

**„Porównanie efektywności antybiotykoterapii i fagoterapii w zwalczaniu bakterii
Salmonella enterica powodujących zakażenia drobiu”
mgr Katarzyna Kosznik-Kwaśnicka**

Artykuły wchodzące w skład rozprawy doktorskiej:

Artykuł 1 Kosznik-Kwaśnicka, K.; Topka, G.; Dydecka, A.; Necel, A.; Nejman-Faleńczyk, B.; Bloch, S.; Węgrzyn, G.; Węgrzyn, A. The Use of Bacteriophages in Animal Health and Food Protection. In Phage Therapy: A Practical Approach; Springer: Cham, Switzerland, 2019; pp. 213–256.

Artykuł 2 Kosznik-Kwaśnicka, Katarzyna, Karolina Ciemińska, Michał Grabski, Łukasz Grabowski, Marcin Górniak, Agata Jurczak-Kurek, Grzegorz Węgrzyn, and Alicja Węgrzyn. 2020. Characteristics of a Series of Three Bacteriophages Infecting *Salmonella enterica* Strains, International Journal of Molecular Sciences 21, no. 17: 6152. <https://doi.org/10.3390/ijms21176152>

Artykuł 3 Kosznik-Kwaśnicka, Katarzyna, Łukasz Grabowski, Michał Grabski, Mateusz Kaszubski, Marcin Górniak, Agata Jurczak-Kurek, Grzegorz Węgrzyn, and Alicja Węgrzyn. 2020. "Bacteriophages vB_Sen-TO17 and vB_Sen-E22, Newly Isolated Viruses from Chicken Feces, Specific for Several *Salmonella enterica* Strains" International Journal of Molecular Sciences 21, no. 22: 8821. <https://doi.org/10.3390/ijms21228821>

Artykuł 4 Kosznik-Kwaśnicka K, Stasiłojć M, Grabowski Ł, Zdrojewska K, Węgrzyn G, Węgrzyn A. (2022) Efficacy and safety of phage therapy against *Salmonella enterica* serovars Typhimurium and Enteritidis estimated by using a battery of in vitro tests and the *Galleria mellonella* animal model Microbiological Research Volume 261, 127052, <https://doi.org/10.1016/j.micres.2022.127052>

Artykuł 5 Kosznik-Kwaśnicka K, Podlacha M, Grabowski Ł, Stasiłojć M, Nowak-Zaleska A, Ciemińska K, Cyske Z, Dydecka A, Gaffke L, Mantej J, Myślińska D, Necel A, Pierzynowska K, Piotrowska E, Radzanowska-Alenowicz E, Rintz E, Sitko K, Topka-Bielecka G, Węgrzyn G and Węgrzyn A (2022) Biological aspects of phage therapy versus antibiotics against *Salmonella enterica* serovar Typhimurium infection of chickens. Front. Cell. Infect. Microbiol. 12:941867. doi: 10.3389/fcimb.2022.941867

Mięso drobiowe jest obecnie najczęściej spożywanym mięsem na świecie. W 2020 roku na osobę przypadało ok. 14,9 kg mięsa drobiowego, dla porównania, konsumpcja wołowiny wynosiła 6,4 kg/os., a wieprzowiny 10,7 kg/os. (dane OECD na 2020 rok, <https://data.oecd.org/agroutput/meat-consumption.htm>). Produkcja mięsa drobiowego przekracza obecnie 100 mln ton, a szacuje się, że ma ona wzrosnąć o kolejne 17% do roku 2030. Prognozuje się też, że do 2030 roku drób stanowić będzie ok. 41% produktów mięsnych dostępnych na rynku (OECD-FAO). Aby sprostać wymaganiom coraz większych potrzeb konsumentów, hodowcy skupiają się na zwiększeniu wydajności hodowli poprzez przyspieszanie wzrostu i przyrostu masy mięśniowej ptaków. W tym celu pasza dla kur wzbogacana jest o aminokwasy, witaminy, enzymy i probiotyki, a ostatnio także o ekstrakty roślinne czy olejki eteryczne (Zhai i in. 2018; Borda-Molina i in. 2019). Od lat 50-tych ubiegłego wieku najpopularniejszym promotorem wzrostu były antybiotyki, m.in. tetracyklina, bacytracyna czy penicylina G (Castanon 2007). Badania wykazały, że podawanie antybiotyków w subterapeutycznych stężeniach zwiększały przyrost masy mięśniowej u zwierząt hodowlanych poprzez stabilizację mikrobiomu jelitowego, co przekładało się na lepsze przyswajanie składników odżywczych z diety i tym samym zwiększenie przyrostu masy ciała (Chattopadhyay 2014). Po latach takich praktyk okazało się jednak, że antybiotyki stosowane w przemysłowej hodowli zwierząt miały negatywny wpływ na środowisko oraz na organizm ludzki. Długotrwała ekspozycja na pozostałości antybiotyków w mięsie powodowała nieustanną aktywację układu immunologicznego człowieka, prowadząc do nadwrażliwości i stanów zapalnych w układzie pokarmowym, a także powodowała niekorzystne zmiany w mikrobiomie jelitowym (Donoghue 2003; Ramatla i in. 2017; Binienda i in. 2020; Zhang i in. 2021). Ponadto badania wykazały, że stosowanie antybiotyków jako dodatków do pasz w znacznym stopniu przyczyniało się do wykształcania przez bakterie lekooporności oraz do

rozprzestrzeniania się tych bakterii w środowisku (Castanon 2007; Chattopadhyay 2014). Biorąc pod uwagę powyższe dane Światowa Organizacja Zdrowia (WHO) oraz Amerykańska Agencja ds. Żywności i Leków (FDA) rozpoczęły propagowanie idei radykalnego ograniczenia stosowania antybiotyków jako promotorów wzrostu. Pierwszą regulacją prawną była wydana przez Unię Europejską uchwała 1831/2003, która zakładała delegalizację stosowania antybiotyków w paszach dla zwierząt hodowlanych od 1 stycznia 2006 roku (Bedford 2000; Castanon 2007). Dalsze regulacje dotyczące limitów pozostałości substancji farmakologicznie czynnych w środkach spożywczych pochodzenia zwierzęcego zostały wprowadzone rozporządzeniem Parlamentu Europejskiego i Rady Europy nr 470/2009, a rozporządzenie UE 2019/6 zakładało całkowite wykluczenie stosowania większości antybiotyków w weterynarii, wliczając w to zastosowanie ich w celach terapeutycznych.

Wprowadzenie wyżej wymienionych przepisów dotyczących stosowania antybiotyków w hodowlach przemysłowych miało na celu ograniczenie nabywania oporności patogennych bakterii na antybiotyki oraz podniesienie jakości pozyskiwanego mięsa (Attia i in. 2011; Chattopadhyay 2014). Oznaczało to jednak, że w wyniku wprowadzenia w życie surowych regulacji prawnych, hodowcy mieli być pozbawieni możliwości profilaktycznego stosowania antybiotyków w celu zabezpieczenia stada przed kolonizacją przez patogenne bakterie oraz ich leczenia (Bedford 2000). Przepisy te pozwoliły na zdecydowane obniżenie ilości antybiotyków stosowanych w hodowli przemysłowej drobiu w Unii Europejskiej, ale równocześnie uświadomiły konieczność poszukiwania ekologicznych metod eliminacji patogennych bakterii z hodowli.

