

Henni Tuomala

Bakteriofagien eristys ja isäntäspesifisyyden määrittäminen faagiterapiaa varten

Esimerkkinä *Staphylococcus aureus*- ja *Acinetobacter baumannii* -faagit

Metropolia Ammattikorkeakoulu

Laboratorioanalyttikko (AMK)

Laboratorioala

Opinnäytetyö

31.10.2016

Tekijä(t) Otsikko Sivumäärä Aika	Henni Tuomala Bakteriofagien eristys ja isäntäspesifisyyden määrittäminen faagiterapiaa varten 40 sivua + 2 liitettä 31.10.2016
Tutkinto	Laboratorioanalyttikko (AMK)
Koulutusohjelma	Laboratorioalan koulutusohjelma
Ohjaaja(t)	Tutkija FT Saija Kiljunen Professori Mikael Skurnik Lehtori Jarmo Palm
<p>Opinnäytetyössä tutkittiin bakteriofagien mahdollista käyttöä faagiterapiatarkoitukseen. Faagiterapia on mikrobilääkkeiden rinnalle kehitteillä oleva hoitomuoto, joka perustuu bakteereita infektioivien virusten kykyyn tappaa isäntäbakteeria. Bakteriofagien avulla voidaan eliminoida bakteeri sitä kantavan eliön elimistöstä ja täten parantaa infektiota. Tutkimus on ajankohtainen, sillä mikrobilääkkeiden teho hiipuu bakteerien kehittäessä resistenssimekanismeja, joilla ne voivat puolustautua näiden lääkkeiden tappavaa vaikutusta vastaan. Antibioottiresistentit ja ihmisille patogeeniset bakteerit lisäävät bakteeri-infektioiden vaarallisuutta. Tämän vuoksi antibioottiresistentit bakteerit ovat yksi ihmiskunnan terveyttä eniten uhkaava tekijä.</p> <p>Opinnäytetyön tarkoituksena oli etsiä neljästä sairaalasta kerätystä viemäriveresinäytteestä uusia bakteriofageja, jotka infektioivat <i>Acinetobacter baumannii</i> -kantoja. Toinen osa opinnäytetyötä oli tehdä sioista eristetyille MRSA-kannoille herkkyysmääritykset fRu-Sau02-faagilla. Työssä tutkittiin myös infektoiko kyseinen faagi sioista eristettyjä MRSA-kantoja (MRSA=metisilliini-resistentti <i>Staphylococcus aureus</i>) samalla tapaa kuin se infektioi ihmisistä eristettyjä MRSA-kantoja. Tarkoituksena oli myös seuloa fRu-Sau02-faaginäytteen joukosta laajemman isäntäkirjon omaavia bakteriofageja. Projekti tehtiin Helsingin yliopiston Tutkimusohjelmajaksikon, Immunobiologian tutkimusohjelmassa, ryhmässä joka tutkii faagiterapiaa. Tavoitteena oli selvittää voidaanko fRu-Sau02-faagia hyödyntää hoidettaessa sioista ihmisiin tarttuneita ja infektiota aiheuttaneita MRSA-kantoja. Työssä yritettiin myös löytää lisää faageja, joilla voidaan hoitaa <i>A. baumannii</i> -bakteerin aiheuttamia infektiota.</p> <p>Lopputuloksena voidaan todeta, että uusia <i>A. baumannii</i> -kantoja infektioivia bakteriofageja ei löytynyt sairaaloista kerätystä viemäriveresinäytteistä. fRu-Sau02-faagi puolestaan infektioi sioilta eristetyistä MRSA-kannoista 30 %, mikä on suhteellisen hyvä infektioprosentti, mutta rajoittaa sen käyttöä faagiterapiatarkoituksessa. Seulonnan tuloksena voitiin havaita näytteessä olevan virusta, joka infektioi yhtä sioilta eristettyä MRSA-kantaa, joka alkuperäisellä fRu-Sau02-näytteellä ei infektoitunut. Saadun viruksen heikon elinkyvyn vuoksi ei voitu määrittää oliko kyseessä mutaatio alkuperäisestä faagista vai jokin muu virus, joka on lähtenyt kasvamaan seulonnan seurauksena. Täten se ei ole kiinnostava faagiterapian kannalta.</p>	
Avainsanat	Faagiterapia, antibioottiresistenssi, MRSA, <i>A. baumannii</i> , bakteriofagit, <i>S. aureus</i>

Author(s) Title	Henni Tuomala Isolation and Host Specificity Determination of Bacteriophages for Phage Therapy
Number of Pages Date	40 pages + 2 appendices 31 October 2016
Degree	Bachelor of Laboratory Services
Degree Programme	Laboratory Sciences
Instructors	Saija Kiljunen, Researcher PhD Mikael Skurnik, Professor Jarmo Palm, Senior Lecturer
<p>The possibility for the use of phages in phage therapy was investigated throughout this project. Phage therapy is a potential form of treatment to be practiced alongside antibiotics. It is based on the ability of bacteriophages to infect their host bacteria, and thereby eliminate bacteria from the infected host's system and cure the infection. Antibiotic resistance - the ability of bacteria to resist the antimicrobial effect - as well as pathogenicity, increase the severity of bacterial infections that is one of the main health hazards towards humankind.</p> <p>The aim of the study was to find new bacteriophages that infect <i>Acinetobacter baumannii</i>-strains. Bacteriophages were searched from sewage water samples collected from four different hospitals. The second part of the study involved testing how many MRSA-strains—collected from pig samples—would ultimately be infected by the bacteriophage fRu-Sau02. In addition, the aim of this experiment was to find out whether or not the phage will infect MRSA-strains collected from pigs, similarly to the way it infects human-MRSA-strains. The results gained from this experiment led to the isolation of mutant among the original fRu-Sau02 phage population, in order to find a phage with wider range of host strains. The project was carried out at the University of Helsinki the Research Programs Unit (RPU) in a group researching phage therapy, in the research program of immunobiology. The aim behind the study as a whole, was to find out if the fRu-sau02-phage may be used in the treatment of infection caused by MRSA bacteria spread from pigs to humans, as well as to identify more phages that can be used as a treatment for infections caused by <i>A. baumannii</i>.</p> <p>New bacteriophages that infect <i>A. baumannii</i>-strains were not identified from hospital sewage waters in this study. Furthermore, phage fRu-Sau02 was found to infect 30 % of pig-MRSA-strains. Even though the coverage is quite good it's not wide enough for phage therapy. Therefore, its use for therapeutical purposes on pigs would be limited. During the screening of mutant fRu-Sau02 phages, a candidate infecting one pig-MRSA-strain was identified, however, the growth of the virus was too weak for further analyzes. Due to the weak growth of this virus it was not possible to determine whether it was a mutant of the original phage. However, due to its weak growth this virus was not of interest for phage therapy purpose.</p>	
Keywords	Phage therapy, antibiotic resistance, MRSA, <i>A. baumannii</i> , bacteriophages

Sisällys

1	Johdanto	2
2	Antibioottiresistenttiys bakteereilla	2
3	<i>Staphylococcus aureus</i>	6
4	<i>Acinetobacter baumannii</i>	7
5	Bakteriofagit	8
5.1	Bakteriofagi fRu-Sau02	10
6	Faagiterapia	10
7	Työn tavoitteet	13
8	Materiaalit ja menetelmät	14
8.1	Materiaalit	14
8.1.1	Bakteerikannat ja bakteriofagit	14
8.1.2	Faagieristysnäytteet	15
8.1.3	Kasvatusolosuhteet	15
8.2	Menetelmät	16
8.2.1	Faagititraus	16
8.2.2	Mutatoituneiden bakteriofagien seulonta	18
8.2.3	Virusten eristys	19
8.2.4	Faagien tuotto	20
9	Tulokset	22
9.1	MRSA-kantojen faagiherkkyys	22
9.2	Mutatoituneiden faagien seulonta fRu-Sau02-faagilysaatista	29
9.3	Viruseristysten tulokset	30
10	Yhteenveto	32
	Lähteet	35
	Liitteet	
	Liite 1. fRu-Sau02-faagin isäntäherkkyysmääritysten tulokset	
	Liite 2. fRu-Sau02-faagin onnistuneisiin isäntäherkkyysmäärittämiin käytetyt menetelmät	

1 Johdanto

Bakteerien mikrobilääkeresistenttien kasvun myötä on tärkeää kehittää uusia hoitomenetelmiä bakteerien aiheuttamien infektioiden hoitoon (Rios ym. 2006). Mikrobilääkkeille resistentit bakteerit ovat yksi suurimmista terveysuhista, joita ihmiskunta kohtaa nykypäivänä. Uusia antibiootteja on yritetty löytää, mutta bakteerien lisääntyvä moniresistenttisyys useita eri antibioottityyppejä kohtaan tekee työstä haastavaa (Alanis 2015). Tämän vuoksi myös vaihtoehtoisia hoitomuotoja tutkitaan. Bakteriofagien, bakteereita infektioivien virusten, käyttö sellaisten infektioiden hoidossa, joihin antibiootit eivät auta, on yksi potentiaalinen vaihtoehto. Hoitomuotoa kutsutaan faagiterapiaksi.

Opinnäytetyö tehtiin Helsingin yliopiston tutkimusohjelmayksikön (TOY) immunobiologian tutkimusohjelmassa. Tutkimusryhmä, jossa tämä opinnäytetyö tehtiin, tutkii faagiterapiaa hoitomuotona. Tämän opinnäytetyön tarkoitus oli etsiä *Acinetobacter baumannii*-kantoja infektioivia bakteriofageja sairaalajätevesistä ja testata ihmisistä eristettyjä MRSA-kantoja infektioivan *Staphylococcus aureukselle* spesifisen fRu-Sau02-bakteriofagin isäntäherkkyttä sioista eristettyjä MRSA-kantoja vastaan. Tavoitteina oli löytää uusia *A. baumannii*-kannoille spesifisiä viruksia, sillä näitä tunnetaan vasta hyvin vähän. *A. baumannii* on yksi lähinnä sairaalainfektioita aiheuttava multiresistentti bakteeri. Sioilta eristettyjen MRSA-kantojen (MRSA=Metisilliini-resistentti *S. aureus*) herkkyys fRu-Sau02-faagille tutkittiin, jotta saataisiin selville infektoiko kyseinen virus samalla tapaa sika-kantoja, kuin ihmiskantojakin ja voidaanko niitä käyttää sioista eristettyjen MRSA-kantojen aiheuttamia infektoita vastaan.

2 Antibioottiresistenttiys bakteereilla

Vuonna 1928 löydetty penisilliini mullisti maailmaa. Se oli ensimmäinen löydetty antibiootti ja sitä seurannut muiden mikrobilääkkeiden, kuten sulfonamidien kehittäminen ja markkinoille tuonti 1930-luvun loppupuolella mahdollisti infektiosairauksien tehokkaan hoidon. (Davies & Davies 2010: 417–419.) Tuolloin ajateltiin, että infektiosairauksista oli vihdoinkin päästy eroon (Spellberg ym. 2008: 156). Tämä oli helpotus, sillä bakteerit olivat

yksi yleisimpiä syitä sairastumisiin (Dzidic ym. 2008: 11). Samaan aikaan, hyvin varhaisessa vaiheessa antibioottien historiaa, ruvettiin havaitsemaan bakteereilla resistenssimekanismeja mikrobilääkkeitä vastaan. Esimerkiksi jo ennen penisilliinin käyttöönottoa tutkijat löysivät bakteerikantoja, jotka tuottavat penisilliinin vaikutusta inhiboivaa penisillinaasia (β -laktamaasia). (Davies & Davies 2010: 419.) Toisaalta fylogeneettisten tutkimusten perusteella bakteereilla on ollut antibioottiresistenssimekanismeja jo ennen antibioottien keksimistä ja käyttöönottoa. Antibioottien laajemman käyttöönoton myötä resistentit kannat ovat yleistyneet. (Dzidic ym. 2008: 11–15.) Mikrobilääkkeiden historian alkuaikoina ne olivat tehokkaita lääkkeitä, sillä bakteerit olivat altistuneet näille vain vähän. Pitkäaikaisen altistumisen seurauksena bakteerit omaksuivat kuitenkin laajemmassa mittakaavassa keinoja, joilla ne puolustautuvat mikrobilääkkeiden vaikutusta vastaan. (Tortora ym. 2012: 579–582.) Nykypäivänä olemme palaamassa aikaan ennen antibiootteja (Sulakvelidze ym. 2001: 649). Resistenssimekanismeja esiintyy bakteereilla kaikkia tunnettuja mikrobilääketyyppejä vastaan, mikä voidaan luokitella yhdeksi vakavimmista terveysuhista, joita kohtaamme nykyaikana (Alanis 2015). Uhka on maailmanlaajuinen ja koskee koko ihmiskuntaa (Bush ym. 2011: 3). Erityisesti ihmisille mahdollisesti tauteja aiheuttavat bakteerit ovat huolen aiheena. Näitä patogeenisiä bakteereita kutsutaan yhteistermillä ESKAPE ja termi viittaa bakteerilajeihin *Enterococcus faecium*, *S. aureus*, *Klebsiella pneumoniae*, *A. baumannii*, *Pseudomonas aeruginosa* ja *Enterobacter* spp. (Wittebole ym. 2014: 228–229.) Huomiota herättäväksi riskiksi mikrobilääkeresistenssin tekee infektioiden vaarallisuuden lisääntyminen, kun hoitokeinoja on käytössä entistä vähemmän. Tämän lisäksi haasteita tuottavat potilaiden hoidon ja diagnoosinnin pidentyminen, kallistuminen ja monimutkaistuminen. (Alanis 2015; Lin ym. 2015.) Mikrobilääkeresistenssin aiheuttamaa uhkaa voidaan pienentää kehittämällä uusia hoitomuotoja, mutta myös tehostamalla nykyisten käytössä olevien antibioottien toimivuutta ehkäisemällä mikrobilääkeresistenssien yleistymistä (Lin ym. 2015). Käytännössä tämä tapahtuu esimerkiksi välttämällä ylenmääräistä ja tarpeetonta mikrobilääkkeiden käyttöä (Bush ym. 2011: 5).

Suuren uhan mikrobilääkeresistentit bakteerit ovat aiheuttaneet etenkin sairaaloissa, joissa on paljon potilaita, joiden immuunipuolustus on heikentynyt sairastumisen johdosta. Tällaisissa olosuhteissa bakteereilla on hyvät mahdollisuudet levitä ympäristössä sekä ihmiseltä toiselle. Nykyään sairaalat eivät kuitenkaan ole ainoita paikkoja, joissa moniresistenttejä bakteerikantoja esiintyy. Ne ovat levinneet sairaalaympäristöstä yhteisöihin asti. (Alanis 2015.) Hallitsematon mikrobilääkkeiden käyttö on suurin syy resis-

tenttien kantojen yleistymiseen, sillä mikrobilääkkeet luovat kovat valintapaineet bakteereille (Davies & Davies 2010: 418). Mikrobilääkkeille resistenttien kantojen yleistymistä edistäviä tekijöitä ovat esimerkiksi kliininen antibioottien käyttö ja maatalous (Spellberg ym. 2008: 156; Dzidic ym. 2008: 11). Resistenssimekanismien monimutkaisuus ja puuttuvan tiedon määrä tekee mikrobilääkeresistenttien bakteerien aiheuttaman ongelman ratkaisemisesta haastavaa (Davies & Davies 2010: 417). Uusien antibioottien kehittäminen on hidastunut paljon, mikä lisää antibioottiresistenttien mikrobikantojen aiheuttamaa riskiä (Spellberg 2008: 156). Antibioottiresistenssi-ominaisuuksien säilyminen osana bakteerigenomia, tekee ongelmasta pitkäkestoisen. Bakteerille tuottamansa hyödyn vuoksi ne jäävät pysyviksi osiksi sen genomia ja siten myös osaksi ekosysteemeitä. (Dzidic ym. 2008:12.) Myös lisääntynyt globalisaatio ja tavaroiden, sekä ihmisten kulkeminen maasta toiseen tuovat lisähaasteita ongelman torjumiseksi. Nämä tekijät mahdollistavat mikrobilääkeresistenttien kantojen leviämisen paikallisesta ympäristöstä maailmanlaajuisesti ongelmaksi (Bush ym 2011: 3).

Bakteereilla voi olla useita erilaisia toimintamalleja, jotka estävät antibioottien toiminnan (Blair ym. 2014) ja yksi bakteerilaji voi ilmentää useita eri resistenssigeenejä (Lin ym. 2015). Samaan aikaan kun bakteerit ilmentävät antibioottiresistenssigeenejä, niillä on myös säätelytapoja kontrolloida resistenssigeenien ilmentymistä. Näitä kutsutaan transkriptiosäätelijöiksi ja ne vaikuttavat niin geenin hiljentämiseen kuin myös tuottamiseen. (Lin ym. 2015.) Antibioottiresistenssi syntyy, kun bakteeri ilmentää geenejä, joista tuotetaan tekijöitä joiden avulla antibioottien vaikutus inhiboidaan (Dzidic ym. 2008: 12–13). Näistä tekijöistä puhutaan myös nimellä r-tekijä (Drulis-Kawa ym. 2012: 700). Bakteerilajit voivat tuottaa niitä luonnostaan tai omaksua mutaatioiden tai muilta bakteerisoluilta saadun geneettisen materiaalin avulla. Resistenssigeenien omaksuminen muilta lähisukua olevilta lajeilta tai saman lajin eri kannoilta, tapahtuu prosessin myötä, jota kutsutaan geenin horisontaaliseksi siirtymiseksi. Geenin horisontaaliseen siirtymiseen on kolme vaihtoehtoa, jotka riippuvat bakteerien ominaisuuksista ja ympäröivistä olosuhteista. Resistenssigeeni voi siirtyä, kun vastaanottaja- ja luovuttajasoluilla on fyysinen kontakti toisiinsa ja r-tekijä sijaitsee plasmidissa. Tällöin plasmidista jää kopio sekä vastaanottaja- että luovuttajasolulle. Plasmidin siirtymisen jälkeen vastaanottajasolu kykenee tuottamaan plasmidissa olevia geenejä. Tällaisessa tapauksessa kyse on konjugatiosta ja se on esimerkki siitä, kuinka suurin osa tetrasykliini-resistenssigeenin omaavista bakteerikannoista on kyseisen geenin saanut. (Dzidic ym. 2008: 12–17.) Antibioottiresistenssi-geeni vois siirtyä myös transposonina, DNA juosteessa paikasta toiseen liikkuvana DNA-pätkänä. Vaihtoehtoisesti resistenssigeenit voivat siirtyä virusten välittämänä.

