



Annika Flod

Enterococcus faecalis ja *Enterococcus faecium* – spesifisten faagien eristys faagihoitokäyttöön

Metropolia Ammattikorkeakoulu

Bioanalyttikko (AMK)

Bioanalytiikan tutkinto-ohjelma

Opinnäytetyö

19.11.2021

Tekijä	Annika Flod
Otsikko	<i>Enterococcus faecalis</i> ja <i>Enterococcus faecium</i> - spesifisten faagien eristys faagihoidokäyttöön
Sivumäärä	33 sivua + 2 liitettä
Aika	19.11.2021
Tutkinto	Bioanalyttikko (AMK)
Tutkinto-ohjelma	Bioanalytiikan tutkinto-ohjelma
Ohjaajat	Dosentti Saija Kiljunen Diplomi-insinööri Henni Tuomala Lehtori Heidi Malava
<p>Opinnäytetyö toteutettiin yhteistyössä Helsingin yliopiston tutkimusohjelmayksikkö Ihmisen mikrobit -tutkimusryhmään kuuluvan Faagihoidoryhmän kanssa. Tavoitteena oli laajentaa tutkimusryhmän bakteriofaagikokoelmaa eristämällä uusia <i>Enterococcus faecalis</i> ja <i>Enterococcus faecium</i> bakteereille spesifisiä bakteriofageja faagihoidon tarkoitukseen. Faagihoidossa hyödynnetään bakteerien viruksia, bakteriofageja, antibioottiresistenttien bakteerien aiheuttamien infektioiden hoidossa. Faagihoidon perustuu bakteriofaagien kykyyn infektoida niiden isäntäbakteeri ja näin hävittää infektio. Antibioottiresistentit bakteerit ja niiden aiheuttamat infektiot aiheuttavat ongelmia maailmanlaajuisesti. Yhä useammalla bakteerilla on luontaista sekä hankittua resistenssiä antibiootteja kohtaan, resistenssi on voinut muodostua useille yleisesti käytössä oleville antibiooteille. Antibioottiresistentit infektiot lisäävät kuolleisuutta ja pitkittävät sairaalahoitojaksoja, josta koituu taloudellisia kustannuksia niin potilaille, kuin terveydenhuollolle maailmanlaajuisesti. Tämän vuoksi on kehitettävä vaihtoehtoisia hoitomuotoja, sillä uusien antibioottien kehittämien on hidasta.</p> <p>Työ toteutettiin eristämällä uusia bakteriofageja sekä Suomesta, että Beninistä kerätyistä jätevesinäytteistä. <i>E. faecalis</i> ja <i>E. faecium</i> bakteereista valittiin yhteensä 18 bakteerikantaa, joille spesifisiä bakteriofageja tutkimusryhmän bakteriofagi kokoelmasta löytyi vähän tai ei ollenkaan. Jätevesinäytteistä muodostettiin näyteseokset, jotka rikastettiin valittujen bakteerikantojen kanssa. Rikastetut näytteet titrattiin maljoille, joilta tarkasteltiin, löytyikö näyteseoksista faageja. Plakkipuhdistus suoritettiin löydetyille faageille ja niistä tuotettiin faagilysaatti. Lysaatista eristettiin faagin DNA:ta sekvensointia varten ja kustakin DNA eristysnäytteestä mitattiin DNA konsentraatio. Näytteistä ajettiin myös agarosigeeli, jonka avulla tarkasteltiin, onko DNA ehjää, jolloin se voitiin lähettää sekvensoitavaksi. Lopuksi kukin eristetty bakteriofagi karakterisoitiin kartoittamalla niiden isäntäkirjo.</p> <p>Työn tuloksena tutkimusryhmän kokoelmaan eristettiin seitsemän uutta bakteriofagia, joista neljän näytteen DNA eristysnäytteen konsentraatio oli tarpeeksi korkea sekvensointia varten. Karakterisoinnin tuloksena todettiin jokaisen faagin infektoivan oman eristysisäntänsä lisäksi kahta muuta kartoitukseen mukaan otettua <i>E. faecalis</i> tai <i>E. faecium</i> bakteerikantaa.</p> <p>Lopputuloksena voidaan todeta, että <i>E. faecalis</i> sekä <i>E. faecium</i> kannoille bakteriofageja on haastava löytää. Etenkin <i>E. faecium</i> kantojen resistenssi on viime vuosina ollut nousussa, joka luo painetta uusien hoitomuotojen kehittämiseen antibioottien kehittämisen ollessa hidasta. Tämä korostaa myös faagihoidon liittyvän tutkimuksen ja sen kehittämisen tärkeyttä.</p>	
Avainsanat	<i>Enterococcus faecalis</i> , <i>Enterococcus faecium</i> , antibioottiresistenssi, bakteriofagi, faagihoido

Author	Annika Flod
Title	The Isolation of <i>Enterococcus faecalis</i> and <i>Enterococcus faecium</i> -Specific Bacteriophages for Therapeutic Purposes
Number of Pages	33 pages + 2 appendices
Date	19 November 2021
Degree	Bachelor of Health Care
Degree Programme	Biomedical Laboratory Science
Instructors	Saija Kiljunen, Docent Henni Tuomala, Master of Science (Technology) Heidi Malava, Lecturer
<p>The thesis was carried out in the phage therapy research group. This research group is a part of the Human Microbiome Research Program which belongs to Research Programs Unit of University of Helsinki. The aim of this study was to expand the group's phage collection by isolating new <i>Enterococcus faecalis</i> and <i>Enterococcus faecium</i> -specific bacteriophages. Phage therapy can be used to treat infections caused by antibiotic resistance bacteria. Antibiotic resistance has become a major problem worldwide as increasing number of bacteria have natural as well as acquired resistance to antibiotics. Infections caused by resistant bacteria increases mortality, prolong hospital stays as the infections can be hard to treat and add financial costs to both patients and healthcare. As research of developing new antibiotics can be slow, there is a need for alternative therapies alongside antibiotics. Phage therapy is based on using bacterial viruses, bacteriophages, to infect and eliminate their host bacteria and thereby cure the infection.</p> <p>The aim was to isolate phages from wastewater samples collected from both Finland and Benin. A total of 18 <i>E. faecalis</i> and <i>E. faecium</i> strains were selected for this project, all which had only few or no specific phages in existing phage collection. Wastewater samples were pooled to different mixtures and were then enriched together with selected bacterial strains. Plaque purification was done, and lysate produced on the phages found. Isolation of phage DNA was done for sequencing purposes. Before sending isolated DNA samples for sequencing, they were run on an agarose gel to examine that the DNA was not fragmented. Finally, each isolated phage was characterized by screening their bacterial host range.</p> <p>In total, seven new phages were isolated from Finnish wastewater samples. Four of them had DNA concentration high enough for them to be send for sequencing. As a result of characterization, each isolated phage was found to infect two <i>E. faecalis</i> or <i>E. faecium</i> strains that were included in screening. This was in addition to their own host bacteria.</p> <p>In conclusion, phages for <i>E. faecalis</i> and <i>E. faecium</i> strains can be challenging to find and isolate. Especially the resistance of <i>E. faecium</i> strains has been rising in the last years as well as antibiotic resistance in general. It has been putting pressure to research alternative treatment options, like phage therapy, since development of new antibiotics is slow. This highlights the importance of continuing research of phage therapy and develop it further as a treatment option.</p>	
Keywords	<i>Enterococcus faecalis</i> , <i>Enterococcus faecium</i> , antibiotic resistance, bacteriophage, phage therapy

Sisällys

1	Johdanto	1
2	<i>Enterococcus faecium</i> ja <i>Enterococcus faecalis</i>	2
3	Antibioottiresistentit bakteerit	3
4	Bakteriofagit	5
5	Faagihoido ja sen käyttö	7
6	Tarkoitus, tavoite ja tutkimustehtävä	10
7	Opinnäytetyön materiaalit ja menetelmät	11
7.1	Aineisto	11
7.2	Aineiston analysointimenetelmät	12
7.2.1	Faagien rikastus	12
7.2.2	Rikastetun näytteen titraus isäntäbakteerin kanssa	13
7.2.3	Plakkipuhdistus ja lysaatin tuotto	14
7.2.4	DNA eristys ja geeli	16
7.2.5	Isäntäkirjon kartoitus	17
8	Tulokset	18
8.1	Rikastus	18
8.2	Lysaatin tuotto	19
8.3	DNA eristys ja geeli	21
8.4	Isäntäkirjon kartoitus	22
9	Pohdinta	23
9.1	Tulosten tarkastelu	24
9.2	Johtopäätökset	25
9.3	Kehittämisehdotukset	26
9.4	Luotettavuus	26
9.5	Eettisyys	27
9.6	Ammatillinen kasvu	28
	Lähteet	30
	Liitteet	
	Liite 1. Jätevesinäytteistä kootut näyteseokset	

Liite 2. Isäntäkirjon kartoituksen tulokset

1 Johdanto

Enterokokki sukuiset bakteerit pystyvät selviytymään vaikeissakin olosuhteissa ja niillä on luonnollinen resistenssi usealle antibiootille. Sopeutuvuutensa vuoksi ne ovat onnistuneet myös omaksumaan resistentin monelle antibiootille. Enterokokit ovat yksi yleisimmistä sairaalainfektioiden aiheuttajista ja niiden antibioottiresistenssi on yleisty-mässä. Tämä voi hankaloittaa ja pidentää monen potilaan hoitoa sekä lisätä kuolleisuutta. (Garcia-Solache & Rice 2019.) Antibioottiresistenssien bakteerikantojen muodostuminen on haaste nykyaikaiselle lääketieteelle, minkä vuoksi uusia hoitomuotoja on tutkittu ja faagihoido on alkanut herättää uudelleen kiinnostusta. (Cisek & Dabrowska & Gregorczyk & Wyzewski 2017: 277.) Faagihoidossa hyödynnetään bakteerien viruksia, bakteriofageja, jotka tuhoavat niille spesifisen isäntäbakteerinsa infektoimalla sen, jonka jälkeen ne poistuvat itse kehosta (Malik ym. 2017: 101).

Opinnäytetyössä pyrittiin kehittämään jo olemassa olevaa bakteriofagikokoelmaa ja eristämään uusia *Enterococcus faecalis* ja *Enterococcus faecium* bakteereille spesifisiä bakteriofageja erilaisiksi seoksiksi kootuista jätevesinäytteistä. Tavoitteena oli löytää ennalta kerätyistä jätevesinäytteistä bakteriofageja, jotka voivat infektoida potilaista eristettyjä kliinisiä *E. faecalis* ja *E. faecium* kantoja. Jätevesinäytteet rikastettiin spesifisten isäntäbakteerien kanssa. Tämän jälkeen tarkasteltiin, onko näytteissä bakteriofageja, jotka infektoivat niille spesifisiä isäntäbakteereita. Lopuksi bakteriofagit eristettiin, niiden isäntäkirjo kartoitettiin ja DNA eristettiin sekvensointia varten, jolloin voitiin selvittää voiko kyseistä bakteriofagia käyttää hoitotarkoitukseen. Onnistuneesti eristetyt bakteriofagit säilöttiin tutkimusryhmän faagikokoelmaan.

Opinnäytetyö tehtiin yhteistyössä Helsingin yliopiston tutkimusohjelmayksikön Ihmisen mikrobiot –tutkimusohjelmaan kuuluvan Faagihoidoryhmän kanssa. Tutkimusryhmä on tällä hetkellä keskittynyt bakteriofagien tutkimiseen ja faagituotteiden kehittämiseen, mutta tavoitteena on yhdessä HUS:in sekä Helsingin yliopiston Lääketieteellisen tiedekunnan kanssa perustaa faagihoidokeskus Helsinkiin (Kiljunen & Skurnik 2018: 63).

Työni ohjaajana toimi Metropolian Ammattikorkeakoulun puolesta lehtori Heidi Malava. Tutkimusryhmän puolesta ohjaajana toimi dosentti Saija Kiljunen sekä käytännön ohjaajana projektiin liittyvissä asioissa diplomi-insinööri Henni Tuomala.

2 *Enterococcus faecium* ja *Enterococcus faecalis*

E. faecium ja *E. faecalis* ovat grampositiivisia, fakultatiivisesti anaerobisia kokkibakteereita, jotka kuuluvat ihmisen suoliston normaaliin mikrobistoon (Van Tyne & Martin & Gilmore 2013: 869; Uda ym. 2021: 1). Vaikka ne eivät tyypillisesti aiheuta infektioita, voivat ne kuitenkin infektoida vakavasti immuunipuolustukseltaan heikkoja sekä kriittisesti sairaita potilaita (Miller & Murray & Rice & Arias 2020: 752). Enterokokkibakteerit voivat selviytyä vaihtelevissa olosuhteissa, ne voivat lajista riippuen kasvaa 10–45 °C lämpötiloissa, sekä happamissa että emäksisissä olosuhteissa (Raza & Ullah & Mehmood & Andleeb 2018: 796; Leonard 2017).

Jo 1980-luvulta alkaen enterokokkibakteerit ovat yksiä yleisimmistä sairaalapatogeenistä, aiheuttaen muun muassa virtsateiden, verenkierron sekä haavojen infektioita (Yuen & Ausubel 2014:1; Raza ym 2018: 769). Näihin infektioihin liittyy usein antibiootiresistenssi, joka vaikeuttaa infektioiden hoitoa. Vuonna 2014 julkaistussa tutkimuksessa todettiin, että *E. faecium* aiheuttaa noin 10–15 % ja *E. faecalis* noin 80–90 % kaikista enterokokkien aiheuttamista infektioista. (Yuen & Ausubel 2014: 1.) Euroopan tautienekhäisy- ja valvontakeskus ECDC julkaisi marraskuussa 2020 raportin, jossa todettiin, että tutkimukseen osallistuneista Euroopan maista raportoi 53 % eristetyistä *E. faecalis* kannoista olevan resistenttejä gentamisiinille ja 99 % eristetyistä *E. faecium* kannoista olevan vankomysiiniresistentejä (European Centre for Disease Prevention and Control 2020).