Salmonelloza to choroba najczęściej kojarzona z mięsem drobiowym oraz innymi produktami pochodzącymi od hodowlanego ptactwa, np. podrobami i jajami. Jest to grupa chorób zakaźnych wywoływanych przez bakterie z gatunku *Salmonella enterica*, który dzieli się na ponad 2500 serotypów o różnym stopniu patogenności. Serotypy najczęściej odpowiedzialne za wywoływanie salmonelloz to *S. Typhimurium* i *S. Enteritidis* (Gal-Mor i in. 2014) [artykuł 1]. Zakażenia bakteriami z rodzaju *Salmonella* przybierają różne postacie kliniczne oraz różnią się stopniem ciężkości. Do najczęstszych objawów należą bóle brzucha, biegunka (czasem krwawa), gorączka, a czasem także wymioty. W skrajnych przypadkach może dochodzić do penetracji bariery jelitowej i przedostania się bakterii do krwi, co może skutkować takimi powikłaniami jak sepsa czy zapalenie opon mózgowo-rdzeniowych (Cianflone 2008; Sánchez-Vargas i in. 2011). Szacuje się, że na świecie dochodzi do około 100 milionów zachorowań tą bakterią oraz 150 000 zgonów rocznie. W Europie zapadalność na tę chorobę określa się jako 690 przypadków na 100 000 rocznie (Sánchez-Vargas i in. 2011; Gal-Mor i in. 2014). Dla większości serotypów *S. enterica* ptaki pełnią rolę nosiciela, bez wykazywania objawów chorobowych. W sprzyjających warunkach *S. enterica* kolonizuje układ pokarmowy kurcząt, a do skażenia mięsa lub podrobów dochodzi najczęściej podczas obróbki tuszek w masarni, gdzie może dochodzić do uszkodzenia jelit i wylania się ich treści, co jest równoznaczne z nadkażeniem mięsa (Fries 2002; Adeyanju i Ishola 2014).

W związku z faktem, że salmonellozy znajdują się w czołówce zatruć pokarmowych w wielu krajach, w tym w Polsce, stosowana jest tak zwana polityka „zero tolerancji”. Polega ona m.in. na tym, że jeśli podczas kontroli weterynaryjnych w stadzie wykryte zostaną bakterie z rodzaju *Salmonella* stado zostaje poddane terminacji, co wiąże się z dużymi stratami finansowymi hodowców (Ehuwa i in. 2021). Kurczęta nie są poddawane leczeniu, gdyż uniemożliwiają to z jednej strony przepisy prawne, o których była mowa powyżej, oraz fakt, że dostępne w weterynarii antybiotyki o szerokim spektrum działania są wysoce toksyczne, wywołują szereg skutków ubocznych u zwierząt, a także mają długi okres karencji po zastosowaniu, przez co mogą być potencjalnie toksyczne dla ludzi (Grabowski i in. 2022).

Ponieważ hodowla drobiu oraz produkcja mięsa drobiowego jest wciąż dynamicznie rozwijającą się gałęzią światowego przemysłu spożywczego, a Polska znajduje się w czołówce krajów Unii Europejskiej pod względem produkcji i eksportu mięsa drobiowego, potrzebne jest opracowanie alternatywnej, w stosunku do antybiotyków, metody zapobiegania kolonizacji jelit kurcząt przez patogeny takie jak *S. enterica* (Pawłowska i Sosnowka-Czajka 2019). Jedną z obecnie proponowanych metod jest zastosowanie fagoterapii, czyli preparatów opartych na bakteriofagach.

Bakteriofagi to wirusy infekujące i namnażające się w bakteriach. Ta cecha biologii fagów stała się podstawą zwalczania infekcji bakteryjnych. Fagoterapia u ludzi jest z powodzeniem stosowana od ponad 100 lat w Gruzji, gdzie preparaty fagowe są dostępne w aptekach jako leki bez recepty (Parfitt 2005). W krajach należących do Unii Europejskiej, m.in. w Polsce, terapia fagowa stosowana jest jako terapia eksperymentalna, chociaż coraz więcej krajów podejmuje działania mające na celu wdrożenie jej jako jednej ze standardowych metod leczenia zakażeń (Pirnay i in. 2018). Potencjał bakteriofagów został dostrzeżony także przez różne gałęzie przemysłu, także przez przemysł spożywczy. Rok 2006 był przełomowy w historii stosowania bakteriofagów w profilaktyce chorób bakteryjnych. FDA oraz amerykańskie Ministerstwo Rolnictwa zatwierdziło kilka produktów zawierających bakteriofagi do stosowania w ochronie żywności przed *Listeria monocytogenes*. Były to: ListShield™ (Intralytix Inc.) oraz LISTEX (Microcos) [artykuł 1]. Sukces tych dwóch produktów pozwolił na rozszerzenie produkcji preparatów fagowych do stosowania w przemyśle spożywczym także o preparaty zabezpieczające żywność przed *S. enterica*. Obecnie na rynku dostępne są trzy produkty na bazie fagów do ochrony żywności przed *S. enterica*: SalmoFresh™ i SalmoLyse® produkowane przez Intralytix Inc. oraz Salmonellex™ produkowany przez Microcos [artykuł 1]. Przeprowadzono również badania, których celem była ocena profilaktycznego użycia preparatów zawierających bakteriofagi w hodowli drobiu w celu zapobiegania kolonizacji jelit ptaków przez *S. enterica*. Ahmadi i in. (2016) zaobserwowali, że podawanie przepiórkom preparatu fagowego przez 3 dni ograniczało biofilmy *S. Enteritidis* wytworzone na migdałkach. Zastosowanie mieszaniny fagów i probiotyków przez Torro i in. (2005) oraz Borie i in. (2009) powodował zmniejszenie liczby bakterii *S. Typhimurium* i *S. Enteritidis* w jelitach kurcząt w sposób istotny statystycznie, szczególnie jeśli do zakażenia doszło krótko po wykluciu piskląt [artykuł 1]. Polska firma biotechnologiczna, Proteon Pharmaceuticals, opracowała koktajl fagowy, dostępny w Rosji, USA i na Ukrainie, jako dodatek paszowy. Produkt BAFASAL® jest mieszaniną fagów infekujących niektóre serotypy *Salmonella enterica*, w tym Enteritidis, Typhimurium, Typhi i Paratyphi. Testy wyżej wymienionego preparatu przeprowadzone na łącznej liczbie 220 brojlerów wykazała istotny statystycznie spadek miana *S. Enteritidis* w przewodzie pokarmowym kurcząt (Wójcik i in. 2020) [artykuł 1].