Tällaisessa tapauksessa lysogeenisen viruksen genomiin on jäänyt DNA-juostetta isäntäsolulta. Lysogeenisen viruksen vaihtaessaan elinkiertoonsa lyyttiseen kiertoon vapautuu uusi sukupolvi bakteriofageja, joilla on isäntäsolun DNA:ta liittyneenä viruksen kromosomiin. Nämä virukset voivat puolestaan infektoida uusia isäntäbakteereita, jolloin ensimmäisen isäntäsolun antibioottiresistenssigeeni siirtyy virusten mukana uusille bakteereille. Geenien siirtymistä virusten mukana kutsutaan transduktioksi. Transformaatio on kolmas menetelmä jolla bakteerit voivat omaksua antibioottiresistenssigeenejä. Geenin siirtäminen tässä tapahtuu siten, että geenin luovuttajasolu vapauttaa DNA:taan ympäristöön. Ympäristöstä vastaanottaja solu, eli kompetentti solu, omaksuu sen osaksi omaa genomiaan. (Tortora ym. 2012: 232–237.)

Resistenssigeenejä voi muodostua myös mutaatioiden avulla. Tällöin mutaatio bakteerin DNA-juosteessa saa aikaan resistenssigeeniä kopioivan sekvenssipätkän. Mutaation tuottaman edun vuoksi bakteeri ei kuole mutaatioon vaan saa paremmat selviytymisominaisuudet verrattuna bakteerisoluuun, jolla tätä mutaatiota ei ole. Mutaatio voi olla sattumanvarainen mutaatio, joka tapahtuu DNA-juosteen transkriptio-vaiheessa tai vahingoituneen DNA-juosteen korjauksessa. Pistemutaatio on yksi esimerkki sattumanvaraisesta mutaatiosta ja tavasta, jolla *E. coli*-bakteeri on omaksunut kinoloni-resistenssimekanismi. Sattumanvaraisia mutaatioita tapahtuu harvakseltaan. Poikkeuksena tälle on hypermutatoituvat kannat, joilla on luonnossa etua herkästä mutatoitumisesta. Mutaatio voi myös tapahtua elinympäristön aiheuttaman paineen vaikutuksesta. Mutaatio ei tapahtuisi ilman valintapainetta ja syntynyt mutaatio antaa edun bakteerille, jolloin se selviää ympäristössä paremmin kuin bakteerisolua joka ei ole mutatoitunut. Tällaisia mutaatioita esiintyy erityisesti hitaasti jakaantuvilla bakteereilla. (Dzidic ym. 2008: 15–17.)

Bakteerien muodostamat biofilmit ja kollektiivinen antibioottiresistenssi ovat bakteeripopulaatioiden keinoja selvitä ympäristössä antibioottien läsnäolosta huolimatta. Kollektiivisessa antibioottiresistenssissä bakteerit pystyvät yhteisönsä turvin selviämään olosuhteista, joissa yksittäinen bakteerisolua tai pieni bakteeripopulaatio ei selviäisi. Tässä esimerkiksi antibioottien entsyymattinen inhiboiminen pienentää antibiootikonsentraatiota, jolloin antibioottien vaikutus ei ole enää tappava. Mitä suurempi määrä bakteereita tuottaa näitä entsyymejä, sitä tehokkaampi resistenssi on antibiootteja vastaan. Bakteerien tiheys, jopa ilman antibiootteja inhiboivia entsyymeitä, vaikuttaa antibioottien tehokkuuteen. Tällöin olennainen tekijä on kuinka paljon antibioottia on bakteerisolua kohden. Myös bakteeripopulaation yksilöiden välisten fenotyyppien vaihtelu tuo bakteereille kyvyn vastustaa antibioottien vaikutusta. Tällöin antibioottien läsnäolosta huolimatta osa

bakteerisoluista saattaa selviytyä antibioottien vaikutuksesta huolimatta ja populaatio kykenee jatkamaan kasvua antibioottien lisäyksenkin jälkeen. (Vega & Gore 2014: 2.) Biofilmejä muodostavat bakteerit aiheuttavat pitkittyneitä infektioita ja ovat täten haitallisia terveydelle (Stewart 2002). Biofilmien tuottama resistenssimekanismi toimii hyvin pitkälle kuten kollektiivinen resistenssi (Vega & Gore 2014: 2-3).

3 *Staphylococcus aureus*

S. aureus on *Staphylococcus*-sukuun kuuluva bakteerilaji (Kazmierczak ym. 2014: 2552). Se luokitellaan soluseinärakenteensa perusteella gram-positiivisiin bakteereihin. *S. aureus* on kokkibakteeri ja nämä bakteerisolut kasvavat kahden tai useamman bakteerisolun muodostamissa ryhmissä. (Todar 2008-12: 1.) *S. aureus* sietää hyvin osmootista painetta, kuivuutta ja elää sekä hapellisissa, että hapettomissa olosuhteissa ja on täten fakultatiivisesti anaerobi. Näiden ominaisuuksiensa avulla sitä tavataan nisäkkäiden sieraimilla ja iholla. Jopa 20 % ihmisistä kantaa kyseistä bakteeria sieraimissa, suussa tai iholla. Samat ominaisuudet, jotka mahdollistavat *S. aureuksen* esiintyvyyden nisäkkäillä, mahdollistavat sen kasvun myös erilaisissa elintarvikkeissa. (Tortora ym. 2012: 316.)

S. aureuksen aiheuttamien sairauksien kirjo on laaja. Se on vaaraton iholla, mutta päästessään elimistöön ja verenkiertoon sillä on lukuisia tapoja aiheuttaa oireilua potilaille. Infektiot ovat vaarallisuudeltaan hyvinkin toisistaan poikkeavia. Lievimmillään infektio voidaan havaita märkärakkuloina iholla, mutta myös vakavat infektiot ovat mahdollisia. (Kazmierczak ym. 2014: 2552.) Bakteerien tuottamat toksiininit voivat aiheuttaa potilaalla erilaisia myrkytystiloja. *S. aureuksen* tuottamat eksotoksiinit luokitellaan kahteen ryhmään, joita ovat pyrogeeniset toksiinisuperantigeenit (PTSAGs) sekä hemolysiinit. *S. aureus* tuottaa esimerkiksi eksoproteiineja, kuten toksista shokkioireyhtymää aiheuttavaa toksiniä (TSST-1). (Dinges ym. 2000: 16–17.) Toksinen shokkioireyhtymä aiheuttaa korkeaa kuumetta ja oksentamista ja pahimmillaan sillä on kuolemaan johtava vaikutus (Venkataraman & Sharma 2016). Enterotoksiini on toinen PTSAG-toksiineihin luokiteltu toksini, joka aiheuttaa pahoinvointia ja oksentamista (Dinges ym. 2000: 16; Tortora ym. 2012: 316). Yleisin syy ruokamyrkytyksiin onkin juuri *S. aureuksen* tuottama enterotoksiini (Kazmierczak ym. 2014: 2552). Sekä enterotoksiinit, että TSST-1 luokitellaan superantigeeneiksi (Dinges ym. 2000: 16). *S. aureuksen* aiheuttamat infektiot ovat yleisiä esimerkiksi sairaaloissa, leikkauspotilailla tai muilla potilailla, joilla on haavoja. Bakteerin

leviäminen tapahtuu useimmiten sairaalaolosuhteissa. Leukosidiinit ja hemolysiinit, joita *S. aureus* tuottaa, hajottavat verestä punasoluja ja leukosyyttejä. (Vandenesch ym. 2012: 1.) Esimerkiksi metisilliiniresistentit *S. aureukset* kykenevät myös tuottamaan leukosidiini-toksiinia, joka aiheuttaa vaarallisia kuolioita potilailla (Lo ym. 2009: 70). *S. aureuksen* aiheuttamat monenlaiset infektiot ja myrkytystilat johtuvat sen pääsystä lähes kaikkialle elimistöön useiden virulenssitekijöidensä avulla (Kazmierczak ym. 2014: 2552).

S. aureus on erityisen haitallinen johtuen sen kyvystä omaksua nopeasti uusia mikrobi-lääkeresistenssimekanismeja (Kazmierczak ym. 2014: 2552). Antibioottiresistenssigeenejä omaavia *S. aureus*-kantoja on raportoitu jo 1950-luvulla. Tällöin *S. aureus*-infektioita hoidettiin penisilliinillä, jota vastaan bakteeri omaksui resistenssin. Penisilliinin menettäessä tehokkuutta hoitomuotona jouduttiin siirtymään muihin antibiootteihin. Metisilliiniin todettiin olevan tehokas korvaaja penisilliinille, mutta jo 30 vuodessa *S. aureus* oli omaksunut tehokkaan puolustusjärjestelmän metisilliiniä vastaan. Metisilliini-resistenteistä *S. aureus*-kannoista puhutaan MRSA:na. (Tortora ym. 2012: 18.) Metisilliiniresistenttien kantojen yleistyessä alkoi MRSA:n aiheuttamat ongelmat. Vaikeasti hoidettavat MRSA-kannat muodostivat laajoja epidemioita, eikä tilanne ole muuttunut nykypäivään mennessä (Kazmierczak ym. 2014: 2553). MRSA aiheuttaa jopa yli puolet kaikista *S. aureuksen* aiheuttamista infektioista (Hidron ym. 2005: 159) ja koko maailmassa esiintyvien infektioiden vuoksi MRSA:n aiheuttamat sairastumiset ovat muodostuneet pandemiaksi (Golkar ym. 2014: 129). Vankomysiini kehitettiin hoitamaan MRSA-infektioita. 2000-luvun alussa MRSA-infektioita seurasi kuitenkin uusia resistenssimekanismeja omaavia *S. aureus*-kantoja. Näistä puhutaan nimellä VRSA, joka tulee sanoista vankomysiini-resistentti *S. aureus*. (Tortora 2012: 18.)

4 *Acinetobacter baumannii*

A. baumannii on yksi akinetobakteereihin kuuluva laji. Se elää hapellisissa olosuhteissa ja sen elinpaikkoja uskotaan olevan vesiympäristöt kuten myös maaperä (Cunha 2016). Soluseinärakenteensa vuoksi *A. baumannii* kuuluu gram-negatiivisiin bakteereihin ja bakteerisolun muodon perusteella se voidaan luokitella pyöreisiin sauvabakteereihin. Se on läheistä sukua esimerkiksi *Acinetobacter calcoaceticuselle* (Peleg ym. 2008: 540). *A. baumannii* -tartunta saadaan pääasiassa sairaaloissa. Suurin osa infektioista todetaan

sairaalapotilailla, joiden heikentyneen immuunipuolustuksen vuoksi bakteeri pääsee potilaan elimistöön, eikä kehon oma immuunipuolustus riitä poistamaan sitä elimistöstä ja henkilö sairastuu (Cunha 2016). Bakteeri pystyy selviämään pitkiäkin aikoja sairaalaympäristöissä, mikä lisää sen haitallisuutta (Cunha 2016; Peleg ym. 2008: 539). Sairaaloissa *A. baumannii*-tartunnat ovat muodostuneet ongelmaksi, sillä *A. baumannii* kykenee sietämään antibiootteja, desinfektioaineita ja kuivuutta (Peleg ym. 2008: 557). Heikon taudinaiheutuskykynsä vuoksi *A. baumannii* aiheuttaa terveillä ihmisillä vain harvoin infektioita (Cunha 2016). *A. baumannii* aiheuttamia sairauksia ovat keuhkokuume ja virtsatie-infektiot. Myös keskushermoston-, ihon- ja pehmytkudosten infektiot ovat mahdollisia (Perez ym. 2007: 3471).

Maailmanlaajuisesti *A. baumannii* on muodostunut viimeisten 15 vuoden aikana yksi haitallisimmista bakteerilajeista omaksumiensa antibioottiresistenssimekanismien vuoksi. Muutoksia sen genomissa on tapahtunut noin 30 vuoden aikana, jolloin eri kannat ovat muodostaneet resistenssimekanismit kaikkia tunnettuja antibioottiryhmiä vastaan. Resistenssimekanismien kehittymistä on edistänyt bakteerin poikkeuksellinen kyky vastaanottaa DNA:ta muilta bakteerilajeilta. (Peleg ym. 2007: 539.) Esimerkiksi moniresistentille *A. baumannii*-kannalle tehdyssä sekvenssianalysissä on havaittu, että sen genomissa on runsaasti vierasperäistä DNA:ta (Fournier ym. 2006: 62–63). Näitä DNA-pätkiä *A. baumannii* on omaksunut muilta lajeilta, kuten *Pseudomonas* spp.:ltä, *Salmonella* spp.:ltä ja *E. coli*ta (Perez ym. 2007: 3472). Vieraat DNA-pätkät on löydetty geenistä *AbaR1*, joka esiintyy esimerkiksi moniresitentillä *A. baumannii*-kannalla nimeltä AYE. *AbaR1*:stä bakteeri ilmentää jopa 45 erilaista antibioottiresistenssigeeniä (Fournier ym. 2006: 63). Erilaisia resistenssimekanismia *A. baumannii*-kannoilla voi olla useita. Näihin lukeutuu niin entsyymattisia resistenssitekijöitä, kuten β -laktaamaasit ja aminoglykosidirakenteita muokkaavat entsyymit. Bakteerisolun rakenteilla on oma osuutensa mikrobilääkeresistenttiyden muodostumisessa. Solukalvorakenteiden muutokset ja pumppurakenteet, jotka pumppaavat erilaisia mikrobilääkkeitä pois bakteerisolun sisältä, ovat esimerkkejä tällaisista tekijöistä. (Peleg ym. 2008: 542–547.)

5 Bakteriofagit

Bakteriofagit ovat viruksia, joiden isäntäeliöitä ovat bakteerit (Drulis-Kawa ym. 2012:700). Yksi bakteriofagilaji infektoi spesifisesti tiettyä bakteerilajia tai vain jopa muu-

tamia kantoja, bakteerikantojen välisen runsaan vaihtelun vuoksi. Bakteriofagit tunnista-
vat vain tietynlaisia pintamolekyylejä, reseptoreita bakteerisolun pinnalta. Ne ovat myös
yleisin eliöryhmä maailmassa ja niitä esiintyy ympäristöissä, joissa niiden isäntälajit kas-
vavat. (Wang ym. 2016: 2.) Bakteriofagit säätelevät bakteerien määrää maailmassa ja
ovat näin olennainen osa ekosysteemiä (Gutiérrez ym. 2016: 16). Ensimmäiset havain-
not bakteriofageista tehtiin Intiassa 1800-luvun loppupuolella. Vaadittiin kaksi vuotta,
kunnes samanlaisia havaintoja tehtiin muuallakin maailmassa, tällä kertaa Venäjällä.
Näistä löydöksistä huolimatta virallisesti bakteriofagit tunnistettiin ja nimettiin vasta
vuonna 1915 Felix d'Herellen toimesta. (Sulakvelidze ym. 2001: 649.)

Bakteriofagit voidaan jakaa elinkiertonsa perusteella lyyttisiin ja lysogeenisiin faageihin
(Weinbauer 2004: 130-131). Lysogeenisen elinkierron omaavista viruksista puhutaan
myös lauhkeina viruksina. Bakteriofagin isäntäsolun tunnistus tapahtuu isäntäsolun pin-
nalla olevien reseptoreiden avulla (Wang ym. 2016: 2). Bakteriofagi havaitsee häntäkar-
vojensa avulla spesifisen reseptorin bakteerin solukalvolta, jonka avulla se kykenee kiin-
nittymään solun pinnalle ja siirtämään geneettisen materiaalinsa isäntäsoluun. Lyyttiset
faagit infektoivat isäntäsolun ja päästävät oman genominsa bakteerisolun sisään. Virus-
ten genomia monistetaan isäntäbakteerin avulla ja uudet viruspartikkelit vapautuvat ha-
jottamalla isäntäsolun häiritsemällä sen omaa aineenvaihduntaa. (Weinbauer 2004: 130-
131.) Lysiinit ja holiinit ovat bakteriofagien tuottamia entsyymejä, jotka ovat vastuussa
isäntäsolun solukalvon rikkomisesta (Wittebole ym. 2014: 228). Lauhkeat faagit puoles-
taan vapauttavat oman genominsa isäntäsolun sisälle ja liittävät sen integraasiensyy-
mien avulla isäntäeliön genomiin. Lauhkeilla faageilla on lysogeeninen ja lyyttinen sykli.
Viruksen genomi säilyy sellaisenaan osana isäntäorganismien genomia, niin kutsutussa
profaagi-tilassa, eikä siitä ole silloin haittaa isäntäorganismien elintoiminnoille. Virus säilyy
profaagi-tilassa niin kauan kun faagi-repressoriproteiini estää faagin hajottavia ominai-
suuksia ilmentävien geenien transkription. Kun faagi-repressoriproteiini ei enää estä näi-
den ominaisuuksien ilmenemistä elinkierto vaihtuu lyyttiseen kiertoon. Lysogeenisillä vi-
ruksilla on kyky omaksua omaan genomiinsa isäntäorganismien DNA-juosteen pätkiä,
muiden muassa taudinaiheutuskykyä edistäviä geenejä tai toksisuusgeenejä. Lysogee-
nisillä bakteriofaageilla on myös kyky tehdä isäntäorganismistaan vastustuskykyisen it-
sensä kaltaisia bakteriofageja vastaan. (Lobocka ym. 2012: 146-147.)