Enterokokkibakteerikannoilla on usein luontaista vastustuskykyä useille mikrobilääkkeille, kuten betalaktaamille. Ne voivat myös omaksua resistenssimekanismeja esimerkiksi plasmidien avulla tai käyttää hyväkseen horisontaalista geeninsiirtoa resistenssin muodostamiseen. (Raza ym 2018: 769.) Osa mikrobilääkkeistä vaikuttaa bakteerinfektioihin häiritsemällä bakteerin foolihapon muodostusta. Foolihappo on monen bakteerin kasvulle välttämätön aine, jota ne joutuvat muodostamaan itse. Esimerkiksi *E. faecalis* pystyy kuitenkin imemään sitä ympäristöstään, jolloin näiden lääkkeiden tehokkuus *E. faecalis* bakteeria vastaan on alentunut. (Leonard 2017.) Biofilmi, bakteerisolusta koostunut yhteisö, joka on usein kiinnittynyt johonkin pintaan, on myös tehokas tapa suojautua mikrobilääkkeiden vaikutukselta (Adesanya & Odusell & Aki-Ajani & Adewumi & Ademowo 2020: 2017). Biofilmin koostuessa useista tiiviisti elävistä bakteereista, tarjoaa se bakteerisolulle ideaalin ympäristön resistenssiä koodaavien plasmidien vaihdolle keskenään. Tämä puolestaan lisää resistenttien bakteerien määrää

biofilmissä. Myös horisontaalisen geeninsiirron on todettu olevan tehokkaampaa biofilmissä elävien bakteereiden kesken verrattuna yksittäisiin bakteereihin. (Bowler & Murphy & Wolcott 2020: 2.) Sekä *E. faecalis* että *E. faecium* bakteereilla on ominaisuuksia, kuten virulenssigeenejä, jotka edesauttavat biofilmin muodostumista (Zhou & Willems & Friedric & Rossen & Bathoorn 2020: 2).

Enterokokkien laaja resistenssi usealle mikrobilääkkeelle on edesauttanut bakteerien selviytymistä ja lisääntymistä, etenkin sairaalaympäristössä (Raza ym. 2018: 769). Koska sairaalapotilaat ovat tyypillisesti iäkkäitä, taustalla on immuunipuolustusta heikentävä sairaus tai potilasta on hoidettu pitkään laajakirjoisilla antibiooteilla, ovat he herkempiä saamaan infektioita (Ceci ym. 2015).

E. faecalis on merkittävä sairaalainfektioiden aiheuttaja, sillä se voi tarttua esimerkiksi hoitohenkilökunnan välityksellä potilaasta toiseen huonon käsihygienian seurauksena (Ceci ym. 2015). Enterokokkibakteereita voidaan usein löytää pinnoilta, jotka altistuvat monen henkilön kosketukselle kuten sairaaläsänkyjen laidat, potilaiden hälytysnapit ja ovenkahvat. Tästä voidaan päätellä, että enterokokki ei tartu ainoastaan huonon käsihygienian vuoksi vaan se voi tarttua myös kontaminoituneesta ympäristöstä. (Zhou ym. 2020: 6.)

Enterokokkibakteerit ovat pystyneet myös hankkimaan ominaisuuksia, jotka edesauttavat selviytymistä ympäristön rasitteista, joita löydetään esimerkiksi sairaalaympäristöstä. Australiassa tehdyn tutkimuksen mukaan käsien desinfektiohuuhteen käyttö on lisännyt isopropanolille resistenttien enterokokkibakteereiden määrää. Vaikka tutkimus suoritettiin matalakonsentraatioisella (23 %) alkoholilla, todettiin, että resistenttiä muodostaneet bakteerit selvisivät paremmin myös niistä desinfektioitoimista, jotka suoritettiin korkeakonsentraatioisella (70 %) alkoholilla. Tutkimustulos viittaa siihen, että etenkin *E. faeciumilla* on ominaisuuksia mukautua ympäristön muutoksiin. (Zhou ym. 2020: 6.)

3 Antibioottiresistentit bakteerit

Antibiootit ovat mikrobilääkkeitä, joiden tarkoitus on hillitä bakteerien kasvun kannalta välttämätöntä toimintaa ja näin hoitaa bakteeri-infektioita (Lerminiaux & Cameron 2019: 35). Antibioottien käyttöönotto on ollut yksi modernin lääketieteen onnistuneimpia kehitysaskelaita, joka on edesauttanut useiden lääketieteellisten toimenpiteiden kehittämistä sekä nostanut eliniän odotetta koko maailmassa. Jotta bakteeri voisi selviytyä

ympäristössä, jossa antibioottien käyttö on yleistynyt, on niiden täytynyt kehittää mekanismeja kiertää mikrobilääkkeen vaikutuksia. (Munita & Arias 2016: 25.)

Jotta lääketieteellisten toimenpiteiden, kuten leikkausten ja erilaisten hoitojen, esimerkiksi kemoterapian, toteuttaminen on mahdollista, pitää mikrobien aiheuttamia infektioita voida kontrolloida. Monia mikrobien aiheuttamia infektioita voidaan hoitaa laajakirjoisten antibioottien avulla, vaikka infektiota aiheuttavaa bakteeria ei olisi edes tunnistettu. Tämä kuitenkin aiheuttaa myös antibioottien yli- ja väärinkäyttöä, joka puolestaan edesauttaa antibioottiresistenttien bakteerien kehittymistä. Antibioottiresistensseistä bakteereista onkin tullut merkittävä ongelma, sillä moni yleisesti infektiota aiheuttava bakteeri on voinut muodostaa resistenssin useammalle yleiselle antibiootille. (Malik ym. 2017: 100–101.)

Bakteerit voivat muodostaa resistenttiä esimerkiksi mutatoitumalla tavalla, joka estää antibioottien vaikutusmekanismeja tai hankkia resistenttiä koodaavia geenejä ympärillä olevilta bakteereilta (Munita & Arias 2016: 3). Resistenteillä geeneillä on useita tapoja vaikuttaa antibioottien toimintaan. Ne voivat tuottaa entsyymiä, joka inaktivoi antibiootin, osa resistenttigeeneistä taas vaikuttaa bakteerin solukalvoon niin, että lääkkeet eivät pääse läpäisemään solukalvoa ja näin vaikuttamaan bakteerin toimintaan. (Munita & Arias 2016: 5-11.) Resistenssin kehittyminen yhdessä bakteerissa edesauttaa resistenttien kantojen syntymistä, sillä bakteerin on helppo siirtää resistenttiä koodaavia geenejä ympärillä oleville bakteereille. Resistentit bakteerikannat pääsevät myös leviämään, sillä bakteereihin kohdistuu valintapaine, joka suosii niitä bakteereita, joille on kehittynyt resistenssimekanismeja. (Lerminiaux & Cameron 2019: 35.)

Maailman terveysjärjestö WHO on ilmaissut huolensa antibioottiresistenssien mikrobien lisääntymisestä. Tällä hetkellä mikrobien antibioottiresistenssi luetaan mukaan yhdeksi kymmenestä suuresti ihmiskuntaa kohtaavista terveysuhista. Resistenssin muodostumisen vuoksi bakteerit lakkaavat vastaamasta lääketieteelliseen hoitoon, jolloin infektioista tulee hankalahoitoisia, ne leviävät helpommin ja infektiot voivat aiheuttaa vakavia sairastumisia ja lisätä kuolleisuutta. Antibioottiresistenssien mikrobien lisääntymisen vaikutus myös esimerkiksi talouteen on merkittävä, sillä niiden aiheuttamien kuolemien lisäksi infektioista johtuva pitkittynyt sairastaminen pidentää hoitojaksoa sairaalassa. Tästä koituu lisäkustannuksia niin potilaille, kuin terveydenhuollolle. (World Health Organization 2020.)

E. faecium, *Staphylococcus aureus*, *Klebsiella pneumoniae*, *Acinetobacter baumannii*, *Pseudomonas aeruginosa* ja enterobakteerilajit muodostavat ryhmän, jota kutsutaan

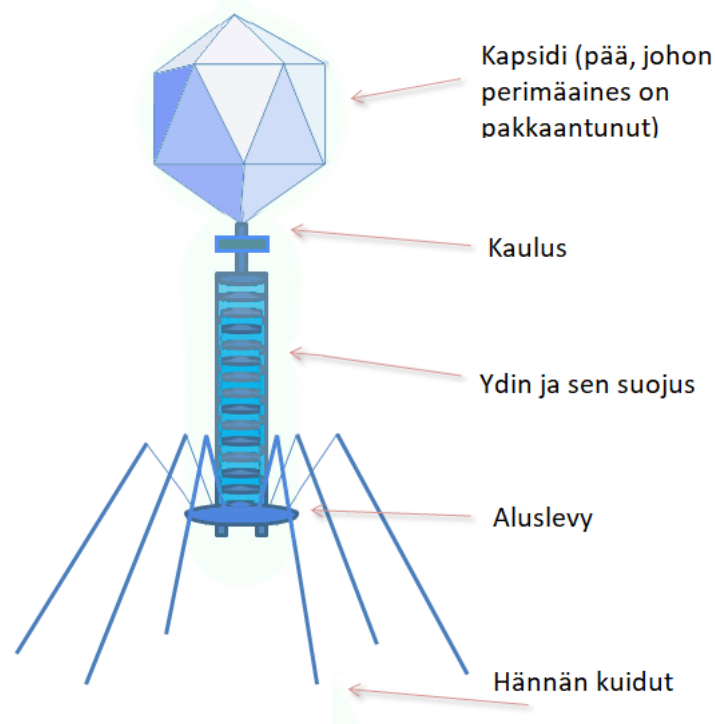
bakteerien nimistä koostuvalla nimellä ESKAPE. Ryhmän nimi viittaa myös bakteerien kykyyn muodostaa resistenttejä ominaisuuksia ja niin sanotusti paeta antibioottien vaikutusta. ESKAPE-ryhmään kuuluu myös bakteereita, jotka ovat WHO:n mukaan prioriteetti uusien antibioottien kohteeksi. (Gordillo Altamirano & Barr 2019: 4.) ESKAPE-ryhmän bakteerit esiintyvät usein kliinisissä olosuhteissa, jolloin ei ole yllättävää, että ne ovat omaksuneet useita eri resistenttimekanismeja (De Oliveira ym. 2020: 8).

Antibioottiresistenssin muodostuminen on normaali osa bakteerien evoluutiota, mutta sen nopea kehittyminen on muodostunut viime vuosikymmenien aikana suureksi terveysuhaksi. Tilannetta pahentaa se, että uusien antibioottien kehitys ja siihen liittyvä tutkimus on hidasta. (Munita & Arias 25.) Vaikka antibiootit ovat aikanaan mullistaneet terveydenhuollon ja ne ovat edelleen tärkeänä osana infektioiden hoitoa, on löydettävä vaihtoehtoisia hoitomuotoja niitä bakteereita vastaan, jotka ovat muodostaneet antibioottiresistenssin (Rohde & Wittmann & Kutter 2018: 737.)

4 Bakteriofagit

Bakteriofagit eli faagit ovat bakteereiden viruksia, joita voidaan hyödyntää vaihtoehtoisen hoitomuodon avulla antibioottiresistenttien bakteerien aiheuttamien infektioiden hoidossa (Nikolich & Filippov 202). Faageista on ollut havaintoja jo reilu sata vuotta sitten ja ensimmäisiä kertoja faageja on käytetty jo 1919-luvulla hoitomuotona mikrobien aiheuttamissa infektioissa (Lin & Koskella & Lin 2017). Antibioottien kehitys ja käyttöönotto kuitenkin aiheutti sen, että faagien tutkiminen ja niiden kehittäminen hoitotarkoituksiin jäi taka-alalle suuressa osassa maailmaa (Nikolich & Filippov 2020).

Vaikka rakenteellisesti bakteriofagit ovat hyvin yksinkertaisia, ovat ne kuitenkin todella monimuotoisia organismeja, joita löytyy kaikkialta ympäristöstämme. Niillä on tärkeä tehtävä ekosysteemissä bakteeripopulaation säätelemisessä. (Adesanya ym. 2020: 206.) Bakteriofagien geneettinen perimäaines, DNA tai RNA, on pakkautunut niiden ikosaedrin muotoiseen päähän; proteiineista muodostuneeseen kapsidiin (Black & Thomas 2013). Yleisimmin esiintyvät faagit ovat hännällisiä, jolloin ne käyttävät hännän kuituja apunaan siirtäessään perimäainestaan isäntäbakteerin sisälle (Rohde ym. 2018: 740). Kuvassa 1 on havainnollistettu hännällisen faagin rakennetta.

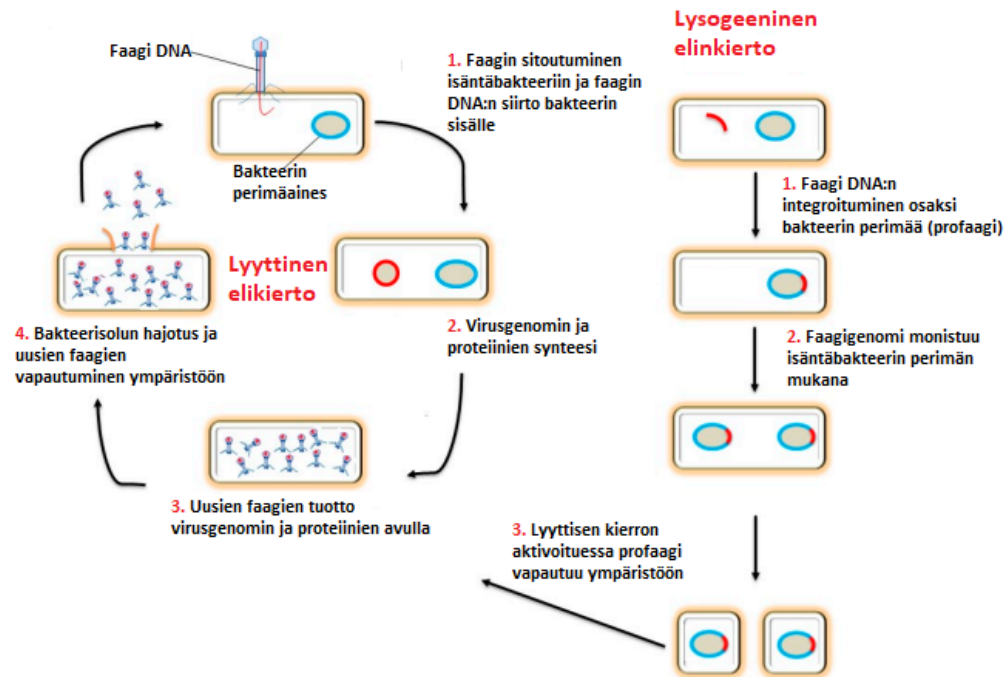


Kuva 1. Hännällisen faagin rakenne (Wikimedia Commons 2008 mukaillen).