Dane prezentowane przez wiele grup badawczych na całym świecie pokazują, że zastosowanie preparatów fagowych może być potencjalną alternatywą w stosunku do antybiotyków w zapobieganiu rozwojowi zakażeń. Zauważono jednak wiele ograniczeń tej formy terapii. Obecnie wiemy, że skuteczność fagoterapii jest zależna od wielu czynników, takich jak: rodzaj serotypu wywołujący infekcję, rodzaj zastosowanych fagów, mechanizmy adaptacyjne bakterii, schemat leczenia, dawkowanie i formuła stosowanych preparatów fagowych. Dodatkowo skuteczność preparatów fagowych jest bardzo ograniczona i zleży w dużej mierze od spektrum lizy użytych fagów, które charakteryzują się wysoką specyficznością. W niektórych eksperymentach efekt terapeutyczny miał działanie krótkotrwałe ze względu na rozwój oporności bakterii na bakteriofaga (Wernicki i in. 2017). Dostępnych jest też niewiele prac porównujących skuteczność terapii fagowej oraz innych metod leczenia (np. stosowanych antybiotyków). Ponadto obecnie pojawia się coraz więcej doniesień o interakcjach między bakteriofagami a komórkami organizmów wyższych. Fagi są zdolne do przenikania do krwi i docierania tą drogą do różnych narządów wewnętrznych (Podlacha i in. 2021). Stawia to pod znakiem zapytania bezpieczeństwo terapii fagowej także dla potencjalnych konsumentów. Pojawia się pytanie, czy bakteriofagi mogą mieć negatywny wpływ na zdrowie i życie człowieka? Nie znany jest także czas utrzymywania się bakteriofagów w organizmach zwierząt poddanych terapii. Wiedza taka pomogłoby w ustaleniu okresu karencji, po którym mięso uznawane będzie za bezpieczne. Wszystkie te doniesienia wskazują jasno, że koniecznością jest przeprowadzenie kompleksowych analiz dotyczących efektywności i bezpieczeństwa stosowania preparatów fagowych zapobiegających kolonizacji układu pokarmowego przez *S. enterica* u drobiu.

Celem mojej pracy doktorskiej było stworzenie eksperymentalnego koktajlu fagowego przeciwko najpopularniejszym serotypom *S. enterica*: Typhimurium i Enteritidis oraz porównanie jego skuteczności z dotychczas stosowanymi w weterynarii antybiotykami z wykorzystaniem różnych modeli badawczych. Ponadto sprawdziłam, jak długo bakteriofagi utrzymują się w organizmie

zwierzęcym po zakończeniu terapii oraz czy docierają one do różnych narządów wewnętrznych, jak również określiłam, czy po terapii pojawiają się formy bakterii *Salmonella* odporne na stosowne w terapii fagi.

Swoją pracę rozpoczęłam od scharakteryzowania trzech bakteriofagów: vB_SenM-1, vB_SenM-2 i vB_SenS-3 infekujących różne serotypy *S. enterica*, znajdujących się w kolekcji Katedry Biologii Molekularnej Uniwersytetu Gdańskiego (Jurczak-Kurek i in. 2016). Zaobserwowałam, że bakteriofagi te charakteryzują się szerokim spektrum gospodarza i są stabilne w różnych temperaturach, w tym w 42°C (temperaturze ciała ptaków) [artykuł 2]. Szczegółową charakterystykę tych bakteriofagów, uwzględniającą czas adsorpcji, czas jednego cyklu życiowego i plon fagowy przeprowadziłam w trzech temperaturach: 25°C, 37°C i 42°C oraz na czterech szczepach *S. enterica* pochodzących z kolekcji Krajowego Ośrodka Salmonella (KOS) w Gdańsku: *S. Typhimurium* 12, *S. Typhimurium* 13, *S. Enteritidis* 64 i *S. Enteritidis* 1392, aby jak najlepiej ocenić ich potencjalne zastosowanie. Zaobserwowałam, że wszystkie trzy bakteriofagi skutecznie adsorbowały na wszystkich testowanych szczepach, we wszystkich badanych temperaturach w ciągu 15 min. Najwydajniej proces adsorpcji przebiegał dla faga vB_SenM-1 na *S. Typhimurium* 13 w 25°C i na *S. Enteritidis* 1392 w 42°C, dla faga vB_SenM-2 na *S. Typhimurium* 12 w 25°C i na *S. Enteritidis* 1392 w 25°C i 42°C oraz vB_SenS-3 na *S. Typhimurium* 12 w 42°C i na *S. Enteritidis* 64 w 37°C [artykuł 2]. Podczas doświadczeń typu „one-step growth”, określających kinetykę pojedynczego cyklu życiowego bakteriofaga oraz liczbę wirionów potomnych zaobserwowałam, że fag vB_SenS-3 rozwijał się słabo w 25 i 42°C, gdy gospodarzem był szczep *S. Typhimurium* 13 i *S. Enteritidis* 64, a rozwój fagów vB_SenM-2 i vB_SenS-3 był mniej efektywny w *S. Enteritidis* 1392 niezależnie od temperatury [artykuł 2]. Wszystkie trzy bakteriofagi największy plon fagowy, wynoszący od ok. 100 do nawet 500 wirionów potomnych, dawały w 37°C bez względu na to, na jakim gospodarzu się namnażały. Ponadto, plon fagowy pomiędzy 100 a 400 wirionów potomnych zaobserwowałam dla faga vB_SenM-1 na *S. Typhimurium* 12 i 13 w 25°C oraz *S. Enteritidis* 64 w 42°C, a dla vB_SenM-2 na *S. Typhimurium* 12 w 25°C oraz *S. Enteritidis* 64 w 42°C [artykuł 2]. Analiza profilu lizy hodowli bakteryjnej oraz analiza redukcji biomasy i miana bakterii w biofilmie bakteryjnym potwierdziła, że bakteriofagi te są zdolne redukować miano bakterii *S. enterica* w warunkach laboratoryjnych. Zaobserwowałam, że wszystkie zastosowane m.o.i (0,1; 1,0 i 10) powodowały znaczny spadek gęstości optycznej (OD₆₀₀) hodowli oraz miana bakterii (CFU/ml), najefektywniejsze były jednak m.o.i= 1,0 i 10, między którymi nie było statystycznie istotnych różnic. W badaniach na biofilmach bakteryjnych zaobserwowałam, że każdy testowany fag był w stanie zmniejszyć miano bakterii o 47%-99% CFU/mL (w zależności od gospodarza i temperatury inkubacji) [artykuł 2]. Analiza genomów bakteriofagów vB_SenM-1, vB_SenM-2 i vB_SenS-3 nie wykazała obecności genów toksyn czy też genów integraz, co mogłoby sugerować, że bakteriofagi te są fagami łagodnymi, a co wykluczałoby ich użycie w terapii. Lityczna natura tych bakteriofagów została dodatkowo potwierdzona doświadczeniami, w których nie stwierdzono powstawania bakterii lizogennych [artykuł 2].

