

LuK-tutkielma

**Faagiresistenssin vaikutus *Acinetobacter baumannii* -
sairaalabakteerin kasvuominaisuuksiin**

Veera Gynther, Tuomo Loula ja Vilma Moisio



Jyväskylän yliopisto

Bio- ja ympäristötieteiden laitos

Solu- ja molekyylibiologia

01.12.2021

JYVÄSKYLÄN YLIOPISTO, Matemaattis-luonnontieteellinen tiedekunta
Bio- ja ympäristötieteiden laitos
Solu- ja molekyylibiologia

Veera Gynther, Tuomo Loula ja Vilma Moision: Faagiresistenssin vaikutus
Acinetobacter baumannii -sairaalabakteerin
kasvuominaisuuksiin
Kandidaatin tutkielma: 22 s., 2 liitettä (3 s.)
Tutkielman ohjaajat: FT, dos. Matti Jalasvuori, FM Juuli Peräkylä ja FT
Cindy Given

Joulukuu 2021

Hakusanat: faagiterapia, suurin bakteerimäärä, suurin kasvunopeus

Antibioottiresistenssi on kasvava ongelma bakteerien aiheuttamien infektioitautien hoidossa, ja sitä on pyritty ratkaisemaan käyttämällä hoitomuotona bakteereita infektoivia faageja. Bakteerit ovat havaittu kehittävänsä myös faageja vastaan resistenssin, mikä vaikuttaa bakteerin kelpoisuuteen usein heikentävästi. *Acinetobacter baumannii* on Maailman terveysjärjestön prioriteettipatogeeni. Se on herkästi antibiooteille resistentiksi tuleva bakteeri, joka aiheuttaa vakavia opportunistisia infektioita. Tässä kandidaatintutkielmassa selvitettiin faagiresistenssin muodostumisen vaikutuksia *Acinetobacter baumannii* -sairaalabakteerin kasvuominaisuuksiin. Potilasnäytteistä eristetyt *Acinetobacter baumannii* -kannat altistettiin niitä infektoiville faageille. Resistenssin kehittäneiden ja altistamattomien kantojen kasvuominaisuuksia vertailtiin spektrofotometrisesti Bioscreen C -mittauksella. Resistenssin kehittymisen havaittiin pääosin heikentävän bakteerit kasvuominaisuuksia. Suurin saavutettu bakteerimäärä pieneni jokaisella resistentillä kannalla ja suurin kasvunopeus heikentyi lähes jokaisella resistentillä kannalla verrattuna altistamattomiin kantoihin. Kasvun heikentyminen on yhteydessä muun muassa bakteerin virulenssin alenemiseen ja antibioottiherkkyden kasvuun. Tutkimuksesta saatuja tuloksia voidaan näin ollen hyödyntää faagiterapian ja antibioottien yhdistelmähoitojen kehittämisessä.

UNIVERSITY OF JYVÄSKYLÄ, Faculty of Mathematics and Science
Department of Biological and Environmental Science
Cell and molecular biology

Veera Gynther, Tuomo Loula and Vilma Moisio: Effect of phage resistance on
Acinetobacter baumannii growth characteristics

Bachelor of Science Thesis: 22 p., 2 supplements (3 p.)

Supervisors: PhD, doc. Matti Jalasvuori, MSc Juuli Peräkylä and
PhD Cindy Given

December 2021

Keywords: maximum bacterial population, maximum growth rate, phage therapy

Antibiotic resistance is a growing concern among treatment of infections caused by bacteria. Phages have been proposed as an alternative treatment method. Bacteria can develop a resistance for phages, often having a negative effect on bacterial fitness. *Acinetobacter baumannii* is a priority pathogen of World Health Organization, developing antibiotic resistance easily and causing serious opportunistic infections in hospitals. In this bachelor's thesis, the effects of phage resistance on growth characteristics of *Acinetobacter baumannii* were studied. Bacterial strains from patients were exposed to phages capable of infecting them. The strains with developed phage resistance and strains not exposed to phages were then compared spectrophotometrically by Bioscreen C measurements. The development of phage resistance was detected to mainly weaken bacterial growth. Maximum bacterial population was reduced with every phage resistant strain and maximum growth rate was reduced with almost every phage resistant strain compared to its respective unexposed strain. The inhibition in growth is connected to, for example, decline in virulence and increased antibiotic sensitivity. As such, the results of this study bring promise towards phage therapy and antibiotic combination treatment development.

SISÄLLYSLUETTELO

| | |
|---|-----------|
| 1 JOHDANTO | 1 |
| 2 AINEISTO JA MENETELMÄT | 4 |
| 2.1 Aineisto | 4 |
| 2.2 Bakteerien nestekasvatus | 5 |
| 2.3 Bakteerien puhtasviljely | 6 |
| 2.4 Tippatesti | 6 |
| 2.5 Bakteerikantojen altistaminen faageille ja näytteiden valmistelu kasvuominaisuuksien määrittämiseen..... | 6 |
| 2.6 Faagiresistenttien ja altistamattomien bakteerikantojen kasvuominaisuuksien määrittäminen..... | 7 |
| 3 TULOKSET | 8 |
| 3.1 Tippatestit..... | 8 |
| 3.2 Kasvuominaisuudet | 8 |
| 4 TULOSTEN TARKASTELO | 13 |
| 4.1 Suurin bakteerimäärä | 13 |
| 4.2 Suurimman bakteerimäärän ajankohta..... | 14 |
| 4.3 Suurin kasvunopeus | 14 |
| 4.4 Suurimman kasvunopeuden ajankohta | 15 |
| 4.5 Virhelähteitä..... | 16 |
| 4.6 Tulosten merkitys ja jatkotutkimuksen tarve..... | 17 |
| KIITOKSET..... | 19 |
| KIRJALLISUUS..... | 19 |
| LIITE 1: Tippatestit faagien infektiokyvyn selvittämiseksi | 23 |

| | |
|--|-----------|
| LIITE 2: Tippatestit faagiresistenssin kehittymisen selvittämiseksi | 24 |
|--|-----------|

1 JOHDANTO

Antibioottien käytön lisääntyessä bakteerit ovat alkaneet kehittyä vastustuskykyisiksi yhä useampia antibiootteja kohtaan. Eräs Maailman terveysjärjestö WHO:n nimeämistä prioriteettipatogeeneista on *Acinetobacter baumannii*. *A. baumannii* infektoi opportunistisena bakteerina lähes yksinomaan immuunipuolustukseltaan heikentyneitä yksilöitä, mikä vaikeuttaa hoitoa sairaalaympäristössä (Vrancianu ym. 2021). *A. baumannii* -kantojen tehokkaasti kehittyvä resistenssi profiili on herättänyt kiinnostusta vaihtoehtoisten hoitokeinojen tutkimuksessa (Vrancianu ym. 2021). Yksi näistä hoitokeinoista on aikoinaan antibioottien syrjäyttämä faagiterapia, josta on lupaavaa näyttöä myös yksittäisissä tapaustutkimuksissa (Schooley ym. 2017).