Bakteriofagit voidaan jaotella lyyttisiin sekä lauhkeisiin faageihin elinkiertoonsa mukaan. Lyyttiset bakteriofagit sitoutuvat niille spesifin bakterisolun pinnalla olevaan reseptoriin ja siirtävät geeniperimänsä bakterisolun sisälle valtaten bakteerin aineenvaihdunnan. Tällöin ne voivat isäntäbakteerin avulla monistaa geeniperimänsä, jonka jälkeen ne hajottavat isäntäbakteerin soluseinän tuottamiensa entsyymien, lysiinin ja holliinin avulla. Kun isäntäbakteeri on tuhottu, pääsevät sen sisällä olleet uudet viruspartikkelit vapautumaan ympäristöön. (Lin ym. 2017: 164; Nikolich & Fillipov 2020: 135; Gordillo Altamirano & Barr 2019: 15.) Vapautuneet bakteriofagit siirtyvät infektoimaan uutta isäntäbakteeria (Kasman & Porter 2021). Useimmat bakteriofagit voivat infektoida ja tuhota vain niitä bakteereita, joiden solun pinnalla on niiden tunnistama reseptori (Lin ym. 2017: 164).

Lauhkeat faagit voivat käyttää joko lyyttistä kiertoa kuten lyyttiset bakteriofagit tai lysogeenistä kiertoa, jolloin ne yhdistävät niiden geeniperimänsä isäntäbakteerin perimän kanssa. Faagia, jonka perintöaine on integroitunut isäntäbakteerin genomiin kanssa, kutsutaan profaagiksi. Profaagi säilyy bakteerin sisällä inaktiivisena, kunnes ympäristötekijöiden vuoksi lyyttinen kierto aktivoituu ja uudet viruspartikkelit vapautuvat ympäristöön. Lauhkeiden bakteriofagien yhdistäessä geeniperimänsä isäntäbakteerin perimän

kanssa, voivat ne muun muassa edistää isäntäbakteerin taudinaiheutuskykyä ja edesauttaa antibioottiresistenssin syntymistä. (Lin ym. 2017: 164; Kortright & Chan & Koff & Turner 2019: 2019.) Kuvassa 2 havainnollistetaan sekä lyyttisten, että lauhkeiden faagien elinkiertoja.



Kuva 2. Lyyttinen ja lysogeeninen elinkierto kuvattuna (Stone & Campbell & Grant & McAuliffe 2019: 3 mukailleen).

5 Faagihoido ja sen käyttö

Mikrobiologi Felix d'Herelleä pidetään bakteriofaagien löytäjänä, vaikka bakteriofageista oli aikaisemmin tehty havaintoja (Nikloch & Filippov 2020: 145). d'Herelle oli kuitenkin ensimmäinen, joka oivalsi miten bakteriofagit toimivat ja miten niitä voisi hyödyntää hoitomuotona bakteri-infektioille (Lin ym. 2017: 164). Tutkittuaan bakteriofageja ja niiden toimintaa jonkin aikaa, hän testasi bakteriofaagien turvallisuutta muun muassa kollegoidensa avulla ja laajensi sitten tutkimustaan potilaisiin. Vaikka useat varhaiset kokeet antoivat faagihoidosta positiivisia tuloksia, suhtauduttiin siihen myös kriittisesti. Eräässä raportissa muun muassa kritisoitiin sitä, että bakteriofaagien biologisia ominaisuuksia ei

tunnettu tarpeeksi, niiden rajoittavien tekijöiden huomioimiseksi. (Cisek ym. 2017: 277-278.)

Vaikka faagihoidon mahdollisuus on ollut tiedossa jo vuosisadan ajan, hiipui alun innostus sen mahdollisuuksista hoitomuotona pian antibioottien kehittämisen jälkeen. Faagihoidon tutkimista ja kehittämistä jatkettiin kuitenkin esimerkiksi entisen Neuvostoliiton alueella sekä Puolassa. (Altamirano & Barr 2019: 2.) Bakteriofageja on hyödynnetty bakteeri-infektioiden hoitomuotona jo lähes vuosisadan ajan Puolassa, Georgiassa ja Venäjällä. Yhä useampi maa kuten Ranska, Belgia, Sveitsi ja Yhdysvallat on alkanut hyödyntämään faagihoitoa. Puolassa sijaitseva faagihoitokeskus tarjoaa potilailleen kokeellista hoitoa useita vaikeita bakteeri-infektioita vastaan, joita aiheuttaa muun muassa enterokokkibakteerit. Hoitokeskuksen julkistaman datan mukaan 30–35 % siellä hoidetuista potilaista sai kokeellisesta hoidosta apua. (Cisek ym. 2017: 280.) Länsimaissa faagihoidon kehittyminen on ollut hitaampaa ja siihen suhtaudutaan varauksellisemmin (Nikolich & Filippov 2020: 3).

Faagihoidossa käytetään vain isäntäbakteerinsa varmasti tuhoavia lyyttisiä faageja. Niistä muodostetaan yleensä faagiseoksia, jotka sisältävät useita eri bakteriofageja, joilla on spesifisyys tiettyä bakteeria kohtaan. (Lin ym. 2017: 164.) Viimeaikaisten tutkimusten perusteella sekä yksittäiset bakteriofagit, että faagiseokset toimivat faagihoidossa. Silti laajakirjoisia faagiseoksia suositaan, jotta bakteriofageille resistenttien bakteereiden muodostumista voitaisiin estää. Faagiseoksista ei myöskään ole todettu olevan haittoja, sillä seoksessa olevat spesifisyydeltään erilaiset bakteriofagit eivät kilpaile keskenään ja näin laske hoidon tehokkuutta. (Kortright ym. 2019: 228–229.)

Faagihoidolla on monia hyviä puolia verrattuna antibioottihoidon käyttöön. Koska bakteriofagit voivat infektoida vain yhtä, tai korkeintaan muutamaa bakteerikantaa, voidaan hoito kohdentaa helpommin tiettyä infektiota aiheuttavaa bakteeria vastaan. (Nikolich & Filippov 2020: 135.) Isäntäspesifisyytensä vuoksi faagihoidon on todettu myös aiheuttaman vähemmän haittaa ihmisen normaalille mikrobistolle, kuin antibioottien käytöstä aiheutuisi (Adesanya ym. 2020: 214). Bakteriofagit myös mukautuvat helpommin isäntäbakteerinsa muuttuneisiin ominaisuuksiin, minkä vuoksi bakteereiden on hankalampaa muodostaa resistenttiä bakteriofageja kohtaan. Joissakin tapauksissa faagiresistenssin muodostuminen on jopa herkistänyt resistenttejä bakteereita uudelleen antibiootille. Bakteriofageja on ympäristössä siellä, missä bakteereitakin ja niiden eristäminen onkin usein teoriassa helppoa. Mikäli bakteeri alkaa muodostamaan resistenssiä bakteriofagia kohtaan, voidaan eristää uusi bakteriofagi, joka on spesifi tätä bakteeria

kohtaan ja näin säilyttää faagihoidon herkkyys. (Adesanya ym. 2020: 217–218.) Bakteriofagien helppo saatavuus voi tehdä hoitomuodosta tehokkaan sekä edullisen verrattuna joihinkin antibioottihoitoihin (Nikolich & Filippov 2020: 135).

Bakteriofageista on myös hyötyä infektioissa, joihin on muodostunut biofilmiä (Adesanya ym. 2020: 216). Jotta antibiootit voisivat tuhota biofilmiä, tulisi niitä saada korkeina pituisuuksina pitkään, kun taas bakteriofagit sen sijaan tuottavat entsyymejä, jotka voivat tuhota biofilmiä ja näin ollen toimia näiden infektioiden hoitomuotona. (Adesanya ym. 2020: 216–217.) Faagihoidon on myös kokeiltu yhdistelmähoitona antibioottien kanssa muun muassa *Klebsiella pneumoniae* -bakteerin muodostaman biofilmin tuhoamisessa ja sen havaittiin lisäävän hoidon tehokkuutta (Kortright ym. 2019: 228).

Vaikka faagihoidolla on useita hyviä puolia, tulee huomioida myös mahdolliset haasteet tai rajoittavat haittatekijät. Se, että bakteriofagi infektoi spesifisesti vain yhtä tai korkeintaan muutamaa bakteerikantaa voi olla sekä hyöty, että haitta faagihoidon tuotannollistamisen ja kehityksen kannalta. (Nikolach & Filippov 2020: 135; Lin ym. 2017: 168.) Esimerkiksi palovamman tulehtuessa, infektoivia bakteereita on yleensä useampi kuin yksi. Tällöin joudutaan käyttämään useista eri faageista koostettuja faagiseoksia ja kaikki palovammaa infektoivat bakteerit tulisi olla tunnistettuja. (Lin ym. 2017: 168.) Faagiseosten valmistamista varten edellytetään melko suuria bakteriofagikokoelmia, joita tulisi päivittää säännöllisesti, jotta voidaan pyrkiä estämään bakteriofageille resistenttien bakteerien syntyminen. Tällaisten suurten bakteriofagikokoelmien keräys sekä ylläpito voi tehdä faagihoidon liittyvistä turvallisuustestauksista haastavampia sekä tehdä tuotannosta kalliimpaa. Tutkimuksissa on myös käynyt ilmi, että saman bakteerilajin aiheuttamiin infektioihin voidaan tarvita erilaisia faagiseoksia maantieteellisestä sijainnista riippuen. (Nikolach & Filippov 2020: 135.)

Vaikka bakteerin on vaikeampi muodostaa resistenssejä ominaisuuksia bakteriofageja kohtaan, voi sitä tapahtua. Resistentti bakteriofagia kohtaa voi muodostua esimerkiksi pistemutaation avulla, joka muuttaa bakteerisolun pinnalla olevaa antigeeniä niin, ettei bakteriofagi pääse infektoitumaan bakteerisolun. Tämä mutaatio voi tapahtua usein etenkin, kun bakteeripopulaatio on suuri, kuten joissakin infektioissa. (Nilsson 2014: 193.) Tämä voi vaikuttaa hoidon tehokkuuteen jopa faagihoidon aikana (Nikolach & Filippov 2020: 135).

Vaikka faagiterapiassa on myös haasteita, on sen potentiaalista ja onnistumisista useita esimerkkejä. 2016 Yhdysvalloissa hoidettiin resistentin *A. baumannii* kannan ai-

heuttamaa infektiota faagien avulla. Bakteeri oli muodostanut resistentin kaikkia hoitoon kokeiltuja antibiootteja vastaan ja faagihoidon alettua se muodosti resistenttiä myös faageja kohtaan. Uusia faageja kuitenkin voitiin eristää ja käyttää niitä yhdessä antibioottien kanssa infektion hoitoon. Infektio saatiin lopulta hoidettua onnistuneesti ja potilas toipui vakavasta infektiosta täysin. (Schooley ym. 2017.) Myös Saksassa on saatu äskettäin tuloksia onnistuneesta faagihoito tapauksesta. Alle vuoden ikäisellä lapsella oli usean maksansiirron ja siitä aiheutuneiden komplikaatioiden seurauksena vankomysiinille resistentin *E. faecium* kannan aiheuttama infektio, jota hoidettiin faagihoidolla. Vaikka potilaalla on maksansiirron komplikaatioista johtuen ollut vuoden seurannan aikana muutamia infektiota, vankomysiinille resistenttiä *E. faecium* kantaa ei ole havaittu potilaan näytteistä kuin kerran, ja silloin se vastasi tilapäiseen antibioottihoitoon. (Paul ym. 2021: 5-6.) Vaikka faagiterapiassa nähdään paljon potentiaalia, vaa-dittaisiin siitä kuitenkin enemmän kontrolloiduissa kliinisissä olosuhteissa tehtyjä ko-keita ja tietoa (Paul ym. 2021: 2).

6 Tarkoitus, tavoite ja tutkimustehtävä

Opinnäytetyön tarkoituksena oli eristää tutkimusryhmälle uusia *E. faecalis* sekä *E. faecium*-bakteereille spesifisiä bakteriofageja potilaista eristettyjä kliinisiä *E. faecalis* ja *E. faecium*-kantoja vastaan. Bakteriofageja eristettiin jätevesinäytteistä, jonka jälkeen faagit karakterisoitiin isäntäkirjon laajuutta kartoittamalla. Tämä tapahtui testaamalla bakteriofagit mahdollisimman monta Enterokokki-suvun bakteereita vastaan, joita koko-elmasta löytyi. Bakteriofageista eristettiin myös genomien sekvensointia varten niiden perintöainesta. Sekvensointi on välttämätöntä, jotta voidaan selvittää ovatko eristetyt faagit soveltuvia ja turvallisia faagihoidokäyttöön.

Tavoitteena oli kehittää ja laajentaa tutkimusryhmän jo olemassa olevaa bakteriofa-gikokoelmaa, jonka tulisi olla mahdollisimman laaja bakteriofagien kapean isäntäkirjon vuoksi. Tutkimusryhmällä on tällä hetkellä yli 500 bakteriofagin kokoelma ja siinä olevat bakteriofagit infektoivat pääasiassa ESKAPE-ryhmän bakteereita, joille antibioottiresis-tenssi on yleistä.

Tutkimustehtävässä yhdistyy sekä työn tarkoitus, että tavoite. Onnistuneesti eristetyt *E. faecalis* ja *E. faecium* bakteereille spesifiset bakteriofagit laajentavat tutkimusryhmän bakteriofagikokoelmaa ja näin auttaa myös tutkimuksen kehittämistä eteenpäin.

7 Opinnäytetyön materiaalit ja menetelmät

7.1 Aineisto

Projektiin valittiin potilaista eristettyjä *E. faecalis* ja *E. faecium* kantoja, joille tutkimusryhmän faagikokoelmassa ei ollut yhtään tai vain vähän faageja. Yhteensä projektin aikana pyrittiin eristämään faageja kuutta *E. faecalis* sekä kahtatoista *E. faecium* kantaa vastaan, jotka on esitetty taulukossa 1. Käytetyt kannat ovat HUSLAB kliinisen bakteriologian osastolta saatuja potilaista eristettyjä kliinisiä bakteerikantoja. Kannat on nimetty uudelleen tutkimusryhmän järjestysnumeron mukaan potilaiden yksityisyyden suojaamiseksi.

Taulukko 1. Projektiin valitut potilaista eristetyt resistentit bakteerikannat tutkimusryhmän järjestysnumeron mukaan.

Valitut <i>E. faecalis</i> kannat	Valitut <i>E. faecium</i> kannat	
#6259	#5675	#5552
#6467	#5732	#5864
#6552	#5899	#5866
#6568	#5791	#5878
#6933	#5897	#5972
#7007	#5900	#5885

Työssä käytettiin elatusaineina sekä Luria (LB) että Brain-Heart Infusion (BHI) – elatusliemiä. LB-elatusliemi valmistettiin tutkimusryhmän käyttöön valmiiksi taulukon 2 ohjeen mukaan.

