

Wanneer deze geselecteerde fagen gebruikt worden in een experimentele infectie van muizen blijken ze beter te werken dan de niet geselecteerde fagen. Alle muizen overleven het met amper ziekteverschijnselen, bij gebruik van niet-geselecteerde fagen zijn er bij bacteriële infectie meer symptomen. In de controlegroep, waarbij geen faagbehandeling plaats vindt, gaan alle muizen dood.

Ook wordt aangetoond aan dat de mate van ziektesymptomen, bij deze *E. coli* infectie, omgekeerd evenredig afhankelijk is aan het aantal gebruikte fagen.

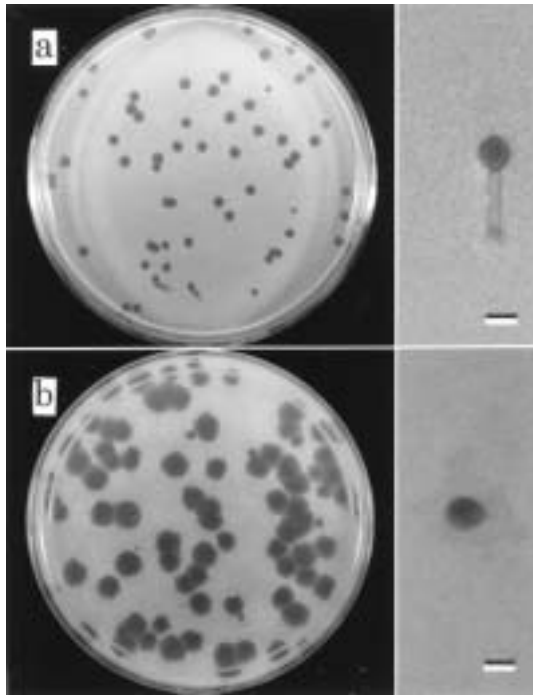
Merril *et al.* tonen aan dat voor het slagen van faagtherapie zuivere preparaten van fagen die niet snel door het RES herkend worden en met een hoge titer, het beste werken.

Moleculair onderzoek van de fagen die niet herkend worden door het RES wijst uit dat deze fagen een mutatie hebben in één van hun manteleiwitten. Deze informatie kan gebruikt worden om andere fagen ook zo te veranderen dat ze het RES kunnen omzeilen. De techniek hier beschreven, het herhaald inspuiten en isoleren, is echter een stuk eenvoudiger en even efficiënt als modificeren van fagen met behulp van moleculaire technieken.

*Barrow, Lovell and Berchieri 1998*

In een recente publicatie borduurt de groep van Barrow voort op de resultaten die Smith en Huggins behaald hebben met *E. coli* infectie in kalveren en kippen. Ze trekken dezelfde conclusies.

In een klein opgezet experiment met kalveren die geen colostrum -biest, eerste melk na de bevalling- hebben gehad blijkt faagtherapie minder goed te werken dan in kalveren die dit wel hebben gehad. Biest bevat factoren die de kalveren helpen bij de afweer, later bouwen ze hun eigen afweer op. Barrow *et al.* vinden dat 1 van de 4 kalveren die colostrum wordt onthouden, ziek wordt na experimentele inoculatie met bacterie en faag.



**Figuur 3.5** Plaques en elektronenmicroscopische opname van de bijhorende fagen [Park 2000].

Na drie dagen worden de kalveren gedood voor onderzoek. De 2 controle kalveren -alleen geïnfecteerd met bacteriën- zijn beide binnen 2 dagen dood.

*Park, Shimamura, Fukunaga, Mori and Nakai 2000*

De Ayu vis wordt veel gekweekt in Japan. Kweekvijvers hebben veel last van verschillende pathogenen. Een van die pathogenen is de *Pseudomonas plecoglossicida*. Park *et al.* impregneren voedsel met fagen of bacteriën. Vissen worden gevoed met bacteriën. Later wordt er al dan niet voedsel met fagen in de vijver gegooid. Het blijkt dat vissen significant baat hebben bij faagtherapie (tabel 3.3). Bij vissen die de infectie overleven en fagen hebben gegeten worden geen bacteriën teruggevonden. Bij vissen uit de controlegroep, die het overleven, worden wel bacteriën teruggevonden.

Het toevoegen van bacteriofagen, die virulent zijn voor de Pseudomonaden, aan de vijver blijkt maar een tijdelijk effect te hebben op de populatiedynamiek. Het toevoegen van alleen bacteriën aan een vijver leidt in twee dagen tot een vaste concentratie van  $10^4$  bacteriën per ml. Het toevoegen van  $10^4$  fagen leidt tot een korte dip van de bacteriepopulatie maar na 2 dagen is deze terug op  $10^4$  bacteriën per ml.

**Tabel 3.3** Faagtherapie bij vissen. Vissen worden via geïmpregneerd voedsel geïnoculeerd met *P. plecoglossicida* en wel of geen fagen [Park *et al.* 2000].

Gemiddeld gewicht vis (gram)	Behandeling	Dood binnen 2 weken %
10	geen faag	65
10	faag op t=0	22.5
2.4	geen faag	79
2.4	faag op t=1 uur	0
2.4	faag op t=24 uur	13

Er worden vier faag-resistente bacteriën gevonden na blootstelling van de vis aan de *Pseudomonas*. In een test waarin  $10^3$  niet-faagresistente bacteriën geïnjecteerd worden in vissen gaat 100% dood. Geen van de vier faag-resistente bacteriën kan, zelfs bij een dosis van  $10^4$  bacteriën, dood veroorzaken.

Park *et al.* tonen hiermee aan dat het natuurlijk evenwicht van de bacteriepopulatie in de vijver niet met fagen te verstoren is. Het verstoren van de bacteriepopulatie in de vissen is echter wel mogelijk.

*Nelson D, Loomis L, Fischetti VA 2001*

Nadat een bacteriofaag zich in een bacteriecel vermenigvuldigd heeft moeten hij en zijn kopieën er ook weer uit. Hiervoor maakt de bacteriofaag een enzym aan dat lysine heet. Dit enzym breekt de wand van de bacterie af.

Nelson *et al.* zuiveren dit enzym van een bacteriofaag die *Streptococcus pyogenes* parasiteert. Deze bacterie is een belangrijke veroorzaker van keelontsteking.

Wanneer ze duizend Units van het enzym in een oplossing met  $10^7$  bacteriën mengen zijn de bacteriën in vijf seconden allemaal dood.

Het enzym kent een grote specificiteit. Het bovenstaande experiment werkt slechts bij enkele van de streptococcus-soorten en vertoont geen activiteit bij *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa* of *Staphylococcus aureus*.

*In vivo* vertoont het enzym ook activiteit. Nelson *et al.* behandelen 21 muizen oraal en nasaal met één dosis (250 Units) met lysine en zeventien muizen ter controle met water. Vervolgens worden de muizen geïnfecteerd met  $10^7$  bacteriën. Bij de met lysine behandelde muizen zijn er na één dag zes (28,5%) door de streptococci gekoloniseerd. In de controlegroep zijn dit er twaalf (70,5%).

Negen muizen die na vier dagen veel bacteriën bij zich dragen worden alsnog behandeld met lysine. Na twee uur, na het bekijken van het keelslijm, lijkt het of alle bacteriën verdwenen zijn. Na één dag blijken er toch nog drie muizen geïnfecteerd te zijn en één van de muizen sterft na twee dagen.