Poza charakterystyką bakteriofagów już znajdujących się w kolekcji Katedry Biologii Molekularnej Uniwersytetu Gdańskiego przeprowadziłam izolację bakteriofagów z kurzych odchodów oraz ścieków komunalnych. Wyizolowałam ok. dwadzieścia bakteriofagów, z których dwa wykazywały największy potencjał terapeutyczny i zostały poddane szczegółowej molekularnej charakterystyce. Charakterystyka bakteriofagi vB_Sen-TO17 i vB_Sen-E22 została przeprowadzona w 42°C, aby jak najlepiej przetestować ich potencjalne zachowanie w organizmie kurcząt [artykuł 3]. Bakteriofag vB_Sen-TO17 charakteryzował się wąskim spektrum gospodarza, a szczegółowa analiza kinetyki adsorpcji oraz jego cyklu życiowego wykazała, że namnaża się efektywnie na szczepach *S. Typhimurium* 12 i 13. Czas adsorpcji do tych szczepów wynosił ok. 8 min, a plon fagowy między 50 a 80 wirionów potomnych, podczas gdy w przypadku *S. Enteritidis* 64 wynosił on jedynie ok. 10 wirionów. Fag vB_Sen-E22 charakteryzował się szerszym spektrum gospodarza niż bakteriofag vB_Sen-TO17, był on jednak bardziej wrażliwy na czynniki środowiskowe takie jak pH. Dla

przykładu, bakteriofag vB_Sen-E22 podlegał inaktywacji w pH= 2,2, podczas gdy fag vB_Sen-TO17 podlegał inaktywacji w pH=2,0. Analiza adsorpcji i cyklu życiowego wykazała, że czas adsorpcji oraz długość cyklu życiowego i plon fagowy były zbliżone do tych uzyskanych przez faga vB_Sen-TO17. Analiza genomu faga vB_Sen-E22 wykazała, że bakteriofag ten nie niesie w swoim materiale genetycznym genów kodujących toksyny lub integrazy, a jego cykl życiowy zaklasyfikowano jako lityczny [artykuł 3].

Na podstawie badań zaprezentowanych powyżej, z bakteriofagów wyizolowanych przeze mnie oraz tych dostępnych w kolekcji Katedry Biologii Molekularnej wybrałam dwa, z których stworzony został eksperymentalny koktajl fagowy: vB_Sen-TO17 i vB_SenM-2. W kolejnym etapie mojej pracy skupiłam się na porównaniu efektywności działania koktajlu fagowego z efektywnością pojedynczego faga oraz antybiotyków stosowanych w weterynarii: tetracykliny, kolistyny i enrofloksacyny. Swoje badania prowadziłam z wykorzystaniem różnych modeli badawczych, zarówno *in vitro* jak i *in vivo* [artykuły 4 i 5]. W pierwszej kolejności przeprowadziłam analizę profilu lizy hodowli bakteryjnej zainfekowanej bakteriofagami (10^9 PFU/ml, koktajlem fagowym (2×10^9 PFU/ml) oraz z dodatkiem antybiotyków: tetracykliny (12.5 μ g/ml), kolistyny (50 μ g/ml) lub enrofloksacyny (50 μ g/ml). Zaobserwowałam, że spadek gęstości optycznej hodowli (OD_{600}) w przypadku *S. Typhimurium* 12 i 13 zainfekowanej koktajlem fagowym był większy, niż w przypadku szczepów *S. Enteritidis* 64 i 1392. Poziom zahamowania wzrostu hodowli bakterii był podobny w przypadku bakteriofagów zastosowanych pojedynczo, koktajlu fagowego oraz antybiotyków: kolistyny i tetracykliny. Analiza miana bakterii wykazała jednak, że w przypadku *S. Typhimurium* 12 i 13 koktajl fagowy w większym stopniu ograniczył miano bakterii niż fagi zastosowane pojedynczo. Ponadto zaobserwowałam, że w przypadku tych szczepów koktajl fagowy miał podobną efektywność jak tetracyklina, jednocześnie większą niż kolistyna i mniejszą niż enrofloksacyna. W przypadku serotypu *S. Enteritidis*, szczepów 64 i 1392 koktajl redukował liczbę bakterii w hodowli na poziomie podobnym do pojedynczego faga oraz kolistyny. Antybiotyki tetracyklina i enrofloksacyna były bardziej efektywne w tym doświadczeniu [artykuł 4]. Na kolejnym etapie mojej pracy przeanalizowałam wpływ wyżej wymienionych czynników na redukcję biomasy bakterii oraz miana bakterii w biofilmie. Ten model badawczy zastosowałam ze względu na fakt, że w środowisku naturalnym, w tym w jelitach, bakterie rzadko występują w formie planktonicznej. Zdecydowanie częściej tworzą one skomplikowane struktury składające się z komórek bakteryjnych oraz mieszaniny egzopolisacharydów, lipidów i DNA, zwaną biofilmem (Muhammad i in. 2020). Podczas swoich doświadczeń zaobserwowałam, że podobnie jak w przypadku hodowli płynnej, koktajl fagowy był bardziej efektywny w redukcji biofilmu szczepów *S. Typhimurium* 12 i 13 niż szczepów *S. Enteritidis* 64 i 1392, a największą efektywność wykazywał po 24 h inkubacji [artykuł 4].

Aby jeszcze dokładniej odwzorować warunki panujące w jelicie kurcząt, stworzyłam model biofilmu wielokulturowego, hodowanego w warunkach mikroaerofilnych i zawierającego inne niepatogenne bakterie z rodziny Enterobacteriaceae, które mogą występować w układzie pokarmowym ptaków: *Escherichia coli*, *Citrobacter freundii* i *Proteus mirabilis* oraz przedstawiciela pałeczek kwasu mlekowego *Lactobacillus acidophilus*. Zaobserwowałam, że bakteriofagi oraz koktajl fagowy wykazywały podobną skuteczność w redukcji miana bakterii *S. enterica*, szczególnie szczepów *Typhimurium* 12 i 13. Nie miały jednak wpływu na miano innych bakterii z rodziny Enterobacteriaceae, jak i na miano *L. acidophilus* [artykuł 4]. Badane antybiotyki, poza znaczną redukcją miana bakterii *S. enterica*, znacznie obniżały też miano *E. coli*, *C. freundii* i *P. mirabilis*. Dodatkowo enrofloksacyna wykazywała efekt bakteriostatyczny względem *L. acidophilus* [artykuł 4].

Na podstawie przeprowadzonych badań wysnułam wnioski, że koktajl fagowy był efektywny w zmniejszaniu miana bakterii w różnych modelach hodowli bakterii. W niektórych przypadkach jego efektywność była porównywalna z antybiotykami: tetracykliną i kolistyną. W przeciwieństwie jednak do antybiotyków fagi oraz koktajl nie miały wpływu na inne gatunki bakterii, co może sugerować, że będą one bezpieczniejsze w stosowaniu i nie będą miały negatywnego wpływu na mikrobiom jelitowy kurcząt.