Taulukko 2. Luria-elatusliemen valmistusohje.

	g/l
Tryptoni	10 g
Yeast-extract	5 g
NaCl	10 g

LB elatusliemestä valmistettiin myös pehmytagaria, jolloin elatusliemeen lisättiin 0,32 g bacto-agaria 80 ml:aan elatuslientä. Työn aikana bakteerien kasvatukseen käytettiin LB-maljoja, jotka tilattiin valmiina HUSLABin liuoslaboratoriosta. BHI-elatusliemi valmistettiin valmistajan ohjeiden mukaan (Becton, Dickinson and Company). Myös BHI elatusliemestä valmistettiin pehmytagaria kuten edellä. Kaikki työssä käytetyt reagenssit ja elatusaineet, jotka valmistettiin laboratoriossa itse, autoklavoitiin. Näin voitiin olla varmoja liuosten steriilisuudesta.

Bakteerikantoja säilytettiin $-70\text{ }^{\circ}\text{C}$ pakastettuina, kunnes ne viljeltiin käyttöä varten LB-maljoille. Bakteereita kasvatettiin $+37\text{ }^{\circ}\text{C}$ lämpöhuoneessa sekä $+37\text{ }^{\circ}\text{C}$ lämpökaapissa, jossa oli lisäksi 5 % CO_2 .

E. faecalis ja *E. faecium* aiheuttavat tyypillisesti sairaalainfektioita, joten lähtömateriaalina pyrittiin käyttämään sairaaloiden jätevesiä. Projektin aluksi muodostettiin viisi seosta Suomen sairaaloiden jätevesistä, kaupunkien jätevesistä ja luonnonvesistä sekä viisi seosta Beninin sairaaloiden sekä ympäristön jätevesistä. Beninin jätevedet saatiin dosentti Kaisa Haukan ja professori Anu Kanteleen (Helsingin yliopisto) sekä Dr. Victorien Tamègonin (University of Abomey Calavi) kanssa tehdystä aiemmasta yhteistyöprojektista. Tarkemmat tiedot mitä näytettä kuhunkin näyteseokseen kuului, on esitetty liitteestä 1. Kussakin näyteseoksessa siihen kuuluvia näytteitä pipetoitiin niin, että kutakin näytettä oli seoksessa sama määrä.

7.2 Aineiston analysointimenetelmät

7.2.1 Faagien rikastus

Jokaisesta valitusta bakteerikannasta (taulukko 1) valmistettiin rikastusnäytteet Suomen jätevesiseosten (Suomi Pool A, Suomi Pool B, Suomi Pool C, Suomi Pool D, Suomi Pool E) sekä elatusaineen kanssa. Kuudesta taulukon 1 *E. faecium* kannasta (#5675, #5732, #5899, #5791, #5897, #5900) valmistettiin rikastusnäytteet myös Beninin jätevesiseosten (Benin Pool A, Benin Pool B, Benin Pool C, Benin Pool D, Benin Pool E) sekä elatusaineen kanssa. Kukin rikastusnäyte koostui 1,5 ml jätevesiseoksesta, 4,5 ml elatusliemestä sekä x määrästä esikasvatettua bakteeria.

Bakteereita kasvatettiin aluksi 1,3 ml LB- tai BHI-elatusliemessä. Nesteessä kasvatettavia bakteereita inkuboitiin ravistelussa 2-4 tuntia, $+37\text{ }^{\circ}\text{C}$:ssa. Kun bakteeri oli saavuttanut eksponentiaalisen kasvun vaiheen ja seos oli silmin nähden sameaa, mitattiin

siitä absorbanssi aallonpituudella 600nm (DSM-micro, LAXCO). Rikastusnäytteisiin tarvittava x määrä esikasvatusnäytettä laskettiin käyttäen kaavaa $x = \frac{25}{A_{600}}$, jossa A_{600} on absorbanssi 600 nm aallonpituudella mitattuna.

Rikastusnäytteitä inkuboitiin yön $+37\text{ °C}$ jatkuvassa ravistelussa niin, että näytteet sekoittuivat koko ajan. Seuraavana päivänä näytteet sentrifugoitiin (SL 16R, Thermo Fisher Scientific) $4000 \times g$:ssä, $+10\text{ °C}$, 10–15 minuutin ajan. Sentrifugoinnin avulla bakteerimassa painettiin putken pohjalle. Sentrifugoinnin jälkeen supernatantti suodatettiin $0,22\ \mu\text{l}$ suodattimen läpi. Lopuksi putkeen lisättiin 40 % sakkaroosia säilyvyyden parantamiseksi niin, että sen osuus rikastusnäytteen kokonaistilavuudesta oli 8 %. Näytteitä säilytettiin $+4\text{ °C}$.

7.2.2 Rikastetun näytteen titraus isäntäbakteerin kanssa

Jotta voidaan selvittää, onko rikastetusta näytemateriaalista löytynyt faageja jotka infektoivat spesifiä isäntäbakteeria, on näytteet titrattava isäntäbakteeria vastaan. Titraus voidaan suorittaa kahdella tapaa käyttäen joko kokomaljamenetelmää tai pisaramenetelmää. Kokomaljamenetelmä antaa tarkemman tuloksen, mutta usein pisaramenetelmää voidaan käyttää arvioimaan millä laimennoksilla näyte kannattaisi titrata kokomaljalle parhaan tuloksen saavuttamiseksi. Kokomaljamenetelmää käytetään, kun halutaan maljalle yksittäisiä plakkeja esimerkiksi plakkipuhdistusta tai tiitterin eli pitoisuuden laskua varten. Työvaiheesta riippuen arvioidaan, kumpi menetelmä soveltuu käyttöön paremmin. Kun rikastettu näyte titrattiin isäntäbakteerin kanssa, oli tarkoitus selvittää löytyykö näytemateriaalista isäntäkantoja infektoivia bakteriofageja. Tällöin pisaramenetelmä oli tarkkuudeltaan riittävä.

Haluttua isäntäbakteeria siirrostettiin muutama pesäke $1,3\ \text{ml}$ LB- tai BHI-elatusliemen joukkoon ja kasvatettiin $+37\text{ °C}$ 2–4 tunnin ajan ravistelussa. Tämän jälkeen nesteessä kasvatetusta bakteerista mitattiin absorbanssi aallonpituudella 600 nm.

Sekä kokomalja- että pisaramenetelmässä sulatetun ja $+55\text{ °C}$ asteiseksi tasapainotetun BHI- tai LB-pehmytagarin joukkoon pipetoitiin esikasvatettua bakteeriseosta, jonka määrä laskettiin käyttäen kaavaa $x = \frac{45}{A_{600}}$, jossa A_{600} on absorbanssi mitattuna 600 nm aallonpituudella.

Rikastusnäytteistä tehtiin BHI- tai LB-elatusliemeen laimennossarjat 10^1 , 10^2 , 10^3 ja 10^4 . Pisaramenetelmässä bakteeriseosta pipetoitiin pehmytagarin joukkoon, vorteksoitiin lyhyesti ja kaadettiin maljalle. Pehmytagarin annettiin jähmettyä huoneenlämmössä 30 minuutin ajan, jonka jälkeen maljalle pipetoitiin 10 μ l kutakin laimennosta sekä 10 μ l käytettyä elatuslientä negatiiviseksi kontrolliksi. Maljoja kuivatettiin huoneenlämmössä tunnin ajan, minkä jälkeen ne siirrettiin bakteerille optimaalisiin kasvuolosuhteisiin yön yli. Tulokset luettiin visuaalisesti maljaa tarkastelemalla seuraavana päivänä. Niistä rikastusnäytteistä, joista löytyi isäntäbakteeria infektoivaa faagia, tehtiin titraukset kokomaljamenetelmällä plakkipuhdistusta varten.

Kokomaljamenetelmässä voitiin käyttää hyväksi pisaramenetelmää ja arvioida millä laimennoksella kokomaljalle saataisiin yksittäisiä plakkeja sopiva määrä. Sekä kasvatettua bakteeria että rikastusnäytteestä LB- tai BHI-liemeen tehtyä laimennosta pipetoitiin 50 μ l pehmytagarin joukkoon ja kaadettiin maljalle. Negatiivinen kontrolli tehtiin omalle maljalleen käyttäen elatuslientä, joka pipetoitiin pehmyt agarin joukkoon laimennoksen sijaan. Kunkin bakteerin kaikista laimennoksista tehtiin oma malja. Maljoja kuivatettiin 30 minuutin ajan huoneen lämmössä, jonka jälkeen ne siirrettiin bakteerille optimaalisiin kasvuolosuhteisiin yön yli. Myös kokomaljalta tulokset luettiin seuraavana päivänä visuaalisesti maljaa tarkastelemalla tai esimerkiksi plakkien, faagien infektoimien alueiden, laskennalla.

7.2.3 Plakkipuhdistus ja lymaatin tuotto

Plakkipuhdistuksessa oli tarkoitus kerätä kokomaljalta yksittäisiä morfologialtaan eri kokoisia plakkeja. Kustakin eri isäntäkantaa vastaan löydetyistä faagista poimittiin viisi plakkia, joista osa poimittiin pienemmistä plakeista ja osa isommista. Tässä työvaiheessa poimitut faagit nimettiin väliaikaisesti isäntäbakteerin sekä sen näyteseoksen perusteella mistä faagi oli eristetty ja lisäksi juoksevat numerot 1-5 kullekin poimitulle plakille.

Puhdistus suoritettiin poimimalla kokomaljalta plakin kohdalta pehmytagaria pipetinkärjellä. Plakki sekoitettiin SM-puskuriin, jota voidaan käyttää yleisesti faagien laimennoksiin sekä säilytyspuskurina. Näyte vorteksoitiin, jonka jälkeen plakkipuhdistustuotteen annettiin inkuboitua huoneenlämmössä vähintään tunnin ajan, jolloin faagit pääsivät liukenemaan SM-puskurin joukkoon pehmytagarista.

Ensimmäisellä plakkipuhdistuskierroksella jokainen poimittu plakki uutettiin 500 μ l SM-puskuriin. Kustakin plakkipuhdistusnäytteestä tehtiin laimennossarjat 10^1 , 10^2 , 10^3 , 10^4

jotka titrattiin pisaramenetelmällä. Pisaramenetelmän avulla voitiin arvioida, millaisella laimennoksella saadaan kokomaljalle yksittäisiä plakkeja siten, että plakkimäärä maljalla on 5–20. Näin voitiin varmistua siitä, että maljalta poimittiin vain yksi plakki. Plakkipuhdistus suoritettiin kolme kertaa, jotta voitiin olla varmoja, että näytteessä on vain yhdenlaista faagia. Tämän pystyi arvioimaan alustavasti plakkien morfologiasta ja varmistamaan myöhemmin sekvensoinnilla.

Kun plakkipuhdistus oli suoritettu kolme kertaa ja tulokset ovat selkeitä eli plakkeja muodostui yhä maljalle, tehtiin näytteistä faagilysaatti nestekasvatuksena tai semikonfluenteilta maljoilta. Nestekasvatuksena tuotettuun faagilysaattiin tarvittiin yön yli nesteessä kasvatettua isäntäbakteeria 400 µl, plakkipuhdistustuotetta 40 µl sekä 9,6 ml elatuslientä. Lysaatin annettiin inkuboitua noin viiden tunnin ajan +37 °C koko ajan sekoittuen ja välillä seuraten, mikäli seos on kirkastunut jo aiemmin. Seoksen kirkastuminen oli merkki siitä, että faagit olivat infektoineet valtaosan seoksessa olleista bakteereista ja faagien määrä lisääntynyt. Semikonfluenttien maljojen faagilysaatin tuottoa varten tehtiin halutusta plakkipuhdistustuotteesta sekä siinä olevan faagin isäntäbakteerista kokomaljamenetelmällä 1–3 maljaa, joita kasvatettiin optimaalisissa olosuhteissa yön yli. Tavoitteena oli saada kokomaljoja, joissa faagi oli infektoinut lähes koko bakteerikasvun maljalta, niin että yksittäisiä plakkeja ei voitu havaita. Tällöin faageja oli maljalla mahdollisimman paljon. Maljoille pipetoitiin 3 ml SM-puskuria faagien liuottamiseksi irti maljalta ja maljoja inkuboitiin huoneenlämmössä kaksi tuntia. Pehmeä agar sekä puskuiri irrotettiin maljalta L-sauvaa apuna käyttäen ja kaikki neste pipetoitiin erilliseen putkeen.

Tämän jälkeen molemmilla tavoilla tuotetut lysaatit sentrifugoitiin 5000 x g:ssä, +4 °C, 15 minuutin ajan, jotta bakteerimassa saatiin putken pohjalle. Kirkas faagilysaatti suodatettiin 0,22 µm suodattimen läpi ja putkeen lisättiin 40 % sakkaroosia säilyvyyden parantamiseksi, niin että sakkaroosin määrä oli 8 % lysaatin kokonaistilavuudesta. Lysaatit säilytettiin +4 °C kunnes ne titrattiin kokomaljamenetelmällä tiitterin arvioimiseksi.

Jokaisesta lysaatista laskettiin tiitterit käyttäen alla olevaa kaavaa, joka antoi tuloksen kuinka paljon plakkeja muodostavaa yksikköä on millilitrassa (Plaque forming unit (PFU)/ml). Koska faagilysaatteja oli laimennettu kokomaljatitrausta varten, tuli laskussa ottaa huomioon tämä laimennoksen suuruus.

$$\text{plakkien määrä maljalla} \times \text{laimennoskerroin} \times \frac{1000}{\text{laimennoksen tilavuus}}$$

Kustakin isäntäbakteeriaan infektoivasta faagista valittiin isosta ja pienestä poimitusta plakista ne faagilysaatit joissa tiitteri oli suurin ja nämä näytteet nimettiin ja niistä eristettiin DNA. Faagit nimettiin tutkimusryhmän ohjeiden mukaan, niin että nimestä käy ilmi mistä faagi on eristetty (esimerkiksi fHo = sairaalajätevedestä eristetty) ja mikä sen isäntäkanta on (esimerkiksi Efa = *E. faecalis*).

7.2.4 DNA eristys ja geeli

DNA eristettiin käyttäen valmista kaupallista Phage DNA Isolation (Norgen Biotek Corp.) –kittiä valmistajan ohjeiden mukaan. Jotta DNA voitiin onnistuneesti eristää, tuli faagilysaattien tiitterit olla yli 1×10^8 PFU/ml. DNA eristykseen valittiin yksi isompaa ja yksi pienempää plakkia muodostava faagilysaatti kultakin isäntäbakteerilta. Näytteet valittiin korkeimman tiitterin perusteella.

5 ml sentrifugiputkeen pipetoitiin 1 ml faagilysaattia. Koska faagien rikastusnäytteet oli tehty elatusaineeseen isäntäbakteerin kanssa, noudatettiin ohjeen mukaan ylimääräistä DNase-käsittelyä. Tällöin vältyttiin isäntäbakteerin DNA:n kontaminaatiolta eluointivaiheessa. DNase-entsyymiä (Norgen's RNase-free DNase) pipetoitiin faagilysaatin joukkoon 5 µl ja näytettä inkuboitiin huoneenlämmössä 15 minuutin ajan. DNase:n inaktivoimiseksi näytettä inkuboitiin tämän jälkeen vielä 5 minuutin ajan $+75\text{ }^{\circ}\text{C}$.