5.1 Bakteriofagi fRu-Sau02

Bakteriofagi fRu-Sau02:n isäntäspesifisyyttä määritettiin työssä. fRu-Sau02 on lyyttinen bakteriofagi, joka kuuluu Twort-faagiperheeseen (Kiljunen ym. 2016). Tähän faagiperheeseen kuuluvat bakteriofagit ovat *Staphylococcus*-lajeille spesifisiä (Lobocka ym. 2012: 145). Twort-faagiperheen bakteriofagit on luokiteltu myovirusiin (ICTV). Näillä faageilla on supistuva häntä ja faagin genomi on pakkautunut ikosaedrin muotoiseen proteiiniukuoreen, joka yhdistyy häntään ontolla kaulalla (Calendar 2006: 10). MSA6-faagin genomin ja tässä työssä käytetyn fRu-Sau02-faagin genomi vastaavat toisiaan yli 90 %:sti ja ne ovat ominaisuuksiltaan samankaltaisia (Kiljunen ym.). Twort-faagiperheeseen kuuluva bakteriofagi MSA6 on herkästi tarttuva lyyttinen faagi, joka infektoi gram-positiivisia bakteereita. Sillä on myös laaja isäntäspesifisyys kliinisiä *Staphylococcus*-kantoja vastaan. (Lobocka ym. 2012: 144–149.)

6 Faagiterapia

Antibioottien tehon heikentymisen ja bakteerien antibioottiresistenttityden yleistymisen seurauksena on tärkeää löytää uusia hoitomuotoja käytettäväksi antibioottien rinnalla ja jopa niiden korvikkeena (Rios ym. 2006). Yksi potentiaalinen vaihtoehto on faagiterapia. Mahdollisena hoitomuotona se on ollut tiedossa jo pitkään (Merabishvili ym. 2009: 1). Faagiterapian kehittäjänä pidetään Felix d'Herelleä. Hän osoitti ensimmäisissä faagiterapiakokeissa, että lavantautia sairastavat kanat, joiden hoitoon käytettiin bakteriofageja, selvisivät elossa. Kontrolliryhmän hoitamattomista kanoista puolestaan 75 % kuoli (Pizzorno & Murray 2013: 945–946). Faagiterapiaa on tutkittu jo ennen antibioottien löytymistä ja potentiaalisena hoitomuotona se herätti tutkijoissa niin kiinnostusta kuin epäilyjäkin. 1920- ja -30-luvuilla hoitomuodon toimivuudesta ei saatu riittävän paljon todisteita esimerkiksi heikkojen kontrollien vuoksi. (Wittebole ym. 2014: 226.) Länsimaissa faagiterapian tutkiminen on ollut antibioottien kehittämisen jälkeen pienimuotoista (Viertel ym 2014: 2326 ; Golkar ym. 2014:15). Ranskassa faagiterapiaa on käytetty esimerkiksi haavojen ja ihoinfektioiden hoidossa aina vuoteen 1979 asti ja Puolassa perustettiin tutkimuskeskus 1950-luvun lopulla, jossa faagiterapiaa tutkitaan (Golkar ym. 2014:15). Vaikka faagiterapiatutkimus laantui länsimaissa, niin esimerkiksi Neuvostoliitossa tutkimuksia kuitenkin jatkettiin (Viertel ym 2014: 2326). Puolassa (Madhusoodanan 2014) ja USA:ssa faagiterapiaa voidaan kuitenkin käyttää sellaisissa tapauksissa, joissa antibi-

ootit eivät auta (Phagebiotics International). Näissä maissa faagiterapia luokitellaan korkeelliseksi hoidoksi. Faagiterapiakokeita on tehty ihmisillä (Viertel ym. 2014: 2326–2327) ja eläimillä, kuten hiirillä. Eräs hiirikoe osoitti, että bakteriofageilla saatu hoitotulos oli vähintäänkin yhtä tehokasta tai joihinkin antibiootteihin verrattuna tehokkaampaa, kuin useaan otteeseen annetut antibioottiruiskeet (Smith & Huggins 1982: 316–317). Alustavissa tutkimuksissa on kuitenkin voitu osoittaa bakteriofagien olevan vaaraton hoitotuote. Faagiterapian toimivuutta on tutkittu esimerkiksi infektoituneiden haavojen ja palovammojen hoidossa. Näistä tutkimuksista on saatu positiivisia tuloksia faagiterapian käyttökelpoisuudesta (Viertel ym. 2014: 2327–2328.) Faagiterapiaa voidaan hyödyntää niin ihmisten hoidossa kuin myös eläinlääketieteessä (Abedon ym. 2011: 66).

Faagiterapiaksi kutsuttu hoitomuoto perustuu bakteriofagien kykyyn infektoida spesifisesti vain tiettyyn lajiin kuuluvia bakteereita tai vain muutamia kantoja. Bakteriofageista valmistettua hoitotuotetta annetaan potilaalle, jolloin bakteriofagit pääsevät infektoimaan taudin aiheuttaneita bakteerisoluja. Infektion seurauksena isäntäkanta kuolee. Tällöin saadaan infektion aiheuttama bakteeri eliminoitua elimistöstä. (Abedon ym. 2011: 66.) Myös hoitoon käytetty bakteriofagi poistuu elimistöstä itsestään, kun isäntälaji on poistunut. Tällöin faageilla ei ole enää organismeja, jossa se voi lisääntyä. Tästä seuraa viruksen kuoleminen ja luontainen poistuminen elimistöstä. Bakteriofagien käyttämiseen bakteeri-infektioiden hoidossa vaaditaan käytettävältä virukselta tietynlaisia ominaisuuksia. Näitä ominaisuuksia ovat bakteriofagin lyyttinen elinkierto, jolla ehkäistään virulenssi- ja resistenssitekijöiden siirtymistä faagin isäntäbakteereihin. (Drulis-Kawa ym. 2012: 700–701.) Lyyttisiin viruksiin kuuluvia myovirusia, siphovirusia ja podovirusia on tutkittu eniten faagiterapiaa varten, sillä niiden ominaisuudet täsmäävät parhaiten faagiterapian asettamiin vaatimuksiin (Wittebole ym. 2014: 228). Käytettäessä lysogeenisiä bakteriofageja riskinä on entistä vaarallisempia bakteerikantoja muodostuminen, näiden fagien siirtämien virulenssitekijöiden vuoksi (Lobocka ym. 2012: 147).

Faagiterapiassa on monia hyviä puolia, jotka tekevät siitä mahdollisen vaihtoehdon mikrobilääkkeille. Hoitomuotona siinä on haitallisia sivuvaikutuksia elimistölle vähemmän kuin mikrobilääkkeillä, sillä bakteriofagit infektoivat ainoastaan niille spesifisiä isäntäbakteerisoluja (Golkar ym. 2014: 131). Tällöin potilaan elimistön muut solut ja luonnollinen mikrobikanta ei häiriinny bakteriofagien läsnäolosta elimistössä (Wang ym. 2016: 2), jolloin voidaan välttää esimerkiksi potilaan infektoituminen uudestaan. Bakteriofagit tarvitsevat isäntäbakteerin pystyäkseen lisääntymään. Tämän vuoksi ne esiintyvät vain pai-

kallisesti infektoituneella alueella vaikka faagit kulkeutuvat helposti ympäri kehoa ja voivat läpäistä myös veri-avoesteen. (Golkar ym. 2014: 131.) Faagiterapialla pystytään myös hoitamaan infektioita, joihin mikrobilääkkeet eivät tehoa, sillä bakteriofagien käyttö perustuu eri tekijöihin kuin mikrobilääkkeiden käyttö (Wang ym. 2016: 2).

Mikrobilääkkeisiin verrattuna faagiterapialla on myös lääkkeen kehittämiseen ja tuotantoon liittyviä etuja. Uuden faagin eristäminen ympäristöstä ja tuotanto voivat parhaimmillaan tapahtua hyvinkin lyhyessä ajassa ja tämä prosessi on suhteellisen halpa monen muun lääkkeen tuotantoon ja kehittämiseen nähden. (Golkar ym. 2014: 131.) Laaja faagikirjo maapallolla mahdollistaa monipuolisen faagien käytön eri bakteerilajien tai –kantojen aiheuttamien infektioiden hoidossa. Faagiseosten käyttäminen tuo myös omat etunsa infektioiden hoitoon. Useamman faagin siirtäminen elimistöön voi aikaistaa hoidon aloittamista. Tämä perustuu siihen, ettei tarkkoja bakteerikannan fenotyyppityksiä tarvita oikean bakteriofagin löytämiseksi hoitoa varten. (Chan 2013; Drulis-Kawa ym. 2012: 700–701.) Tällöin voidaan myös välttää bakteriofagiresistenttien kantojen rikastumista ja hoitomenetelmän toimivuus säilyy. Bakteriofageille resistenttien kantojen kehittymistä ei kuitenkaan voida luokitella samanlaiseksi uhaksi kuin mikrobilääkeresistenttiys tällä hetkellä on. Tämä johtuu siitä, että toisin kuin mikrobilääkkeet, bakteriofagit ovat eliöitä, joilla on kyky mukautua elinympäristöönsä. Bakteerien muodostaessa resistenssiä bakteriofagia vastaan, bakteriofagi voi myös mutatoitua selvitäkseen muuttuvassa ympäristössä. (Golkar ym. 2014: 131–132.) Bakteriofageja voidaan myös muokata laboratorioissa, jotta niiden tehokkuus infektioiden hoidossa olisi parempi. Isäntäspesifisyyden laajentaminen ja lyyttisten ominaisuuksien tehostaminen ovat esimerkkejä ominaisuuksista, joiden kehittämisen toimivuutta tutkitaan. (Viertel ym. 2014: 2328-2329.) Biofilmien aiheuttamat toistuvat infektiot ovat vaikeita hoitaa mikrobilääkkeiden avulla. Tähän ongelmaan bakteriofagit ovat hyvä ratkaisu, sillä ne ovat bakteerien luontaisia vihollisia. (Parasion ym. 2014: 137–143.)

Faagiterapialla on myös haittapuolensa, kun sitä käytetään hoitotarkoituksessa. Moniin ongelmiin on kuitenkin jo ratkaisuja. Jos käytetään hoidossa vain yhtä bakteriofagia, hoidon aloittaminen voi viivästyä fenotyyppitykseen ja oikean tuotteen etsimiseen kuluvan ajan vuoksi (Drulis-Kawa ym. 2012: 700). Bakteriofagit hajottavat isäntäsolunsa, jolloin bakteerisolun sisällä oleva materiaali ja solukalvon rakenteet vapautuvat elimistöön uuden bakteriofagisukupolven lisäksi. Toksiineja tuottavien bakteerien kohdalla tämä voi olla ongelma, sillä vapautuneilla toksiineilla voi olla vaarallisia seurauksia potilaan ter-

veydelle. (Drulis-Kawa ym. 2015: 1758.) Ongelmia saattaa myös aiheuttaa potilaan immuunipuolustusjärjestelmä. Immuunipuolustus tunnistaa elimistöön päässeet vieraat partikkelit ja pyrkivät poistamaan ne nopeasti elimistöstä. Faagiterapian käyttö potilaalla voi laukaista tämän kaltaisen reaktion, jolloin immuunijärjestelmä tuottaa vasta-aineita bakteriofageille, ja ne poistuvat elimistöstä. (Sulakvelidze ym. 2001: 656.) Bakterien on mahdollista kehittää resistenssimekanismeja bakteriofageja vastaan samalla tapaa kuin ne voivat kehittää resistenssimekanismeja myös mikrobilääkkeitä vastaan. Bakteri saattaa mutaation seurauksena ruveta koodaamaan erilaisia reseptoreita tai muodostaa kapselirakenteita, jolloin bakteriofagit eivät enää tunnista niitä. Uhkana reseptorien muuttuminen ei kuitenkaan ole kovin huolestuttava, sillä bakteriofagiresistenttien bakteerien virulenssiominaisuudet yleensä heikentyvät samalla, jolloin infektion uhka pienenee. (León & Bastías 2015: 1-3.) Bakteereiden on myös mahdollista hankkia immuniteetti bakteriofageja vastaan. Tällainen tila voi syntyä, jos temperaattinen bakteriofagi on profaagi-tilassa isäntäsolunsa genomissa. Tämän johdosta bakteri ei enää infektoitu profaagi-tilassa olevan bakteriofagin kanssa samaan faagiperheeseen kuuluvan bakteriofagin toimesta. (Lobocka ym. 2012: 147.) CRISP-Cas järjestelmä on osa bakteerin opittua puolustusjärjestelmää jonka avulla se voi kehittää immuniteetin bakteriofageja vastaan. Sen avulla infektoitunut bakteri voi muodostaa lyhyitä RNA-juosteita, joiden avulla voidaan tuhota vierasperäinen, esimerkiksi viruksen, geneettinen materiaali. (Devashish ym. 2015: 119–120.)

7 Työn tavoitteet

Tämä opinnäytetyö on osa tutkimusta, jossa kehitetään faagiterapiaa hoitomuotona. Jotta faagiterapiaa voidaan soveltaa infektioiden hoitoon ja maatalouteen on oleellista, että mahdollisimman monia bakteriofageja on saatavilla (Mirzaei & Anders 2015: 2-3). Tällöin voidaan helposti ja nopeasti saada käyttöön tarvittava hoitotuote riippumatta siitä mikä bakteerilaji on kyseessä. Erilaisten bakteerien kirjo on laaja, joten faagikokoelman tulee kyetä vastaamaan tähän vaatimukseen (Drulis-Kawa ym. 2012:701). Tässä projektissa testattiin miten laajasti humaan-MRSA-kantoja infektoiva bakteriofagi fRu-Sau02 (Wicklund ym.) infektoi puolestaan sioista eristettyjä MRSA-kantoja. Tavoitteena oli saada selville voidaanko kyseistä bakteriofagia hyödyntää sioilta eristettyjen MRSA-kantojen aiheuttamien infektioiden hoitoon. Samalla selvitettiin, käykö tämä faagi tarkoitukseen yksinään, vai vaaditaanko sioilta eristettyjen MRSA-kantojen aiheuttamien infekti-

oiden hoitoon faagiseos. Uusien bakteriofagien metsästys liittyy myös kattavan faagikoelman saavuttamiseksi. *A. baumannii*-spesifisiä bakteriofageja ei ollut käytettävissä projektin alussa ollenkaan. Tästä johtuen faagiterapiaa ei voitaisi soveltaa *A. baumannii*-bakteerien aiheuttamien infektioiden hoitoon lainkaan. Tavoitteena oli siis löytää sairaalajätevedestä bakteriofageja, jotka ovat spesifisiä *A. baumannii*-kannoille. Sairaaloiden viemäriveresi valittiin näytteeksi. Valinta perustui tietoon siitä, että bakteriofageja esiintyy ympäristöissä joissa niiden isäntälajejakin ja *A. baumannii* on erityisesti sairaalainfektioita aiheuttava bakteerilaji. Maailmanlaajuisesti *A. baumannii*-kantoja infektoivista bakteriofageista on pulaa, minkä vuoksi näitä faageja on tärkeä löytää. (Wittman 2016).

Kehitettäessä faagiterapiaa tulee ottaa huomioon millaisia viruksia lähdetään tutkimaan. Potentiaalisimpia bakteriofageja faagiterapiaa varten ovat lyyttiset bakteriofagit, (Lockock ym. 2012:26) joiden kyky infektoida eri bakteerikantoja on mahdollisimman laaja (Gutiérrez ym. 2016: 16). Tällöin virus tappaa isäntäbakteerisolunsa nopeasti (Golkar ym. 2013: 1), eikä sen mukana siirry vierasta DNA:ta bakteerilajista toiseen (Drulis-Kawa ym. 2012: 700–701). Edellä mainittujen ominaisuuksien vuoksi juuri bakteriofagi fRu-Sau02 on kiinnostava tutkimuksen kannalta (Kiljunen ym.).

8 Materiaalit ja menetelmät

8.1 Materiaalit

8.1.1 Bakteerikannat ja bakteriofagit

Tutkimuksessa käytettiin kahta eri bakteerilajia, jotka aiheuttavat infektoita ihmisillä. Tutkimuksen kohteena olivat *S. aureus* ja *A. baumannii* bakteerit. *S. aureus*-bakteereista käytettiin terveistä sioista eristettyjä MRSA-kantoja. Kannat saatiin käyttöön Annamari Heikinheimon (Eläinlääketieteellinen tiedekunta, Helsingin yliopisto) kanssa tehdyn yhteistyön kautta (Liite 1). Sioilla esiintyvät MRSA-kannat on eristetty suomalaisilta sikatiloilta vuonna 2015 (Heikinheimo ym. 2016: 2) ja ne oli viljelty veriagar-maljoille ennen tämän projektin aloittamista. MRSA-kannoilla tehdyissä tutkimuksissa kontrollikantoina käytettiin humaani-MRSA-kantoja 13KP11088/1 (eristetty HUSLabissa) ja 13 S44 S. 13 S44 S on palohaavasta eristetty MRSA-kanta (Merabishvili ym. 2009: 3). Nämä kannat infektoituvat kummatkin bakteriofagi fRu-Sau02:lla. *A. baumannii*-kannat oli eristetty HUSLabissa sairaalapotilasnäytteistä.