Ostatnim etapem badań *in vitro* jakie przeprowadziłam było porównanie wykształcania oporności przez bakterie *S. enterica* na bakteriofagi oraz kolistynę i enrofloksacynę. Zauważyłam, że w trakcie 24-godzinnej inkubacji bakterii z enrofloksacyną nie doszło do wykształcenia się form bakterii opornych na ten antybiotyk. W przypadku koktajlu fagów vB_Sen-TO17 i vB_SenM-2 oraz kolistyny tempo wykształcania przez bakterie oporności było porównywalne [artykuł 4].

W związku z zaobserwowaną różnicą w efektywności działania koktajlu zawierającego fagi względem różnych serotypów *S. enterica*, badania *in vivo* przeprowadziłam na serotypie Typhimurium 13. Był to serotyp względem którego koktajl wykazywał największą efektywność i przewidywałam, że efekt terapeutyczny w doświadczeniach *in vivo* może być najlepiej widoczny. Oczywiście w przyszłości należałoby przeprowadzić analizę efektywności koktajlu na pozostałych szczepach bakterii z rodzaju *Salmonella*, ale wymaga to dużego nakładu finansowego oraz dodatkowych zgód komisji etycznej.

Pierwszym doświadczeniem *in vivo* było określenie efektywności działania koktajlu fagowego z wykorzystaniem modelu *Galleria mellonella*. Model ten był już z powodzeniem wykorzystywany zarówno do oceny skuteczności terapii fagowej, jak i innych substancji o działaniu bakteriobójczym, ponieważ zaobserwowano, że eksperymenty na tym prostym modelu badawczym mogą dać wiarygodne wyniki w krótkim czasie, przy jednoczesnym ograniczeniu wykorzystania kręgowców (Grygorcewicz i in. 2020; Kaźmierczak i in. 2022). Larwy zostały zakażone szczepem *S. Typhimurium* 13 w dawce 5×10^3 CFU/zwierzę. Godzinę po infekcji larwom zaaplikowano lizat bakteriofagowy vB_Sen-TO17 lub vB_SenM-2 lub koktajl fagowy o m.o.i.=1, 10 i 100. W grupie kontrolnej przeżywalność wynosiła 40% i 10% odpowiednio 24 i 48 godzin po zakażeniu, a po 108 h e wszystkie zwierzęta były martwe. Podanie faga vB_Sen-TO17 doprowadziło do znacznego wzrostu przeżywalności larw w stosunku do grupy kontrolnej bez względu na zastosowaną dawkę. W przypadku faga vB_SenM-2 zastosowanie m.o.i.=1 nie wykazywało efektu terapeutycznego, a istotną statystycznie różnicę w przeżywalności zaobserwowałam, gdy fag ten był podany w m.o.i.=100. Najwyższy procent przeżywalności (pomiędzy 65% a 75%) zaobserwowałam w przypadku zastosowania koktajlu. Nie stwierdziłam istotnych statystycznie różnic w zależności od użytego m.o.i. Wyniki te potwierdzają, że zastosowanie koktajlu daje lepsze efekty terapeutyczne niż zastosowanie pojedynczych fagów, nawet jeśli w badaniach *in vitro* efekt nie był tak wyraźnie widoczny [artykuł 4].

Ostatnim etapem mojej pracy był eksperyment polegający na sprawdzeniu efektywności eliminowania bakterii *S. Typhimurium* 13 przez preparat złożony z dwóch bakteriofagów na modelu z wykorzystaniem kury domowej, *Gallus gallus*. Badania przeprowadzono w Pawilonie Zakażeń Eksperymentalnych Ptaków przy Katedrze Chorób Ptaków Wydziału Weterynarii Uniwersytetu Warmińsko-Mazurskiego w Olsztynie. Kurczęta w siódmym dniu życia podzielono na 8 grup po 25 osobników. Pierwszego dnia doświadczenia ptaki z grup 3-8 zakażono 1 ml zawiesiny *S. Typhimurium* o mianie 10^6 CFU/ml w 0,89% NaCl. 24 h po zakażeniu grupie 6 przez 14 dni podawano koktajl fagowy o mianie 2×10^9 PFU/ml (1×10^9 PFU/ml każdego faga) w 20 mM CaCO₃. Grupy 4 i 5 przez 5 dni otrzymywały antybiotyk: enrofloksacynę w dawce 10 mg/kg (grupa 4) i kolistynę; 120 000 IU/kg (grupa 5). Grupa 1 była kontrolą negatywną, która przez 14 dni otrzymywała 0,89% NaCl. Grupa 2 przez 14 dni otrzymywała koktajl fagowy, natomiast grupa 3, zakażona *S. Typhimurium* była kontrolą pozytywną i analogicznie do grupy pierwszej otrzymywała 0,89% NaCl. Grupa 7 otrzymała pierwszą dawkę koktajlu fagowego 2 dni po wykryciu *S. Typhimurium* w odchodach, a Grupa 8 – 4 dni po wykryciu *S. Typhimurium*. W obu przypadkach pełny cykl fagoterapii trwał 14 dni. W celu oznaczania miana *S. Typhimurium* oraz bakteriofagów codziennie pobierano próbki odchodów kurzych. Dodatkowo pobierano codziennie wymazy z kloaki od pięciu losowo wybranych kurcząt w każdej z grup. W 7 dniu doświadczenia, po zakończeniu podawania kurczętom antybiotyku, po 5 zwierząt z każdej grupy poddano terminacji, a ich narządy zbadano pod kątem obecności fagów i bakterii. W dniu 21, po zakończeniu cyklu terapii fagowej, uśpiono kolejne 5 zwierząt z każdej grupy. Dwie kolejne terminacje miały miejsce w dniu 28 i 35 eksperymentu. Cały eksperyment trwał 35 dni i odpowiadał pełnemu cyklowi hodowlanemu broilerów [artykuł 5].