DNA eristysnäytteisiin lisättiin 500 µl hajotuspuskuria (Lysis Buffer B), jonka tarkoituksena oli yhdessä lämpökäsittelyn kanssa hajottaa faagipartikkelit. Näytettä ja hajotuspuskuria vorteksoitiin voimakkaasti 10 sekunnin ajan. Näytteisiin lisättiin myös 4 µl pitoisuudeltaan 20 mg/ml Proteinaasi K:ta, jonka tarkoituksena oli hajottaa faagin kapsidi. Näytteitä inkuboitiin ensin 15 minuuttia $+55\text{ }^{\circ}\text{C}$, jonka jälkeen 15 minuuttia $+65\text{ }^{\circ}\text{C}$. Toisen inkuboinnin aikana näytteitä käännettiin 2–3 kertaa sen aikana. Inkuboinnin jälkeen näytteisiin pipetoitiin 320 µl isopropanolia ja vorteksoitiin kevyesti.

Spin-kolonnit asetettiin keräysputkeen ja kolonniin pipetoitiin 650 µl näytettä. Näytettä sentrifugoitiin huoneenlämmössä minuutin ajan 6000 x g:ssä (Mini spin, Eppendorf). Sentrifugoinnin aikana spin-kolonniin sitoutuu näytteessä olevaa DNA:ta, kun taas suurin osa RNA:sta ja proteiineista suodattuu keräysputkeen. Sentrifugoinnin jälkeen keräysputken sisältö tyhjennettiin jäteastiaan. Tämä vaihe toistettiin, kunnes kaikki näyte oli suodatettu spin-kolonnin läpi.

Spin kolonniin sitoutunut DNA pestiin jäljellä olevien epäpuhtauksien poistamiseksi pesuliuksella, johon oli lisätty etanolia. Pesuliuosta pipetoitiin 400 µl spin kolonniin, jonka

jälkeen sentrifugoitiin minuutin ajan 6000 x g:ssä. Pesu toistettiin kolme kertaa ja keräysputkeen kertynyt neste tyhjennettiin joka pesun välissä. Lopuksi näytettä sentrifugoitiin 2 minuutin ajan 14 000 x g:ssä näytteen kuivattamiseksi. Puhdistettu DNA-eluoitiin kitin mukana tulevaan eluointiputkeen. Eluointipuskuria pipetoitiin 75 µl spin kolonniin ja näytteet sentrifugoitiin 2 minuutin ajan 6000 x g:ssä. Eristettyjä DNA näytteitä säilytettiin +4 °C.

Eristetyistä DNA näytteistä mitattiin konsentraatio Qubit-fluorometrillä. Mittaukseen käytettiin Qubit dsDNA BR Assay (Thermo Fisher Scientific) kittiin kuuluvia määritysreagenssia, laimennuspuskuria sekä kahta DNA-standardia. Mittausta varten valmistettiin käyttöliuos, jossa dsDNA BR-reagenssi laimennettiin dsDNA BR-puskurin avulla laimennossuhteen ollessa 1:200. Standardeja varten käyttöläimennosta pipetoitiin Qubit-määritykseen tarkoitettuihin 0,5 ml putkiin 190 µl ja näytteitä varten 198 µl. Standardeja pipetoitiin putkiin 10 µl ja eristettyjä DNA-näytteitä 2 µl, jolloin kunkin putken kokonaistilavuus oli 200 µl. Määritykseen käytettävä dsDNA BR-reagenssi on valoherkkä, joten näytteitä inkuboitiin valolta suojattuna huoneenlämmössä 2 minuuttia. Mittaus tehtiin huoneenlämmössä, jotta lämpötilanvaihtelut eivät vaikuttaisi määrityksen tarkkuuteen. Qubit –fluorometristä valittiin dsDNA broad range -ohjelma, jonka jälkeen laitteella luettiin ensin järjestyksessä molemmat standardit ja lopuksi näytteet.

Ne näytteet, joissa konsentraatio oli tarpeeksi korkea, ajettiin 0,8 % tehdyllä agarosigeelillä. Geeli tehtiin 1 x Tris-Acetate-EDTA (TAE) -puskuriin, jota käytettiin myös ajopuskurina. Geelin avulla tarkasteltiin, onko DNA ehjää. Sulaan ja hieman jäähtyneeseen agarosiseokseen pipetoitiin 2 µl Midori Green -väriainetta, jotta DNA saatiin näkyviin. Ajopuskuriin upotettuun geeliin pipetoitiin näytettä niin, että kuopassa olisi 150-200 ng näytettä/10 µl. Näytteet oli valmisteltu ajoa varten niin, että niihin oli pipetoitu myös 6 x latauspuskuria. Ensimmäiseen kuoppaan pipetoitiin 5 µl DNA ladderia eli kokostandardia (GeneRuler, Thermo Fisher Scientific). Geeliä ajettiin 70 V jännitteellä 350 mA noin tunnin ajan, jonka jälkeen se kuvattiin Midori Green kustomoidulla ohjelmalla (Bio-rad Gel Doc XR+). Sekvensointinäytteet lähetettiin Novogenelle Iso-Britanniaan.

7.2.5 Isäntäkirjon kartoitus

Faagien isäntäkirjon kartoituksessa käytettiin Bioscreen C:tä (Labsystems), jonka avulla mitattiin bakteerien kasvua 10 tunnin ajan. Laite mittasi näytteiden absorbanssia 600 nm aallonpituudella puolen tunnin välein koko analysoinnin ajan. Isäntäkirjon kartoituksella testattiin mitä valittuja enterokokkikantoja kukin eristetty faagi infektoi.

Viidestä *E. faecalis* (#5900, #5899, #5989, #5897, #5896) ja viidestä *E. faecium* (#7107, #6552, #6934, #6571, #6908) kannasta tehtiin yön yli kasvatus nesteessä. Lisäksi yön yli kasvatus tehtiin kunkin faagin eristysisäntäbakteerista eli faagin alkuperäisestä isäntäkannasta. Yön yli kasvatetut bakteerit laimennettiin 1:50 LB-liemeen. Faagilysaatit laimennettiin niin, että tiitteri oli 10^8 PFU/ml. Laimennettua faagilysaattia pipetoitiin kuoppalevyn pohjalle 10 µl pipetointikartan mukaisesti. Päälle pipetoitiin 200 µl laimennettua bakteeriseosta.

Kuoppalevyn alkuun pipetoitiin jokaisesta faagista aina positiivinen kontrolli, jonka tarkoituksena oli varmistaa, että faagi infektoi edelleen eristysisäntäänsä. Positiiviseksi kontrolliksi valittiin faagin alkuperäinen isäntäkanta. Näihin kuoppiin pipetoitiin 10 µl laimennettua faagilysaattia sekä 200 µl laimennettua bakteeriseosta. Alkuperäisistä isäntäkannoista tehtiin myös negatiivinen bakteerikontrolli, jolloin faagilysaatin sijaan pipetoitiin LB-elatuslientä. Jokaisesta näytteestä tehtiin kolme rinnakkaista näytekupppaa ja kullekin bakteerikannalle tehtiin oma negatiivinen kontrolli. Laimennettua faagilysaattia pipetoitiin kuoppalevyn pohjalle 10 µl pipetointikartan mukaisesti. Päälle pipetoitiin 200 µl laimennettua bakteeriseosta. Kaikkiin negatiivisiin bakteerikontrolleihin pipetoitiin faagilysaatin sijasta LB-elatuslientä. Jokaisen kuoppalevyn loppuun pipetoitiin kolme rinnakkaista kupppaa LB-elatusliemestä, jolloin voitiin varmistua, ettei se ole kontaminoitunut bakteerilla.

8 Tulokset

8.1 Rikastus

Kaikki bakteerikasvatukset maljoilla tehtiin +37 °C lämpökaapissa, jossa oli 5 % CO₂ sillä kasvu oli optimaalisempi näissä olosuhteissa. Nestekasvatukset siirryttiin tekemään alun jälkeen LB-elatuslientä ravintorikkaammassa BHI-elatusliemessä. Nestekasvatuksessa bakteerit kasvoivat hyvin +37 °C.

Yhteensä kymmenen eri näytteseosta koottiin niin, että viisi seoksista oli koostettu Suomesta kerätyistä jätevesinäytteistä ja viisi Beninin jätevesinäytteistä (liite 1). Taulukon 1 *E. faecium* kannat #5675, #5732, #5899, #5791, #5897 ja #5900 rikastettiin ensin sekä Suomen että Beninin näytteseosten kanssa. Näitä bakteerikantoja infektoivia faageja ei löytynyt kummankaan maan näytteseoksista.

Loput taulukon 1 *E. faecalis* sekä *E. faecium* kannoista rikastettiin Suomen näyteseosten kanssa. Kantoja #5864 ja #6467 infektoivia faageja havaittiin seoksista Suomi Pool B ja Suomi Pool C sekä kantaa #6933 infektoivia faageja seoksesta Suomi Pool C.

8.2 Lysaatin tuotto

Plakkipuhdistus suoritettiin kaikille näytteille kolme kertaa. Osalle näytteistä toinen tai kolmas plakkipuhdistuskierros jouduttiin toistamaan, jotta plakkeja saatiin maljalle sopiva määrä. Kaikista eristetyistä faageista pyrittiin tuottamaan ensisijaisesti nestelysaatti. Nestelysaatin tuotto onnistui Suomi Pool C eristetyistä faageista, jotka infektoivat *E. faecalis* kantoja #6467 sekä #6933. Semikonfluenttien maljojen avulla lysaatin tuotto onnistui seoksesta Suomi Pool B eristetyistä *E. faecalis* kantaa #6467 infektoivista faageista sekä kolmesta *E. faecium* kantaa #5864 infektoivista faageista, jotka oli eristetty seoksesta Suomi Pool C. Niistä faageista, jotka eristettiin *E. faecium* kantaa vastaan seoksesta Suomi Pool B, ei onnistuttu tuottamaan lysaattia projektin aikana kummallakaan menetelmällä. Taulukossa 3 on esitetty kullekin isäntäbakteerille eristetyt faagit, niiden tiitterit, nimet ja mistä näyteseoksesta faagit eristettiin. Kursiivilla on esitetty faagit, joille ei projektin aikana saatu tuotettua tarpeeksi tuottoisaa lysaattia DNA eristystä varten. Kannan #6467 B1, B2 ja B3 näytteissä plakin kokoa ei ole merkitty, sillä kaikki plakit olivat yhtä suuria.

Taulukko 3. Taulukossa on esitetty onnistuneesti eristetyt faagit. Ensimmäisessä sarakkeessa nähdään plakkipuhdistusnäytteet, joista kustakin tuotettiin lysaatti. Lysaatin tiitteri laskettiin ja ne faagit, joilla oli korkein tiitteri, nimettiin. Tiitteri sarakkeessa on paksumunnettu ne näytteet, joissa pitoisuus oli korkein. Viimeisessä sarakkeessa on nähtävissä sen näytteseoksen sisältä, josta faagit eristettiin.

Isäntäkanta	Faagin nimi	Tiitteri	Näytteseos, josta faagit eristetty
#6933 (<i>E.faecalis</i>)			C: HUS Meilahti, Keski-Suomen keskussairaala, Turun yliopistollinen keskussairaala, Lapin keskussairaala jätevesipooli 2020.
C1 (pieni plakki)	fHo-Efa04	2,6 x 10⁹ PFU/ml	
C2 (pieni plakki)		2,3 x 10 ⁹ PFU/ml	
C3 (pieni plakki)		7,2 x 10 ⁸ PFU/ml	
C4 (iso plakki)		1,1 x 10 ⁹ PFU/ml	
C5 (iso plakki)	fHo-Efa05	6,8 x 10⁹ PFU/ml	
#6467 (<i>E.faecalis</i>)			C: HUS Meilahti, Keski-Suomen keskussairaala, Turun yliopistollinen keskussairaala, Lapin keskussairaala jätevesipooli 2020. B: Peijaksen sairaala, Meilahden sairaala, Jorvin sairaala jätevesipooli 2019
C1 (pieni plakki)		4,2 x 10 ⁹ PFU/ml	
C2 (pieni plakki)		4,0 x 10 ⁹ PFU/ml	
C3 (pieni plakki)	fHo-Efa01	4,7 x 10⁹ PFU/ml	
C4 (iso plakki)	fHo-Efa02	6,7 x 10⁹ PFU/ml	
C5 (iso plakki)		5,8 x 10 ⁹ PFU/ml	
B1	fHo-Efa03	2,3 x 10¹⁰ PFU/ml	
B2		2,0 x 10 ¹⁰ PFU/ml	
B3		1,5 x 10 ¹⁰ PFU/ml	
#5864 (<i>E. faecium</i>)			C: HUS Meilahti, Keski-Suomen keskussairaala, Turun yliopistollinen keskussairaala, Lapin keskussairaala jätevesipooli 2020. B: Peijaksen sairaala, Meilahden sairaala, Jorvin sairaala jätevesipooli 2019
C1 (pieni plakki)	fHo-Efm07	5,0 x 10⁹ PFU/ml	
C2 (iso plakki)		1,2 x 10 ⁹ PFU/ml	
C3 (pieni plakki)		2,4 x 10 ⁹ PFU/ml	
C4 (iso plakki)	fHo-Efm08	4,9 x 10⁹ PFU/ml	
C5 (pieni plakki)		1,7 x 10 ⁹ PFU/ml	
B1 (iso plakki)		1,7 x 10 ⁸ PFU/ml	
B2 (pieni plakki)		5,8 x 10 ⁷ PFU/ml	
B3 (iso plakki)		5,2 x 10 ⁸ PFU/ml	
B4 (pieni plakki)		2,3 x 10 ⁸ PFU/ml	
B5 (iso plakki)		6,0 x 10 ⁸ PFU/ml	

8.3 DNA eristys ja geeli

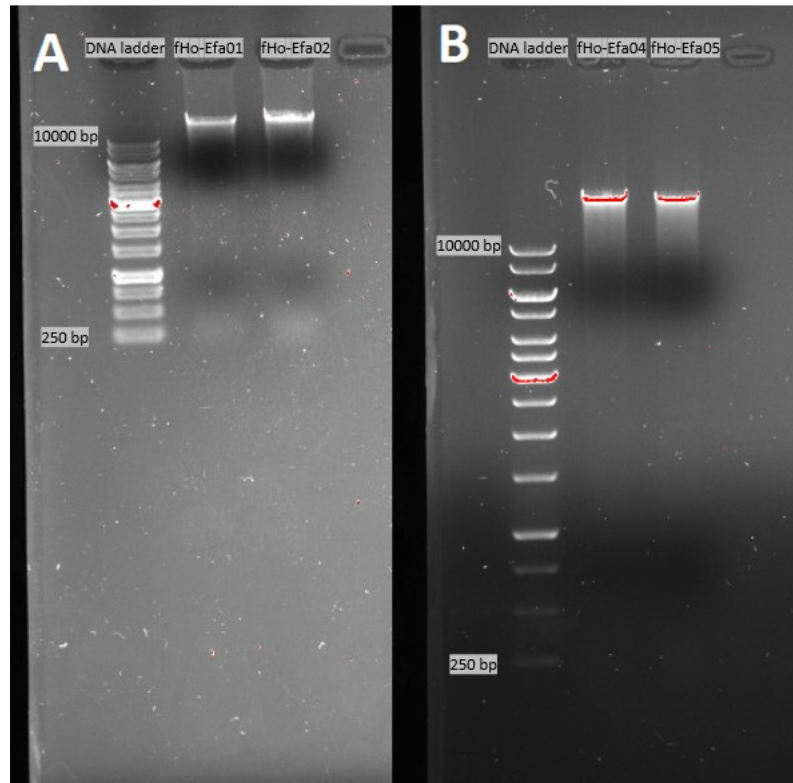
DNA eristykseen valikoitui kultakin isäntäbakteerilta kaksi faagilysaattia, joista toinen oli tuotettu pienen- ja toinen ison plakin plakkipuhdistustuotteesta. Taulukossa 4 nähdään kunkin faagin DNA-konsentraatio Qubit-fluorometrillä mitattuna.