MRSA-kantojen isäntäherkkyyksiä tutkittiin käyttämällä fRu-Sau02-bakteriofagia. fRu-Sau02-faagi on eristetty faagiterapiatuotteesta, jonka valmistaja on Microgen. Kyseinen virus infektoi humaani-MRSA-kantoja hyvin laajasti, 90 % tutkituista *S. aureus*-kannoista (Wicklund ym.) ja se on spesifinen *S. aureus*-bakteerille.

8.1.2 Faagieristysnäytteet

Bakteriofageja lähdettiin etsimään paikoista, joissa niiden isäntälajia voisi esiintyä. Tämä lisää faagien esiintyvyyden todennäköisyyttä, sillä näitä viruksia esiintyy isäntälajiensa yhteydessä. Koska isäntäkanta *A. baumannii* on lähinnä sairaalainfektioita aiheuttava bakteeri, virusten etsimisessä lähdettiin liikkeelle sairaaloiden viemäriveresistä. Näytteitä otettiin neljän eri sairaalan viemäriveresistä (Taulukko 1).

Taulukko 1. Jätevesinäytteiden keräystiedot

Sairaala	Näytteenottoaika	Päivämäärä
Porvoon sairaala	Pumppukaivo	13.4.2016
Peijaksen sairaala	Ulkokaivo	14.4.2016
Lohjan sairaala	Pihakaivo	13.4.2016
Syöpätautien klinikka	Viemäriveresinäyte	15.4.2016

Jätevesinäytteet kerättiin paikan päältä sairaalassa ja toimitettiin tämän jälkeen laboratorioon tutkimusta varten. Näytteiden saavuttua ne säilöttiin odottamaan analyysijä. Näytteet säilöttiin ensin sentrifugoimalla suurimmat roskat pullon pohjalle, jotta seuraavassa vaiheessa suodatin ei menisi tukkoon. Putket sentrifugoitii olosuhteissa 7500 rpm, 15 min ja +4 °C (Sorvall RC-513 Refrigerated Superspeed centrifuge, GSA roottori). Tämän jälkeen näytteet vakuu suodatettiin 0,22 µm suodattimen läpi (Stericup and Steritop Vacuum Driven Filtration Systems, Millipore Express PLUS, Bottle Top Filter). Viemäriveresinäytteet säilöttiin kylmässä +4 °C:ssa.

8.1.3 Kasvatusolosuhteet

Projektin aikana bakteerien kasvatukseen käytettiin useita erilaisia elatusaineita joista valmistettiin elatuslientä, – agar ja – pehmytagaria (soft-agar). *A. baumannii*- ja MRSA-kantoja kasvatettiin +37 °C lämpötilassa. Bakteerimaljat kasvatettiin ilman ravistelua, mutta liemikasvatukset tehtiin puolestaan ravistelussa. MRSA-kantojen kasvatukseen käytettiin Luria-maljoja, -pehmytagaria ja -lientä (Taulukko 2).

Taulukko 2. Luria-elatusaineiden valmistusohje

LA-maljat	
Reagenssi	g/l
Bacto-agar	15
Bacto-tryptoni	10
Yeast-extract	5
NaCl	10

Luria-pehmyt agar valmistettiin kuten Luria-maljat (LA-maljat), mutta bacto-agaria lisättiin 4 g/l. Luria-liemestä (LB) jätettiin bacto-agar kokonaan pois, muuten käytettiin samaa ohjetta, kuin LA-maljoissa. Luria-elatusaineita käytettiin myös, kun työskenneltiin *A. baumannii* -kantojen kanssa.

Brain-Heart Infusion -lientä (BHI) käytettiin myös sioista eristetyille MRSA-kannoille tehdyissä analyyseissä. BHI-elatusaine valmistettiin valmistajan ohjeen mukaan (Becton, Dickinson and Company). Myös tästä elatusaineesta valmistettiin BHI agar-maljoja, -pehmytagaria ja –lientä kuten edellä.

Sioista eristettyjä MRSA-kantoja kasvatettiin myös veriagarmaljoilla, jotka tilattiin laboratorioon valmiina (HUSLab). Kaikki bakteerikannat säilytettiin pakastettuina -70 °C:ssa, josta ne viljeltiin analyysistä riippuen LA- tai BHI-maljoille.

8.2 Menetelmät

8.2.1 Faagititraus

Faagimaljaus on menetelmä, jonka avulla voidaan testata infektoiko tutkittava bakteriofagi tiettyä isäntäbakteeria. Faagimaljausta käyttämällä voidaan tämän lisäksi laskea faagilysaattien pitoisuuksia ja sitä voidaan hyödyntää osana bakteriofagien puhdistusta. Minkä lisäksi se on menetelmä, joka soveltuu myös bakteriofagien tuottoon. Menetelmän avulla on myös mahdollista havaita uusia bakteriofageja ja tämä onkin osa uusien bakteriofagien etsimistä. Näytteiden sentrifugaus ja suodatus 0,22 µm suodattimen läpi varmistaa, ettei siinä ole analyysejä häiritseviä tekijöitä. Menetelmän periaatteena on kasvattaa isäntäbakteeria, jonka joukkoon lisätään tutkittavaa bakteriofagia. Bakteerien

kasvatuksen jälkeen tällä menetelmällä voidaan havaita kasvaako isäntäbakteeri normaalisti näytteen läsnä ollessa vai onko näytteessä bakteereita tappavaa aktiivisuutta, bakteriofagia.

Faagititraus voidaan tehdä monella tavalla. Projektin aikana käytettiin maljamenetelmää (Classical double-layer method) ja pisaramenetelmää (Drop test), sekä nestekasvatusta 96-kuoppalevyllä. Menetelmä valittiin käyttötarkoituksen mukaan. Malja- ja pisaramenetelmiä varten bakteeria kasvatettiin 1,3 ml elatusliemessä, ravistelussa 2-4 h ajan +37 °C. Tästä esikasvatusnäytteestä määritettiin bakteerimäärä absorbanssin avulla, mittamalla absorbanssi aallonpituuden ollessa 600 nm (BioPhotometer, eppendorf, 8,5 mm Light center, height Lichtstrahlhöhe). Kummassakin menetelmässä sulatetun ja 55 asteiseksi tasapainotetun pehmytagarin joukkoon pipetoitiin isäntäbakteeria ja sekoitettiin näyte. Seos kaadettiin agar-maljan pinnalle ja tasoitettiin kääntelemällä maljaa siten, että pehmytagaria on koko maljalla. Pehmytagarin joukkoon pipetoitu bakteerimäärä laskettiin kaavasta 1.

$$\frac{90}{A_{600}} = x \mu l \quad (1)$$

Bakteerimäärän laskukaava faagititrausta varten.

A600=absorbanssimittauksesta saatu tulos aallonpituuden ollessa 600 nm

Malja- ja pisaramenetelmissä erona on viruksen lisääminen bakteerin joukkoon. Maljamenetelmässä sekä bakteerikanta että 50 µl viruslaimennosta lisättiin 55 °C pehmytagarin joukkoon ja kaadettiin maljalle. Jokainen viruslaimennos tehtiin edellä mainitulla tavalla omalle maljalleen. Pisaramenetelmässä puolestaan pehmytagarin joukkoon pipetoitiin bakteeri ja se kaadettiin maljalle ja annettiin jähmettyä 30 min ajan. Jähmettyneen pehmytagarin päälle pipetoitiin 10 µl:n pisara jokaista haluttua viruslaimennosta. Kummassakin menetelmässä maljat joissa on virusta ja bakteeria annettiin jähmettyä 30 min ja kasvatettiin yön yli bakteerin optimilämpötilassa, minkä jälkeen tulokset voitiin lukea. Projektissa käytettiin viruslaimennoksia 10⁻⁴, 10⁻⁶, 10⁻⁸ ja negatiivisena kontrollina samaa kasvatuslientä, joissa bakteerit oli esikasvatettu. Pisaratitrouksia voidaan tehdä myös ilman pehmytagaria. Tällöin kantoja kasvatettiin 1 h ajan +37 °C:ssa ravistelussa, jolloin niiden A600-arvo on noin 0,5. Inkubaation jälkeen bakteeriliemi kaadettiin ja levitettiin tasaiseksi kerrokseksi kasvualustalle ja pipetoitiin ylimääräinen neste pois. Maljojen annettiin kuivua ja kuivuneen bakteerikerroksen pinnalle pipetoitiin 10 µl pisarat jokaista viruslaimennosta.

Virusen infektiokyky määritettiin nestekasvatuksessa 96-kuoppalevyllä lisäämällä BHI-liemessä esikasvatettua ja BHI-liemeen laimennettua bakteerikantaa kuoppiin. Bakteerikasvatuksesta tehtiin sopiva laimennos. Bakteerisuspensiota lisättiin kuoppaan yhteensä 200 µl. Bakteerin lisäksi kuoppaan lisättiin 10 µl 10⁻² laimennettua fRu-Sau02-bakteriofagia, jonka laimentamaton pitoisuus oli 6,8x10¹⁰ PFU/ml (PFU=Plaque Forming Unit). Yhdessä kuopassa oli siis virusta 6,8x10⁶ PFU. Jokaisesta tutkitusta bakteerikannasta tehtiin omat kuopat. Kontrollinäytteet valmistettiin ilman virusta pelkästä bakteerilaimennoksesta, jotta voitiin verrata bakteerien kasvua viruksen kanssa ja ilman. Kun kaikki näytteet oli valmisteltu, mitattiin jokaisen kuopan absorbanssi 600 nm aallonpituudella (FLUOstar OPTIMA bMG). Tämän jälkeen näytelevyä inkuboitiin ravistelussa +37 °C:ssa ja siitä mitattiin absorbanssi 1 h välein bakteerien kasvun määrittämiseksi. Bakteerien kasvua seurattiin 4 h ajan. Saaduista absorbanssiarvoista piirrettiin kuvaajat, joissa verrattiin keskenään bakteerinäytteiden kasvua viruksella ja ilman ja voitiin päätellä infektoituuko isäntäkanta kasvukäyrien eroavaisuuksien perusteella.

8.2.2 Mutatoituneiden bakteriofagien seulonta

Bakteriofagien isäntäspesifisyyttä voidaan laajentaa yrittämällä seuloa bakteriofaginäytteestä mutatoituneita faageja. Menetelmä perustuu bakteriofagin rikastamiseen olosuhteissa, joissa on poikkeavuuksia faagin isäntäkannoissa. Tällöin lähdetään liikenteeseen sillä olettamuksella, että alkuperäisen faagilysaatin joukossa olisi viruksia, joiden genomissa on poikkeamia verrattaessa suurimpaan osaan saman näytteen viruksista. Periaatteena on siis lähteä etsimään olosuhteita, joissa nämä genomiltaan poikkeavat bakteriofagit lähtisivät rikastumaan ja niiden faagiterapian kannalta hyödyllisiä ominaisuuksia voitaisiin tutkia ja hyödyntää laajemmin.

Bakteriofagi fRu-Sau02:n isäntäspesifisyyttä pyrittiin laajentamaan siten, että valittuja isäntäkantoja siirrostettiin 1,3 ml LB-liemeen ja kasvatettiin 4 h ajan, 37 °C:ssa, ravistelussa. Jokaisesta isäntäkannasta mitattiin absorbanssi 600 nm:ssä (BioPhotometer, ependorf, 8,5 mm Light center, height Lichtstrahlhöhe). Absorbanssilukemasta laskettiin, kuinka paljon bakteeria lisättiin rikastusnäytteeseen (Kaava 2).

$$\frac{90}{\frac{A_{600}}{n}} = x \mu l \quad (2)$$

Bakteerimäärien laskukaava bakteriofagin mutatointia varten.

n = isäntäbakteerien määrä mutaationäytteessä.

A_{600} = absorbanssimittauksesta saatu tulos aallonpituuden ollessa 600 nm

Näytteeseen tämän jälkeen lisättiin yhtälöstä laskettu määrä isäntäkantoja, LB-lientä, jonka totaalilavuudeksi tuli 5 ml, sekä fRu-Sau02-faagia 50 μ l. Näytteiden annettiin rikastua yön yli 37 °C:ssa ja ravistelussa. Kasvatuksen jälkeen seuraavana päivänä lisättiin näytteen joukkoon 200 μ l kloroformia ja näytettä käännettiin huoneenlämmössä 20 min ajan. Seuraavassa vaiheessa näyte sentrifugoitiin olosuhteissa 5000 rpm, +4 °C ja 10 min ajan (Jouan CR3). Sentrifugauksen jälkeen näytteiden nestemäinen kerros, supernatantti, suodatettiin 0,22 μ m suodattimen läpi 5 ml eppendorf-putkiin. Nämä työvaiheet toistettiin 5 kertaa peräkkäisinä päivinä, minkä jälkeen näytteet titrattiin käyttäen isäntäkantoina rikastukseen käytettyjä näytteitä. Näin havaittiin infektoiko mutaationäyte yhtäkään seulontaan käytetyistä isäntäkannoista. Titraus tehtiin pisaramenetelmällä (luku 8.2.1).

Jatkotutkimuksia lähdettiin tekemään maljoilta, joille oli ilmestynyt plakkeja. Ennen varsinaista isäntäkantojen määrittystä mutaationäyte puhdistettiin kahteen otteeseen. Plakkipuhdistuksessa otettiin talteen steriilillä pasteur-pipetilla yksittäinen plakki ja siirrostettiin se 500 μ l SM-puskuria. Näyte sekoitettiin nopeasti ja siihen lisättiin 12 μ l kloroformia. Seuraavassa vaiheessa näytettä inkuboitiin 15 min huoneenlämmössä, ravistelussa ja sentrifugoitiin 13,2 rpm, 5 min ajan huoneenlämmössä (Eppendorf, Centrifuge 5415 R). Sentrifugoitu näyte suodatettiin 0,22 μ m suodattimen läpi ja titrattiin maljamenetelmällä käyttäen viruksesta laimentamatonta näytettä ja 10^{-1} - 10^{-3} laimennoksia. Puhdistus toistettiin samalla tavalla toiseen kertaan, minkä lisäksi tällä periaatteella tehtiin näyte, johon otettiin talteen 10 plakkia. Saadusta virusnäytteestä tehtiin maljtitraus (Luku 8.2.1) käyttäen isäntäbakteerina infektoitunutta bakteerikantaa ja virusnäytteestä laimentamatonta näytettä ja 10^{-1} - 10^{-4} laimennoksia. Negatiivisena kontrollina käytettiin pelkkää isäntäbakteeria.

8.2.3 Virusten eristys

Uusia bakteriofageja voidaan yrittää eristää mistä tahansa ympäristöstä. Tässä työssä hyödynnettyä menetelmää käytettiin tutkittaessa nestemäistä näytettä, josta bakteriofageja lähdettiin eristämään. Tarkoituksena on puhdistusten ja suodatusten avulla saada

näytteestä erotettua bakteriofagit muista näytteen sisältämästä materiaalista. Puhdistuksen jälkeen voidaan vasta tutkia bakteriofageja, jotta voidaan olla varma tulosten luotettavuudesta.

Virusten eristys näytteistä tehtiin sekoittamalla näytteitä 15 ml sentrifuugiputkeen, tässä työssä sairaaloiden viemäriveresinäytteitä, siten että kaikkia näytteitä oli yhtä paljon ja lopputilavuus on 10 ml, eli 2,5 ml jokaista jätevesinäytettä. Edellisenä päivänä maljalle viljeltyjä isäntäkantoja siirrostettiin 1,3 ml:aan LB-lientä. Kantoja kasvatettiin +37 °C:ssa, 4 h ajan, minkä jälkeen niistä mitattiin absorbanssi aallonpituuden ollessa 600 nm (BioPhotometer, eppendorf, 8,5 mm Light center, height Lichtstrahlhöhe). Absorbanssimittausten tuloksista laskettiin Kaavan 2 avulla, kuinka paljon kutakin näytteeseen tulevaa isäntäkantaa lisätään. Isäntäkannat lisättiin 4,5 ml:aan LB-lientä ja 1,5 ml:aan viemäriveresistä tehtyä seosta. Näitä näytteitä kasvatettiin yön yli ravistelussa lämpötilan ollessa 37 °C.

Yön yli kasvatusta seurasi näytteiden nopea sekoitus, minkä jälkeen lisättiin 200 µl kloroformia. Seuraava vaihe oli 20 min inkubaatio huoneenlämmössä kääntelyssä. Näytteet sentrifugoitiin olosuhteissa 5000 rpm, 10 min ajan, +4 °C:ssa (Jouan CR3). Näytteen ylempi, vesikerros suodatettiin 0,22 µm suodattimen läpi. Joukkoon lisättiin 1 ml 40 % sakkaroosia. Näytteelle tehtiin virustitraukset käyttämällä pisaramenetelmää (Luku 8.2.1). Testauksessa isäntäkantoina olivat ne kannat, joita rikastukseen oli käytetty. Näin saatiin selville löytyykö viemäriveresinäytteistä bakteriofageja, jotka infektoivat *A. baumannii*-kantoja.