Dit onderzoek toont aan dat ook producten van fagen onderzocht kunnen worden op hun therapeutische kwaliteiten. Er zou naar de potentie van verschillende lysines, voor verschillende gram-positieve bacteriën, onderzoek gedaan kunnen worden.

# Faagtherapie bij mensen

28

Met de opkomst van de antibiotica verdwijnen in het Westen de publicaties over faagtherapie bij mensen. In Rusland en Polen blijft onderzoek bestaan. Van het Russisch onderzoek zijn geen Engelstalige publicaties beschikbaar. Een klein aantal Russische artikelen zijn gelezen en in het Engels samengevat door Alisky [1998] en Sulakvelidze [2001].

In april 2001 bezocht de auteur van dit rapport het instituut voor immunologie en experimentele therapie in de Poolse stad Wroclaw. In dit instituut bevindt zich een laboratorium dat al twintig jaar patiënten behandelt met bacteriofagen, in de eerste jaren onder leiding van dr. S. Slopek en tegenwoordig onder leiding van dr. B. Weber-Dabrowska. De resultaten worden, in het Engels, gepubliceerd in: *Archivum Immunologiae et Therapiae Experimentalis*; een tijdschrift dat het instituut zelf uitgeeft.

Vanuit heel Polen, en ook vanuit het buurland Duitsland, komen mensen om geholpen te worden. Door het lage welvaartspeil in Polen is het echter onmogelijk om veel geld voor hun behandeling te vragen. Dit feit en, zoals een Poolse professor vertelde, de lage waardering die het communisme voor de wetenschap had heeft er toe geleid dat het laboratorium er financieel slecht voor staat. Het laboratorium heeft vier medewerkers en geen geld voor meer mensen of voor samenwerking met het grootschalige bacteriofaagonderzoek in Rusland.

Desondanks bezit het instituut een zeer degelijk laboratorium waar, tussen 1981 en 1999, 1.857 patiënten behandeld zijn. In gemiddeld 90% van de gevallen, afhankelijk van de soort infectie, herstelden de patiënten. Bij sommige infecties, zoals bij furunculose, was dit 100%.

Het ontbreken van controlegroepen zorgt er voor dat het onderzoek een anekdotisch karakter houdt. Dit is funest voor de acceptatie van bacteriofaagtherapie door de rest van de wetenschappelijke wereld. Op dit moment vinden er wel placebo-gecontroleerde klinische experimenten plaats.

Alle patiënten die faagtherapie krijgen zijn al eerder behandeld met antibiotica. Er wordt echter geen duidelijkheid geboden over de antibioticabehandelingen. Het is waarschijnlijk dat, zeker de duurdere, antibiotica vaak niet voorhanden zijn.

Bacteriofagen worden gebruikt bij ieder type infectie en bij mensen van alle leeftijden. De behandeling ziet er als volgt uit:

- Van de patiënt wordt/worden de pathogene bacterie(n) in reïncultuur gebracht.
- Vanuit hun faagbibliotheek wordt een faag gezocht die in de petrischaal grote, geheel heldere, plaques veroorzaakt. Wanneer meerdere fagen groten plaques veroorzaken wordt de patiënt met meerdere fagen tegelijkertijd behandeld.
  - De faag wordt in grote hoeveelheden gekweekt en over 10 ml ampullen verdeeld.
  - De patiënt neemt, drie maal daags, een half uur voor het eten, na neutralisatie van het maagzuur, de fagen oraal tot zich. Ook worden fagen, zover mogelijk, op de plek van infectie aangebracht.

- Tijdens de behandeling worden er nieuwe kweken van de infectie gemaakt en zonodig wordt er een nieuwe faag gezocht en ingezet.
- Faagtherapie duurt 1 tot 12 weken met een gemiddelde van 32 dagen.

Naast het voortdurend kweken van fagen voor patiënten zijn de Poolse onderzoekers bezig hun faagbibliotheek uit te breiden. Het komt nu voor dat er voor een patiënt geen goede, virulente faag voor handen is. Dit is een belangrijke reden waarom faagtherapie soms niet werkt.

Er zijn geen data over mogelijkheden van faagbehandeling bij herhaalde infectie.

Hieronder staat een samenvatting van de artikelen van Slopek en Weber-Dabrowska.

*Slopek et al. 1983*

In deze publicatie beschrijven Slopek *et al.* 138 patiënten die met faagtherapie behandeld zijn. In 125 gevallen heeft behandeling met antibiotica plaatsgevonden en heeft deze gefaald.

Van de 138 gevallen zijn er 90 mono-infecties (een infectie met één specifieke pathogene bacterie), voornamelijk de opportunistische *Staphylococcus*. Andere en poli-infecties (een infectie met meerdere pathogene bacteriesoorten) worden veroorzaakt door *Staphylococcus*, *Pseudomonas*, *Klebsiella*, *Escherichia* en *Proteus*.

Evaluatie vindt plaats door artsen die de patiënten in de volgende vier groepen onderverdelen:

- 1 complete genezing (22 gevallen)
- 2 genezing van de infectie (99 gevallen)
- 3 verbetering van de infectie, maar niet vrij van pathogene bacteriën (8 gevallen)
- 4 slechts een tijdelijke verbetering (9 gevallen)

Veel van de infecties zijn ziekenhuisinfecties, opgelopen tijdens behandeling of na operatie in het ziekenhuis. Genezing van infectie wil niet altijd zeggen dat mensen ook hun, soms vergevorderde, ziekte overleven.

Met een aantal statistische toetsen laten ze zien dat er geen verband bestaat tussen de mate van genezing en sekse, leeftijd (patiënten waren 0 tot 70) of de wijze van toediening van de faag. Ook vinden ze geen verschil in mate van genezing tussen infecties met wel of niet antibioticaresistente bacteriën. Sommige groepen zijn echter te klein voor goede statistische analyse.

90 patiënten krijgen tijdens hun faagtherapie ook antibiotica toegediend. In deze groep en in de groep die geen antibiotica meer krijgt, is er een ongeveer gelijk succespercentage ( $\pm 90\%$  valt in evaluatie groep 1 of 2).

Bijwerkingen blijken bij faagtherapie bijna niet voor te komen. Slechts één van de 138 mensen vertoonde lokaal allergische symptomen en twee kunnen de oraal toegevoegde faag niet binnenhouden. Soms krijgen patiënten rond dag 4 last van hun lever. Dit duurt dan een paar uur en dit is waarschijnlijk te wijten aan het vrijkomen van endotoxinen van de gelyseerde bacteriën. Patiënten met in het begin grote aantallen pathogene bacteriën hebben rond dag 7 een verhoogde lichaamstemperatuur. Rond dag 8 voelen patiënten zich over het algemeen gezonder. Lokale wonden vertonen vaak na 4 dagen goede verbetering.

Infecties die in het artikel behandeld worden zijn:

*Infecties van het spijsverteringskanaal*

*Infecties van het ademhalingsstelsel (keel- en longontsteking)*

*Infecties van het urinekanaal*

*Infecties van de huid*

Van de 90 mono-infecties zijn er 82 gebaat bij faagtherapie, bij de 48 poli-infecties zijn er 39 gebaat bij faagtherapie. De poverste resultaten worden behaald bij mensen met een ziekte aan hun ademhalingsstelsel.