Taulukko 4. Faagien DNA-konsentraatio Qubit-fluorometrillä mitattuna. Ensimmäisessä sarakkeessa oleva tulos on DNA eristyksen jälkeisenä päivänä. Toisessa sarakkeessa tulokset ovat sen jälkeen, kun faagilysaattia yritettiin konsentroida suuremman DNA pitoisuuden saavuttamiseksi. Lihavoidut luvut ovat niiden faagien konsentraatiot, joissa pitoisuus oli tarpeeksi suuri sekvensointia varten.

Faagi	1. Qubit –mittaus	2. Qubit –mittaus konsentroinnin jälkeen
fHo-Efa01	12,6ng/μl	
fHo-Efa02	16,6ng/μl	
fHo-Efa03	6,97ng/μl	6,51ng/μl
fHo-Efa04	9,59ng/μl	17,2ng/μl
fHo-Efa05	5,03ng/μl	10,2ng/μl
fHo-Efm07	2,45ng/μl	1,67ng/μl
fHo-Efm08	too low	3,03ng/μl

Faageilla fHo-Efa03, fHo-Efa04, fHo-Efa05, fHo-Efm07 ja fHo-Efm08 DNA eristysnäytteiden pitoisuus oli liian matala (alle 10 ng/μl). Näitä faagilysaatteja pyrittiin konsentroidaan DNA-pitoisuuden lisäämiseksi. Konsentroidointi onnistui kahdelle faagille, fHo-Efa04 ja fHo-Efa05.

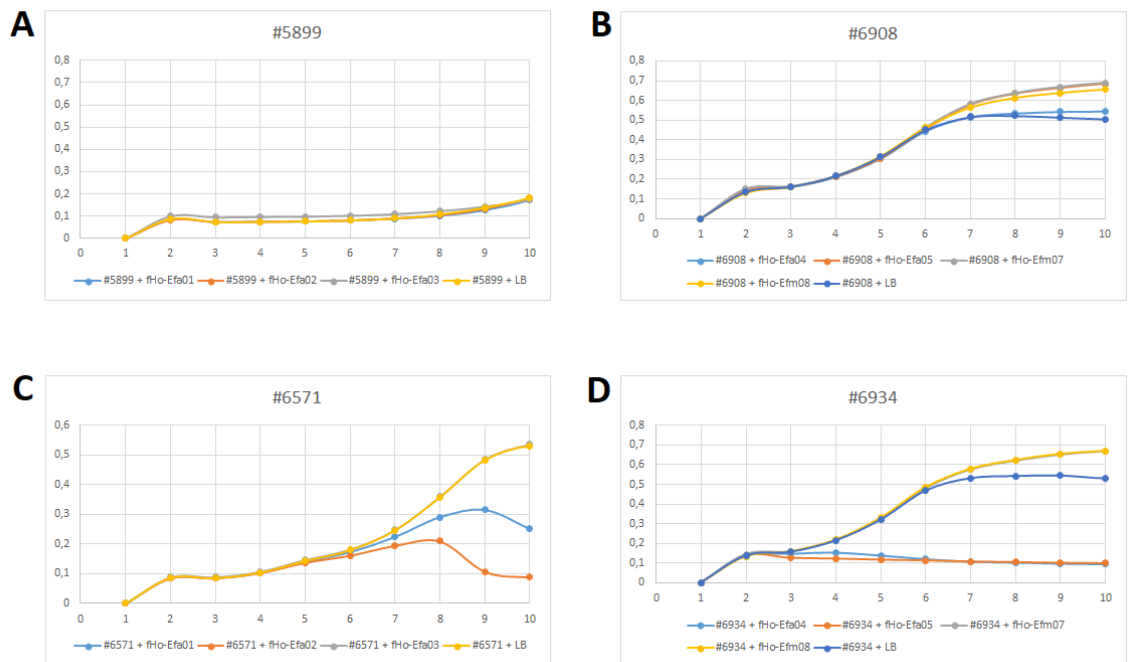
Faageissa fHo-Efa01, fHo-Efa02, fHo-Efa04 ja fHo-Efa05 konsentraatio oli tarpeeksi suuri, jotta ne voitiin lähettää sekvensoitavaksi. Sekvensointia varten näytteen DNA pitoisuus tuli olla vähintään 10 ng/μl. Ennen näytteiden lähettämistä sekvensoitavaksi ne ajettiin agarosigeelillä, jotta voitiin varmistua DNA:n olevan ehjää (kuva 3). Sekvensointitulokset eivät ehtineet valmistua projektin aikana.



Kuva 3. Agaroosigeelissä A ja B ensimmäisissä kuopissa olevan DNA-ladderin, eli kokostandardin perusteella näytteiden DNA fragmenttien kokoa voidaan arvioida. Fragmenttien koko ilmoitetaan basepair (bp). Molemmissa geelikuvissa nähdään, että vyöhykkeet ovat yhtenäisiä niissä kuopissa, joihin pipetoitiin faagien DNA eristysnäytteitä. Kuvasta voidaan siis huomata DNA:n olevan ehjää.

8.4 Isäntäkirjon kartoitus

Kullekin faagille tehtiin isäntäkirjon kartoitus ensin viidellä *E. faecalis* ja viidellä *E. faecium* kannalla liuoskasvatuksessa Bioscreen C laitteella. fHo-Efm07 ja fHo-Efm08 infektoivat eristysisäntänsä lisäksi *E. faecium* kantaa #5900. fHo-Efa04 sekä fHo-Efa05 infektoivat eristysisäntänsä lisäksi *E. faecalis* kantaa 6934. fHo-Efa01 ja fHo-Efa02 infektoivat eristysisäntänsä lisäksi *E. faecalis* kantaa #6571. Kuvassa 4 nähdään esimerkit siitä, miltä kuvaajat näyttivät, kun isäntäkirjon kartoituksesta saadusta datasta oli piirretty kuvaajat.



Kuva 4. Kussakin kuvaajassa pystyakselilla kuvataan laitteen mittaamaa absorbanssia 600nm aallonpituudella. Vaaka-akselilla kuvataan mittausaikaa tunteina. Kuvaajassa A nähdään esimerkki kannasta, joka ei ollut kasvanut kunnolla ja tällöin näyte uusittiin pisaramenetelmällä. Kuvaajassa B yksikään testattu faagi ei infektoi testattavaa bakteerikantaa. Kuvaajassa C faageilla fHo-Efa01 ja fHo-Efa02 nähdään keskitason infektiota. Faagi infektoi kantaa kuitenkin selvästi, kun kartoitus toistettiin pisaramenetelmällä. Kuvaajassa D sekä fHo-Efa04 että fHo-Efa05 infektoivat testattavaa bakteerikantaa.

Osa isäntäkirjon kartoituksista uusittiin maljalle pisaramenetelmällä, sillä bakteeri ei ollut kasvanut kunnolla LB-liemessä, johon näytteistä tehtiin kasvatukset Bioscreen C:llä tehtävää mittausta varten. Pisaramenetelmällä testattiin myös kukin faagi ristiin toistensa eristysisäntien kanssa, mutta faagit eivät infektoineet toistensa isäntäkantoja. Liitteessä 3 nähdään taulukko kaikista isäntäkirjon kartoituksen tuloksista, taulukossa tähdellä merkityt bakteerikannat ovat niitä, jotka uusittiin pisaramenetelmällä.

9 Pohdinta

Työssä saatuja tuloksia pohditaan tulosten tarkasteluosiossa, jossa saatuja tuloksia verrataan ja reflektoidaan olemassa olevaan tutkimustietoon. Johtopäätöksissä pohditaan miten työn tarkoitus ja tavoitteet toteutuivat ja mikä merkitys faagihoitoon liittyvällä tutkimuksella on. Tässä osiossa pohdittiin myös opinnäytetyön luotettavuuteen ja eettisyyteen liittyviä seikkoja sekä prosessin aikaista ammatillista kasvua.

9.1 Tulosten tarkastelu

Useimmille enterokokkilajeille +37 °C on optimaalinen kasvu­lämpötila (Garcia-Solache & Rice 2019). Bakteerien kasvu oli huomattavasti tehokkaampaa, kun lämpötilaan lisät­tiin 5 % CO₂ ja työn aikana todettiin, että se on valituille *E. faecalis* ja *E. faecium* kan­noille kasvuolosuhteiltaan optimaalisempi. Tästä voidaan päätellä, että osa enterokok­kikannoista tarvitsee hiilidioksidia kasvaakseen tehokkaasti. Bakteerikannat kasvoivat myös tehokkaammin LB-elatuslientä ravintorikkaammassa BHI-elatusliemessä sekä siitä valmistetussa pehmytagarissa. Nestekasvatukset elatusliemessä voitiin siis ravin­torikkaammassa liemessä suorittaa vain +37 °C ilman hiilidioksidia.

Beninistä peräisin olevista jätevesinäytteistä ei löydetty yhtään valittuja bakteerikantoja infektoivia faageja. On todettu, että samojen bakteerien aiheuttamia infektioita voidaan joutua hoitamaan erilaisilla faagiseoksilla maantieteellisestä sijainnista riippuen (Niko­lich & Filippov 2020: 2). Eräässä tutkimuksessa vertailtiin eroavaisuuksia erään *Esche­richia coli* bakteerikantojen välillä, joista osa kannoista oli eristetty Australiassa ja osa Yhdysvalloissa. Tutkimus tuki oletusta, että samaan lajiin kuuluvat kannat voivat ge­neettisesti erota toisistaan riippuen maantieteellisestä sijainnista. (Mellor ym. 2013: 5057.) On mahdollista, että myös *E. faecalis* ja *E. faecium* kannat voisivat erota toisis­taan riippuen mistä maasta ne on eristetty, jolloin esimerkiksi Suomesta eristettyjä bak­teerikantoja kohtaan tarvittaisiin faageja, jotka ovat spesifisiä juuri kyseiselle kannalle. Tämä osittain selittäisi sitä, miksi Beninistä eristetyistä jätevesinäytteistä ei löytynyt yh­ttäään projektiin valittuja kantoja infektoivia faageja. Vuonna 2017 julkaistun artikkelin mukaan *E. faecalis* ja *E. faecium* eivät myöskään kuulu bakteerilajeihin, jotka tyypilli­sesti aiheuttavat antibioottiresistenttejä bakteeri-infektioita Afrikassa. Kuitenkin tutki­mukselta puuttui antibioottiresistenttien bakteerikantojen tiedot lähes 40 % Afrikan maista. (Tadesse ym. 2017) On mahdollista, että osassa maista myös *E. faecalis* ja *E. faecium* aiheuttavat antibioottiresistenttejä infektioita, mutta tämä osaltaan antaisi myös selityksen miksi faageja ei löytynyt Beninin jätevesinäytteistä. Ne faagit jotka löydettiin Suomesta kerätyistä jätevesistä löytyivät näyteseoksista, jotka oli koostettu sairaaloi­den jätevesinäytteistä. Sekä *E. faecalis* että *E. faecium* aiheuttavat antibiooteille resis­tenttejä infektioita yleisimmin sairaalapotilaille (Selleck & Van Tyne & Gilmore 2019: 1). Näin ollen on luonnollista, että faageja löydettiin sieltä, missä voidaan olettaa olevan myös runsaasti niiden isäntäbakteereita.

Isäntäkirjon kartoitukseen valituista *E. faecalis* ja *E. faecium* kannoista kukin onnistu­neesti eristetty faagi infektoi oman eristysisäntänsä lisäksi vain yhtä kantaa. Vaikka

työn aikana isäntäkirjon kartoitusta ei ehditty toteuttamaan niin laajasti, kuin oli tarkoitus, viittaisi saadut tulokset siihen, että eristetyillä faageilla on melko kapea isäntäkirjo. Tämä on kuitenkin melko yleistä ja usein kapean isäntäkirjon faageista tuotetaan faagi-seoksia, joiden avulla myös isäntäkirjoon kuulumattomat bakteerikannat saadaan tuhoottua. Vaikka joillekin bakteerilajille on olemassa myös isäntäkirjoltaan laajoja faageja, voi niiden eristäminen spesifistä bakteerikantaa kohtaan olla haastavaa. (Stone ym. 2019: 20) Antibioottiresistenttejä *E. faecalis* ja *E. faecium* kantoja infektoivia faageja ei ole tutkimusryhmän faagikokoelmassa monia ja tarve niille on suuri. Niiden eristäminen on kuitenkin osoittautunut hankalaksi ja myös opinnäytetyössä saatujen tulosten perusteella faagien löytäminen näille kannoille ei ole helppoa. Vuonna 2015 Suomessa tehtiin tutkimus, jossa pyrittiin eristämään uusia faageja useita eri bakteereita vastaan. Tutkimus osoitti, että todennäköisyys löytää faageja esimerkiksi vankomysiinille resistenttejä enterokokkikantoja kohtaan oli alle 40 %. (Mattila & Ruotsalainen & Jalasvuori 2015: 1.) Tehty tutkimus tukee opinnäytetyöprosessin aikana tehdyistä havainnoista siitä, että kyseisiä bakteerikantoja vastaan ei ole helppoa löytää uusia faageja.