A. baumannii on muiden *Acinetobacter*-suvun lajien tavoin aerobinen, gramnegatiivinen, katalaasipositiivinen eli katalaasientsyymiä tuottava ja oksidaasinegatiivinen eli oksidaasientsyymiä tuottamaton bakteeri (Peleg ym. 2008). Muista suvun lajeista poiketen *A. baumannii* on kuitenkin suhteellisen harvinainen luonnossa ja yleinen sairaalaympäristössä, jossa se voi elää kuivilla pinnoilla jopa neljän kuukauden ajan (Van ym. 2014). Sairaalahenkilöstön käsistä, potilaiden hengitysteiltä ja iholta, lattialta, sängyiltä ja tietokoneen näppäimistöiltä on löytynyt sen kasvustoja (Kulkarni ym. 2017). Osana *A. baumannii* – *A. calcoaceticus* -kompleksia (Acb) *A. baumannii* omaa usein resistenssin karbapeneemille sekä muille antibiooteille (Vrancianu ym. 2021).

A. baumannii aiheuttaa monia hoitoon liittyviä infektioita, kuten ventilaattoriin liittyvää keuhkokuumetta, bakteremiaa eli verenkierron infektioita, virtsatieinfektioita, aivokalvotulehdusta ja palovammoja vaikeuttavia infektioita (Van ym. 2014). *A. baumannii* -bakteerin aiheuttamien sairaalainfektioiden

yleisimmät ilmenemismuodot ovat ventilaattoriin liittyvä keuhkokuume ja bakteremia (Dijkshoorn ym. 2007). Molemmat niistä voidaan yhdistää korkeaan kuolleisuuteen, jopa 60 % altistuneiden potilasryhmien keskuudessa (Blanchard ym. 2014).

A. baumannii -kantojen aiheuttamista infektioista 63 % on moniresistenttien eli kolmelle tai useammalle antibioottiluokalle resistenttien kantojen aiheuttamia (Blanchard ym. 2014). *Acinetobacter*-suvun bakteerien aiheuttamista infektioista on tullut suuri vaara terveydenhuoltojärjestelmälle bakteerien muuttuessa monilääkeresistenteistä lähes kaikille lääkkeille resistenteiksi patogeeneiksi (Kulkarni ym. 2017). Myös kaikille tunnetuille antibiooteille resistenttejä *A. baumannii* kantoja on löydetty (Peleg ym. 2008). *Acinetobacter*-suvun monilääkeresistenttien ja kaikille lääkkeille resistenttien kantojen nopea ilmaantuminen korostaa organismin kykyä sopeutua nopeasti selektiivisiin muutoksiin ympäristön paineen alaisena (Howard ym. 2012). Organismien synnynnäisten resistenssimekanismien säätelyllä yhdistettynä vieraiden mekanismien hankkimiseen on ollut ratkaiseva rooli organismin tulemisessa monilääkeresistentiksi patogeeneiksi (Howard ym. 2012).

Faagit ovat bakteereja infektoivia viruksia, joita käytetään faagiterapiassa bakteerinfektoiden hoidossa (Luong ym. 2020). Usein faagiterapiassa käytetään lyyttisiä faageja, jotka kaappaavat solun koneiston ja replikoituvat nopeasti hajottaen lopulta bakteerisolun (Luong ym. 2020). Eräs etu faagien käytölle antibioottien sijasta on niiden spesifisyys, joka riippuu bakteerin pinnalla olevista reseptoreista (Luong ym. 2020). Spesifisyyden ansiosta kohdennettu hoito helpottuu (Luong ym. 2020). Lisäksi faagien laaja geneettinen vaihtelu voi auttaa niitä kilpailemaan ongelmabakteereita vastaan (Pope ym. 2011). Faageja löytyy biosfääristä noin 10 kertaa enemmän kuin prokaryoottisoluja (Hendrix ym. 1999).

Faageille altistuessaan bakteerit voivat valintapaineen alla kehittää niitä vastaan resistenssin (Shen & Loessner 2021). Koska resistenssimekanismit ovat jokaiselle faagille hyvin spesifiset, tutkijat pitävät epätodennäköisenä faageille

moniresistenttien bakterikantojen syntyä (Schooley ym. 2017). Schooley ym. (2017) havaitsivat tutkimuksensa tukevan väitettä, sillä faagikoostumuksen vaihto kumosi aiempia faageja vastaan muodostuneen faagiresistenssin vaikutukset. Faagiterapiassa hyödynnetäänkin faagcocktaileja eli useammasta eri faagista koostuvia sekoituksia parantamaan hoidon tehoa ja onnistumismahdollisuutta. Myös faagiresistenssin kehittyminen hidastuu faagcocktailien käytön myötä, sillä bakteerin on kehitettävä resistenssi useammalle eri faagille yhtä aikaa (Schmerer ym. 2014). Mikäli resistenssi kuitenkin kehittyy, on tämän raportoitu usein vaikuttavan bakteerin virulenssiin negatiivisesti (Oechslin 2018).

Faagiresistenssin ja erityisesti pintareseptorivälitteisen resistenssin muodostaminen heikentää bakteerin kelpoisuutta (Shen & Loessner 2021). *A. baumannii* -bakteereilla ensisijaisena faagien kiinnittymiskohtana toimii muiden gram-negatiivisten bakteerien tapaan kapsulaarisesta polysakkaridista muodostuva ekstrasellulaarinen kapseli (Gordillo Altamirano ym. 2020). Faagiresistenssin synty johtaa täten suoraan kapselin rakenteen muuttumiseen, jolloin sen normaali toiminta bakteerilla häiriintyy. Kapselin biosynteesin puuttuminen voi johtaa muun muassa bakteerin kasvun hidastumiseen, jolloin sen infektiokyky heikkenee johtaen patogeenisyyden laskuun (Friman ym. 2011). Lisäksi Gordillo Altamirano ym. (2020) totesivat tutkimuksessaan, että kapselin heikentyneen muodostumisen johdosta *A. baumannii* -bakteerit olivat herkempiä ihmisen komplementtijärjestelmälle, osoittivat herkkyyttä tietynlaisille antibiooteille sekä myöhemmin lisätyille faageille, ja niiden kyky biofilmin muodostukseen aleni.