Monitorując miano bakterii *S. Typhimurium* w kale oraz wymazach z kloaki, w przypadku grup, które otrzymały antybiotyk oraz koktajl fagowy 24 h po infekcji nie zaobserwowałam obecności *S. Typhimurium* w żadnym z tych materiałów. W pozostałych grupach *S. Typhimurium* pojawiła się między 4 a 6 dniem od zakażenia, a jej średnie miano wynosiło ok. 10^5 CFU/ml w próbkach odchodów i ok. $5,5 \times 10^4$ CFU/ml w kloace. W przypadku grup, które otrzymały terapię fagową już po rozwinięciu się zakażenia *S. Typhimurium*, przestałam wykrywać bakterie w odchodach między 10 a 13 dniem eksperymentu i po 10 dniach w kloace. W przypadku grupy kontrolnej nr 3 miano *S. Typhimurium* spadło poniżej poziomu wykrywalności ok. 13 dnia eksperymentu. W tym przypadku prawdopodobnie zakażenie przebiegało dalej ale nie byłam w stanie wykryć go z materiałów biologicznych, gdyż parametry biochemiczne krwi kurcząt badane przez inne osoby z zespołu wskazywały na wciąż toczący się stan zapalny i infekcję bakterijną (Grabowski i in. in press). Analizując miano bakteriofagów zaobserwowałam, że w grupach, które otrzymały koktajl (Grupy 2, 6, 7, 8) oba bakteriofagi były obecne w obu badanych materiałach biologicznych (próby kału oraz wymazy z kloaki) do 25 dni jeśli miały kontakt z gospodarzem (wliczając w ten czas 14 dni terapii). Bakteriofagi utrzymywały się w kale (Grupy 6, 7, 8) jeszcze przez około 1,5-2 tygodnie po zakończeniu terapii. W przypadku grupy 2, która nie była zainfekowana bakteriami, przestałam wykrywać bakteriofagi w materiałach biologicznych ok. 7 dni po zaprzestaniu terapii.

Kolejnym etapem mojej pracy była analiza przenikania bakteriofagów do narządów wewnętrznych kurcząt. Zaobserwowałam, że bakteriofagi były obecne jedynie w narządach ptaków, które podlegały terminacji krótko po zakończeniu podawania fagów lub jeszcze w trakcie podawania.. Obecność bakteriofagów stwierdziłam przede wszystkim w żołądku i jelicie kurcząt. Ponadto, obecność fagów obserwowałam najczęściej w takich narządach jak wątroba, śledziona i nerki, co jest spójne z danymi literaturowymi (Dabrowska i in. 2005; Podlacha i in. 2021). Zaobserwowałam także, że penetracja fagów do narządów wewnętrznych zależała od bakteriofaga (fag vB_Sen-TO17 penetrował do narządów w większym stopniu, niż fag vB_SenM-2) oraz indywidualnych cech każdego osobnika [artykuł 5].

W swojej pracy sprawdziłam także, czy terapia bakteriofagami w jakikolwiek sposób wpłynęła na skład mikrobiomu jelitowego kurcząt w porównaniu do grup kontrolnych oraz grup leczonych antybiotykami. W tym celu z treści kurzych jelit pobranych podczas sekcji wyizolowano materiał genetyczny i po odpowiednim przygotowaniu poddano amplifikacji i sekwencjonowaniu regionów V3-V4 genu kodującego 16S rRNA. Analizując uzyskane dane zaobserwowałam, że w przypadku kurcząt z grupy kontrolnej po ustabilizowaniu się mikrobiomu dominowały w nim bakterie z rodziny Lactobacillaceae i Lachnospiraceae, ze znacznym udziałem Ruminococcaceae. Infekcja *S. Typhimurium* skutkowałą znaczącym wzrostem liczebności Enterobacteriaceae, ale dodatkowo znacząco zwiększył się także procentowy udział Enterococcaceae w mikrobiomie jelitowym. Leczenie antybiotykami, enrofloksacyną lub kolistyną, spowodowało znaczny wzrost procentowego udziału Enterococcaceae i Ruminococcaceae, a w kolejnych terminacjach zaobserwowałam znaczną przewagę Lactobacillaceae nad innymi rodzinami bakterii. Zastosowanie bakteriofagów początkowo zwiększało procentowy udział innych rodzin, m.in. Lactobacillaceae w stosunku do kontroli, jednak mikrobiom bardzo szybko ustabilizował się i w późniejszych etapach eksperymentu nie zaobserwowałam istotnych statystycznie różnic między grupami otrzymującymi terapię fagową a grupą kontrolną. W przypadku grup otrzymujących antybiotykoterapię mikrobiom do samego końca eksperymentu wykazywał istotne statystycznie różnice w porównaniu z grupą kontrolną, z dominującymi rodzinami Enterococcaceae, Lactobacteriaceae i Enterobacteriaceae [artykuł 5]

Podsumowując:

W związku z masowym pojawianiem się lekoopornych szczepów *S. enterica*, częstością występowania salmonelloz oraz restrykcji dotyczących stosowania antybiotyków w hodowli drobiu, koniecznością staje się poszukiwanie alternatywnych metod zwalczania infekcji wywoływanych przez te bakterie. Bakteriofagi są jedną z proponowanych alternatyw i choć istnieje wiele doniesień dotyczących skuteczności terapii fagowej u kurcząt (Wernicki i in. 2017) [artykuł 1], brakuje prac porównujących efektywność tej metody leczenia z dotychczas dostępną antybiotykoterapią. W

związku z powyższym celem mojej pracy było stworzenie eksperymentalnego koktajlu fagowego i kompleksowa analiza jego efektywności na różnych modelach badawczych oraz porównanie jego skuteczności ze stosowanymi w weterynarii antybiotykami. W swojej pracy scharakteryzowałam szereg bakteriofagów infekujących różne serotypy *S. enterica* w celu określenia ich potencjału terapeutycznego [artykuł 2 i 3]. Ze scharakteryzowanych przeze mnie bakteriofagów wybrałam dwa, vB_SenM-2 i vB_Sen-TO17, z których stworzyłam eksperymentalny koktajl fagowy. Następnie porównałam aktywność tego koktajlu i antybiotyków: tetracykliny, kolistyny i enrofloksacyny względem dwóch serotypów *S. enterica*: *S. Enteritidis* i *S. Typhimurium* na różnych modelach laboratoryjnych [artykuł 4]. Podczas badań *in vitro* zaobserwowałam, że koktajl fagowy wykazywał się podobną aktywnością antibakteryjną co antybiotyki: tetracyklina i kolistyna. Stosując model biofilmu wielogatunkowego stwierdziłam, że bakteriofagi były bardziej selektywne, niż antybiotyki w działaniu i nie redukowałam miana innych pałeczek z rodziny Enterobacteriaceae [artykuł 4]. Na podstawie przeprowadzonych doświadczeń *in vitro* stwierdziłam, że stworzony przeze mnie koktajl ma potencjał terapeutyczny i postanowiłam przeprowadzić badania na modelu *in vivo* wykorzystując dwa modele zwierzęce: *Galleria mellonella* i *Gallus gallus*. Wykorzystując model *Galleria mellonella* zaobserwowałam, że koktajl fagowy w istotnym stopniu zwiększał przeżywalność larw bez względu na zastosowaną dawkę. Bakteriofagi stosowane pojedynczo nie były tak skuteczne, a ich efekt terapeutyczny zależał od zastosowanego m.o.i. [artykuł 4]. W doświadczeniach przeprowadzonych na modelu kurczym (*Gallus gallus*) zaobserwowałam, że podanie koktajlu fagowego krótko po infekcji zapobiegało rozwojowi zakażenia. Tym samym koktajl fagowy był tak samo skuteczny jak antybiotyki stosowane w weterynarii. Bakteriofagi podane już po pojawieniu się *S. Typhimurium* w kale były w stanie zwalczyć zakażenie, co pokazuje, że bakteriofagi mogą mieć zastosowanie w leczeniu zakażeń u drobiu. Jednak obecne przepisy prawne nie pozwalają na terapię kurcząt zainfekowanych szczepami *Salmonella*, stąd preparat może być z powodzeniem stosowany w profilaktyce zakażeń oraz jako środek dezynfekujący (po zmianie przepisów prawa unijnego co do stosowania preparatów opartych na fagach). Ponadto zaobserwowałam, że bakteriofagi utrzymywały się w kale kurcząt przez ok. 10-14 dni po zakończeniu podawania koktajlu fagowego. W narządach wewnętrznych fagi izolowałam jedynie jeśli kurczęta były poddawane terapii w trakcie terminacji lub jeśli terminacja miała miejsce kilka dni po zakończeniu leczenia. Dodatkowo nie wyizolowałam form bakterii z rodzaju *Salmonella* opornych na fagi po zakończonej terapii. Badanie mikrobiomu jelitowego kurcząt pozwoliło potwierdzić moje obserwacje poczynione podczas badań *in vitro* na wielogatunkowym modelu biofilmu bakteryjnego. Podczas terapii dochodziło co prawda do zmian w procentowym udziale poszczególnych rodzin bakterii w porównaniu do grupy kontrolnej (prawdopodobnie spowodowane zwalnianiem się niszy ekologicznej w wyniku lizy bakterii *S. enterica*), jednak po zakończeniu leczenia procentowy udział poszczególnych rodzin w mikrobiomie jelitowym normował się na poziomie podobnym do kontroli [artykuł 5]. Przeprowadzone przeze mnie badania wydają się wskazywać na to, że fagoterapia może być skuteczną metodą zapobiegania infekcjom *S. enterica* u drobiu, jeśli będzie podawana od pierwszych dni życia, jako środek prewencyjny. Ponieważ bakteriofagi usuwane są z organizmu kurcząt w przeciągu kilku do kilkunastu dni po zakończeniu terapii, nie powinny budzić obaw konsumentów.