Tutkimusryhmässä on havainnoitu, että faagilysaateista on usein vaikeaa saada riittävästi DNA:ta sekvensointia varten. Tämä tukee myös itse saamiani tuloksia lyaatin tuotosta ja siihen liittyvistä haasteista. Vaikka sekvensointitulokset eivät ehtineet valmistua opinnäytetyöprojektin aikana, on hyvä muistaa, että faageilla on oltava tiettyjä ominaisuuksia, jotta ne sopivat terapiakäyttöön. Sekvensoinnin avulla voidaan selvittää, onko faagi lyyttinen vai lauhkea, onko faagilla esimerkiksi toksinigeenejä ja nämä määrittävät voidaanko faagia käyttää faagihoidossa. (Nikolich & Filippov 2020: 5.) On siis otettava huomioon mahdollisuus, että faagit eivät päädy terapiakäyttöön.

9.2 Johtopäätökset

Opinnäytetyön tavoitteena oli laajentaa tutkimusryhmän bakteriofaagikokoelmaa. Työn aikana onnistuttiin eristämään seitsemän uutta faagia, viisi *E. faecalis* kantoja vastaan ja kaksi *E. faecium* kantoja vastaan.

ECDC on ilmaissut huolensa etenkin vankomysiinille resistenttien *E. faecium* kantojen lisääntymisestä, joiden määrä on noussut neljän vuoden aikana 7,8 %. ECDC:n laatiman raportin mukaan monissa muissa antibioottiresistensseissä bakteereissa oli nähtävissä maantieteellistä vaihtelua Euroopan alueiden välillä, mutta *E. faecium* aiheutti tasaaisesti resistenttejä infektoita joka puolella. Raportin mukaan antibioottiresistentit enterokokkibakteerit aiheuttavat suuren haasteen infektion torjumisille, sillä ne leviävät

helposti sairaalaympäristössä ja aiheuttavat infektiota siellä. (European Centre for Disease Prevention and Control 2020) Tämä kertoo siitä, että tutkimus faagihoidosta on tarpeellista ja sen jatkuminen ja kehittyminen on erittäin tärkeä ja ajankohtainen asia. Faagikokoelman laajentaminen on tärkeä osa tutkimusta, jotta yhä useampaa antibioottiresistenttien bakteerien aiheuttamia infektiota voidaan yrittää hoitaa mahdollisuuksien mukaan faagihoidon avulla.

9.3 Kehittämisehdotukset

Faagien fHo-Efa03, fHo-Efm07 ja fHo-Efm08 lysaateista ei saatu eristettyä DNA:ta Phage DNA Isolation -kitillä niin, että DNA konsentraatio olisi ollut tarpeeksi suuri sekvensointia varten. DNA eristystä olisi voitu kokeilla vielä esimerkiksi fenoli-kloroformiuu- ton avulla. Näytteitä myös konsentroidiin DNA pitoisuuden parantamiseksi. Kaikista konsentroiduista näytteistä säilytettiin suodattimen läpi mennyt näyte, jonka olisi voinut titrata auki. Näin olisi voitu testata, onko suodattimen läpi päässyt faagipartikkeleita. Tämä olisi vaikuttanut siihen, että konsentroidun näytteen DNA pitoisuus ei parantunut konsentroidin jälkeen.

E. faecalis kannalle #5864 seoksesta Suomi Pool B ei saatu tuotettua tarpeeksi tehokkaita lysaatteja ja lysaattia olisi voitu pyrkiä tuottamaan vielä eri tavoin. Myös näiden näytteiden kolmansista plakkipuhdistusnäytteistä olisi voitu yrittää aloittaa lysaatin tuotto alusta tai testata, onko faagit säilyneet näytteessä aktiivisina.

Myös isäntäkirjoa olisi voitu kartoittaa laajemmin, sillä faagien julkistamisen perusteena on se, että isäntäkirjoa on testattu mahdollisimman laajasti. Työssä niitä ehdittiin testaamaan kahdeksaa *E. faecalis* ja kymmentä *E. faecium* kantaa vastaan. Myös sekä Beninin- että Suomen näyteseoksista olisi voitu etsiä faageja useampaa kokoelmasta löytyvää *E. faecalis* ja *E. faecium* kantaa vastaan.

9.4 Luotettavuus

Tutkimuksen aikana pyrittiin huomioimaan inhimillisten virheiden mahdollisuus. Työväi- heisiin perehdyttämiseen käytettiin aikaa, jotta työn suorittaminen sujui varmasti ja vir- heiden mahdollisuus voitiin minimoida. Bakteerien ja faagien kanssa työskennellessä oli huomioitava kontaminaation mahdollisuus. Kontaminaatiota pyrittiin välttämään esi- merkiksi käyttämällä filterikärkiä pipetoidessa faagituotteita, autoklavoimalla käytettä- vät liuokset ja elatusaineet sekä bakteerien pipetointiin tarkoitetut pipetin kärjet ja ep-

pendorf putket. Käytössä olevia elatusaineita säilytettiin huoneenlämmössä omalla työpisteellä, jolloin voitiin tarkkailla, ettei siellä kasvanut bakteereita, joka olisi ollut merkki kontaminaatiosta.

Jokaisessa työvaiheessa, josta saatiin tuloksia, oli huomioitava negatiivisen kontrollin merkitys. Negatiivinen kontrolli antoi tuloksia siitä, että kontaminaatiota ei ollut syntynyt myöskään faagilysaattiin. Jokaisessa työvaiheessa noudatettiin tarkasti työohjeita.

Koko tutkimusryhmässä suoritettujen harjoittelujakson ajan työn kulusta pidettiin työpäiväkirjaa. Työpäiväkirjan tarkoituksena on, että tehty työ voidaan toistaa tismalleen samalla tavalla, kuin tekijä on sen alun perin tehnyt. Työpäiväkirjan tärkeys korostui tutkimusryhmässä työskennellessä, sillä on erittäin tärkeää, että työ on toistettavissa. Tällöin tuloksia voidaan pitää luotettavana. Työpäiväkirjaa pitäessä oli tärkeä muistaa merkitä tehdyt asiat selkeästi ja avoimesti.

Opinnäytetyön luotettavuutta edistää myös kestävien ja luotettavien lähteiden käyttö teoriaosuudessa. Tiedonhakuun käytettiin aikaa ja käytettyihin lähdemateriaaleihin perehdyttiin huolella, jotta voitiin arvioida niiden todenmukaisuus ja luotettavuus. Tieteelliset artikkelit valittiin sen perusteella, että ne olivat vertaisarvioituja. Tämä osaltaan vahvistaa myös tulosten luotettavuutta sillä hankittu teoriatieto tukee opinnäytetyössä saatuja tuloksia.

Opinnäytetyöprosessissa sitouduttiin noudattamaan hyvän tieteellisen tutkimuksen käytäntöjä. Tämä lisäsi työn luotettavuutta sekä tulosten uskottavuutta. Koko opinnäytetyöprosessin aikana toimittiin tarkkuutta ja huolellisuutta noudattaen, erityisesti harjoittelujakson aikana tutkimusryhmässä, jolloin työhön tarvittava materiaali kerättiin.

9.5 Eettisyys

Tutkimuseettisyys on laaja käsite, joka sisältää ajatuksia tutkimuksen tekoon liittyvästä vastuullisuudesta, eettisyydestä sekä rehellisyydestä. Sillä tarkoitetaan usein kaikkia eettisiä näkökulmia, jotka liittyvät tieteeseen ja tutkimukseen. (Mustajoki & Kohonen 2021; Tutkimuseettinen Neuvottelukunta 2012.)

Opinnäytetyöprosessissa sitouduttiin noudattamaan hyvän tieteellisen tutkimuksen käytäntöjä. Tämä lisäsi työn luotettavuutta sekä tulosten uskottavuutta. Koko opinnäytetyöprosessin aikana toimittiin tarkkuutta ja huolellisuutta noudattaen, erityisesti harjoittelujakson aikana tutkimusryhmässä, jolloin työhön tarvittava materiaali kerättiin.

Hyvän tieteellisen tutkimuksen lähtökohtia on muiden tutkijoiden työn sekä saavutusten kunnioittaminen ja niiden arvostaminen, sillä opinnäytetyössä hyödyttiin myös heidän työstään. Tämä toteutettiin käyttämällä asianmukaisia viittauksia opinnäytetyöraportissa. Valmis opinnäytetyö raportoitiin asiaankuuluvalla tavalla ja työssä kerrottiin rehellisesti tutkimustuloksista ja niiden arvioinnista. Opinnäytetyötä tehdessä tiedostettiin käytösmallit, jotka luokitellaan vilpiksi eikä syyllistytty plagiointiin tai vääristelty tutkimuksen tuloksia. Prosessin aikana ei syyllistytty epärehelliseen tai epäeettiseen toimintaan ja tiedostettiin käytösmallit, jotka luokitellaan vilpiksi eikä syyllistytty plagiointiin tai vääristelty tutkimuksen tuloksia. Ymmärrettiin millainen käytös voi pahimmillaan johtaa työn mitätöintiin. (Tutkimuseettinen Neuvottelukunta 2012.)

Opinnäytetyöprosessissa noudatettiin Euroopan yleistä tietosuojaa-asetusta (2016/679), jota sovellettiin tutkimuksessa siten, että potilaiden henkilötietoja ei julkaista missään muodossa, vaikka työhön käytettävät bakteerikannat olivat eristetty potilasnäytteistä. Kaikki käytettävät bakteerikannat on koodattu uudelleen ja mahdollisissa julkaisuissa on käytetty vain tutkimusryhmän omaa varastonumeroa. Näin vältyttiin siltä, ettei potilaan tietoja voida löytää tietokannoista alkuperäisen tunnisteen perusteella.

Opinnäytetyön aiheeseen perehdyttiin riittävästi ja työn edellyttämät resurssit punnittiin. Työn tekemiseen ei edellytetty tutkimuslupaa ja opinnäytetyöstä solmittiin sopimus Metropolia Ammattikorkeakoulun sekä tutkimusryhmän välille. Sopimuksessa myös sovittiin opinnäytetyöhön liittyvien aineistojen ja tuloksien käyttöoikeuksista. (Ammattikorkeakoulujen opinnäytetöiden eettiset suositukset 2020.) Myös bioanalyytikon eettiset ohjeet näkyivät opinnäytetyöprosessissa, työn aikana ammattitaitoa ylläpidettiin ja kehitettiin. Oman osaamisen rajat tiedostettiin ja vastuu omasta toiminnasta kannettiin koko prosessin ajan. Muiden ammattiryhmien ja kollegoiden asiantuntemusta kunnioitettiin ja heidän kanssaan toimittiin yhteistyössä. (Bioanalyytikon eettiset ohjeet 2017.)

9.6 Ammatillinen kasvu

Tutkimusryhmässä opinnäytetyön tekeminen tutustutti minut uudelleeniseen työympäristöön sekä menetelmiin. Prosessin alussa kokonaisuuden hallitseminen tuntui haastavalta, mutta opinnäytetyöprojektin edetessä sen hahmottamisesta tuli selkeämpää ja helpompaa.

Luottamus itseen ja omiin kykyihin kasvoi prosessin aikana onnistumisten myötä. Tutkimusryhmässä työskentely vaatii pitkäjänteisyyttä sekä toistoa ja tätä puolta pääsin ehdottomasti kehittämään itsessäni projektin aikana. Välillä kun toivottuja tuloksia ei

saatu, oli pohdittava vaihtoehtoisia toimia ja ratkaisuja. Näissä hetkissä koin, että yhteistyö muiden tutkimusryhmän jäsenten kanssa sekä ohjaajani tuki oli korvaamatonta. Tunsin projektin aikana työskenteleväni osana tutkimusryhmää ja yhteistyö sekä kommunikaatio ryhmän muiden jäsenten kanssa sujui mutkattomasti. Huolellisen suunnitelman tekemisen tärkeys korostui, sillä työ ei aina edennyt ideaaliseen tahtiin ja aikataulu tuntui ajoittain tiiviiltä. Koen, että työn tekemiseen varatut resurssit riittivät melko hyvin projektin aikana.

Työn edetessä ongelmanratkaisukykyäni kehittyi siten, että kohdattuja ongelmia pohditiin aluksi yhdessä, mutta projektin edessä huomasin, että osaan ratkaista joitakin ongelmia itsenäisesti. Itsenäisesti työskentely tuntui luontevalta, kun menetelmät ja työtavat oli käyty perusteellisesti läpi ennen uuden työvaiheen aloittamista. En myöskään arastele kysyä apua ja koen, että tämä kasvattaa luottamusta ohjaajan suunnalta yleisesti laboratoriotyöskentelyssä. Koen, että yksi vahvuuksistani on huolellinen, suunnitelmallinen ja tarkka työskentelytapa ja tämä oli suuri etu projektin aikana. Huomasin, että myös kiireen keskellä rauhallinen työskentely takaa luotettavan lopputuloksen.

Tutkimusryhmässä työskentely on opintojen alusta asti kiinnostanut minua ja opinnäytetyöprosessi antoi minusta realistisen kuvan siitä, mitä työ on ja mitä se vaatii bioanalyytikon roolissa. Pääsin vahvistamaan tärkeitä laboratoriotyöhön liittyviä taitoja, joita ei tavallisessa analyysilaboratoriossa tehdä rutiininomaisesti. Koen kehittäneeni työskentelytaitojani tavalla, josta on hyötyä myös tulevaisuudessa.

Kokonaisuudessa opinnäytetyöprosessin aikana pääsin kehittämään tiedonhakutaitojani ja kehittämään kriittistä ajattelua esimerkiksi siitä, millaiset lähteet ovat luotettavia. Laajensin teoriaosaamista omasta alastani ja koin, että olisin voinut syventyä opinnäytetyön aiheeseen vieläkin laajemmin, mikäli aikataulu olisi antanut periksi.

Lähteet

Adesanya, Oluwafolajimi & Oduseli, Tolulope & Akin-Ajani, Oluwawapelumi & Adewumi, Olubusuyi M & Ademowo, Olusegun G 2020. An exegesis of bacteriophage therapy: An emerging player in the fight against anti-microbial resistance. *AIMS Microbiology* 6 (3). 204-230. Viitattu 27.1.2021.

Ammattikorkeakoulujen opinnäytetöiden eettiset suositukset. Ammattikorkeakoulujen rehtorineuvosto Arene ry. Päivitetty 9.1.2020. <<https://www.arene.fi/julkaisut/raportit/opinnaytetoiden-eettiset-suositukset/>> Viitattu 3.11.2021.

Bioanalyttikon eettiset ohjeet 2017. Suomen bioanalyttikkoliitto ry. <https://www.bioanalyttikkoliitto.fi/@Bin/659271/Eettiset+periaatteet_FI_print_2017.pdf> Viitattu 2.11.2021.