Faagiresistenssin muodostumisen myötä faagin antivirulenttinen vaikutus kohdistuu bakteerin tappamisen sijaan bakteerin virulenssiin (Shen & Loessner 2021). Faagiterapiaa voidaanakin käyttää samanaikaisesti antibioottihoidon kanssa, jotta antibioottien vaikutusta saadaan tehostettua (Shen & Loessner 2021). Faagien mahdollinen antibiootteja tehostava vaikutus perustuu faagin bakteerissa tekemiin muutoksiin, jotka voivat olla joko muutoksia antibiootin liikkumisessa

bakteerisolusta sisään ja ulos tai vaikutuksessa bakteerisolun sisällä (Luong ym. 2020). Faagiterapian tehokkuuden kannalta on tärkeää tutkia faagiresistenssin aiheuttamia muutoksia kohdebakteerissa. Vaikka muutamia tutkimuksia faagiterapian toimivuudesta antibioottiresistenttien *A. baumannii* -kantojen hoitoon on tehty, resistenssin kehittyminen faageille ja faagiresistenssin vaikutus *A. baumannii* -bakteerin kasvuominaisuuksiin on tuntemattomampi ilmiö.

Tämän kandidaatintutkielman aiheena oli tutkia faagiresistenssin kehittymisen vaikutuksia *A. baumannii* -bakteerissa. Tavoitteena oli selvittää, vaikuttaako faagiresistenssin kehittyminen bakteerin kasvuominaisuuksiin. Kokeellisessa tutkimuksessa altistettiin potilasnäytteistä eristettyjä *A. baumannii* -kantoja faageille. Bakteerikantojen kasvuominaisuuksia mitattiin spektrofotometrisesti, jolloin voitiin verrata resistenssin kehittäneiden kantojen kasvuominaisuuksia altistamattomien kantojen kasvuominaisuuksiin. Hypoteesiksi asetettiin, että *A. baumannii* -bakteerien kasvuominaisuudet heikkenevät niiden muodostaessa faagiresistenssin.

2 AINEISTO JA MENETELMÄT

2.1 Aineisto

Tutkimuksessa käytetyt *A. baumannii* -kannat olivat peräisin anonymisoiduista potilasnäytteistä. Näitä kantoja infektoivat faagit oli aiemmin eristetty Jyväskylän Nenäinniemen jätevedenpuhdistamon vedestä. Faagit ja niille altistetut bakteerikannat on listattu Taulukossa 1.

Taulukko 1. Tutkimuksessa käytetyt *A. baumannii* -bakteerikannat ja kutakin kantaa infektoivat faagit. Tiitteri ilmaisee faagin plakkeja muodostavien yksikköjen määrän millilitrassa faagistokkia (pfu/ml, eng. plaque forming units / ml).

| Bakteerikanta | Faagi | Tiitteri (pfu/ml) |
|---------------|------------|----------------------|
| AB07 | fNenAB07p3 | $4,5 \times 10^7$ |
| AB29 | fNenAB29p1 | $1,5 \times 10^7$ |
| AB30 | fNenAB30p1 | $4,0 \times 10^8$ |
| AB34 | fNenAB34p1 | $1,3 \times 10^{11}$ |
| AB34 | fNenAB34p3 | $1,9 \times 10^{11}$ |
| AB97 | fNenAB97p1 | $8,7 \times 10^6$ |

2.2 Bakteerien nestekasvatus

Faageille altistamattomia bakteerikantoja kasvatettiin nestekasvatuksella koko kokeen ajan, jotta ne pysyivät elinkelpoisina. Bakteerikannoista tehtiin lisäksi erilliset nestekasvatukset faageille altistusta varten, jolloin resistenssin muodostaneiden kantojen kasvukykyä pystyttiin vertaamaan altistamattomiin kantoihin. Yksittäisiin kantoihin viitattiin niiden koodilla (Taulukko 1), esimerkiksi AB07. Bakteerien nestekasvatukset tehtiin joko puhdasviljelmistä tai jatkamalla edellisiä nestekasvatuksia. Puhdasviljelmistä tehtiin nestekasvatukset siirtämällä puhdaskasvatusmaljoilta yksi pesäke 5 ml:aan Lysogeny Broth (LB)-mediaa (Sambrook ym. 1989). Jos edellisiä nestekasvatuksia jatkettiin, lisättiin 5 μ l bakteerisuspensiota 5 ml:aan LB-mediaa. Nestekasvatuksia pidettiin ravistelijassa (210 kierrosta minuutissa, rpm, eng. rounds per minute) +37 °C lämpötilassa yön yli.

2.3 Bakteerien puhdasviljely

Puhdasviljelmät tehtiin, jotta kasvukyvyn mittausta varten saatiin eroteltua yksittäinen bakteerifenotyyppi. Nestekasvatuksesta siirrettiin silmukalla bakteereita agar-maljalle. Agar-maljoja pidettiin inkubaattorissa +37 °C lämpötilassa yön yli.

2.4 Tippatesti

Tippatestin avulla selvitettiin, oliko faagi infektiokykyinen bakteeria vastaan. 100 µl yön yli nestekasvatettua bakteeria lisättiin 3 ml:aan L-softia, joka kaadettiin agar-maljalle. L-softin jähmetyttyä lisättiin 10 µl faagistokkia maljalle merkittyyn kohtaan. Agar-maljoja pidettiin inkubaattorissa +37 °C lämpötilassa yön yli. Faagi oli infektiokykyinen bakteeria vastaan, jos maljalla näkyi plakki eli kirkas kohta merkityssä pisteessä.

2.5 Bakteerikantojen altistaminen faageille ja näytteiden valmistelu kasvuominaisuuksien määrittämiseen

Bakteerikannoista tehtiin puhdasviljelmät. Kahden viikon kuluttua puhdasviljelmistä tehtiin nestekasvatukset. Nestekasvatuksista tarkastettiin faagien infektiokyky tippatestillä. Resistenssin aikaansaamiseksi bakteerit altistettiin faageille lisäämällä uuteen nestekasvatukseen 5 µl faagia. Altistetut bakteerikannat nimettiin kannan koodin sekä faagin koodin loppuosan mukaan (Taulukko 1), ja faagille altistuminen ilmoitettiin res. -merkinnällä, esimerkiksi AB07 res. p3.