*Slopek et al. 1984, 1985, 1987*

De Poolse onderzoeksgroep blijft gelijksoortige patiënten behandelen met soortgelijke resultaten. Het slagingspercentage (categorie 1 of 2) ligt steeds tegen de 90%. Infecties worden veroorzaakt door *Staphylococcus*, *Klebsiella*, *Escherichia*, *Proteus* of *Pseudomonas*.

De gevallen waarin faagtherapie faalt blijkt onder meer samen te hangen met de staat van de patiënt. Erg zieke mensen met een zeer verzwakt immuunsysteem hebben een kleinere kans dat de faagtherapie werkt.

Faagtherapie wordt toegepast bij mensen waarbij antibiotica niet meer werken (de antibiotica-behandelingen worden niet gespecificeerd). Sommige mensen krijgen naast hun faagtherapie toch nog antibiotica toegediend. Deze groep blijkt een significant kleiner succes percentage te hebben dan de groep die uitsluitend met fagen wordt behandeld.

In het review van 1987 doen Slopek *et al.* een aantal aanbevelingen, onder andere welke patiënten voor faagtherapie in aanmerking zouden moeten komen. Dit zouden patiënten moeten zijn met:

- Acute infectie van het spijsverteringskanaal
- Septicemia (bloedvergiftiging), van elk origine
- Postoperatieve infectie, elke locatie
- Purulente huid infecties, infectie van lymfevaten
- Purulente infecties van het ademhalingsstelsel
- Urineweg infecties
- Purulente infecties van gewrichten en botten
- Purulente fistulas (abnormale holtes)
- Als profylaxis bij brandwonden en operaties

30

*Kucharewics-Krukowska 1987*

De Poolse groep onderzoekt of er bij patiënten die fagen oraal krijgen toegediend, een immuunreactie op gang komt tegen de fagen. Ze kijken of er antilichamen in het bloed zitten.

Van de 57 onderzochte patiënten blijken er 44 geen antilichamen tegen fagen te hebben voor de aanvang van faagtherapie. Na 10 dagen zijn dit er nog 22. De patiënten die wel antilichamen ontwikkelen doen dit in een lage concentratie, zodat er vermoedelijk maar een kleine immuunreactie op gang zal komen.

Bij patiënten die het minst succes hebben bij faagtherapie worden antilichamen gevonden. Het zou therapie ten goede komen om op antilichamen te blijven controleren en zo nodig van fagen te verwisselen.

*Weber-Dabrowska 1987*

De Poolse groep onderzoekt ook of fagen die oraal worden toegediend het bloed of de urine bereiken. Van de 56 onderzochte patiënten heeft geen enkele fagen in zijn bloed of urine voor de behandeling. Na 10 dagen hebben van de 56 er 47 fagen in hun bloed en van de 26 hebben er 9 fagen in hun urine.

*Weber-Dabrowska 2000*

In deze recente publicatie worden de data van 1307 nieuwe gevallen geanalyseerd. Het grootste deel van de patiënten heeft volhardende infecties waarbij antibiotica niet heeft gewerkt. De effectiviteit van faagtherapie ligt rond de 90%.

In deze publicatie kondigt de groep een dubbel-blind placebo-gecontroleerd klinisch experiment aan naar de effectiviteit van faagtherapie. Verwacht wordt dat deze data medio 2001 beschikbaar komen.

In twee reviews zijn samenvattingen van een aantal onderzoeken te lezen die de afgelopen 40 jaar in Rusland en Georgië zijn gedaan. Uit deze artikelen blijkt dat men grote hoeveelheden onderzoeksdata mist wanneer men zich beperkt tot de Engelstalige literatuur.

In Georgië, Tbilisi, bevindt zich een laboratorium dat al sinds 1923 onderzoek doet naar de medische toepassingen van bacteriofagen. In 1963-64 wordt van daaruit een gigantisch onderzoek uitgevoerd naar het gebruik van fagen als profylaxis tegen dysenterie. Hierbij worden 30.769 kinderen opgedeeld in twee groepen, afhankelijk aan welke kant van de straat ze wonen. 17.044 kinderen krijgen één keer in de week *Shigella* fagen toegediend en 13.725 kinderen dienen als controle. De onderzoekers vinden bij de met faag behandelde kinderen gemiddeld bij 1,76 op de 1.000 kinderen dysenterie. Bij de controle groep is dit getal 3,8 maal hoger, 6,7 op de 1.000.

Andere onderzoeken tonen aan dat faagtherapie effectief is bij het behandelen van *Pseudomonas aeruginosa* infectie bij cystic fibrose patiënten. Ook hier wordt bij behandeling van verschillende postchirurgische infecties opnieuw een succes percentage van rond de 90% gevonden.

Een ander onderzoek uit de Sovjet-Unie is gericht op baby's die een te laag geboortegewicht hebben. Door toedoen van antibiotica zijn de bacteriën die in een gezonde darm zitten verdwenen. In dit microbieel vacuüm zijn pathogene bacteriën gaan zitten. 500 van deze baby's krijgen een faagmix toegediend tegen de pathogene bacteriën en ook krijgen ze bacteriën toegediend die thuishoren in een gezonde darmflora. Alle 500 baby's gaan hierna vooruit, de diarree stopt en ze komen weer aan.

In nog een groot onderzoek worden 1.390 patiënten behandeld met antibiotica, antibiotica + fagen of fagen alleen. De resultaten staan hieronder.

- 404 patiënten alleen **antibiotica**                      **48%** succes
- 576 patiënten **antibiotica** en **faag**                      **82%** succes
- 360 patiënten alleen **faag**                              **86%** succes



## Faagtherapie bij planten

32

De bacterie *Erwinia amylovora* kost fruitteilers in vele delen van de wereld jaarlijks grote delen van hun opbrengst. Antibiotica, veredeling en het gebruik van concurrerende, niet-virulente bacteriën heeft dit probleem niet opgelost. Schnabel en Jones schrijven in 2001 een aanzet tot het gebruik van fagen in de strijd tegen de plantenziekte veroorzakende *Erwinia*.

Ze isoleren en typeren een aantal fagen bij verschillende boomkwekerijen en testen de virulentie van de fagen *in vitro*. Er worden nog geen *in vivo* experimenten gedaan.

De fagen die gekozen worden om de bacterie te bestrijden komen in de natuur ook gewoon voor naast deze bacterie. Het aanbrengen van een extra aantal van deze fagen zal om deze reden geen grote impact hebben. Sterker, de hoeveelheid bacteriën tegen de hoeveelheid fagen zal waarschijnlijk snel weer in het oude evenwicht vallen. Schnabel en Jones stellen daarom het volgende plan voor: Het moment dat de bacterie het meeste schade aanricht is het moment dat de bloesems staan. Het aanbrengen van virulente fagen op de bloesems zou *Erwinia amylovora* tijdelijk kunnen onderdrukken en daarbij de bomen door deze kritieke periode heen kunnen helpen. Het laten koloniseren van de bloesem door een niet-virulente *Erwinia* gastheer zou een faagpopulatie kunnen helpen zich te vestigen en zich te laten onderhouden.