Black, Lindsay W & Thomas, Julie A 2013. Condensed Genome Structure. *Advances in experimental medicine and biology* 726. 469-487. <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/22297527/>> Viitattu 27.1.2021.

Bowler, Philip & Murphy, Christine & Wolcott, Randall 2020. Biofilm exacerbates antibiotic resistance: Is this a current oversight in antimicrobial stewardship? *Antimicrobial Resistance & Infection Control* 9. 1-5. <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/33081846/>> Viitattu 2.11.2021.

Ceci, Mónica & Delpech, Gastó & Sparo, Mónica & Mezzina, Vito & Sánched Bruni, Sergio & Baldaccini, Beatriz 2015. Clinical and microbiological features of bacteremia caused by *Enterococcus faecalis*. *The Journal of Infection in Developing Countries* 9 (11). 1195-1203. <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/26623628/>> Viitattu 26.1.2021.

Cisek, Agata Anna & Dabrowska, Iwona & Gregorczyk, Karolina Paulina & Wyzewski, Zbigniew 2017. Phage Therapy in Bacterial Infections Treatment: One Hundred Years After the Discovery of Bacteriophages. *Current microbiology* 74 (2). 277-283. <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/27896482/>> Viitattu 28.1.2021.

De Oliveira, David M & Forde, Brian M & Kidd, Timothy J & Harris, Patrick N A & Schembri, Mark A & Beatson, Scott A & Paterson, David L & Walker, Mark J 2020. Antimicrobial Resistance in ESKAPE Pathogens. *Clinical Microbiology Reviews* 33 (3). 1-49. <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/32404435/>> Viitattu 2.11.2021.

Euroopan yleinen tietosuoja-asetus 2016/679. Annettu 27.4.2016. <<https://eur-lex.europa.eu/legal-content/FI/TXT/HTML/?uri=CELEX:32016R0679&from=FI>> Viitattu 1.2.2021.

European Centre for Disease Prevention and Control 2020. Antimicrobial resistance in the EU/EEA (EARS-Net) - Annual Epidemiological Report for 2019. Julkaistu 18.11.2020. <<https://www.ecdc.europa.eu/en/publications-data/surveillance-antimicrobial-resistance-europe-2019>> Viitattu 2.11.2021.

Garcia-Solache, Monica & Rice, Louis B 2019. The Enterococcus: a Model of Adaptability to Its Environment. *Clinical microbiology reviews* 32 (2). <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/30700430/>> Viitattu 27.1.2021.

Gordillo Altamirano, Fernando L & Barr, Jeremy J 2019. Phage Therapy in the Post-anti-biotic Era. *Clinical microbiology reviews* 32 (2). 1-15. <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/30651225/>> Viitattu 28.1.2021.

Kiljunen, Saija & Skurnik, Mikael 2018. Faagiterapian nykytilanne. *Suomen sairaalahygienialehti* 36. 60-63.

Kortright, Kaitlyn E & Chan, Benhamin K & Koff, Jonathan L & Turner, Paul E 2019. Phage Therapy: A Renewed Approach to Combat Antibiotic-Resistant Bacteria. *Cell host & Microbe* 25 (2). 219-232. <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/30763536/>> Viitattu 28.1.2021.

Leonard, Jayne 2017. Whats to know about Enterococcus faecalis. *Medical News Today*. <<https://www.medicalnewstoday.com/articles/318337>> Viitattu 26.1.2021.

Lerminiaux, Nicole A & Cameron, Andrew, D S 2019. Horizontal transfer of antibiotic resistance genes in clinical environments. *Canadian journal of microbiology* 65 (1). 34-33. <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/30248271/>> Viitattu 16.10.2021.

Lin, Derek M & Koskella, Britt & Lin, Henry C 2017. Phage therapy: An alternative to antibiotics in the age of multi-drug resistance. *World journal of gastrointestinal pharmacology and therapeutics* 8 (3). 162-173. <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5547374/>> Viitattu 27.1.2021.

Malik, Danis J & Sokoloy, Ilya J & Vinner, Furinder K & Mancuso, Francesco & Cinquer-rui, Salvatore & Vladisavljevic, Goran T & Clokie, Martha R.J & Garton, Natalie J & Sta-pley, Andrew G.F & Kirpichnikova, Anna 2017. Formulation, stabilisation and encapsulation of bacteriophage for phage therapy. *Advances in Colloid and Interface Science* 249. 100-113. <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/28688779/>> Viitattu 26.1.2021.

Mattila, Sari & Ruotsalainen, Pilvi & Jalasvuori, Matti 2015. On-Demand Isolation of Bacteriophages Against Drug-Resistant Bacteria for Personalized Phage Therapy. *Frontiers in microbiology* 6. 1-7. <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/26617601/>> Viitattu 6.11.2021.

Mellor, Glen E & Besser, Thomas E & Davis, Margaret A & Beavis, Brittany & Jung, Wookyoung & Smith, Helen V & Jennison, Amy V & Doyle, Christine J & Chandry, P Scott & Gobius, Kari S & Fegan, Narelle 2013. Multilocus genotype analysis of Escherichia coli O157 isolates from Australia and the United States provides evidence of geographic divergence. *Applied and environmental microbiology* 79 (16). 5050-5058. <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/23770913/>> Viitattu 6.11.2021.

Miller, William R & Murray, Barbara E & Rice, Louis B & Arias, Cesar A 2020. Resistance in Vancomycin-Resistant Enterococci. *Infectious disease clinics of North*

America 34 (4). 751-771. <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/33131572/>> Viitattu 5.8.2021.

Munita, Jose M & Arias, Cesar A 2016. Mechanisms of Antibiotic Resistance. *Microbiology Spectrum* 4 (2). 1-36. < > Viitattu 29.11.2021.

Mustajoki, Henriikka & Kohonen, Iina 2021. Mikä ihmeen tutkimusetiikka? *Vastuullinen tiede*. <<https://vastuullinentiede.fi/fi/tutkimuksen-suunnittelu/mika-ihmeen-tutkimus-etikka>> Viitattu 2.11.2021.

Nikolich, Mikeljon P & Filippov, Anrey A 2020. Bacteriophage Therapy: Developments and Directions. *Antibiotics* 9 (3). 135. <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/32213955/>> Viitattu 27.1.2021.

Nilsson, Anders S 2014. Phage therapy--constraints and possibilities. *Upsala journal of medical sciences*. 119 (2). 192-198. <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/24678769/>> Viitattu 28.1.2021.

Paul, Kevin & Merabishvili, Maya & Hazan, Ronen & Christner, Martin & Herden, Uta & Gelman, Daniel & Khalifa, Leron & Yerushalmy, Ortal & Coppenhagen-Glazer, Shunit & Harbauer, Theresa & Schulz-Jürgensen, Sebastian & Rohde, Holger & Fischer, Lutz & Aslam, Saima & Rohde, Christina & Nir-Paz, Ran & Pirnay, Jean-Paul & Singer, Dominique & Muntau, Ania Carolina 2021. Bacteriophage Rescue Therapy of a Vancomycin-Resistant *Enterococcus faecium* Infection in a One-Year-Old Child following a Third Liver Transplantation. *Viruses* 13. 1-10. <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/34578366/>> Viitattu 1.11.2021.

Raza, Taskeen & Ullah, Sidra Rahmat & Mehmood, Khalid & Andleeb, Saadia 2018. Vancomycin resistant Enterococci: A brief review. *The Journal of the Pakistan Medical Association* 68 (5). 768-772. <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/29885179/>> Viitattu 7.10.2021.

Rohde, Christine & Wittmann, Johannes & Kutter, Elizabeth 2018. Bacteriophages: A Therapy Concept against Multi-Drug-Resistant Bacteria. *Surgical infections* 19 (8). 737-733. <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/30256176/>> Viitattu 28.1.2021.

Schooley, Robert T & Biswas, Biswajit & Gill, Jason J & Morales-Hernandez, Adriana & Lancaster, Jacob & Lessor, Lauren & Barr, Jeremy J & Reed, Sharon L & Rohwer, Forest & Benler, Sean & Segall, Anca M & Taplitz, Randy & Smith, Davey M & Kerr, Kim & Kumaraswamy, Monika & Nizet, Victor & Lin, Leo & McCauley, Melanie D & Strathdee, Steffanie A & Benson, Constance A & Pope, Robert K & Leroux, Brian M & Picel, Andrew C & Mateczun, Alfred J & Cilwa, Katherine E & Regeimbal, James M & Estrella, Luis A & Wolfe, David M & Henry, Matthew S & Quinones, Javier & Salka, Scott & Bishop-Lilly & Kimberly A & Young, Ry & Hamilton, Theron 2017. Development and Use of Personalized Bacteriophage-Base Therapy Cocktails To Treat a Patient with a Disseminated Resistant *Acinetobacter baumannii* Infection. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 61 (10). 1-14. <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/28807909/>> Viitattu 16.11.2021.

Selleck, Elizabeth M & Van Tyne Daria & Gilmore, Michael S 2019. Pathogenicity of Enterococci. *Microbiology Spectrum* 7 (4). 1-38. <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC6629438/>> Viitattu 6.11.2021.

Stone, Edel & Campbell, Katrina & Grant, Irene & McAuliffe, Olivia 2019. Understanding and Exploiting Phage-Host Interactions. *Viruses* 11 (6). 1-26. <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/31216787/>> Viitattu 15.6.2021.

Tadesse, Birkneh Tilahun & Ashley, Elizabeth A & Ongarello, Stefano & Havumaki, Joshua & Wijegoonewardena, Miranga & González, Iveth J & Dittrich, Sabine 2017. Antimicrobial resistance in Africa: a systematic review. *BMC infectious diseases*. 1-17. <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/28893183/>> Viitattu 5.11.2021.

Tutkimuseettinen neuvottelukunta 2012. Hyvä tieteellinen käytäntö ja sen loukkaus-epäilyjen käsitteleminen Suomessa. <<https://vastuullinentiede.fi/fi/ajankohtaista/hyva-tieteellinen-kaytanta>> Viitattu 28.1.2021.

Uda, Atsushi & Shigemura, Katsumi & Kitagawa, Koichi & Osawa, Kayo & Onuma, Kenichiro & Yan, Yonmin & Nishioki, Tatsuya & Fujisawa, Masato & Yano, Ikuko & Miyara, Takayuki 2021. Risk Factors for the Acquisition of Enterococcus faecium Infection and Mortality in Patients with Enterococcal Bacteria: A 5-year Retrospective Analysis in a Tertiary Care University Hospital. *Antibiotics* 10 (1). 1-11. <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/33440660/>> Viitattu 9.9.2021.

Van Tyne, Daria & Martin, Melissa J & Gilmore, Michael S 2013. Structure, Function, and Biology of the Enterococcus faecalis Cytolysin. *Toxins* 5 (5). 895-911. <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/23628786/>> Viitattu 26.1.2021.

Wikimedia Commons 2008. Phage. Päivitetty 15.7.2009. <<https://commons.wikimedia.org/wiki/File:Phage.png>> Viitattu 13.11.2021.

World Health Organization 2020. Antimicrobial resistance. Julkaistu 13.10.2020. <<https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/antimicrobial-resistance>> Viitattu 28.1.2021.

Yuen, Grace J & Ausubel, Frederick M 2014. Enterococcus Infection Biology: Lessons from Invertebrate Host Models. *Journal of Microbiology* 52 (3). 200-210. <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4556283/>> Viitattu 5.9.2021.

Zhou, Xuewei & Willems, Rob J L & Friedrich, Alexander W & Rossen, John W A & Bathoorn, Erik 2020. Enterococcus faecium: from microbiological insights to practical recommendations for infection control and diagnosis. *Antimicrobial resistance and infection control* 9 (1). 1-13. <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/32778149/>> Viitattu 13.9.2021.

Jätevesinäytteistä koostetut näyteseokset

	Näytteenottoaika	Kerätty
Suomi Pool A	Syöpätautien klinikka Peijaksen sairaala Porvoon sairaala Lohjan sairaala	15.6.2016 14.4.2016 13.4.2016 13.4.2016
Suomi Pool B	Peijaksen sairaala Meilahden sairaala Jorvin sairaala	11.6.2019 1.7.2019 7.6.2019
Suomi Pool C	HUS Meilahti: Kolmiosairaan pääviemäri Meilahden sairaalan pääviemäri Uusi lastensairaala pääviemäri Keski-Suomen keskussairaala: pääviemäri Syöpätaudit/hematologia/leukakirurgian poliklinikka Päivystys/päiväsairaala Turun yliopistollinen keskussairaala: Pääviemäri 1 Pääviemäri 2 Lapin keskussairaala: H-osa viemäriä* G-osa viemäriä* *tarkempaa tietoa sijainnista ei ole	20.1.2020 20.1.2020 20.1.2020 20.1.2020 20.1.2020 20.1.2020 23.1.2020 23.1.2020 28.1.2020 28.1.2020
Suomi Pool D	Helsingin kaupungin jätevesi Helsingin kaupungin jätevesi 2 Oulun kaupungin jätevesi Turun kaupungin jätevesi	7.7.2017 17.8.2017 6/2017 6/2017
Suomi Pool E	luonnonvesinäyte 1 luonnonvesinäyte 2 luonnonvesinäyte 3	24.8.2015 24.8.2015 24.8.2015
Benin Pool A	Hopital de Zone de Calavi alueelta kerätyt jätevesinäytteet	
Benin Pool B	Menontin Hospital alueelta kerätyt jätevesinäytteet	
Benin Pool C	Hopital Saint Jean alueelta kerätyt näytteet	
Benin Pool D	Ympäristövesinäytteet	
Benin Pool E	Ympäristövesinäytteet	

Isäntäkirjon kartoituksen tulokset

	fHo- Efa01	fHo- Efa02	fHo- Efa03	fHo- Efa04	fHo- Efa05	fHo- Efm07	fHo- Efm08
#6933	-	-	-	+	+	-	-
#6467	+	+	+	-	-	-	-
#5864	-	-	-	-	-	+	+
#5896*	-	-	-	-	-	-	-
#5897*	-	-	-	-	-	-	-
#5898*	-	-	-	-	-	-	-
#5899*	-	-	-	-	-	-	-
#5900*	-	-	-	-	-	+	+
#6571*	+	+	-	-	-	-	-
#6552	-	-	-	-	-	-	-
#6934	-	-	-	+	+	-	-
#6571	-	-	-	-	-	-	-
#6908	-	-	-	-	-	-	-
#5792	-	-	-	-	-	-	-
#5552	-	-	-	-	-	-	-
#7007	-	-	-	-	-	-	-
#5885	-	-	-	-	-	-	-
#5878	-	-	-	-	-	-	-
#5866	-	-	-	-	-	-	-
#6259	-	-	-	-	-	-	-
#6568	-	-	-	-	-	-	-