Faageille altistetuille bakteereille tehtiin puhdasviljelmät. Jokaisen maljan kahdesta eri pesäkkeestä tehtiin nestekasvatukset. Kahden pesäkkeen otannalla parannettiin resistentin kannan saannin mahdollisuutta. Kyseisistä puhdasviljelmistä tehtiin nestekasvatukset. Uudella tippatestillä selvitettiin, olivatko bakteerit kehittäneet resistenssit faageille. Resistenssin kehittäneiden pesäkkeiden nestekasvatuksista

valittiin satunnaisesti toinen. Jos vain toinen pesäke oli resistentti, valittiin sen nestekasvatus. Valittujen pesäkkeiden nestekasvatuksia jatkettiin.

Faagiresistenttien ja altistamattomien bakteerikantojen nestekasvatuksista tehtiin laimennokset 1:2. Jokaisesta faagiresistentistä ja faagille altistamattomasta näytteestä sekä kontrollina käytetystä LB-mediasta siirrettiin 200 µl neljään eri kuoppaan honeycomb-kuoppalevyille. Käyttämällä neljän eri otoksen keskiarvoa satunnaisvirhettä saatiin pienennettyä.

2.6 Faagiresistenttien ja altistamattomien bakteerikantojen kasvuominaisuuksien määrittäminen

Kasvuominaisuuksien määrittäminen suoritettiin spektrofotometrisesti Bioscreen C -laitteistolla. Mittaus antoi kantojen absorbanssin 5 minuutin välein 24 h ajan. Bakteerimäärän lisääntyessä näyte samenee, jolloin myös absorbanssin arvo kasvaa. Mittaustuloksia analysoitiin R-ohjelmalla käyttäen Ketolan ym. (2013) tutkimuksessa julkaisemaa kasvuominaisuuksien analysointialgoritmia.

Algoritmin avulla mittaustuloksista saatiin jokaiselle kannalle neljä eri tulosta kannan suurimmasta kasvunopeudesta (r_c) ja suurimmasta bakteerimäärästä (K). Lisäksi saatiin absorbanssin arvo ennen mittausta (minOD), suurimman kasvunopeuden ajankohta mittauksen aikana (r_{pos}) ja suurimman bakteerimäärän ajankohta mittauksen aikana (K_{pos}). Näistä arvoista laskettiin keskiarvot kullekin bakteerikannalle. Algoritmi ilmoitti myös liian varhain lopetetusta mittauksesta omalla suureellaan (KatEnd).

Bioscreen C -mittauksen absorbanssi-arvoista muodostettiin myös jokaiselle kannalle kasvukäyrä: jokaisen kannan neljästä eri datasarjasta laskettiin kunkin mittapisteen keskiarvo. Näistä keskiarvoista piirrettiin kullekin kannalle kasvukäyrä keskihajonnan kanssa. Faageille altistettujen bakteerikantojen käyrät piirrettiin niitä vastaavien altistamattomien kantojen kanssa samaan kuvaajaan.

3 TULOKSET

3.1 Tippatestit

Kaikki käytetyt faagit olivat tippatestin perusteella infektiokykyisiä isäntänä toimivalle *A. baumannii* -bakteerikannalle (Taulukko 1), sillä faagit aiheuttivat selkeän kirkkaan kohdan sameassa bakteerimatossa (Liite 1). Bakteerit eivät siis kyenneet jatkamaan kasvuaan faagien vuoksi.

Faageille altistettujen bakteerien resistenssin testaus tippatestillä osoitti lähes kaikilla bakteerimaljoilla olevien kantojen tulleen resistenteiksi niitä infektoineille faageille. AB07 tuli resistentiksi fNenAB07p3-faagille, AB29 fNenAB29p1-faagille, AB30 fNenAB30p1-faagille ja AB34 fNenAB34p1- sekä fNenAB34p3-faagille. Resistenssi ilmeni näiden kantojen molemmista pesäkkeistä tehtyjen puhdaskasvatusten tippatesteistä (Liite 2). AB97 oli tippatestin mukaan resistentti fNenAB97p1-faagille vain toisessa pesäkkeen puhdaskasvatuksesta (Liite 2). Resistenteiksi tulneiden kantojen maljoilla ei näkynyt kirkasta kohtaa, joten bakteerit olivat jatkaneet kasvuaan tasaisesti faageista huolimatta. AB97 res. p1 -näytteistä ensimmäisellä maljalla näkyi kirkas kohta, jossa faagit olivat infektoineet bakteerit.

3.2 Kasvuominaisuudet

Bakteerien suurin kasvunopeus (Taulukko 2: rc) pieneni lähes jokaisella resistentillä bakteerikannalla verrattuna saman bakteerikannan altistamattomaan muotoon. Prosentuaalisesti eniten kasvunopeus pieneni AB97 res. p1 -kannalla, 18,5 %. Huomattavasti kasvunopeus pieneni myös AB34 res. p1 -kannalla, jolla muutos oli 16,5 %. AB34 res. p3 -kannalla suurin kasvunopeus pieneni 13,3 %, AB29 res. p1 -kannalla 10,7 % ja AB30 res. p1 -kannalla vähiten, 0,2 %. Muista bakteerikannoista poiketen AB07 res. p3 -kannalla suurin kasvunopeus kasvoi 22,5 % verrattuna altistamattomaan kantaan.

Taulukko 2. Bioscreen C -mittauksen tulokset faageille altistamattomilla sekä faageille resistenteillä (res.) bakteerikannoilla. Taulukosta ilmenee suurin kasvunopeus (rc), suurin bakteerimäärä (K), suurimman kasvunopeuden ajankohta (r_pos), suurimman bakteerimäärän ajankohta (K_pos) ja absorbanssi ennen mittausta (minOD). Taulukoidut arvot ovat saman näytteen neljän eri otoksen keskiarvoja.

| | AB07 | AB07 res. p3 | AB29 | AB29 res. p1 | AB30 | AB30 res. p1 | AB34 | AB34 res. p1 | AB34 res. p3 | AB97 | AB97 res. p1 |
|--------------------------------|-------|-----------------|-------|-----------------|-------|-----------------|-------|-----------------|-----------------|-------|-----------------|
| rc (x 10 ⁻³) | 7,057 | 8,643 | 7,365 | 6,578 | 7,255 | 7,240 | 6,650 | 5,554 | 5,765 | 5,634 | 4,590 |
| K | 1,119 | 1,048 | 1,209 | 1,092 | 1,100 | 0,876 | 1,146 | 0,956 | 0,941 | 0,985 | 0,919 |
| r_pos (x 5 min) | 34 | 61 | 11 | 20 | 69 | 80 | 74 | 21 | 19 | 98 | 78 |
| K_pos (x 5 min) | 242 | 232 | 265 | 265 | 265 | 238 | 263 | 260 | 243 | 209 | 265 |
| minOD (x 10 ⁻²) | 7,5 | 7,2 | 7,4 | 7,1 | 7,4 | 7,3 | 7,8 | 7,5 | 7,4 | 7,4 | 7,3 |