Istotnym z punktu widzenia bezpieczeństwa terapii jest pojawianie się mutacji w genomie fagów oraz teoretyczna możliwość przenoszenia elementów bakteryjnego czy eukariotycznego DNA. Dlatego ważnym jest, aby materiał genetyczny wyizolowanych przeze mnie z bakteriofagów po zakończeniu terapii, poddać szczegółowej analizie w poszukiwaniu elementów obcego materiału genetycznego oraz rearanżacji w genomie.

Bakteriofagi są jednym z najbardziej obiecujących narzędzi do zwalczania zakażeń bakteryjnych u zwierząt, jednak przed ich wprowadzeniem do powszechnego stosowania należy zebrać jak najwięcej danych dotyczących efektywności i bezpieczeństwa tej terapii, stworzenia schematu podań preparatów łącznie z dobozem dawek i czasem stosowania oraz możliwością tworzenia przeciwciał przeciwko fagom co mogłoby wydecydować o obniżeniu skuteczności terapii.

- Adeyanju, Gladys Taiwo, i Olayinka Ishola. 2014. „Salmonella and Escherichia Coli Contamination of Poultry Meat from a Processing Plant and Retail Markets in Ibadan, Oyo State, Nigeria”. *SpringerPlus* 3 (1): 139. <https://doi.org/10.1186/2193-1801-3-139>.
- Ahmadi, Mosab, M. Amir Karimi Torshizi, Shaban Rahimi, i John J. Dennehy. 2016. „Prophylactic Bacteriophage Administration More Effective than Post-infection Administration in Reducing Salmonella enterica serovar Enteritidis Shedding in Quail”. *Frontiers in Microbiology* 7. <https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fmicb.2016.01253>.
- Attia, Youssef, H.S. Zeweil, A.A. Alsaffar, i A.S. El-Shafy. 2011. „Effect of non-antibiotic feed additives as an alternative to flavomycin on productivity, meat quality and blood parameters in broilers”. *Archiv fur Geflugelkunde* 75 (styczeń): 40–48.
- Bardina, Carlota, Denis A. Spricigo, Pilar Cortés, i Montserrat Llagostera. 2012. „Significance of the Bacteriophage Treatment Schedule in Reducing Salmonella Colonization of Poultry”. *Applied and Environmental Microbiology* 78 (18): 6600–6607. <https://doi.org/10.1128/AEM.01257-12>.
- Bedford, Michael. 2000. „Removal of Antibiotic Growth Promoters from Poultry Diets: Implications and Strategies to Minimise Subsequent Problems”. *World's Poultry Science Journal* 56 (4): 347–65. <https://doi.org/10.1079/WPS20000024>.
- Binienda, Agata, Agata Twardowska, Adam Makaro, i Maciej Salaga. 2020. „Dietary Carbohydrates and Lipids in the Pathogenesis of Leaky Gut Syndrome: An Overview”. *International Journal of Molecular Sciences* 21 (21): 8368. <https://doi.org/10.3390/ijms21218368>.
- Borda-Molina, D., T. Zuber, W. Siebert, A. Camarinha-Silva, D. Feuerstein, i M. Rodehutschord. 2019. „Effects of Protease and Phytase Supplements on Small Intestinal Microbiota and Amino Acid Digestibility in Broiler Chickens”. *Poultry Science* 98 (7): 2906–18. <https://doi.org/10.3382/ps/pez038>.
- Borie, C., M. L. Sánchez, C. Navarro, S. Ramírez, M. A. Morales, J. Retamales, i J. Robeson. 2009. „Aerosol Spray Treatment with Bacteriophages and Competitive Exclusion Reduces Salmonella Enteritidis Infection in Chickens”. *Avian Diseases* 53 (2): 250–54. <https://doi.org/10.1637/8406-071008-Reg.1>.
- Castanon, J. I. R. 2007. „History of the Use of Antibiotic as Growth Promoters in European Poultry Feeds”. *Poultry Science* 86 (11): 2466–71. <https://doi.org/10.3382/ps.2007-00249>.
- Chattopadhyay, Madhab K. 2014. „Use of antibiotics as feed additives: a burning question”. *Frontiers in Microbiology* 5. <https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fmicb.2014.00334>.
- Cianflone, Nancy F. Crum. 2008. „Salmonellosis and the GI Tract: More than Just Peanut Butter”. *Current gastroenterology reports* 10 (4): 424–31.
- Dabrowska, K., K. Switała-Jelen, A. Opolski, B. Weber-Dabrowska, i A. Gorski. 2005. „Bacteriophage Penetration in Vertebrates”. *Journal of Applied Microbiology* 98 (1): 7–13. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2672.2004.02422.x>.
- Donoghue, DJ. 2003. „Antibiotic Residues in Poultry Tissues and Eggs: Human Health Concerns?” *Poultry Science* 82 (4): 618–21. <https://doi.org/10.1093/ps/82.4.618>.
- Ehuwa, Olugbenga, Amit K. Jaiswal, i Swarna Jaiswal. 2021. „Salmonella, Food Safety and Food Handling Practices”. *Foods* 10 (5): 907. <https://doi.org/10.3390/foods10050907>.
- Fries, R. 2002. „Reducing Salmonella Transfer during Industrial Poultry Meat Production”. *World's Poultry Science Journal* 58 (4): 527–40. <https://doi.org/10.1079/WPS20020038>.
- Gal-Mor, Ohad, Erin C. Boyle, i Guntram A. Grassl. 2014. „Same species, different diseases: how and why typhoidal and non-typhoidal Salmonella enterica serovars differ”. *Frontiers in Microbiology* 5 (sierpień): 391. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2014.00391>.
- Grabowski, Łukasz, Lidia Gaffke, Karolina Pierzynowska, Zuzanna Cyske, Marta Choszcz, Grzegorz Węgrzyn, i Alicja Węgrzyn. 2022. „Enrofloxacin - the Ruthless Killer of Eukaryotic Cells or the Last Hope in the Fight against Bacterial Infections?” *International Journal of Molecular Sciences* 23 (7). <https://doi.org/10.3390/ijms23073648>.
- Grygorcewicz, Bartłomiej, Marta Roszak, Piotr Golec, Daria Śleboda-Taront, Natalia Łubowska, Martyna Górńska, Joanna Jursa-Kulesza, Rafał Rakoczy, Bartosz Wojciuk, i Barbara Dołęgowska. 2020. „Antibiotics Act with VB_AbaP_AGC01 Phage against Acinetobacter Baumannii in Human Heat-Inactivated Plasma Blood and Galleria Mellonella Models”. *International Journal of Molecular Sciences* 21 (12): 4390. <https://doi.org/10.3390/ijms21124390>.
- Jurczak-Kurek, Agata, Tomasz Gąsior, Bożena Nejman-Faleńczyk, Sylwia Bloch, Aleksandra Dydecka, Gracja Topka, Agnieszka Necel, i in. 2016. „Biodiversity of Bacteriophages: Morphological and Biological Properties of a Large Group of Phages Isolated from Urban Sewage”. *Scientific Reports* 6 (1): 34338. <https://doi.org/10.1038/srep34338>.
- Kaźmierczak, Natalia, Bartłomiej Grygorcewicz, Marta Roszak, Beata Bochentyn, i Lidia Piechowicz. 2022. „Comparative Assessment of Bacteriophage and Antibiotic Activity against Multidrug-Resistant Staphylococcus Aureus Biofilms”. *International Journal of Molecular Sciences* 23 (3): 1274. <https://doi.org/10.3390/ijms23031274>.