8.2.4 Faagien tuotto

Bakteriofageja voidaan tuottaa joko liemessä tai maljalla. Tuotto perustuu bakteriofagin lisäämiseen isäntäkantansa joukkoon, jolloin faagi pääsee lisääntymään näissä soluissa ja niiden määrä näytteessä kasvaa. Tuotossa pyritään siis kasvattamaan jo olemassa olevan bakteriofagipartikkeleiden määrää, jolloin niistä kerättyä lyaattia voidaan hyödyntää tarpeen mukaan joko jatkotutkimuksia tai käyttöä varten.

Bakteriofageja tuotettiin nestekasvatuksena kasvattamalla isäntäbakteerikantaa 1,3 ml:ssä LB-elatuslientä n. 4 h ajan. Tämän jälkeen mitattiin bakteerikasvatuksen absorbanssi aallonpituudella 600 nm (BioPhotometer, eppendorf, 8,5 mm Light center, height Lichtstrahlhöhe). Absorbanssimittauksen perusteella laskettiin isäntäkannan tai isäntäkantojen määrä rikastusnäytteessä (Kaava 2).

Faagien tuotto tehtiin kolmella eri bakteeripitoisuudella. Isäntäkannan määrät olivat 50 µl, 100 µl ja 200 µl, minkä lisäksi näytteisiin lisättiin 50 µl rikastettavaa virusta ja bakteerien elatuslientä siten, että näytteen totaalitilavuus oli 5 ml. Näytettä kasvatettiin bakteerin optimikasvulämpötilassa yön yli ravistelussa. Inkuboinnin jälkeen näytteeseen lisättiin 200 µl kloroformia ja sen annettiin olla huoneenlämmössä ravistelussa 15–20 min ajan. Näytteessä oleva kuollut bakteerimassa sentrifugoitiin putken pohjalle olosuhteissa 5000 rpm, +4 °C ja 10 min (Jouan CR3). Fuugauksen jälkeen näytteen vesifaasi suodatettiin 0,22 µm suodattimen läpi eppendorf-putkeen.

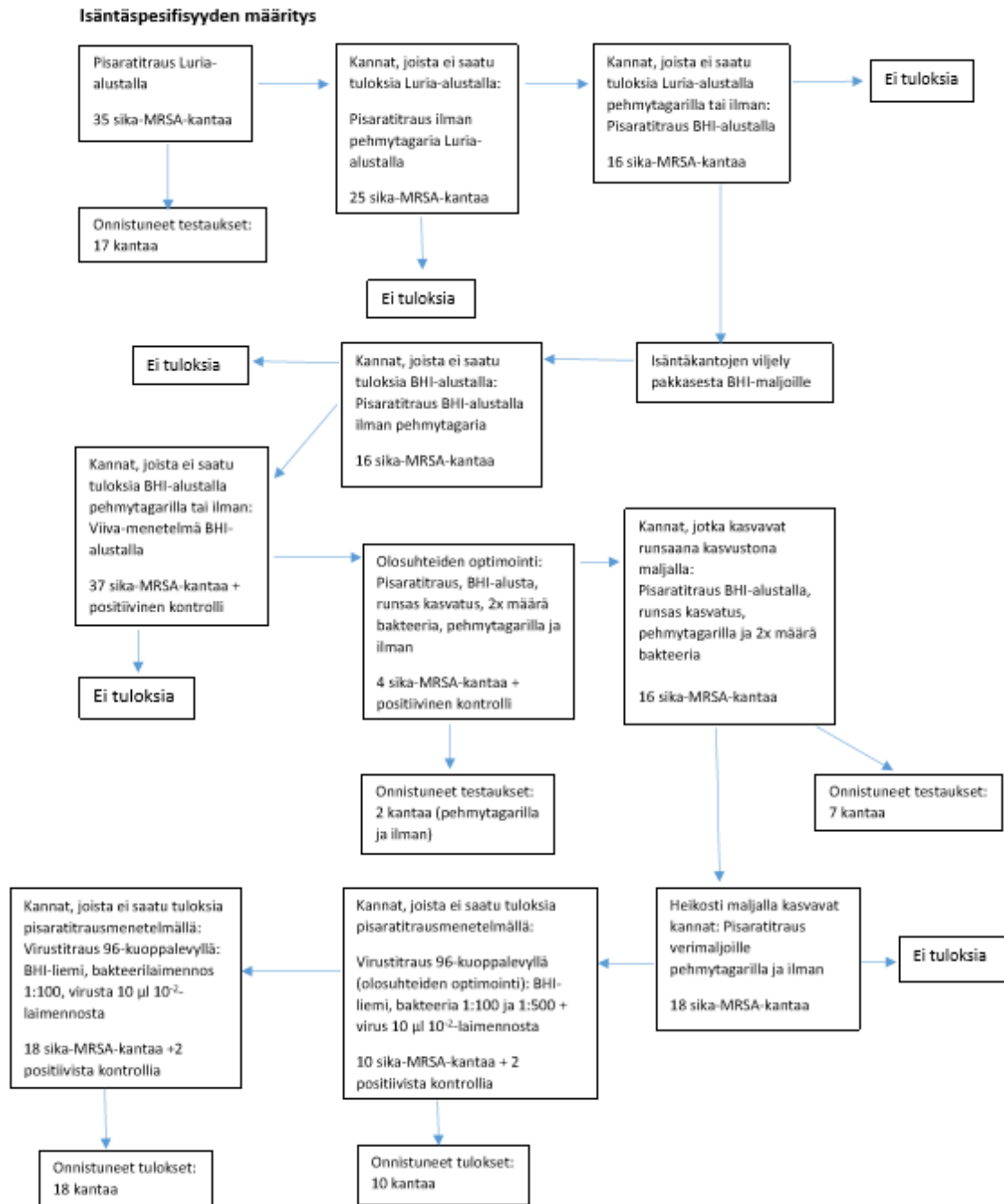
Bakteriofageja tuotettiin maljalla valmistamalla semikonfluentteja maljoja. Isäntäkannaksi valittiin bakteeri, jota faagi infektioi. Semikonfluentit maljat valmistettiin maljatitrausmenetelmällä (kappale 8.2.1). Näille maljoille pipetoitiin SM-puskuria 3 ml ja niiden annettiin olla 1-2 h huoneenlämmössä. Inkubaation jälkeen kaavittiin pehmyt agar-kerros irti agar-alustalta. Kaikki maljalla oleva neste pipetoitiin sentrifuugiputkeen, johon lisättiin kloroformia 200 µl/3 ml nestettä. Putkea käännettiin huoneenlämmössä 15–20 min ja sentrifugoitiin olosuhteissa 5000 rpm, 10 min (Jouan CR3). Erottunut supernatantti suodatettiin eppendorf-putkeen 0,22 µm suodattimen läpi. Jos haluttiin näytteestä säilyvää, siihen lisättiin 40 % sakkaroosia 8 % faagilysaatin tilavuudesta. Heikosti kasvavan faagilysaatin joukkoon ei tarvinnut lisätä sakkaroosia jos näyte analysoitiin lyhyen ajan kuluttua sen valmistamisesta. Tällöin voitiin tehdä virustitraus laimentamattomasta näytteestä, sillä muuten sakkaroosi saattaa inhiboida viruksen kasvua.

Jos faagilysaatissa ei ole riittävän korkea pitoisuus, voidaan sille tehdä konsentroidi. Näyte konsentroidiin ultrasentrifuugilla (DuPont Instruments, Sorvall RC-5B Refrigerated Suspenders Centrifuge). Ultrasentrifuugiputkeen lisättiin konsentroitavaa virusnäytettä 3,5 ml ja täytettiin putki TM-puskurilla pintaan asti ja tasapainotettiin vastaputken kanssa. Putkien tuli olla saman painoiset. Näyte ultrasentrifugoitiin olosuhteissa 40 000 rpm, 2h ja +4 °C. Fuugatusta näytteestä pipetoitiin 4,5 ml nestettä putken pinnalta pois ja pelletti liuotettiin jäljelle jääneeseen 0,5 ml puskuriliuosta.

9 Tulokset

9.1 MRSA-kantojen faagiherkkyys

MRSA-kantojen isäntäherkkyysmääriä lähdettiin tekemään pisaratitrausmenetelmällä. Verimaljoilta valittiin sioista eristettyjä MRSA-kantoja, jotka testattiin käyttäen kasvualustana LB-lientä, -agaria ja -pehmytagaria. Näytteet titrattiin kuten luvussa 8.2.1.. Titraukseen käytetyn fRu-Sau02-faagin pitoisuus oli $1,5 \times 10^{13}$ PFU/ml ja viruslysaatti oli valmistettu 22.3.2016. MRSA-kannoista 17 kannan isäntäherkkydet saatiin määritettyä. Lopuista 18 kannasta ei pystytty lukemaan tuloksia, sillä ne eivät muodostaneet tasaista bakteerimattoa agar-maljan pinnalle. Heikosti maljoilla kasvaville kannoille tehtiin määrittäminen kaksi kertaa (Menetelmä kuvattu luvussa 8.2.1). Saaduista tuloksista voitiin havaita, etteivät kaikki testattavista kannoista muodosta tasaista mattoa kasvatusmaljan pinnalle. Lähdettiin testaamaan millaisissa olosuhteissa sioista eristetyille MRSA-kannoille voidaan tehdä bakteriofaagiherkkyysmääriä pisaramenetelmällä. Työskentelyn eteneminen on esitetty kuvassa 1.



Kuva 1. fRu-Sau02-faagin isäntäspesifisyyden määrittämisen eteneminen. fRu-Sau02-faagin isäntäspesifisyyden määrittämisessä lähdettiin liikkeelle käyttäen pisaratitrausmenetelmää ja kasvualustana Luria-elatusainetta. Tällä menetelmällä ei kuitenkaan saatu tuloksia kaikista sioista eristetyistä MRSA-kannoista, joten työskentelyä jatkettiin kokeilemalla millaisissa olosuhteissa MRSA-kantojen herkkyysmäärittämisen tuloksia pystytään lukea. Työskentelyssä edettiin testaamalla onko pehmytagar häiritsevä tekijä, josta siirryttiin rikkaampiin kasvatusalustoihin ja lopulta isäntäspesifisyyden määrittämisen toteuttamiseen nestekasvatuksena 96-kuoppalevyllä.

Ne kannat, joista ei saatu tuloksia vähäisen kasvun vuoksi LB-maljoilla, titrattiin uudestaan jättäen menetelmästä pois LB-pehmytagarin. Näin voitiin selvittää onko syynä pehmytagar, joka estäisi kantojen kasvun. Yhdestäkään kannasta ei saatu tällä menetelmällä tuloksia. Kasvua ei ollut ollenkaan lukuun ottamatta muutamia yksittäisiä pesäkeitä. Testi tehtiin kaksi kertaa, mutta kannat kasvoivat niin heikosti, ettei tuloksia saatu määritettyä kummallakaan kerralla.

Kannat joiden herkkyysmääritykset eivät onnistuneet LB-alustalla, testattiin uudestaan BHI-elatusaineella. LB-alusta saattaa olla liian ravintoköyhä, jotta nämä MRSA-kannat kasvaisivat siinä. Näytteet titrattiin käyttäen pisaramenetelmää, kuten luvussa 8.2.1. Yksikään testatuista kannoista ei kasvanut. Selvitettiin onko syynä liian pitkään samoilla maljoilla olleet näytebakteerit ja viljeltiin ne uudestaan pakkasesta BHI-maljoille. Testi toistettiin, mutta tälläkään kerralla isäntäbakteerit eivät kasvaneet. BHI-agarilla kokeiltiin myös saada tuloksia viivamenetelmällä, jokaisesta kannasta kasvatetusta bakteerisuspensiosta vedettiin BHI-agarille noin 3 mm levyinen viiva. Bakteeriviivojen annettiin kuivua ja pipetoitiin 10 µl pisara 10⁻²-laimennettua virusta viivalle (fRu-Sau02 1,5x10¹³ PFU/ml, valmistettu 22.3.2016). Positiivisina kontrollikantoina käytettiin MRSA-kantaa 13KP11088/1. Tuloksia ei pystytty lukemaan, bakteerien leviämisen ja ylikasvun tai liian vähäisen kasvun vuoksi. Edes positiivisesta kontrollikannasta ei kyetty lukemaan tulosta. Seuraavaksi pyrittiin optimoimaan virustitrauksessa käytettyjä olosuhteita eli bakteerien määrää ja kasvusaikaa. Valittiin neljä MRSA-kantaa (7605_6_10P, 7936_6_10, 1724_6_10, 1724_11_15) ja otettiin käyttöön positiivinen kontrolli eli kanta, joka infektoituu bakteriofagi fRu-Sau02:lla. Positiivisena kontrollina käytettiin humaani-MRSA-kantaa 13KP11088/1. Sioista eristetyt MRSA-kannat valittiin siten, että kaksi niistä kasvoi hyvin BHI-alustalla, kun ne oli viljelty pakkasesta ja kaksi siten, että niiden kasvu oli heikkoa (Taulukko 3).

Taulukko 3. Maljaitrausmenetelmän optimointiin valitut sioista eristetyt MRSA-kannat

Kanta	Kasvu
7605_6_10P	Runsas kasvu
7936_6_10	Runsas kasvu
1724_6_10	Heikko kasvu
1724_11_15	Heikko kasvu

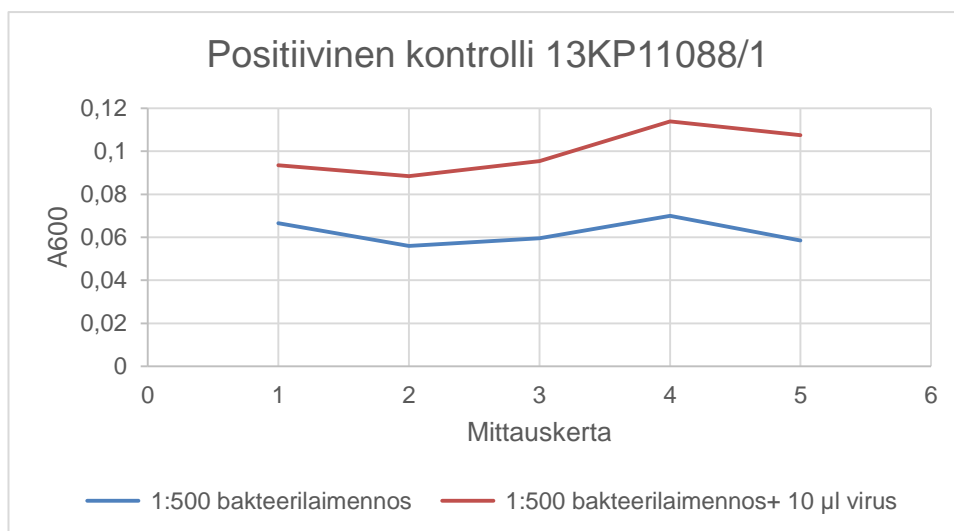
Jokainen valittu bakteerikanta, sekä positiivinen kontrolli titrattiin pisaramenetelmällä pehmytagarilla ja ilman käyttäen kasvualustana edelleen BHI:a. Poikkeuksena aikaisempiin menetelmiin näitä bakteereita kasvatettiin pitkään 3 h ajan, jotta bakteerikasvusto olisi mahdollisimman runsasta. Tämän jälkeen pehmytagarin kanssa tehdyille titrauksille, maljalle pipetoidun bakteerimassan määrä laskettiin kuten kaavalla 1, mutta saatu määrä kerrottiin vielä kahdella.

Optimoinnin tuloksena runsaskasvuisista kannoista 7605_6_10P ja 7936_6_10 saatiin luettua tulokset molemmilla menetelmillä, sekä pehmytagarilla että ilman. Myös positiivisesta kontrollista saatiin molemmilla menetelmillä oikea tulos, eikä näiden kolmen kannan kasvussa ollut ongelmia. Kasvatusalustalla heikosti kasvavat kannat 1724_6_10 ja 1724_11_15 eivät antaneet tuloksia pehmytagarilla tai ilman pehmytagaria tehdyillä titrauksilla. Kannat eivät muodostaneet tasaista bakteerimattoa kasvatusalustan pinnalle. Niiden kasvatusaikaa pidennettiin 24 h, mutta niiden faagiherkkyttä ei saatu määritettyä. Voitiin siis havaita, että kantoja jotka kasvavat runsaana kasvustona maljalla pakkasesta viljelyn jälkeen, voidaan testata tällä menetelmällä. Runsaasta bakteerimäärää ja pidennettyä kasvatusaikaa käyttämällä saatiin faagiherkkyys määritettyä vielä kannoista 1057_11_15, 7936_16_20, 7502_1_5P, 6161_1_5, 7605_16_20, 1333_6_10, 7594_1_5 (Liite 2). Kantojen, joista ei ole saatu tuloksia LB-elatusaineessa tai BHI-elatusaineessa, faagiherkkyysmääritykset päätettiin kokeilla tehdä BHI-elatusainetta rikkaammalla alustalla, niiden heikon kasvun vuoksi. Kasvualustaksi valittiin veriagar.

Veriagarin käyttö kasvatusalustana ei myöskään antanut tuloksia. Isäntäkantojen kasvatukseen liemessä ja pehmytagarina käytettiin BHI:a. Veriagarin käyttö ei kuitenkaan tuottanut tuloksia pehmytagarilla tai ilman tehdyissä testeissä. Ensinnäkin maljan tumma väri vaikeutti tulosten lukua ja toiseksi kannat kasvoivat yksittäisinä pesäkkeinä maljalla, eivätkä tasaisena mattona.