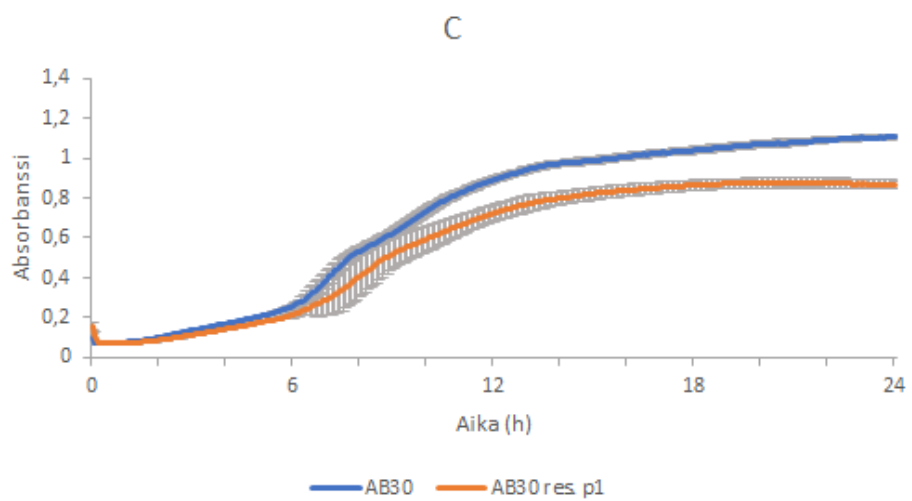
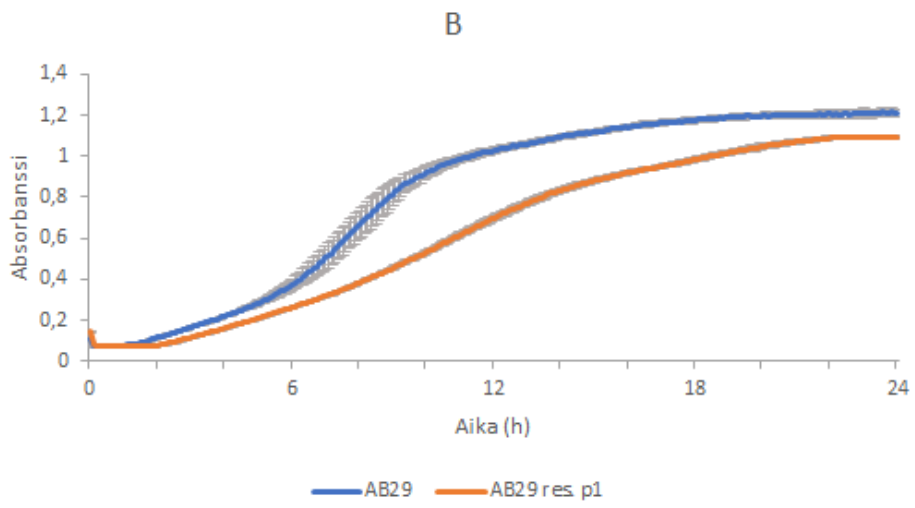
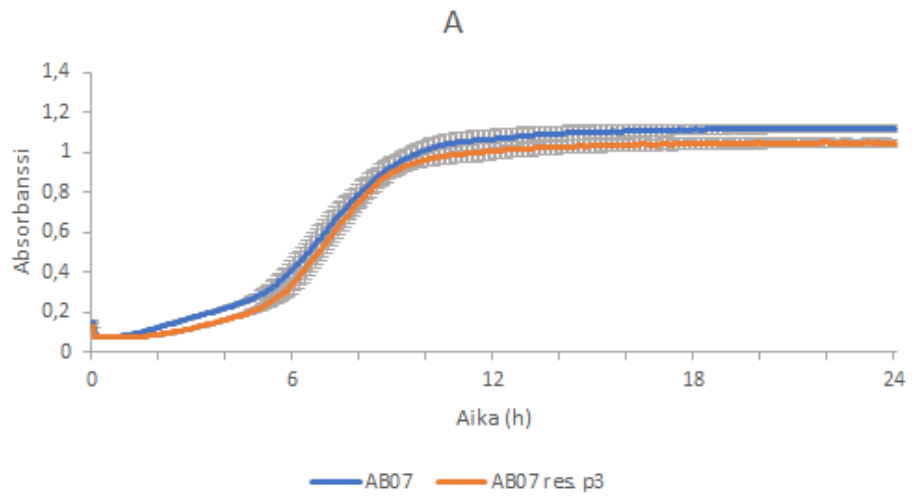
Kaikilla bakteerikannoilla altistamaton kanta saavutti arvoltaan suuremman maksimiabsorbanssin eli suuremman bakteerimäärän (Taulukko 2: K) kuin sen resistentti versio tai versiot. Suurin bakteerimäärä pieneni 6,4–20,4 % resistenteillä kannoilla verrattuna altistamattomiin kantoihin. Suurin prosentuaalinen ero oli AB30 ja AB30 res. p1 -kantojen välillä. Vähiten eroa oli AB07 ja AB07 res. p3 -kantojen välillä.