- Muhammad, Musa Hassan, Aisha Lawan Idris, Xiao Fan, Yachong Guo, Yiyan Yu, Xu Jin, Junzhi Qiu, Xiong Guan, i Tianpei Huang. 2020. „Beyond Risk: Bacterial Biofilms and Their Regulating Approaches”. *Frontiers in Microbiology* 11. <https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fmicb.2020.00928>.
- Parfitt, Tom. 2005. „Georgia: An Unlikely Stronghold for Bacteriophage Therapy”. *The Lancet* 365 (9478): 2166–67. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(05\)66759-1](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(05)66759-1).
- Pawłowska, J., i E. Sosnowka-Czajka. 2019. „Factors Affecting Chick Quality in Poland”. *World's Poultry Science Journal* 75 (4): 621–32. <https://doi.org/10.1017/S0043933919000618>.
- Pirnay, Jean-Paul, Gilbert Verbeken, Pieter-Jan Ceysens, Isabelle Huys, Daniel De Vos, Charlotte Ameloot, i Alan Fauconnier. 2018. „The Magistral Phage”. *Viruses* 10 (2): 64. <https://doi.org/10.3390/v10020064>.
- Podlacha, Magdalena, Łukasz Grabowski, Katarzyna Kosznik-Kawśnicka, Karolina Zdrojewska, Małgorzata Stasiłój, Grzegorz Węgrzyn, i Alicja Węgrzyn. 2021. „Interactions of Bacteriophages with Animal and Human Organisms—Safety Issues in the Light of Phage Therapy”. *International Journal of Molecular Sciences* 22 (16): 8937. <https://doi.org/10.3390/ijms22168937>.
- Ramatla, Tsepoo, Lubanza Ngoma, Modupeade Adetunji, i Mulunda Mwanza. 2017. „Evaluation of Antibiotic Residues in Raw Meat Using Different Analytical Methods”. *Antibiotics* 6 (4): 34. <https://doi.org/10.3390/antibiotics6040034>.
- Sánchez-Vargas, Flor M., Maisam A. Abu-El-Haija, i Oscar G. Gómez-Duarte. 2011. „Salmonella Infections: An Update on Epidemiology, Management, and Prevention”. *Travel Medicine and Infectious Disease* 9 (6): 263–77. <https://doi.org/10.1016/j.tmaid.2011.11.001>.
- Toro, H., S. B. Price, A. S. McKee, F. J. Hoerr, J. Krehling, M. Perdue, i L. Bauermeister. 2005. „Use of Bacteriophages in Combination with Competitive Exclusion to Reduce Salmonella from Infected Chickens”. *Avian Diseases* 49 (1): 118–24. <https://doi.org/10.1637/7286-100404R>.
- Wernicki, Andrzej, Anna Nowaczek, i Renata Urban-Chmiel. 2017. „Bacteriophage Therapy to Combat Bacterial Infections in Poultry”. *Virology Journal* 14 (1): 179. <https://doi.org/10.1186/s12985-017-0849-7>.
- Wójcik, Ewelina A., Małgorzata Stańczyk, Arkadiusz Wojtasik, Justyna D. Kowalska, Magdalena Nowakowska, Magdalena Łukasiak, Milena Bartnicka, Joanna Kazimierzak, i Jarosław Dastyk. 2020. „Comprehensive Evaluation of the Safety and Efficacy of BAFASAL® Bacteriophage Preparation for the Reduction of Salmonella in the Food Chain”. *Viruses* 12 (7): 742. <https://doi.org/10.3390/v12070742>.
- Zhai, Hengxiao, Hong Liu, Shikui Wang, Jinlong Wu, i Anna-Maria Kluentner. 2018. „Potential of essential oils for poultry and pigs”. *Animal Nutrition* 4 (2): 179–86. <https://doi.org/10.1016/j.aninu.2018.01.005>.
- Zhang, Yu, Jianjiang Lu, Yujun Yan, Jinhua Liu, i Manli Wang. 2021. „Antibiotic Residues in Cattle and Sheep Meat and Human Exposure Assessment in Southern Xinjiang, China”. *Food Science & Nutrition* 9 (11): 6152–61. <https://doi.org/10.1002/fsn3.2568>.