Maljtitraus-menetelmällä vain pieni osa MRSA kantojen herkkyysmäärityksistä saatiin tehtyä. Loput kannoista, joita ei saatu määritettyä, testattiin 96-kuoppalevyllä (Menetelmä kuvattu kappaleessa 8.2.1). Voitiin todeta, että faagiherkkyden selvittämiseen parhaimmat olosuhteet olivat, kun käytettiin bakteereista 1:100 laimennosta ja 10 µl 10⁻² viruslaimennosta. Tulosten luotettavuus varmistettiin tekemällä kolme rinnakkaismääritystä jokaisesta näytteestä. Kun bakteereita laimennettiin 1:500, bakteerisoluja ei ollut tarpeeksi, jotta ne olisivat lähteneet kunnolla kasvamaan. Tällöin ilman virusta olevien

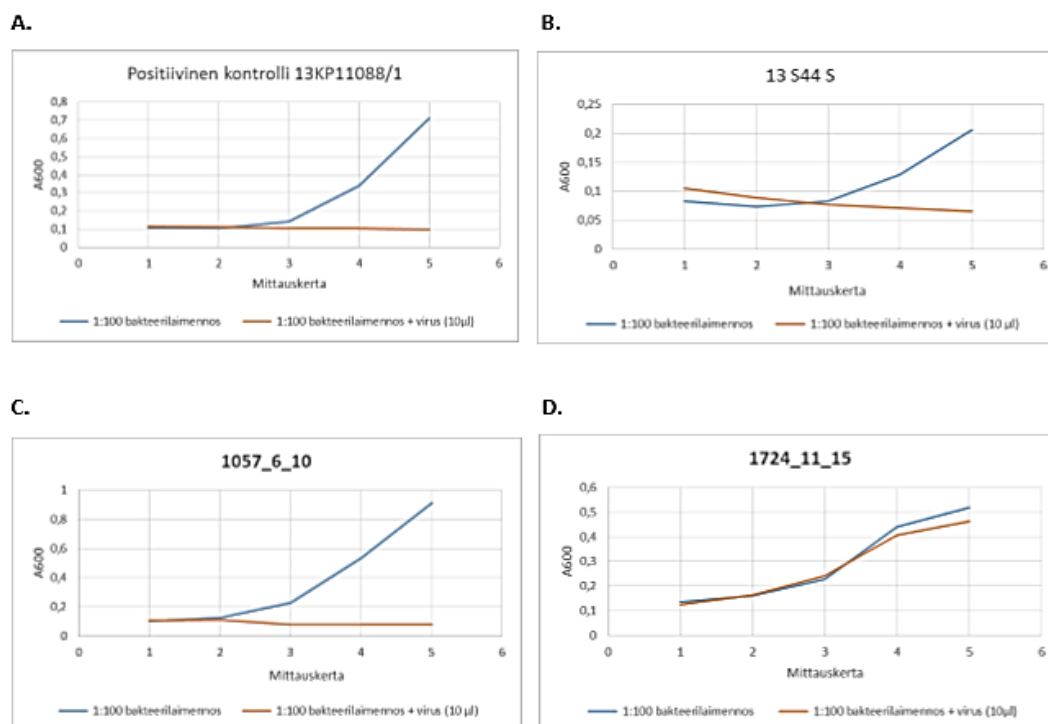
näytteiden ja virusta sisältävien näytteiden kasvun välillä ei ollut havaittavaa eroa jolloin tuloksia ei voida pitää luotettavina (Kuva 2).



Kuva 2. 96-kuoppalevytitrauksesta saatu kasvukäyrä positiiviselle kontrollibakteerille bakteerilaimennoksen ollessa 1:500.

Pystyakselilta voidaan seurata bakteerin kasvua absorbanssimittausten perusteella, mittauksiin käytettiin aallonpituutta 600 nm. Vaaka-akselilla on puolestaan kuvattu mittauskertoja, ensimmäinen mittaus tehtiin ennen näytteiden kasvatuksen aloitusta ja näytteitä mitattiin 1 h välein. Absorbanssi nousee vain vähän kasvatuksen aikana ja laskee viimeisen mittauksen aikana suunnilleen samalle tasolle kuin ennen kasvatuksen aloittamista. Kuvasta voidaan siis havaita, ettei bakteeri ole lähtenyt kasvamaan kunnolla.

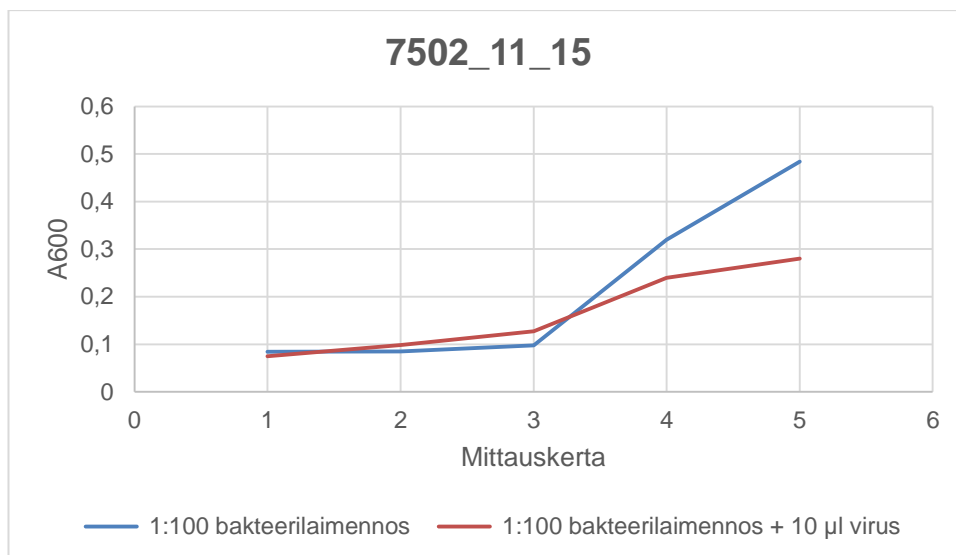
Positiivisina kontrolleina käytetyt humaani-MRSA-kannat 13KP11088/1 ja 13 S44 S toimivat. Faagin lisäys esti kasvun selkeästi bakteerilaimennoksen ollessa 1:100 ja tutkituista MRSA-kannoista saatuja tuloksia voitiin hyvin verrata näihin (Kuva 3).



Kuva 3. 96-kuoppalevyllä nestekasvatuksena fRu-Sau02-bakteriofagille tehtyjen isäntäspesifisyyssmääritysten tuloksia.

Kuvassa A. ja B. on esitetty positiivisina kontrolleina käytettyjen humaan-MRSA-kantojen 13KP11088/1 (A) ja 13 S44 S (B) antamat tulokset isäntäspesifisyyssmäärityksestä. Kuvista C. ja D. voidaan havaita kahden tutkittavan sioista eristetyin MRSA-kannan antamia tuloksia isäntäspesifisyyssmäärityksestä. Kuvassa C. esitetty kanta infektoituu faagilla fRu-Sau02. Kuvan D. kanta ei puolestaan infektoitu. Pystyakselilta voidaan seurata bakteerin kasvua absorbanssimittausten perusteella, mittauksiin käytettiin aallonpituutta 600 nm. Vaaka-akselilla on puolestaan kuvattu mittauskertoja, ensimmäinen mittaus tehtiin ennen näytteiden kasvatuksen aloitusta ja näytteitä mitattiin 1 h välein.

Negatiivisena kontrollina käytettiin BHI-lientä ja se antoi tasaisen absorbanssikäyrän. Menetelmällä saatuja tuloksia voidaan siis näin ollen pitää luotettavina. 96-kuoppalevy-menetelmällä voitiin myös havaita jos kannat infektoituivat fRu-Sau02-bakteriofagilla, mutta sietivät sen läsnäoloa, siten etteivät ne infektoituneet täydellisesti. Bakteeri oli lähtenyt kasvamaan bakteriofagin läsnäolosta huolimatta, mutta sen kasvu ei ollut yhtä runsasta kuin näytteessä, johon faagia ei oltu lisätty (Kuva 4).



Kuva 4. 96-kuoppalevyllä nestekasvatuksena tehty isäntäherkkyysmääritys sioista eristetyille MRSA-kannalle 7502_11_15, joka ei infektoitu täysin bakteriofagi fRu-Sau02:lla. Pystyakselilta voidaan seurata bakteerin kasvua absorbanssimittausten perusteella, mittaukseen käytettiin aallonpituutta 600 nm. Vaaka-akselilla on puolestaan kuvattu mittauskertoja, ensimmäinen mittaus tehtiin ennen näytteiden kasvatuksen aloitusta ja näytteitä mitattiin 1 h välein.

Kaikista MRSA-kannoista, joita oli yhteensä 54, 33 % infektoitui, mikä tarkoittaa että 18 kantaa infektoituu ja 33 ei infektoitu. Tämän lisäksi havaittiin kolmella kannalla kasvun hidastumista faagin läsnä ollessa, mutta bakteerit eivät infektoituneet täysin (Liite 1). Isäntäspesifisyyshmääritykset onnistuivat parhaiten nestekasvatuksena 96-kuoppalevyllä, sillä maljattitruuksissa oli huomattavia vaikeuksia saada isoa osaa kannoista muodostamaan tasaista bakteerimattoa kasvatusalustan pinnalle. Myös ne kannat, jotka eivät kasvaneet maljoilla saatiin testattua 96-kuoppalevymenetelmällä. Kaikki LB- ja BHI-elatusaineissa testatut kannat kasvoivat liemessä, vaikei agar-maljalla voitu havaita kasvustoa juuri ollenkaan. Tämän havainnon vuoksi 96-kuoppalevymenetelmä otettiin käyttöön. Huomiota herättää myös se, että kaikki samoilta sikatiloilta eristetyt bakteerikannat eivät anna samanlaisia tuloksia isäntäherkkyysmäärityksistä. Esimerkiksi MRSA-kanta 1333_1_5 infektoituu fRu-Sau02-faagilla, mutta kannat 1333_6_10 ja 1333_11_15 eivät.

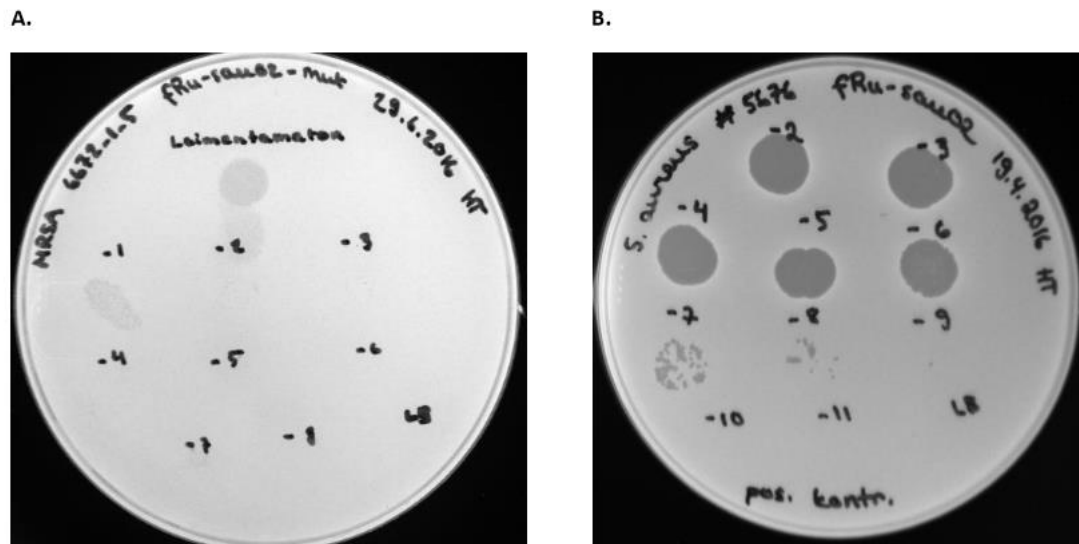
9.2 Mutatoituneiden faagien seulonta fRu-Sau02-faagilysaatista

Mutatoituneiden bakteriofaagien seulonnalla pyrittiin laajentamaan fRu-Sau02-faagin isäntäspesifisyyttä ja tuloksia lähdettiin tarkastelemaan tekemällä virustitruukset kahdesta näytteestä. Näytteet titrattiin käyttämällä isäntäkantoina rikastukseen käytettyjä kantoja, jotta nähdään onko mutaatioita tapahtunut ja infektoituvatko kannat, jotka eivät aiemmin infektoituneet (Taulukko 4).

Taulukko 4. Mutatointinäytteen tuottamiseen käytetyt isäntäkannat

Näyte 1	Näyte 2
0186_6_10	0186_11_15
0186_11_15	5105_6_10
6672_1_5	6672_1_5
5105_6_10	0250_16_20

Rikastukseen käytetyistä isäntäkannoista ainoastaan 0250_16_20 infektoitui alkuperäisellä fRu-Sau02-faagilla. Tämä toimi myös positiivisena kontrollina. Titrauksissa voitiin havaita, että MRSA-kanta 6672_1_5 infektoitui heikosti mutaationäytteellä 1 (Kuva 5).



Kuva 5. fRu-Sau02-faagin isäntäspesifisyyden laajentamistestissä havaitut virusplakit. Kuvassa A. näkyy fRu-Sau02-faagin mutaationäytteestä saadut virusplakit. Kuvassa B. on esitetty alkuperäinen fRu-Sau02 positiivisessa kontrollikannassa 13KP11088/1.

Seulonnan toisen ja kolmannen vaiheen faagiseulonnanäytteet titrattiin positiiviselle kontrollikannalle. Näissä titrauksissa käytettiin laimentamattomia näytteitä. Kumpikaan niistä

ei kuitenkaan infektoitunut. Jatkotutkimuksia varten mutatoitunutta fRu-Sau02-faagia yritettiin tuottaa isäntäkannassa 6672_1_5 sekä maljoilla, että nesterikastuksena. Kummallakin menetelmällä viruslysaatin faagipitoisuus ei noussut jatkotutkimusten vaatimiin pitoisuuksiin. Nesterikastukset valmistettiin kolmella eri faaginäyte-tilavuudella, eikä saaduissa viruspitoisuuksissa ollut huomattavia eroavaisuuksia. Nesterikastuksessa korkein saatu viruspitoisuus oli $1,2 \times 10^5$ PFU/ml. Maljarikastus toimi paremmin kuin nesterikastus, vaikka viruskonsentraatio jäi myös tässä liian matalaksi. Maljarikastuksessa eniten viruksia saatiin, kun pipetoitiin 20 µl virusta maljalle yhteensä kymmenen pisaraa, jolloin tiitteri nousi $3,6 \times 10^6$ PFU/ml.

Lopputuloksena voidaan sanoa, että tässä mutaationäytteessä kasvoi virusta. Heikon elinkyvyn vuoksi jatkotutkimuksia ei pystytty tekemään, eikä virusta saatu tuotettua tarpeeksi DNA-eristystä varten. Eristetty DNA olisi ajettu agaroosigeelillä ja sen DNA olisi sekvensoitu, jolloin voitaisiin tunnistaa, mikä virus on kyseessä. Saaduista tuloksista ei saada selville mikä bakteriofagi oli kyseessä, mahdollisia vaihtoehtoja on kuitenkin mutaatio, kontaminaatio tai lauhkean elinkierron omaava virus, joka infektoi isäntäkantaa heikosti, muttei tapa bakterikasvustoa täysin. Positiivisena käytetty MRSA-kanta 0250_16_20 ei infektoitunut seulontanäytteellä.

9.3 Viruseristysten tulokset

Sairaaloiden viemäri-vesinäytteistä eristettiin viruksia rikastamalla näytteitä isäntä *A. baumannii* -kannoissa. Viruksia etsittiin kappaleessa 8.2.3 kuvatulla menetelmällä. Jätevesistä valmistettiin 4 näytettä, käyttäen isäntäkantoina kolmea tai neljää sairaaloista eristettyä *A. baumannii*-kantaa (Taulukko 5).

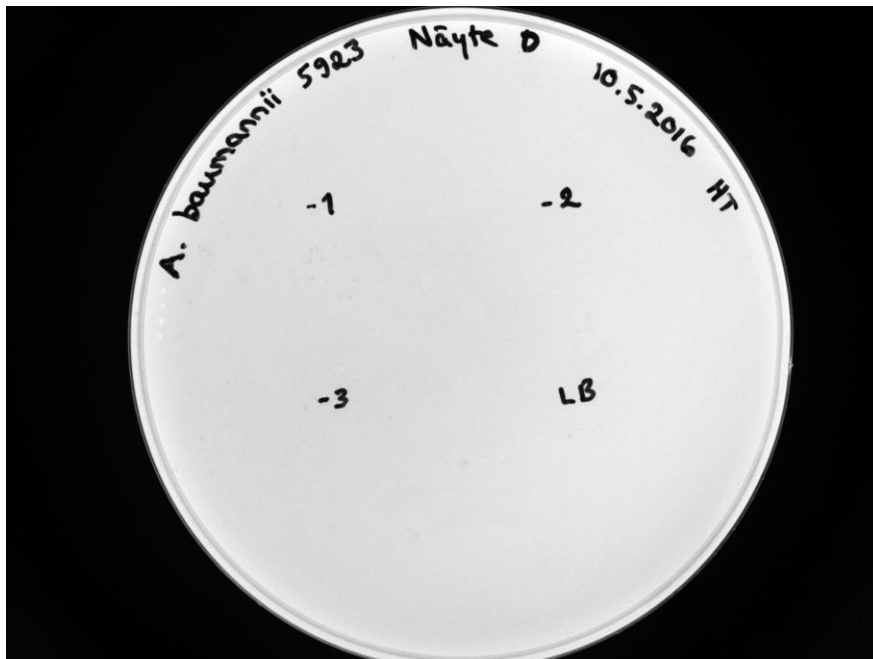
Taulukko 5. Sairaalahätevesinäytteiden rikastuksiin käytetyt *A. baumannii*-isäntäkannat.