In overeenstemming met deze gedachten is een studie van Erskine uit 1973 die experimenteel aantoont dat het impregneren van peren met een *Erwinia* faag het ontwikkelen van symptomen vertraagt. Het impregneren van peren met een lysogene, niet-virulente *Erwinia* resulteert zelfs in symptoom vrije peren tot 21 dagen na incubatie met de pathogene *Erwinia amylovora*. Het inzetten van lysogene fagen tegen virulente bacteriën is in principe onverstandig. Deze fagen, als transporteurs van DNA, kunnen niet virulente bacteriën doen veranderen in wel-virulente bacteriën.

# Theoretische analyse

Theoretische modellen leveren soms onverwachte inzichten op of tonen aan dat de aandacht binnen een onderwerp verlegd moet worden. Levin and Bull maken in hun artikel uit 1996 een theoretische analyse van de resultaten van Smith en Huggins 1982 (zie hoofdstuk 3).

Smith en Huggins laten zien dat er een minimaal hoeveelheid bacteriën aan een muis moeten worden gegeven voor de muis dood gaat. Om een organisme te doden moet de bacterie een bepaalde dichtheid behalen. In theorie zou één bacterie, die zich al in twintig replicatieronden tot een miljoen vermeerdeert, dodelijk kunnen zijn. In de praktijk behaalt deze bacterie de letale dichtheid niet omdat het afweersysteem van het proefdier de bacteriën voortijdig ruimt. Dit proces kan als een soort wedloop gezien worden waarbij de bacterie zijn letale dichtheid probeert te halen voordat het afweersysteem goed en wel op gang komt.

Dat het in een lage concentratie toevoegen van faag niet werkt is dan ook uit dit model te verklaren. Wanneer er weinig faag wordt toegevoegd heeft de bacterie nog net ruimte en tijd genoeg om zijn letale dichtheid te behalen. Het toevoegen van grote hoeveelheden faag is dan wel effectief. Het ontstaan van faagresistente bacteriën hoeft dan ook geen probleem te zijn wanneer het immuunsysteem deze nog gewoon herkent. Doordat groei van de faaggevoelige bacterie beperkt wordt blijft de totale bacterie populatie lang genoeg onder de letale dichtheid en krijgt het afweersysteem van het proefdier de tijd om de infectie volledig op te lossen.

Payne en Jansen [2001] gaan verder op dit onderwerp. Ze realiseren zich dat het afweersysteem, in betrekking tot de faag, of de zogenaamde opruimsnelheid van vrije faag, meegenomen moet worden in de vergelijking. Ze komen op een model waaruit twee mogelijke werkingen van faagtherapie voortkomen.

- **Passieve therapie.** Hierbij wordt een grote hoeveelheid faag aan het geïnfecteerde organisme toegevoegd. De fagen infecteren één maal een bacterie en worden daarna uit het lichaam verwijderd. In de praktijk zal dit zichtbaar worden door een kortstondige daling van het aantal bacteriën. Een probleem bij deze vorm van therapie is dat de behandeling een aantal malen herhaald zou moeten worden, maar de afweer van het organisme zal waarschijnlijk bij herhaalde behandeling sneller op de fagen reageren.

- **Actieve therapie.** Hierbij wordt een kleine hoeveelheid fagen aan het geïnfecteerde organisme toegevoegd en er is een grote hoeveelheid bacteriën. De fagen zullen zich snel lokaal vermeerderen en de infectie oplossen. In de praktijk zal actieve therapie waarschijnlijk plaats moeten vinden wil faagtherapie slagen.

Het paradoxale van hun model is dat er veel bacteriën nodig zijn wil actieve faagtherapie succes hebben. Dit voorspelt dat additioneel toevoegen van antibiotica tijdens faagtherapie niet positief, maar negatief zou werken. Dit komt voornamelijk doordat het model rekening houdt met een laag hechtingspercentage van de faag aan de bacterie, terwijl de faag toch snel een hoog aantal moet halen. De negatieve invloed van antibiotica op faagtherapie is ook in een aantal empirische experimenten gevonden.

Waar Payne en Jansen niet over schrijven en Levin en Bull wel is het feit dat fagen in hun activiteit

afhankelijk zijn van de fysiologische staat van de bacterie. Veel fagen kunnen alleen bacteriën lyseren wanneer deze bacteriën in hun zogenaamde log fase zitten. Bij het selecteren van fagen zou dit een belangrijk zoekcriterium moeten zijn. Ook het gebruik van antibiotica, mocht het in situaties toch effectief blijken, die op de translatie/transcriptie machinerie werken zouden om deze reden vermeden moeten worden.

# Discussie

## 7.1 Waarom stopt onderzoek naar faagtherapie rond 1940?

35

In 1941 wordt in opdracht van de Amerikaanse 'Council on Pharmacy and Chemistry' een literatuurstudie gedaan naar faagtherapie. De studie verschijnt in 1941 in het tijdschrift the JAMA [Kreuger 1941] en is voornamelijk gebaseerd op de overzichtsartikelen van Eaton en Bayne-Jones uit 1934.

Reden voor deze studie is onder andere het evalueren van de faagpreparaten die door commerciële bedrijven verkocht worden. De conclusie luidt dat deze preparaten weinig tot geen activiteit *in vitro* bevatten en helemaal geen activiteit *in vivo*.

Er wordt in deze artikelen gespeculeerd over 'the nature of the bacteriophage phenomena' en de conclusie luidt dat het hoogstwaarschijnlijk een bacterieel enzym is, een enzym dat een soort zelfmoord veroorzaakt.

De doodsteek voor faagtherapie is de conclusie dat fagen *in vivo* de bacteriën niet lyseren. De artikelen die succes propageren over faagtherapie worden niet vertrouwd. Mogelijke therapeutische kwaliteiten van succesvolle faaglysaten worden toegeschreven aan immuniserende bacterie-resten in de preparaten.

In veel van het onderzoek naar bacteriofaagtherapie mist de controlegroep. Mensen worden behandeld met fagen, maar dit wordt niet vergeleken met mensen die een placebobehandeling krijgen. Het blijft zo onduidelijk hoe effectief faagtherapie is. Dit gebrek is ook een oorzaak dat faagtherapie niet geaccepteerd wordt.

Na de Tweede Wereldoorlog komen de antibiotica beschikbaar. Met dit nieuwe middel zijn fagen volledig overbodig geworden. Onderzoek naar de omstreden therapie valt in West-Europa en Amerika volledig stil. Achter het IJzeren Gordijn blijven er wel laboratoria onderzoek doen naar faagtherapie. Tot op de dag van vandaag zijn Polen en Rusland nog bezig met faagtherapie. Deze therapie wordt alleen toegepast op mensen bij wie antibiotica niet meer helpen.

## 7.2 Waarom komt onderzoek naar bacteriofagen terug?

In 1928 ontdekt Alexander Fleming de penicilline. Het duurt, met name vanwege de aanvankelijke problemen in de productie, tot de jaren 40 voor dit antibioticum als bruikbaar medicijn ontwikkeld is. Het is Fleming zelf die voorspelt dat dit medicijn geen eeuwig leven zal hebben. Een jaar na de introductie verschijnen er penicillineresistente *Staphylococci* in de ziekenhuizen. In 1950 zijn al 80% van de *Staphylococcus aureus* isolaten resistent en breidt deze resistentie zich uit naar andere bacteriesoorten. Velerlei bacteriën zijn resistent

geworden tegen de huidige antibiotica. Het probleem kan worden onderverdeeld in twee groepen [Cohen 1992, Davies 1996].