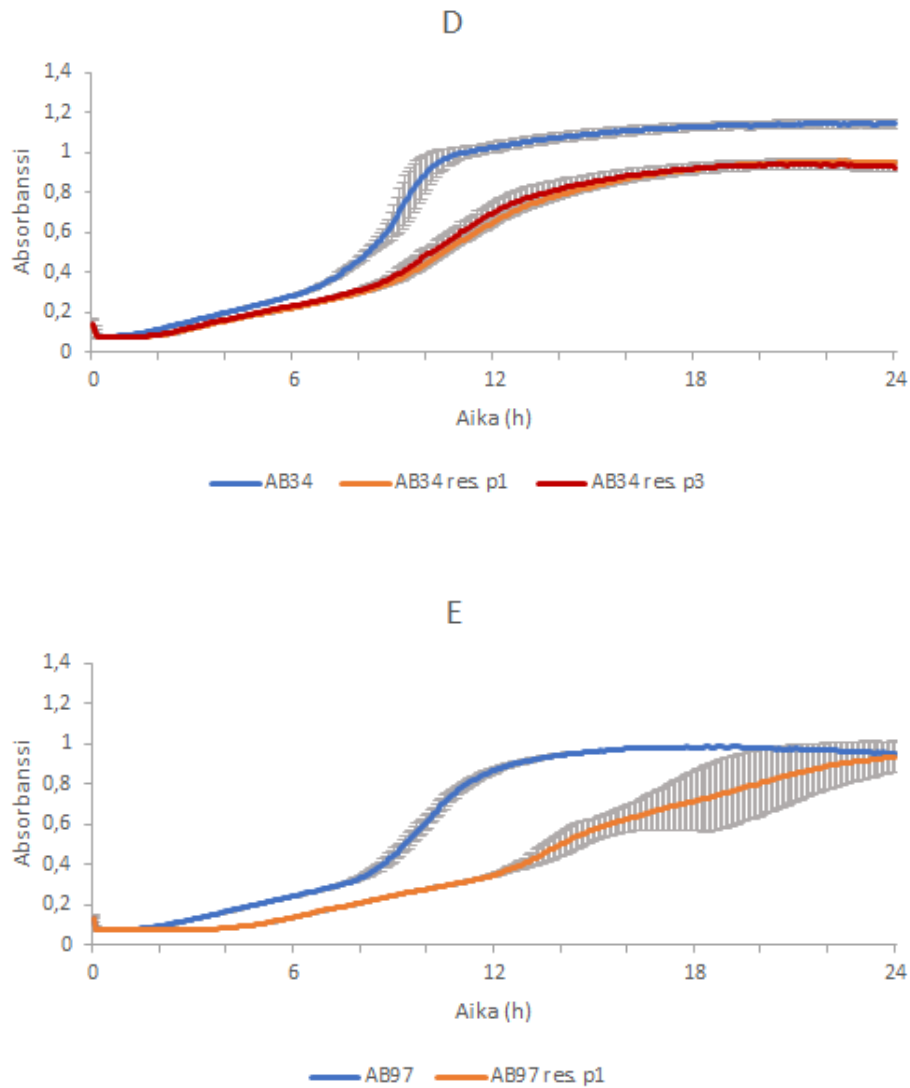
Median neljästä eri otoksesta laskettu keskiarvo absorbanssille ennen mittausta oli $7,150 \times 10^{-2}$. Bakteerikantojen absorbanssien keskiarvot ennen mittausta vaihtelivat kantojen välillä arvosta $7,050 \times 10^{-2}$ arvoon $7,775 \times 10^{-2}$ (Taulukko 2: minOD).

Liian varhain lopetetusta mittauksesta, jossa bakteerien maksimimäärää ei välttämättä ehditty saavuttaa, ilmoittava suure (KatEnd), oli bakteerikantojen useimmille toistoille arvoltaan 0. AB30 ja AB97 res. p1 -kantojen kummankin yksi

toisto neljästä sai arvon 1. AB29 res. p1 -kannan kolme toistoa neljästä saivat arvon 1.

AB07 res. p3 -kantaa (Kuva 1: A) lukuun ottamatta resistenteissä kannoissa oli huomattavissa erityisesti suurimman kulmakertoimen suuruuden pienenemistä eli eksponentiaalisen kasvun lieventymistä (Kuva 1: B, C, D ja E). Myös suurin bakteerimäärä vaikutti pienentyvän faageille altistetuilla kannoilla kuvaajien perusteella, mikä näkyi suurimman absorbanssi-arvon pienenemisenä (Kuva 1: A, B, C ja D), lukuun ottamatta AB97 res. p1 -kantaa (Kuva 1: E).





Kuva 1. Kasvukäyrät faageille altistamattomille *A. baumannii* -bakteerikannoille (sininen) ja resistentille *A. baumannii* -bakteerikannoille (oranssi/punainen). Käyrien pisteet ovat keskiarvoja kyseisen bakteerinäytteen neljästä eri otoksesta Bioscreen C -mittauksessa. Keskihajonnat on merkitty käyriin harmaalla alueella. Kuvaajat esitetään seuraavasti altistamattoman kannan mukaan: kuvaaja A: AB07, kuvaaja B: AB29, kuvaaja C: AB30, kuvaaja D: AB34 ja kuvaaja E: AB97.

4 TULOSTEN TARKASTELU

Useimmilla resistenteillä *A. baumannii* -kannoilla oli havaittavissa kasvuominaisuuksien heikentymistä verrattuna altistamattomiin kantoihin. Bakteerien maksimimäärä pienentyi jokaisella kannalla ja pääosin kantojen kasvu oli myös hitaampaa resistenssin kehittymisen myötä.

4.1 Suurin bakteerimäärä

Kaikkien faagiresistenttien kantojen suurin bakteerimäärä eli suurin populaatiokoko oli pienempi verrattuna kantojen altistamattomiin muotoihin, mikä huomattiin pienempänä maksimiabsorbanssina (Taulukko 2: K). Mitattavista kasvuominaisuuksista suurin bakteerimäärä oli ainoa ominaisuus, joka oli resistenssin kehittymisen myötä merkittävästi pienentynyt. Absorbanssi mittauksen lopussa oli resistenteille kannoille 6,4–20,4 % pienempi kuin altistamattomille kannoille. Suurin bakteerimäärä pieneni erityisesti AB30 res. p1, AB34 res. p1 ja AB34 res. p3 -kannoilla.

Zhang ym. (2014) huomasivat kaloja infektoivan opportunistisen patogeenin kasvuominaisuuksien heikentyneen faagiresistenssin myötä. Sekä bakteerin suurin kasvunopeus että etenkin suurin populaatiokoko olivat selvästi pienentyneet verrattuna bakteerikantaan, jolla ei ollut faagiresistenssiä (Zhang ym. 2014). Luonnosta ei myöskään oltu eristetty yhtäkään faagiresistenssin omaavaa bakteeria isännästä, joka viittaa bakteerin virulenssin alenemiseen (Zhang ym. 2014). Jos suurimman bakteerimäärän pienentyminen on myös *A. baumannii* -bakteerilla yhtä vahvasti yhteydessä virulenssin alenemiseen kuin kyseisen tutkimuksen opportunistisella patogeenilla, on tämä lupaava havainto faagiterapian kehittelyn kannalta.