Faagien numerointi perustuu Skurnik-laboratorion kantakokoelman numerointiin

	Isäntäkanta
Näyte A	#5542
	#5563
	#5570
	#5596
Näyte B	#5597
	#5706
	#5707
	#5729

Näyte C	#5730
	#5731
	#5907
	#5910
Näyte D	#5911
	#5919
	#5920
Näyte E	#5923
	#5924
	#5933

Jokainen näyte titrattiin, jotta nähdään onko siellä virusta, joka infektoisi isäntäkantoja. Määritykset suoritettiin siten, että jokainen näyte titrattiin käyttäen isäntäkantoina niitä bakteereita, joita viemäriveresinäytteiden rikastukseen oli käytetty. Näytteet titrattiin pisa-ramenetelmällä kuten luvussa 8.2.1. Jätevesinäytteistä valmistettiin laimennokset 10^{-1} – 10^{-3} . Näyte D titrattiin myös käyttämällä isäntäkantana *A. baumannii* #5923, #5924 ja #5933. Maljassa jossa oli isäntäkantana *A. baumannii* #5923 ja virusnäytteenä näyte D, voitiin havaita heikkoa viruskasvustoa (Kuva 6)



Kuva 6. *A. baumannii* -kanta #5923:ssa havaitut, sairaalajätevesinäytteestä D peräisin olevat, virusplakit

Virusnäytettä D lähdettiin rikastamaan kannoissa #5911, #5919 ja #5920. Nesterikastus tehtiin kuten kappaleessa 8.2.4. Tähän näytteeseen ei lisätty sakkaroosia, jotta heikkokin

viruskasvusto voitaisiin havaita. Näyte titrattiin pisaramenetelmällä rikastukseen käytettyjen *A. baumannii*-kantojen ollessa isäntäbakteerina. Näistä titrauksista ei voitu havaita viruskasvustoa yhdelläkään maljoista. Uudelleenrikastetusta näytteestä D käytettiin näihin määrittelyihin laimennoksia 10^{-1} – 10^{-3} . Toistettaessa testi laimentamattomalla näytteellä saatiin jälleen näkyviin heikkoja plakkeja kannassa #5923. Jotta saataisiin bakteriofagin läsnäolo varmistettua ja sen pitoisuus kasvatettua rikastettiin näyte kannassa #5923. Nesterikastus tehtiin kolmella eri isäntäkantapitoisuudella, jotka olivat 50 µl, 100 µl ja 200 µl, eikä näytteisiin lisätty sakkaroosia. Näytteet titrattiin pisaramenetelmällä käyttäen isäntäkantaa #5923, jonka liemikasvatuksesta tehtiin laimennokset 1:2, 1:3 ja laimentamaton näyte. Heikkoja plakkeja havaittiin virusnäytteestä, jonka rikastukseen oli käytetty 50 µl isäntäkantaa. Tämä näyte konsentroidiin kuten luvussa 8.2.4., mutta virusplakkeja ei voitu havaita uudestaan.

Näytteestä D valmistetuista rikastuksista voitiin aluksi havaita pientä viruskasvustoa. Kasvusto oli kuitenkin hyvin heikkoa. Osassa titrauksista ei voitu havaita mitään kasvustoa ja havaitut virusplakit olivat hyvin heikkoja. Näistä tuloksista voitiin todeta, ettei sairaaloiden viemäriveresinäytteistä löytynyt bakteriofageja, jotka olisivat käyttökelpoisia, elilyttisiä ja elinkykyisiä, faagiterapiaa varten.

10 Yhteenveto

fRu-Sau02-faagin isäntäherkkyysmäärittelyksistä saadut tulokset kertovat, että pääosin eläimiä infektoivat MRSA-kannat poikkeavat ominaisuuksiltaan huomattavasti humaani-kantoihin nähden. Projektin alussa oletus oli, että fRu-Sau02 infektoisi sioista eristettyjä MRSA-kantoja suunnilleen samalla tapaa, miten se infektoi ihmisistä eristettyjä kantoja. Tämä tarkoittaisi sitä, että sioista eristetyillä MRSA-kannoilla olisi bakteerisolujen pinnalla hyvin samankaltaisia pintarakenteita kuin humaani-MRSA-kannoillakin. Isäntäherkkyysmäärittelyksistä saaduista tuloksista voidaan kuitenkin todeta, että sioista eristetyistä MRSA-kannoista vain suhteellisen pieni osa infektoitu fRu-Sau02-viruksella. Humaani-MRSA-kannoilla prosenttiosuus on merkittävän paljon suurempi. Yli 90 % tutkituista *S. aureus*-kannoista, jotka on eristetty ihmisistä, infektoituu (Wicklund ym.). fRu-Sau02-faagi ei tunnista pintarakenteita suurimmasta osasta sioista eristetyistä MRSA-kannoista, eivätkä siksi voi kiinnittyä ja infektoida näitä kantoja. fRu-Sau02-faagi on kuitenkin

potentiaalinen virus käytettäväksi sioista eristettyjen MRSA-kantojen aiheuttamien infektioiden hoitoon, mutta se ei yksinään riitä. Vaaditaan useamman faagin seos, jotta fRu-Sau02-faagia voidaan hyödyntää tähän tarkoitukseen.

Olennaista tämä tieto on faagiterapian kannalta, kun siitä kehitetään käytännössä toimivaa hoitomuotoa, jota voidaan soveltaa samoihin kohteisiin kuin antibioottejakin. Saatu tulos kertoo millaisia asioita tulee ottaa huomioon, jotta faagiterapiaa voidaan käyttää potilailla infektioiden hoidossa ja niiden leviämisen ehkäisyssä mahdollisimman tehokkaalla tavalla. Tässä edellytyksenä on sellaisen bakteriofaagin käyttö, joka infektoi suuren osan kohdeisäntäkannoista, jolloin hyöty on mahdollisimman suuri. fRu-Sau02-faagin seulonta ei tuottanut faagia, jonka isäntäkirjo on laajempi. Testausten aikana voitiin havaita plakkeja, jotka olivat peräisin mutaationäytteestä. Tästä voidaan päätellä, että joko virus on mutatoitunut niin, ettei se enää infektoi tätä kantaa tai sitten näytteissä havaittu virus ei ole mutaatio, eikä kyseistä kantaa infektoiva virus. Näytteessä kasvaneesta viruksesta ei ole sen huonon elinkyvyn vuoksi hyötyä faagiterapiassa. Toimivampi ja varmempi tapa tuottaa laajalti eri sioista eristettyjä MRSA-kantoja infektoivaa virusta on valmistaa useamman eri bakteriofaagin seos, mikä todennäköisimmin edellyttäisi uusien *S. aureus*-faagien löytymistä.

Tutkimusta voitaisiin mahdollisesti jatkaa etsimällä uusia bakteriofageja isäntäbakteerien elinympäristöstä. fRu-Sau02-faagin tilalle tai rinnalle olisi hyvä löytää uusia viruksia, jotta faagiterapiatutkimusta voitaisiin kehittää eteenpäin. Kehittämistä vaatii myös MRSA-kantojen kasvuolosuhteiden ja niille tehtävän virustitrauksen olosuhteiden optimointi. Projektin aikana tasaisen bakteerimaton aikaansaaminen agar-maljalla onnistui vain pienellä osalla kannoista. Maljtitrausmenetelmä on hyvä ja faagiterapia-tutkimuksen kannalta hyödyllinen menetelmä, sillä isäntäspesifisyyden määrittämisen lisäksi sen avulla voidaan laskea viruspitoisuus näytteessä. Viruspitoisuus on olennainen tieto, jotta saadaan selville kuinka faagi rikastuu ja onko sitä tarpeeksi tuotteessa/näytteessä puhdistusta ja hoitotuotteena käyttöä varten. Tämä myös omalta osaltaan auttaa varmistamaan hoitotuotteen toimivuuden. Viruskasvatus kuoppalevyllä on helppo ja nopea tapa määrittää tutkittavan bakteriofaagin isäntäkantoja. Erona maljtitraukseen on se, ettei kuoppalevyllä voida määrittää viruspitoisuuksia, jolloin testistä saatu tiedon määrä on pienempi ja jatkotutkimuksia jouduttaisiin tekemään titrauksen lisäksi. Seulonnan aikana on mahdollista, että fRu-Sau02 ei lähtenyt rikastumaan käytetyissä olosuhteissa. Maljoilla nähty heikko viruskasvu voi mahdollisesti olla kontaminaatio, jolloin työskentely ei ole ollut täysin steriiliä.

Työssä tutkittujen MRSA-kantojen heikko kasvu on mahdollisesti häirinnyt luotettavien tulosten saamista. Vaikka kaikki vaikeastikin kasvavat bakteerit saatiin testattua lopulta kuoppalevymenetelmällä, osa kannoista kasvoi heikosti jopa liemessä huolimatta siitä että virusta ei lisätty näytteeseen. Tuloksista on kuitenkin mahdollista vertailla bakteerien kasvua virusta sisältävien näytteiden ja pelkkien bakteerinäytteiden välillä. Näitäkin tuloksia voidaan siten pitää luotettavina.

A. baumannii -kantoja infektoivia viruksia ei löytynyt. Testausten aikana havaituista plakkeista voidaan todeta, että kyseessä saattaa olla joku heikosti infektoiva tai elinkykyinen virus. Toinen mahdollisuus on, että maljoilla pehmytagar on ehtinyt hieman jähmettyä ennen sen levittämistä agar-alustalle, ja bakteerikasvuston epätasaisuus ja virusten aiheuttamiksi luullut plakit ovatkin vain jähmettynyttä pehmytagaria. Projekti ei sinällään edistänyt faagiterapiatutkimusta, sillä bakteriofageja ei löytynyt viemäriveresinäytteistä. Se kuitenkin omalta osaltaan osoittaa kuinka hankalaa näitä faageja on löytää. Tutkimusta olisi kuitenkin voinut jatkaa etsimällä uusista lähteistä lisää bakteriofageja. Sairaaloista voitaisiin esimerkiksi kerätä lisää viemäriveresinäytteitä, sillä se on *A. baumannii*in yksi elinympäristö, joten mahdollisuus faagien löytämiseen on suuri kyseisestä paikasta. Tutkimuksen jatkuminen on kannattavaa antibioottiresistenttien *A. baumannii* -kantojen aiheuttaman uhan vuoksi. Uuden faagin löytymisen jälkeen sen rikastus ja elinkyvyn selvittäminen ja DNA-sekvensointi ovat seuraavia vaiheita, jotta faagi saadaan tunnistettua ja sen ominaisuuksista saadaan lisää tietoa. Tärkeää on nimittäin selvittää bakteriofagin elinkierto, sillä ainoastaan lyyttiset faagit ovat kiinnostavia faagiterapian kannalta. Projektin aikana ei kuitenkaan päästy näin pitkälle. Näistä tuloksista todettiin, ettei viemäriveresistä löytynyt viruksia, jotka infektoisivat *A. baumannii*-kantoja.

Kaiken kaikkiaan opinnäytetyön käytännön osuudesta saatiin tuloksia, joita voidaan pitää luotettavina. Projekti oli osa laajempaa tutkimusta. Tämän työn perusteella on todettu, että uusia *S. aureus*-spesifisiä bakteriofageja tarvitaan. Saatujen tulosten pohjalta tutkimustyö faagiterapia tutkimusryhmässä jatkuu faagiterapian kehittämiseksi ja uusia faageja on lähdetty eristämään sikatiloilta kerätyistä näytteistä.

Lähteet

Abedon, Stephen T., Sarah J. Kuhl, Bob G. Blasdel ja Elizabeth Martin Kutter. *Phage Treatment of Human Infections*. Bacteriophage. Landes Bioscience, 3-4/2011. Verkkodokumentti. 30.9.2016. <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3278644/>>.

Alanis, A. J. *Resistance to Antibiotics: Are We in the Post-antibiotic Era?* National Center for Biotechnology Information. U.S. National Library of Medicine, 11/12 2015. Verkkodokumentti. 10.10.2016. <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pub-med/16216651?dopt=Abstract>>.

Blair, Jessica M. A., Mark A. Webber, Alison J. Baylay, David O. Ogbolu, ja Laura J. V. Piddock. *Molecular Mechanisms of Antibiotic Resistance*. Nature Reviews Microbiology, 1.12.2014. Verkkodokumentti. 6.9.2016. <<http://www.nature.com/nrmicro/journal/v13/n1/full/nrmicro3380.html>>.

Bush, Karen, Patrice Courvalin, Gautam Dantas, Julian Davies, Barry Eisenstein, Pentti Huovinen, George A. Jacoby, Roy Kishony, Barry N. Kreiswirth, Elizabeth Kutter, Stephen A. Lerner, Stuart Levy, Kim Lewis, Olga Lomovskaya, Jeffrey H. Miller, Shahrar Mobashery, Laura J. V. Piddock, Steven Projan, Christopher M. Thomas, Alexander Tomasz, Paul M. Tulkens, Timothy R. Walsh, James D. Watson, Jan Witkowski, Wolfgang Witte, Gerry Wright, Pamela Yeh, ja Helen I. Zgurskaya. *Tackling Antibiotic Resistance*. Nature Reviews. Microbiology. U.S. National Library of Medicine, 2.11.2011. Verkkodokumentti. 6.9.2016. <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4206945/>>.

Calendar, Richard. *The Bacteriophages*. 2. painos. Oxford: Oxford UP, 2006.

Chan, Benjamin K., Stephen T. Abedon ja Catherine Loc-Carrillo. *Phage Cocktails and the Future of Phage Therapy*. Future Medicine. Future Microbiology, 6/2013. Verkkodokumentti. 19.10.2016. <http://www.futuremedicine.com/doi/abs/10.2217/fmb.13.47?url_ver=Z39.88-2003&rfr_id=ori%3Arid%3Acrossref.org&rfr_dat=cr_pub%3Dwww.ncbi.nlm.nih.gov>.

Clokie, Martha R.J., Andrew D. Millard, Andrey V. Letarov ja Shaun Heaphy. *Phages in Nature*. Bacteriophage. Landes Bioscience, 2011. Verkkodokumentti. 20.9.2016. <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3109452/>>.

Cunha, Burke A. *Acinetobacter: Background, Pathophysiology, Epidemiology*. Medscape, 15.3.2016. Verkkodokumentti. 25.7.2016. <<http://emedicine.medscape.com/article/236891-overview>>.

Davies, Julian, ja Davies, Dorothy. *Origins and Evolution of Antibiotic Resistance*. MICROBIOLOGY AND MOLECULAR BIOLOGY REVIEWS 74.3 (2010): 417-33. NCBI. Verkkodokumentti. 12.8.2016. < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC2937522/>>.

Dinges, Martin M., Paul M. Orwin, ja Patrick M. Schlievert. *Exotoxins of Staphylococcus Aureus*. Clinical Microbiology Reviews. American Society for Microbiology, 1/2000. Verkkodokumentti. 11.10.2016. <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC88931/>>.

Drulis-Kawa, Zuzanna, Grażyna Majkowska-Skrobek, Barbara Maciejewska, Anne-Sophie Delattre ja Rob Lavigne. *Learning from Bacteriophages - Advantages and Limitations of Phage and Phage-Encoded Protein Applications*. Current Protein & Peptide Science. Bentham Science Publishers, 12/2012. Verkkodokumentti. 19.10.2016. <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3594737/>>.

Drulis-Kawa, Zuzanna, Grazyna Majkowska-Skrobek ja Barbara Maciejewska. *Bacteriophages and Phage-Derived Proteins – Application Approaches*. Current Medicinal Chemistry. Bentham Science Publishers, 5/2015. Verkkodokumentti. 16.9.2016. <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4468916/>>.

Dzidic, Senka, Jagoda Suskovic, ja Blazenka Kos. *Antibiotic Resistance Mechanisms in Bacteria: Biochemical and Genetic Aspects*. Food Technol. Biotechnol 46.1 (2008): 11-21. FTB. PUBMET, 2008. Verkkodokumentti. 5.9.2016. <<http://www.ftb.com.hr/index.php/archives/70-volume-46-issue-no-1/291>>.

Fournier, Pierre-Edouard, David Vallenet, Valérie Barbe, Stéphane Audic, Hiroyuki Ogata, Laurent Poirel, Hervé Richet, Catherine Robert, Sophie Mangenot, Chantal Abbergel, Patrice Nordmann, Jean Weissenbach, Didier Raoult ja Jean-Michel Claverie. *Comparative Genomics of Multidrug Resistance in Acinetobacter Baumannii*. PLoS Genetics. Public Library of Science, 1/2006. Verkkodokumentti. 25.7.2016. <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC1326220/>>.

Golkar, Zhabiz, Omar Bagasra ja Donald Gene Pace. *Bacteriophage Therapy: A Potential Solution for the Antibiotic Resistance Crisis*. The Journal of Infection in Developing Countries, 2/2014. Verkkodokumentti. 23.9.2016. <<http://www.jidc.org/index.php/journal/article/view/24518621/994>>.