Ten eerste zijn er de ziekenhuisinfecties. De meest gevreesde verschijning is de methicilline-resistente *Staphylococcus aureus* (MRSA). Andere resistente veroorzakers van ziekenhuisinfecties zijn verschillende gramnegatieve bacteriën, zoals *Pseudomonas aeruginosa* en *Actinobacillus baumani*.

Ten tweede zijn er groepen resistente bacteriën die zich ophouden in verschillende delen van de samenleving. Resistentie tegen verschillende antibiotica is onder andere gevonden bij bacteriën in voedsel; *Salmonella*, bij luchtwegpathogenen; *Pneumococci*, bij seksueel overdraagbare organismen; *Gonococci* en bij bacteriën uit de feces-orale route als *Shigella*. Een gevreesde bacterie die nu veel voorkomt in Rusland is de multidrug-resistente *Tuberculosis* (MDRTB).

Antibioticaresistentie betekent grote problemen bij behandeling van infecties en is met name levensbedreigend voor mensen met een zeer verzwakte afweer.

Naast verstandig gebruik van de nog werkende antibiotica zijn er nieuwe antimicrobiële middelen nodig. Deze middelen kunnen nieuwe antibiotica zijn, vaccins, zogenaamde non-antibiotica (stoffen die de werking van antibiotica kunnen versterken of resistentie bij bacteriën elimineren) of bacteriofagen [Tan 2000].

Sinds de vijftiger jaren van de vorige eeuw is er veel veranderd in de biologie. De middelen om fagen en daarmee faagtherapie te bestuderen waren tussen 1920-1940 zeer beperkt. De conclusies van Kreuger in 1941 over de aard van de bacteriofaag wijzen op de grote kennis-hiaten van de toenmalige wetenschap rond dit onderwerp.

Vandaag de dag zijn bacteriofagen tot op hun DNA bekend. Van enkele fagen is het gehele genoom gesequenced. Deze kennis tezamen met de huidige technieken betekent een nieuwe kans voor onderzoek naar faagtherapie.

### 7.3 Hoe stevig is de wetenschappelijke basis voor het slagen van faagtherapie?

De meest opvallende publicaties over faagtherapie zijn die van Smith en Huggins, Merrill *et al* en Soothill *et al*. Deze artikelen tonen aan dat het gebruik van geselecteerde fagen effectief is tegen gecontroleerd geïnduceerde bacteriële infecties. De variëteit aan infecties is echter klein in deze studies: spijsverteringskanaal- en huidinfecties. Merrill [1996] toont aan dat er selectieprocedures te ontwikkelen zijn om fagen te verkrijgen die lang in een organisme actief aanwezig blijven.

Er zijn een aantal artikelen uit het Pools en Russisch vertaald die klinische studies van faagtherapie beschrijven en tot 90% succes claimen bij patiënten bij wie antibiotica niet meer helpen. Deze artikelen zijn al meerdere malen kort gereviewed in de westerse wetenschappelijke literatuur, maar hebben de westerse wetenschappelijke wereld slechts in zoverre van de potentie van faagtherapie overtuigd dat het als te onderzoeken alternatief genoemd wordt. Het gebrek aan overtuiging van deze artikelen zit hem in het ontbreken van placebo-gecontroleerde studies.

Er zijn een aantal bedrijven die aan faagtherapie werken en fagen voor klinische studies in voorraad hebben. Hun data worden echter niet openlijk gepubliceerd.

In het algemeen geldt dat door de grote specificiteit van bacteriofagen voor één type bacterie en door het relatief eenvoudig ontstaan van faagresistente bacteriën de mogelijkheid voor het maken van kant-en-klare faagpreparaten tegen toekomstige infecties beperkt is. Ook het toevoegen bijvoorbeeld van bacteriofagen aan veevoer, zoals dat gebeurt met antibiotica, zal om deze reden weinig uithalen.

De kracht van de faagtherapie zit hem, zoals aangetoond door Smith & Huggins en Slopek & Weber-Dabrowska, in de één op één behandeling, waarbij bij iedere infectie de bacterie geïsoleerd wordt en waar vervolgens een eigen bacteriofaag voor gezocht wordt. Deze methode, zowel als het maken van werkzame mixen van fagen, eist dat men beschikt over een grote bacteriofaagbibliotheek.

## 7.4 Faagpreparaten, verleden en toekomst

Felix d'Herelle leidde een commercieel laboratorium in Parijs dat bacteriofaagpreparaten verkocht via het bedrijf dat vandaag bekend is als l'Oreal. Ook ontstonden er bedrijven in Amerika die faagpreparaten verkochten voor behandeling van mensen. Er bestond veel controverse rond deze preparaten. Sommige mensen beweerden dat ze werkten, anderen beweerden dat ze absoluut niet werkten. Met de huidige kennis kan er gespeculeerd worden over wat er fout geweest is aan deze faagpreparaten.

- Men wist niet van lysogenie. Het is goed denkbaar dat er lysogene fagen in de preparaten zaten. Infectie van een bacterie met een lysogene faag betekent dat deze bacterie niet langer door fagen aangevallen kan worden.
- Inadequate zuiveringsmethoden resulteerden in preparaten die bacterieresten bevatten. Deze bacterieresten kunnen op zichzelf toxisch zijn voor mensen.
- Een slecht begrip van het spectrum en verscheidenheid van bacteriofagen, deze ideeën leidde mogelijk tot toediening van de verkeerde faag bij de verkeerde infectie.
- Opslag in vloeistoffen of desinfecterende middelen die bacteriofagen inactiveren; er werden preparaten verkocht die bij nader onderzoek bacteriën *in vitro* niet lyseerden.
- Orale toediening van een faagpreparaat zou vooraf moeten gaan door neutralisatie van het maagzuur. Lokale toediening op een wond zou niet vooraf moeten gaan door behandeling met desinfecterende middelen die ook de faag inactiveren.

Ontwikkeling en productie van bacteriofagen is in Rusland sinds 1923 geconcentreerd in Tbilisi, Georgië (Eliava instituut) en in Polen in Wroclaw (Hirszelfeld instituut).

In 1993 richt Dr. R. Carlton Exponential Biotherapies op. Het bedrijf heeft momenteel fagen tegen vancomycine-resistente *Enterococci* in voorbereiding voor klinische studie.

In 1998 richten G. Morris en A. Sulakvelidze het bedrijf Intralytix op met als doel de behandeling van mensen en dieren. Intralytix werkt nauw samen met het Eliava instituut in Georgië.

Het in 1996 opgerichte bedrijf Phage Therapeutics heeft een eerste klinische studie verricht. Een vrouw is succesvol behandeld met fagen tegen een dodelijke *Staphylococcus* infectie, opgelopen bij een operatie aan haar hart. Het bedrijf verwacht in 2003 een door de Amerikaanse FDA (Food and Drug Administration) goedgekeurd medicijn te kunnen verkopen.

## 7.5 Voordelen en beperkingen bij het gebruik van fagen als medicijn

### *Voordelen*

*'Phage can replicate, antibiotics only decay'* [Levin 1996].