4.2 Suurimman bakteerimäärän ajankohta

Suurimman bakteerimäärän eli suurimman populaatiokoon ajankohta (Taulukko: K_pos) saavutettiin keskimäärin myöhemmin altistamattomilla kuin resistenteillä bakteerikannoilla. AB29 ja AB29 res. p1 saavuttivat keskiarvoiltaan suurimman bakteerimäärän ajankohdan samaan aikaan ja AB97 aikaisemmin kuin AB97 res. p1. Muilla bakteerikannoilla suurimman bakteerimäärän ajankohdan arvot olivat suurempia altistamattomilla kannoilla kuin niiden resistenteillä versioilla, eli suurin bakteerimäärä saavutettiin resistenteillä kannoilla altistamattomia aiemmin.

Tulokset suurimman bakteerimäärän ajankohdasta ovat sinänsä hieman yllättäviä, jos oletetaan kasvun hidastuvan resistenteillä bakteerikannoilla (Castledine ym. 2021, Friman ym. 2011). Tällöin suurimman bakteerimäärän ajankohdan voisi ajatella myöhästyvän resistenteillä kannoilla. Toisaalta, jos suurin bakteerimäärä jää huomattavasti alemmaksi altistamattomaan kantaan nähden, voidaan suurin bakteerimäärä hidastuneesta kasvusta huolimatta saavuttaa ennen altistamatonta kantaa.

4.3 Suurin kasvunopeus

Suurimman kasvunopeuden arvoissa (Taulukko 2: rc) esiintyi ristiriitaisuutta kasvukäyrän kuvaajien kanssa (Kuva 1). Esimerkiksi AB07 res. p3 -kannalla suurin kasvunopeus (Taulukko 2: rc) oli 22,5 % suurempi verrattuna AB07-kantaan, mutta kasvukäyrä noudatti altistamattoman kannan kanssa lähes samaa linjaa koko mittauksen ajan (Kuva 1: A). Tämä voi mahdollisesti johtua siitä, ettei käytetty algoritmi valinnut piirtämiensä kasvukäyrien suurinta kulmakerrointa eksponentiaalisen kasvun vaiheesta. Tämä havaittiin myös tarkastelemalla algoritmin jokaiselle toistolle piirtämiä kasvukäyriä. Kaikki suurimman kasvunopeuden arvoista eivät siis välttämättä ole luotettavia.

Bakteerikantojen kasvukäyrien keskiarvoistetuista kuvaajista havaittiin, että resistenttien kantojen käyrät olivat pääosin altistamattomia versioitaan loivempia eli niiden suurin kasvunopeus oli pienentynyt (Kuva 1). Resistenttien kantojen suurimpien kasvunopeuksien pieneneminen merkitsi bakteerien kasvun hidastumista. Myös aiemmat tutkimukset *Serratia marcescens* sekä *Pseudomonas aeruginosa* -bakteereilla osoittavat faagiresistenssin kehittymisen hidastavan bakteerien kasvunopeutta (Castledine ym. 2021, Friman ym. 2011). Kasvun tehokkuuden heikkenemisen puolestaan tiedetään olevan yhteydessä bakteerin vähentyneeseen patogeenisuuteen, jolloin sen infektiokyky isäntää kohtaan heikkenee (Friman ym. 2011).

4.4 Suurimman kasvunopeuden ajankohta

Suurimman kasvunopeuden ajankohdat (Taulukko 2: r_pos) vaihtelivat resistenteillä ja altistamattomilla bakteerikannoilla paljon. Suurimman kasvunopeuden ajankohta on yhteydessä suurimman kasvunopeuden arvoon, joka ei välttämättä ollut täysin luotettava. Kasvuominaisuuksien analysointialgoritmi on mahdollisesti valinnut käyriltä ajankohdan, jossa ei todellisuudessa ollut suurin kulmakerroin. Tällöin suurimman kasvunopeuden ajankohdan arvo ei luotettavasti osoita ajankohtaa, jossa on suurin kasvunopeus. Tämä on tärkeää ottaa huomioon taulukon 2 tuloksia tarkastellessa.

Taulukon 2 tulosten perusteella resistenssin kehittyminen voi vaikuttaa hidastavasti tai nopeuttavasti suurimman kasvunopeuden ajankohtaan. Suurimman kasvunopeuden ajankohta esiintyi aikaisemmin kannoilla AB07, AB29 ja AB30 kuin näiden kantojen resistentillä versioilla. AB34:n suurimman kasvunopeuden ajankohta esiintyi puolestaan huomattavasti myöhemmin kuin kummallakaan sen resistentistä versioista. Samoin AB97 -kannalla suurimman kasvunopeuden ajankohta esiintyi myöhemmin kuin kannan resistentillä versiolla, mutta ero ei kuitenkaan ollut kovin merkittävä. Kasvukäyrien perusteella puolestaan suurimman kasvunopeuden ajankohta vaikuttaa faagiresistenteillä

kannoilla sijoittuvan usein hieman myöhempään verrattuna altistamattomiin kantoihin, mutta yleistettävien tulosten saamiseksi vaaditaan runsaampaa otoskokoa.

4.5 Virhelähteitä

Kuten Taulukon 2 arvojen ja Kuvan 1 tulosten ristiriitaisuudesta voidaan havaita, algoritmin valitsema suurimman kasvunopeuden ajankohta ei ollut täysin luotettava. Lisäksi mahdollisia virhelähteitä olivat suuri keskihajonta ja liian varhain lopetettu mittaus. Suuret keskihajonnat vaikeuttivat erityisesti AB30 res. p1 ja AB97 res. p1 -kantojen (Kuva 1: C ja E) tulosten tulkintaa: keskihajonta oli huomattavan suurta molemmilla kannoilla suurimman kasvunopeuden kohdalla. Keskihajonnan suuruus vaikeuttaa myös esimerkiksi AB97 res. p1 -kannan maksimiabsorbanssin arvon tulkintaa, joka on keskihajonnan rajoissa mahdollisesti samalla tasolla AB97-kannan kanssa, mutta myös mahdollisesti alempana tai jopa ylempänä. Eräs algoritmin piirtämistä AB97 res. p1 -kannan neljän toiston kasvukäyristä oli epätarkka mittauksen loppupuolella, mikä voi olla syynä suurempaan keskihajontaan. Suurelta osin keskiarvojen keskihajonnat pysyivät kuitenkin pieninä.