Golkar, Zhabiz, Omar Bagasra ja Nusrat Jamil. *Experimental Phage Therapy on Multiple Drug Resistant Pseudomonas Aeruginosa Infection in Mice*. OMICS International. Journal of Antivirals & Antiretrovirals, 30.11.2013. Verkkodokumentti. 14.10.2016. <<http://www.omicsonline.org/experimental-phage-therapy-on-multiple-drug-resistant-pseudomonas-aeruginosa-infection-in-mice-jaa.S10-005.php?aid=21493>>.

Gutiérrez, Diana, Lorena Rodríguez-Rubio, Pilar García, Craig Billington, Aruni Premarante, Ana Rodríguez ja Beatriz Martínez. *Phage Sensitivity and Prophage Carriage in Staphylococcus Aureus Isolated from Foods in Spain and New Zealand*. Science Direct, 16.4.2016. Verkkodokumentti. 18.9.2016. <<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0168160516301775>>.

Heikinheimo, Annamari, Sophia Johler, Laura Karvonen, Jérôme Julmi, Maria Fredriksson-Ahomaa ja Roger Stephan. *New Dominant Spa Type T2741 in Livestock-associated MRSA (CC398-MRSA-V) in Finnish Fattening Pigs at Slaughter*. HELDA. BioMed Central, 2.3.2016. Verkkodokumentti. 14.9.2016. <<https://helda.helsinki.fi/handle/10138/160392>>.

Hidron, Alicia I., Ekaterina V. Kourbatova, J. Sue Halvosa, Bianca J. Terrell, Linda K. McDougal, Fred C. Tenover, ja Henry M. Blumberg. *Risk Factors for Colonization with Methicillin-Resistant Staphylococcus Aureus (MRSA) in Patients Admitted to an Urban Hospital: Emergence of Community-Associated MRSA Nasal Carriage*. Oxford Journals, 2005. Verkkodokumentti. 11.10.2016. <<http://cid.oxfordjournals.org/content/41/2/159.long>>.

Huggins, M. B., H. Williams Smith. *Successful Treatment of Experimental Escherichia Coli Infections in Mice Using Phage: Its General Superiority over Antibiotics*. Microbiology Society Journals. Microbiology, 1.2.1982. Verkkodokumentti. 7.10.2016. <<http://mic.microbiologyresearch.org/content/journal/micro/10.1099/00221287-128-2-307>>.

ICTV Virus Taxonomy. ICTV, 7/2015. Verkkodokumentti. 10.10.2016. <<http://ictvonline.org/virusTaxonomy.asp>>.

Kaźmierczak, Zuzanna, Andrzej Górski, ja Krystyna Dąbrowska. *Facing Antibiotic Resistance: Staphylococcus Aureus Phages as a Medical Tool*. Viruses. MDPI, 1.7. 2014. Verkkodokumentti. 7.10.2016. <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4113783/>>.

Kiljunen, Saija. Tutkija FT, Helsingin yliopisto. Helsinki. Julkaisemattomia tuloksia. Laboratoriomuistiinpanot. 30.9.2016.

Kutter, Elizabeth., Sarah J. Kuhl, Zemphira Alavidze. *Chapter 112: Phage Therapy: Bacteriophages as Self-limiting Antibiotics*. Textbook of Natural Medicine. By Joseph E. Pizzorno. 4. painos. Churchill Livingstone, 2013. 945-46.

León, Marcela, and Roberto Bastías. *Virulence Reduction in Bacteriophage Resistant Bacteria*. Frontiers in Microbiology. Frontiers Media S.A., 23.4.2015. Verkkodokumentti. 29.9.2016. <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4407575/>>.

Lin, Jun, Kunihiko Nishino, Marilyn C. Roberts, Marcelo Tolmasky, Rustam I. Aminov, ja Lixin Zhang. *Mechanisms of Antibiotic Resistance*. Frontiers in Microbiology. Frontiers Media S.A., 5.2.2015. Verkkodokumentti. 8.9.2016. <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4318422/>>.

Lo, Wen-Tsung, Ching-Shen Tang, Shyi-Jou Chen, Ching-Feng Huang, and And Min-Hua Tseng. *Panton-Valentine Leukocidin Is Associated with Exacerbated Skin Manifestations and Inflammatory Response in Children with Community-Associated Staphylococcal Scarlet Fever*. Clinical Infectious Diseases. Oxford Journals, 2009. Verkkodokumentti. 17.9.2016. <<http://cid.oxfordjournals.org/content/49/7/e69.long>>.

Lobočka, M., MS. Hejnowicz, K. Dabrowski, A. Gozdek, J. Kosakowski, M. Witkowska, Ml. Ulatowska, B. Weber-Dabrowska, M. Kwiatek, S. Parasion, J. Gavor, H. Kosowska ja A. Glowacka. *Genomics of Staphylococcal Twort-like Phages--potential Therapeutics of the Post-antibiotic Era*. National Center for Biotechnology Information. U.S. National Library of Medicine, 2012. Verkkodokumentti. 27.9.2016. <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22748811>>.

Madhusoodanan, Jyoti. *Bacteriophage Boom?*. The Scientist. 29.9.2014. Verkkodokumentti. 11.10.2016. <<http://www.the-scientist.com/?articles.view/articleNo/41097/title/Bacteriophage-Boom-/>>.

Merabishvili, Maya, Jean Paul Pirnay, Gilbert Verbeken, Nina Chanishvili, Marina Tediashvili, Nino Lashkhi, Thea Glonti, Victor Krylov, Jan Mast, Luc Van Parys, Rob Lavigne, Guido Volckaert, Wesley Mattheus, Gunther Verween, Peter De Corte, Thomas Rose, Serge Jennes, Martin Zizi, Daniel De Vos ja Mario Vaneechoutte. *Quality-Controlled Small-Scale Production of a Well-Defined Bacteriophage Cocktail for Use in Human Clinical Trials*. PLOS ONE. 20.3.2009. Verkkodokumentti. 25.8.2016. <<http://journals.plos.org/plosone/article?id=10.1371%2Fjournal.pone.0004944>>.

Mirzaei, Mohammadali Khan ja Anders S. Nilsson. *Isolation of Phages for Phage Therapy: A Comparison of Spot Tests and Efficiency of Plating Analyses for Determination of Host Range and Efficacy*. PLoS ONE. Public Library of Science, 11.3.2015. Verkkodokumentti. 18.10.2016. <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4356574/>>.

Parasion, Sylwia, Magdalena Kwiatek, Romuald Gryoko, Lidia Mizak ja Anna Malm. *Bacteriophages as an Alternative Strategy for Fighting Biofilm Development*. Polish Journal of Microbiology 63 (2014): 137-45. Polish Journal of Microbiology, 8/2014. Verkkodokumentti. 15.9. 2016. <https://www.researchgate.net/publication/264797921_Bacteriophages_as_an_Alternative_Strategy_for_Fighting_Biofilm_Development>.

Peleg, Anton Y., Harald Seifert ja David L. Paterson. *Acinetobacter Baumannii: Emergence of a Successful Pathogen*. Clinical Microbiology Reviews. American Society for Microbiology (ASM), 7/2008. Verkkodokumentti. 25.7.2016. <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC2493088/>>.

Perez, Federico, Andrea M. Hujer, Kristine M. Hujer, Brooke K. Decker, Philip N. Rather ja Robert A. Bonomo. *Global Challenge of Multidrug-Resistant Acinetobacter Baumannii*. Antimicrobial Agents and Chemotherapy. American Society for Microbiology, 10/2007. Verkkodokumentti. 26.7.2016. <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC2043292/>>.

Phagebiotics International. Verkkodokumentti. 26.10.2016. <<http://www.phagebiotics.org/>>.

Pizzorno, Joseph E. ja Michael T. Murray. Textbook of Natural Medicine. 4. painos. St. Louis, MO: Elsevier/Churchill Livingstone, 2013.

Rath, Devashish, Lina Amlinger, Archana Rath ja Magnus Lundgren. *The CRISPR-Cas Immune System: Biology, Mechanisms and Applications*. Science Direct, 10/ 2015. Verkkodokumentti. 19.9.2016. <<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0300908415001042>>.

Rios, A. C., Moutinho, C. G., Pinto F. C., Del Fiol F. S., Jozala A., Chaud M. V., Vila M. M., Teixeira J. A., Balcão V. M. *Alternatives to Overcoming Bacterial Resistances: State-of-the-art*. National Center for Biotechnology Information. U.S. National Library of

Medicine, 4/ 2016. Verkkodokumentti. 10.10.2016. <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27524653>>.

Smith, H. Williams ja M. B. Huggins. *Successful Treatment of Experimental Escherichia Coli Infections in Mice Using Phage: Its General Superiority over Antibiotics*. Microbiology Society Journals. Microbiology Society, 1.2.1982. Verkkodokumentti. 20.9.2016. <<http://mic.microbiologyresearch.org/content/journal/micro/10.1099/00221287-128-2-307>>.

Spellberg, Brad, Robert Gidos, David Gilbert, John Bradley, Helen W. Boucher, W. Michael Scheld, John G. Bartlett, ja John Edwards Jr. *The Epidemic of Antibiotic-Resistant Infections: A Call to Action for the Medical Community from the Infectious Diseases Society of America*. Clinical Infectious Diseases. Oxford Journals, 2008. Verkkodokumentti. 13.8.2016. <<http://cid.oxfordjournals.org/content/46/2/155.long>>.

Stewart, Philip S. *Mechanisms of Antibiotic Resistance in Bacterial Biofilms*. Int. J. Med. Microbiol 292 (2002): 107-13. PubMed. The National Center for Biotechnology Information, 7/2002. Verkkodokumentti. 17.9.2016. <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12195733>>.

Sulakvelidze, Alexander, Zempira Alavidze, ja J. Glenn Morris, Jr. *Bacteriophage Therapy*. Antimicrobial Agents and Chemotherapy. American Society for Microbiology, 3/2001. Verkkodokumentti. 5.9.2016. <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC90351/>>.

Todar, Kenneth. *Staphylococcus Aureus and Staphylococcal Disease*. Online Textbook of Bacteriology. Verkkodokumentti. 21.8.2016. <<http://textbookofbacteriology.net/staph.html>>.

Tortora, Gerard J., Funke, Berdell R. ja Christine L. Case. *Microbiology: An Introduction*. 11. versio: Pearson Education, 2012.

Vandenesch, François, G. Lina, ja Thomas Henry. *Staphylococcus Aureus Hemolysins, bi-component Leukocidins, and Cytolytic Peptides: A Redundant Arsenal of Membrane-Damaging Virulence Factors?* Frontiers in Cellular and Infection Microbiology. Frontiers Research Foundation, 16.2.2012. Verkkodokumentti. 11.10.2016. <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3417661/>>.

Vega, Nicole M., ja Jeff Gore. *Collective Antibiotic Resistance: Mechanisms and Implications*. Current Opinion in Microbiology. U.S. National Library of Medicine, 29.2.2014. Verkkodokumentti. 1.10.2016. <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4367450/>>.

Venkataraman, Ramesh ja Sat Sharma. *Toxic Shock Syndrome*. Medscape, 11.8.2016. Verkkodokumentti. 14.9.2016. <<http://emedicine.medscape.com/article/169177-over-view?pa=e1fJDa1iF8cti32hZ9p%2B%2FU06rxkQ%2F8H9nB7Wa7qeC-QUvd6CCfQpB4ZIFdkMdyPNw3B8GFyv9jMfrO2su0CpHTqEUUZyFsFwa3FU%2FcEA13w4%3D>>.

Viertel, Tania Mareike, Klaus Ritter ja Hans-Peter Hertz. *Viruses versus Bacteria—novel Approaches to Phage Therapy as a Tool against Multidrug-resistant Pathogens*. Journal of Antimicrobial Chemotherapy. Oxford Journals, 28.5.2014. Verkkodokumentti. 29.8.2016. <<http://jac.oxfordjournals.org/content/69/9/2326.long>>.

Wang, Zhaofei, Panpan Zheng, Wenhui Ji, Qiang Fu, Hengan Wang, Yaxian Yan ja Jianhe Sun. *SLPW: A Virulent Bacteriophage Targeting Methicillin-Resistant Staphylococcus Aureus In Vitro and In Vivo*. Frontiers in Microbiology. Frontiers Media S.A., 15.6.2016. Verkkodokumentti. 19.9.2016. <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4908117/>>.

Weinbauer, Markus G. *Ecology of Prokaryotic Viruses*. National Center for Biotechnology Information. U.S. National Library of Medicine, 1.5.2004. Verkkodokumentti. 24.10.2016. <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15109783>>.

Wicklund, Anu. Filosofian kandidaatti, Helsingin yliopisto. Helsinki. Julkaisemattomia tuloksia. Laboratoriomuistiinpanot. 1.10.2016.

Wittebole, Xavier, Sophie De Roock, ja Steven M. Opal. *A Historical Overview of Bacteriophage Therapy as an Alternative to Antibiotics for the Treatment of Bacterial Pathogens*. Virulence. Landes Bioscience, 1.1.2014. Verkkodokumentti. 6.9.2016. <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3916379/>>.

Wittman, Johannes. DSMZ, Saksa. Suullinen tiedonanto. 24.10.2016. <<https://www.dsmz.de/>>

fRu-Sau02-faagin isäntäherkkyysmäärittysten tulokset

Tässä taulukossa on esitetty fRu-Sau02-faagin isäntäherkkyysmäärittysten tulokset, siitä mitä tutkittuja sioilta eristettyjä MRSA-kantoja kyseinen bakteriofagi infektoi

Kantatunnus	Genotyyppi	Infektoi	Ei infektoi	Muuta huomioitavaa
7879_1_5	MRSA	x		
7879_6_10P		x		
7801_1_5	MRSA		x	
7605_16_20	MRSA	x		
7605_6_10P			x	
7936_6_10	MRSA		x	
7936_11_15	MRSA		x	
7936_16_20	MRSA		x	
4507_1_5	MRSA		x	
4507_6_10	MRSA		x	
1333_1_5	MRSA	x		
1333_6_10	MRSA		x	
1333_11_15	MRSA		x	
6277_1_5	MRSA		x	
7594_1_5	MRSA		x	
7594_6_10	MRSA		x	
7594_11_15	MRSA	x	x	Kasvu hidastuu, ei lyysaudu
7594_16_20	MRSA		x	
1057_1_5	MRSA	x		
1057_6_10	MRSA	x		
1057_11_15	MRSA		x	
1057_16_20	MRSA		x	
7502_1_5	MRSA	x		
7502_6_10	MRSA	x	x	Kasvu hidastuu, ei lyysaudu
7502_11_15	MRSA	x	x	Kasvu hidastuu, ei lyysaudu
7502_1_5P			x	
6161_1_5	MRSA		x	
6161_6_10	MRSA		x	
6161_11_15	MRSA		x	
6161_16_20	MRSA		x	
6161_6_10P			x	
3582_6_10	MRSA	x		
3582_11_15	MRSA		x	
0812_1_5	MRSA	x		
0812_6_10	MRSA	x		

0812_11_15	MRSA	x		
0812_16_20	MRSA	x		
0250_1_5	MRSA	x		
0250_6_10	MRSA	x		
0250_11_15	MRSA	x		
0250_16_20	MRSA	x		
5105_1_5	MRSA		x	
5105_6_10	MRSA		x	
5105_11_15	MRSA		x	
5105_16_20	MRSA		x	
0186_1_5	MRSA	x		
0186_6_10	MRSA		x	
0186_11_15	MRSA		x	
6672_1_5	MRSA		x	
6672_6_10	MRSA		x	
6672_11_15	MRSA		x	
1724_1_5	MRSA	x		
1724_6_10	MRSA		x	
1724_11_15	MRSA		x	

fRu-Sau02-faagin onnistuneisiin isäntäherkkyysmäärittämiin käytetyt menetelmät

Tässä liitteessä on taulukoituna kaikki fRu-Sau02-faagin isäntäherkkyysmäärittämiin käytetyt sioilta eristetyt MRSA-kannat ja millä menetelmällä jokaisen bakteerikannan infektoituminen saatiin määritettyä.

Kanta	LB-maljatitraus	BHI maljatitraus		Nestekasvatus 96-kuoppalevyllä
	pehmytagar	pehmytagar	ilman pehmytagaria	
7879_1_5				x
7879_6_10P				x
7081_1_5				x
7605_16_20				x
7605_6_10P				x
7936_6_10				x
7936_11_15				x
7936_16_20				x
4507_1_5				x
4507_6_10				x
1333_1_5				x
1333_6_10				x
1333_11_15				x
6277_1_5				x
7594_1_5				x
7594_6_10				x
7594_11_15				x
7594_16_20	x			
1057_1_5				x
1057_6_10				x
1057_11_15				x
1057_16_20				x
7502_1_5				x
7502_6_10				x
7502_11_15				x
7502_1_5P				x
6161_1_5				x
6161_6_10				x
6161_11_15				x
6161_16_20				x
6161_6_10P	x			
3582_6_10				x

3582_11_15	x				
0812_1_5	x				
0812_6_10	x				
0812_11_15	x				
0812_16_20	x				
0250_1_5	x				
0250_6_10	x				
0250_11_15	x				
0250_16_20	x				
5105_1_5					x
5105_6_10	x				
5105_11_15					x
5105_16_20					x
0186_1_5					x
0186_6_10	x				
0186_11_15	x				
6672_1_5	x				
6672_6_10	x				
6672_11_15	x				
1724_1_5					x
1724_6_10					x
1724_11_15					x