- Faagtherapie kent, in vergelijking tot antibiotica, slechts weinig bijwerkingen, zoals blijkt uit het Pools-Russische onderzoek. Een enkele patiënt vertoont lokaal allergische symptomen, die ophouden wanneer met faagtherapie gestopt wordt. Een enkele patiënt kan de fagen niet binnen houden. Een angst bestaat echter dat bij intraveneuze injectie er in korte tijd zoveel bacteriën kunnen lyseren dat de patiënt kan bezwijken aan septische shock (het vrijkomen van toxische componenten van de bacterie). Deze manier van toedienen wordt ook niet gebruikt in Polen, mede omdat de faagpreparaten zelf nog niet compleet vrij zijn van toxines.
- Fagen vermeerderen zich alleen daar waar bacteriën zitten, op de plek van infectie.
- Productie van fagen is relatief goedkoop en, zeker wanneer ze bij één dosis werken, een stuk goedkoper dan antibiotica.
- Bij het ontstaan van faagresistente bacteriën zijn er vrij makkelijk nieuwe fagen te selecteren die deze nieuwe bacterie kunnen aanpakken.
- Onderzoek toont aan dat faagresistente bacteriën soms een stuk virulentie hebben verloren.

- Een voordeel, als ook een nadeel, is dat fagen een klein aanvalsspectrum hebben. Dit betekent dat voor verschillende bacterietypen verschillende fagen nodig zijn. Alle *Pseudomonas aeruginosa* typen zijn pas met een mix van twintig fagen te bestrijken. Het voordeel is dat een faag niet, zoals antibiotica wel doen, de goede bacteriën doodt. Antibiotica verstoren de darm- en huidflora, wat kan leiden tot opportunistische infecties door bijvoorbeeld schimmels en wat vrij spel betekent voor antibioticaresistente bacteriën.

#### *Beperkingen*

- Een niet te onderschatten gevaar van fagen is lysogenie. Lysogene fagen, naast dat ze de bacteriën niet efficiënt lyseren, kunnen antibioticaresistentie en toxiciteit overdragen tussen bacteriën. Lysogene fagen kunnen niet gebruikt worden als medicijn. Ook lytische fagen kunnen DNA van hun gastheer vervoeren. Zolang een faag lytisch is zal dit DNA echter niet bij een andere bacterie worden ingebouwd.
- Het kleine aanvalsspectrum van fagen betekent dat de zoektocht naar een juiste faag voor een bepaalde infectie intensief en misschien soms vruchteloos kan zijn.
- Er zijn onopgeloste vragen rond het gebruik van bacteriofagen als medicijn;
  - Is faagtherapie te herhalen wanneer mensen na onbepaalde tijd een zelfde infectie terugkrijgen?
  - Is faagtherapie voor vele verschillende infecties een antwoord?
  - Kunnen fagen alle verschillende plekken waar bacteriën kunnen zitten in een patiënt bereiken?

38

### 7.6 Selectie- en modificatiecriteria van de superfaag

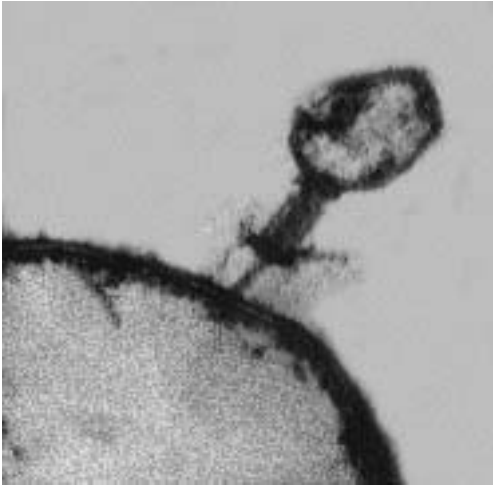
De faag die snel een hele bacteriepopulatie in zijn natuurlijke omgeving vernietigt zal niet snel te vinden zijn. Het paradoxale van een parasiet is dat hij zijn eigen huis afbreekt om te overleven. In de natuur overleven dus alleen de parasieten die sommige van hun gastheren laten ontsnappen. Door selectie en modificatie van fagen in het laboratorium zou men een faag kunnen verkrijgen die virulenter is voor bacteriën dan zijn voorganger, een superfaag.

De superfaag zou aan de volgende criteria moeten voldoen:

- Niet lysogeen; lysogenie leidt tot faag-resistente bacteriën en kan leiden tot conversie van bacteriën (extra antibioticaresistentie en toxiciteit). Dit criterium kan behaald worden door niet-lysogene fagen te selecteren of door wel-lysogene fagen te modificeren.
- Actief *in vivo*; grote activiteit *in vitro* betekent niet grote activiteit *in vivo*. Grote *in vitro* activiteit kan wel als leidraad voor selectie genomen worden. Gedacht moet onder andere worden aan de temperatuur waarbij de faag maximaal actief is en de temperatuur van de plek waar de faag zijn werk moet doen.
- Adsorptie; de superfaag grijpt aan op factoren die van invloed zijn op de mate van virulentie van de bacterie. Een voorbeeld is het K-antigen van *E. coli* [Smith and Huggins 1987].
- Spectrum; de superfaag kan binnen een soort veel verschillende bacterietypen aanpakken.
- Burst size; de superfaag lyseert de bacterie pas wanneer er zeer veel kopieën gemaakt zijn, wat leidt tot hoge lokale (op de plek van infectie) reproductie.
- Latentie periode; de superfaag maakt zeer snel veel kopieën.
- Onafhankelijk van de fysiologische staat van de gastheer; de superfaag kan zeer effectief gebruik maken van de transcriptie/translatie machinerie van de gastheer, ook wanneer deze zelf weinig actief is.
- Long-circulating *in vivo*; de superfaag weet voor een langere tijd het afweersysteem van de patiënt te omzeilen [Merril 1996].

### 7.7 Onderzoek en toepassing

Eén faag maakt in een half uur, ten koste van zijn gastheer, honderden kopieën. In aanwezigheid van voldoende gastheren, in een aantal uren, miljoenen. Het idee dat één faag een infectie kan genezen is echter



**Figuur 7.1** Elektronenmicroscopische opname van een faag tijdens infectie (bron E.B. Kutter [www.phage.org](http://www.phage.org)).

verre van haalbaar. Het probleem voor de bacteriofaag is, bereikt hij de plek van infectie en bereikt hij de plek op tijd?

Het is nog maar de vraag of bacteriofagen ingezet kunnen worden tegen alle soorten bacteriële infecties. Sommige pathogene bacteriën reproducen in de cellen van andere organismen (bijvoorbeeld *Shigella*). Andere bacteriën verschuilen zich in een slijmkapsel (bijvoorbeeld *Pseudomonas*) of zitten in moeilijk penetreerbare abscessen. Deze vraag eist meer onderzoek.

39

Het tweede probleem is dat de bacteriofagen de infectie moeten inperken voordat ze herkend worden door het afweersysteem en zelf worden opgeruimd. Er moet onderzocht worden of er fagen zijn te verkrijgen die lang genoeg het afweersysteem kunnen omzeilen. Levin [1996] beschrijft het spel van faag, bacterie en afweer als een wedloop. Eerst zijn het alleen de fagen die de bacteriën aanpakken maar al snel komt de afweer op gang die zowel de bacterie als de faag aanpakt. De actieve faag moet zolang kunnen bestaan tot de afweer het over kan nemen.

Onderzoek zou zich onder andere moeten richten op de haalbaarheid van actieve therapie: het eenmaal toedienen van een kleine dosis faag, tegenover passieve therapie: het meerdere malen toedienen van een grote dosis faag. De grootste kans voor het slagen van faagtherapie is wanneer deze werkt bij het toedienen van één maal, één dosis.

Een toepassing van fagen zou het gebruik als profylaxis kunnen zijn. Dit zou tijdens chirurgie of bij brandwonden kunnen gebeuren. Dit zouden fagen tegen de meest moeilijk behandelbare bacteriën moeten zijn. Een mogelijk probleem bij het gebruik van fagen als profylaxis is de tijdsduur dat de patiënt extra gevoelig is voor bacteriële infectie tegenover de misschien kortere tijdsduur van de beschermende werking van de bacteriofaag.

Een tweede toepassing van faag als profylaxis ligt in de diergeneeskunde. Smith en Huggins [1983] tonen aan dat geïnfecteerd vee, na behandeling met fagen, niet meer besmettelijk is. Snelle diagnostiek en faagbehandeling van microbiële infecties zou uitbreiding van ziekten kunnen voorkomen.

Faagtherapie zou ook ter verbetering van de voedselveiligheid kunnen dienen, zeker nu de vraag naar meer milieu-verantwoord voedsel toeneemt. De gevaarlijke *Salmonella*, die het pluimvee met zich meedraagt, zou door toediening van fagen voor de slacht, in kleinere aantallen in het voedsel belanden.

Het specifiek getimed onderdrukken van een bacteriepopulatie zou ook voor de fruitteelt, bijvoorbeeld in de gevoelige periode dat de bloesems staan, mogelijk een toepassing zijn.

Faagtherapie zit na meer dan tachtig jaar nog in haar onderzoeksstadium, maar zij is nog niet verloren. In het licht van de antibioticaresistentie zijn er interessante perspectieven.



# Literatuur

40

## **Zoekingangen van deze literatuur studie:**

- The Bacteriophage Homepage <http://www.evergreen.edu/user/T4/home.html> Een wetenschappelijke homepage die een groot aantal referenties van recente en oudere wetenschappelijke artikelen en reviews bevat.
- <http://www.phage.org> Een lijst van mensen die over de wereld aan bacteriofagen werken.
- Medline (zoekmachine voor medische en biologische tijdschriften)  
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed> gezocht met de termen, Bacteriophage/Phage Therapy, of op naam van onderzoekers.
- Science Citation Index, gezocht met zoektermen, Bacteriophage/Phage Therapy.

## **Studieboeken**

Bij het schrijven van dit rapport zijn de volgende studieboeken geraadpleegd:

### **Guyton, Hall (1991)**

Medical Physiology *textbook of*. WB Saunders Company. Ninth edition.

### **Levine A.J. (1994)**

Virussen *het draaiboek van een epidemie*. Natuur en Techniek, Maastricht.

### **Lewis Sinclair (1945)**

Arrowsmith. Harcourt, Brace and Company. (roman)

### **Ptashne M. (1992)**

A genetic switch. Blackwell Scientific Publications & Cell Press.

### **Summers W.C. (1998)**

D'Herelle *and the origins of molecular biology*. Yale University Press.

### **Tortora, Funke, Case (1995)**

Microbiology *an introduction*. Benjamin/Cummings Publishing. Fifth edition.

## Referenties

**Ackerman H.W. (1996)**

Frequency of morphological phage descriptions in 1995. Arch. Virol. 141:209-218

**Alisky J., K. Iczkowski, A. Rapoport, N. Troitsky (1998)**

Bacteriophages show promise as antimicrobial agents. J. Inf. 36:5-15

**Barrow P.A., J. Soothill (1997)**

Bacteriophage therapy and prophylaxis: rediscovery and renewed assessment of potential. Trends in Microbiol. 5:268-271

**Barrow P.A., M.A. Lovell, A. Berchieri (1998)**

Use of bacteriophage for control of experimental *Escherichia coli* septicemia and meningitis in chickens and calves. Clin. Diagn. Lab. Immunol. 5:294-298

**Berchieri A., M.A. Lovell, P.A. Barrow (1991)**

The activity in the chicken alimentary tract of bacteriophages lytic for *Salmonella typhimurium*. Res. Microbiol. 142:541-549

41

**Carlton R.M. (1999)**

Phage therapy: Past history and future prospects. Arch. Immun. Ther. Exp. 47

**Cohen M.L., H.C. Neu, R.M. Krause, I.D. Kuntz (1992)**

Epidemiology of drug resistance: Implications for a Post-Antimicrobial Era. Science 257:1050-1064, 1064-1073, 1073-1078, 1078-1082

**Davies J. (1996)**

Bacteria on the rampage. Nature 383:219-220

**D'Herelle F. (1917)**

Sur un microbe invisible antagoniste des bacilles dysentériques. Comptes rendus acad. Sci. Paris 165:373-375

**D'Herelle F. (1919)**

Du rôle du microbe filtrant bacteriophage dans la fièvre typhoïde. Comptes rendus acad. Sci. Paris 169:932-934

**D'Herelle F. (1923)**

Les défenses de l'organisme. Paris, E. Flammarion

**Eaton M.D and S. Bayne-Jones (1934)**

Bacteriophage therapy. J.A.M.A. 103:1769-1776, 1847-1853, 1934-1939

**Erskine J.M. (1973)**

Characteristics of *Erwinia amylovora* bacteriophage and its possible role in the epidemiology of fire blight. Can. J. Microbiol. 19:837-845

**Geier M.R., M.E. Trigg, C.R. Merrill (1973)**

Fate of bacteriophage lambda in non-immune germ-free mice. Nature 246:221-223

**Kreuger A.P. and J.E. Scribner (1941)**

Bacteriophage therapy : 2.J.A.M.A. 116:2160-2167

**Kucharewics-Krukowska A., S. Slopek (1987)**

Immunogenic effect of bacteriophage in patients subjected to phage therapy. Arch. Immun. Ther. Exp. 35:553-561

**Kutter E. (1997)**

Phage therapy. Bacteriophages as antibiotics. Evergreen State College. Olympia WA 980505 Nov. 15.

**Levin B.R. and J.J. Bull (1996)**

Phage therapy revisited: the population biology of a bacterial infection and its treatment with bacteriophage and antibiotics. Am. Nat. 147:881-898

**Merril C.R., B. Biswas, R. Carlton, N.C. Jensen, G.J. Creed, S. Zullo, S. Adhya (1996)**

Long-circulating bacteriophage as antibacterial agents. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 93:3188-3192

42

**Nelson D., L. Loomis, V.A. Fischetti (2001)**

Prevention and elimination of upper respiratory colonization of mice by group A streptococci by using a bacteriophage lytic enzyme. Proc. Natl. Acad. Sci. 98:4107-4112

**Park S.C., E. Shimura, M. Fukunaga, K.I. Mori, T. Nakai (2000)**

Isolation of bacteriophages specific to a fish pathogen, *Pseudomona pleoglossicida*, as a candidate for disease control. Appl. Environ. Microbiol. 66:1416-1422

**Payne R.J.H. and V.A.A. Jansen (2001)**

Understanding bacteriophage therapy as a density-dependent kinetic process. J. Theor. Biol. 208:37-48

**Schnabel E.L. and A.L. Jones (2001)**

Isolation and characterization of five *Erwinia amylovora* bacteriophages and assessment of phage resistance in strains of *Erwinia amylovora*. Appl. Environ. Microbiol. 67:59-64

**Slopek S., I. Durlakowa, B. Weber-Dabrowska, A. Kucharewicz-Krukowska, M. Dabrowski, R. Bisikiewics (1983)**

Results of bacteriophage treatment of suppurative bacterial infections. Arch. Immun. Ther. Exp. 31:267

**Slopek S., I. Durlakowa, B. Weber-Dabrowska, M. Dabrowski, Kucharewicz-A. Krukowska (1984)**

Results of bacteriophage treatment of suppurative bacterial infections. Detailed evaluation of the results obtained in further 150 cases. Arch. Immun. Ther. Exp. 32:317-335

**Slopek S., A. Kucharewicz-Krukowska, B. Weber-Dabrowska, M. Dabrowski (1985)**

Results of bacteriophage treatment of suppurative bacterial infections. Evaluation of the results obtained in 370 cases. Arch. Immun. Ther. Exp. 33:219-240

**Slopek S., A. Kucharewicz-Krukowska, B. Weber-Dabrowska, M. Dabrowski (1985)**

Results of bacteriophage treatment of suppurative bacterial infections. Evaluation of the results obtained in children. Arch. Immun. Ther. Exp. 33:241-259

**Slopek S., A. Kucharewicz-Krukowska, B. Weber-Dabrowska, M. Dabrowski (1985)**

Results of bacteriophage treatment of suppurative bacterial infections. Analysis of treatment of suppurative staphylococcal infections. Arch. Immun. Ther. Exp. 33:261-273

**Slopek S., B. Weber-Dabrowska, M. Dabrowski, A. Kucharewicz-Krukowska (1987)**

Results of bacteriophage treatment of suppurative bacterial infections in the years 1981-1986. Arch. Immun. Ther. Exp. 35:569

**Smith H.W. and M.B. Huggins (1982)**

Successful treatment of experimental *Escherichia coli* infections in mice using phage: its general superiority over antibiotics. J. Gen. Microbiol. 128:307-318

**Smith H.W. and M.B. Huggins (1983)**

Effectiveness of phages in treating experimental *Escherichia coli* diarrhoea in calves, piglets and lambs. J. Gen. Microbiol. 129:2659-2675

**Smith H.W., M.B. Huggins and K.M. Shaw (1987)(1)**

The control of experimental *Escherichia coli* diarrhoea in calves by means of bacteriophages. J. Gen. Microbiol. 133:1111-1126

43

**Smith H.W., M.B. Huggins and K.M. Shaw (1987)(2)**

Factors influencing survival and multiplication of bacteriophages in calves and in their environment. J. Gen. Microbiol. 133:1127-1135

**Soothill J.S., J.C. Lawrence, G.A.J. Ayliffe (1988)**

The efficacy of phages in the prevention of the destruction of pig skin *in vitro* by *Pseudomonas aeruginosa*. Med. Sci. Res. 16:1287-1288

**Soothill J.S., (1992)**

Treatment of experimental infections of mice with bacteriophages. J. Med. Microbiol. 37:258-261

**Soothil J.S. (1994)**

Bacteriophage prevents destruction of skin grafts by *Pseudomonas aeruginosa*. Burns 20:209-211

**Sulakvelidze A., Z. Alavidze, J.G. Morris (2001)**

Bacteriophage therapy. Antimicrob. Agents Chemother. 45:649-659

**Tan Y.T., D.J. Tillett, I.A. Mckay (2000)**

Molecular strategies for overcoming antibiotic resistance in bacteria. Mol. Med. Today 6:309-314

**Twort (1915)**

An investigation on the nature of ultra-microscopic viruses. Lancet 2:1241-1243

**Weber-Dabrowska B., M. Dabrowski, S. Slopek (1987)**

Studies on bacteriophage penetration in patients subjected to phage therapy. 35:563-568

**Weber-Dabrowska B., M. Mulczyk, A. Gorski (2000)**

Bacteriophage therapy of bacterial infections: an update of our institute's experience. Arch. Immun. Ther. Exp. 33:261-273

# Begrippenlijst

44

<b>Bacteriofaag</b>	Bacteriëel virus (=faag)
<b>Bacteriofaagtherapie</b>	Het gebruik van bacteriofagen ter bestrijding van bacteriële infecties
<b>Conversie</b>	omzetting, hier; omzetting naar een bacterie met nieuwe eigenschappen
<b>Endotoxine</b>	Giftige stof die uit afgestorven bacteriën vrijkomt
<b>Enteropathogeen</b>	Ziekteverwekker uit het spijsverteringskanaal
<b>Faaglysaat</b>	Een oplossing met fagen verkregen door filtratie
<b><i>In vitro</i></b>	In glas, in de reageerbuis
<b><i>In vivo</i></b>	In het intacte organisme
<b>Kolf</b>	Glazen vat, o.a. voor het kweken van bacteriën
<b>Inoculeren</b>	Inenten
<b>LD 50</b>	Lethal Dosis 50, concentratie van een stof waarbij 50% van de proefdieren dood gaat
<b>Log-fase</b>	Fase dat bacteriën exponentieel groeien
<b>Lyseren</b>	Het oplossen/openbarsten van bacteriën
<b>Lysogene faag</b>	Een faag die zijn DNA bij de gastheercel inbouwt en de gastheer hierbij laat leven
<b>Reincultuur</b>	Bacteriekweek met bacteriën van een zelfde soort
<b>Opportunistische bacterie</b>	Een bacterie die alleen een persoon met een verzwakte afweer kan koloniseren
<b>Pathogeen</b>	Ziekteverwekkend
<b>Populatiedynamiek</b>	De aantallen organismen in een populatie over een bepaalde tijd
<b>Purulent</b>	Etterend
<b>Titer</b>	Hoeveelheid virussen in een oplossing
<b>Profylaxis</b>	Geneesmiddel ter voorkoming van ziekte
<b>Virulentie</b>	Vermogen om schade te doen

De Wetenschapswinkel Biologie is een onderzoeksbemiddelings- en adviescentrum op het gebied van biologie, natuur, milieu, gezondheid en educatie. De wetenschapswinkel wil wetenschappelijk onderzoek toegankelijk maken voor maatschappelijk relevante problematiek.

De Wetenschapswinkel Biologie is een onderdeel van de Faculteit Biologie van de Universiteit Utrecht.

Het is niet toegestaan (gedeelten van) deze uitgave te vermenigvuldigen door middel van druk, fotokopie, microfilm of op welke andere wijze dan ook.

Overname van gedeelten van de tekst, mits met bronvermelding, is wel toegestaan.

Toezening van een bewijs-exemplaar wordt zeer op prijs gesteld.

**Wetenschapswinkel Biologie, Universiteit Utrecht, Padualaan 8 / Z 402, 3584 CH Utrecht.**

Telefoon: (030) 253 73 63. Fax: (030) 253 57 95. E-mail: [wbu@bio.uu.nl](mailto:wbu@bio.uu.nl). Website: <http://www.bio.uu.nl/~wbu>

Wetenschapswinkel Biologie, Padualaan 8 / Z 402, 3584 CH Utrecht, (030) 253 73 63