Liian varhain lopetetusta mittauksesta varoittava suure (KatEnd) sai AB29 res. p1 -kannalla arvon 1 kolmella neljästä toistosta. Tämä tarkoittaa, että mittaus on saatettu lopettaa liian aikaisin, jolloin AB29 res. p1 ei ole välttämättä ehtinyt saavuttaa suurinta kasvunopeuttaan tai suurinta bakteerimääräänsä, mikä vähentää tulosten luotettavuutta. Kuitenkin AB29 res. p1:n kasvukäyrän kuvaajasta (Kuva 1: B) voidaan nähdä kasvun olevan melko tasaantunut mittauksen lopussa, joten suurin kasvunopeus ja suurin bakteerimäärä on todennäköisesti saavutettu mittauksen aikana. Sen sijaan AB97 res. p1:n kasvukäyrä oli melko jyrkkä vielä mittauksen loppupuolella, vaikka sen liian varhaisesta mittauksen lopetuksesta varoittavan suureen arvo oli 1 ainoastaan yhdellä neljästä toistosta.

4.6 Tulosten merkitys ja jatkotutkimuksen tarve

Tämän tutkimuksen tulosten perusteella faagiresistentit kannat vaikuttavat kasvavan usein hitaammin verrattuna altistamattomiin kantoihin. Resistenssin kehittyminen ei todennäköisesti kuitenkaan yksin riitä torjumaan bakteerinfektioita. Faagit voivat silti olla hyödyllisiä vakavien infektioiden hoidossa ottaen huomioon faagien kyvyn tappa ei-resistenttejä bakteereja sekä faagiterapian kohdennetun hoidon mahdollisuudet. Tämä tutkimus vahvistikin tutkimuksen tuloksia, jossa havaittiin faagien käytöllä voivan olla lyyttisen eli bakteereja hajottavan syklin ohella *A. baumannii* -bakteerikantoja heikentävä vaikutus (Gordillo Altamirano ym. 2020). Faagiresistenssin kehittymisen myötä bakteerin patogeenisuus vähenee, jolloin menetelmää voidaan hyödyntää myös yhdistelmähoidoissa antibioottien kanssa. Lisäksi antibiooteille resistentit *A. baumannii* -kannat ovat faagi-infektioille alttiimpia kuin antibiooteille alttiit *A. baumannii* -kannat (Chen ym. 2017).

Toisen tippatestin jälkeen huomattiin, että kaikki bakteerikannat kykenivät kehittämään faagiresistenssin. On tärkeää ottaa huomioon, kuinka montaa eri faagia hoidossa käytetään, ja kuinka usein faageja annostellaan. Tässä tutkimuksessa jokaista bakteerikantaa infektoitiin vain yhdellä faagityypillä ja vain kerran, mikä luultavasti edisti resistenssin kehittymistä. Usein faagiterapiassa kuitenkin käytetään faagicocktaileja eli useampaa eri faagia sisältävää seosta: esimerkiksi Yuan ym. (2019) havaitsivat tutkimuksessaan, että kahden faagin käytöllä oli tehokkaampi antibakteerinen vaikutus *A. baumannii* -bakteeriin verrattuna yhden faagin käyttöön.

Tässä tutkimuksessa ei määritetty käytettyjen faagien tarkkoja faagireseptoreita, mutta kasvuominaisuuksien heikentyminen ja aikaisemmat tutkimukset muilla *A. baumannii* -kannoilla viittaavat reseptorin olevan ekstrasellulaarisessa kapselissa (Gordillo Altamirano ym. 2020). Gordillo Altamirano ym. (2020) toteavat erityisesti pintareseptorivälitteisen resistenssin heikentävän bakteerin kelpoisuutta, joten

jatkotutkimuksien kannalta tarkka reseptori kyseisille faageille olisi luultavasti hyvä selvittää. Friman ym. (2011) toteavat tutkimuksessaan, että faagiresistenssin pysyminen bakteeripopulaatiossa vaihtelee ympäristön faagipitoisuuden mukaan. Faagiresistenssin tutkimuksen edetessä kohti elävissä organismeissa tehtäviä kokeita myös nämä asiat on otettava huomioon.

Bakteerikantojen otos oli tässä tutkimuksessa suhteellisen pieni, vain viisi bakteerikantaa. Faagiresistenssin vaikutuksesta *A. baumannii* -bakteerin kasvuominaisuuksiin yleisellä tasolla ei siis voi tehdä varmoja johtopäätöksiä, vaan tulokset ovat ennemminkin viitteellisiä. Tulevaisuudessa olisikin hyvä tutkia *A. baumannii* -bakteerikantojen faagiresistenssin vaikutusta bakteerin kasvuominaisuuksiin laajemmalla tasolla. Lisäksi olisi tärkeää tutkia heikentyneiden kasvuominaisuuksien yhteyttä virulenssiin kohdennetusti *A. baumannii* -bakteereilla, vaikka muilla bakteerilajeilla kasvutehon heikkenemisen tiedetäänkin olevan yhteydessä vähentyneeseen patogeenisuuteen ja siten virulenssin alenemiseen (Friman ym. 2011).

Tässä kandidaatintutkielmassa saadut tulokset eivät olleet täysin yksiselitteisiä, mutta pääosin viittaavat *A. baumannii* -bakteerin kasvuominaisuuksien heikentyvän faagiresistenssin kehittymisen myötä. Kaikilla faagiresistenteillä *A. baumannii* -kannoilla suurin bakteerimäärä pieneni ja suurimmalla osalla resistenteistä kannoista myös suurin kasvunopeus pieneni verrattaessa altistamattomiin kantoihin. Saadut tulokset olivat pitkälti alan aikaisempien tutkimustulosten kanssa yhdensuuntaisia. Tämän tutkielman hypoteesi oli, että *A. baumannii* -bakteerien kasvuominaisuudet heikkenevät niiden muodostaessa faagiresistenssin, joten hypoteesi voidaan todeta paikkansapitäväksi. Aihetta on tutkittava suuremmalla otoskoolla sekä laajemmasta näkökulmasta faagiterapian hyödyntämiseksi käytännössä, mutta tämän tutkimuksen tulokset antavat lupaavan suunnan faagien käytölle *A. baumannii* -infektioiden hoidossa.

KIITOKSET

Kiitämme Matti Jalasvuorta tutkimusaiheesta sekä ohjauksesta, Juuli Peräkylää laboratorio-ohjauksesta ja Cindy Giveniä tilastotieteellisestä ohjauksesta. Lisäksi kiitämme Jyväskylän yliopiston bio- ja ympäristötieteiden laitosta tutkimuksessa tarvittavista tiloista sekä laitteistosta.

KIRJALLISUUS

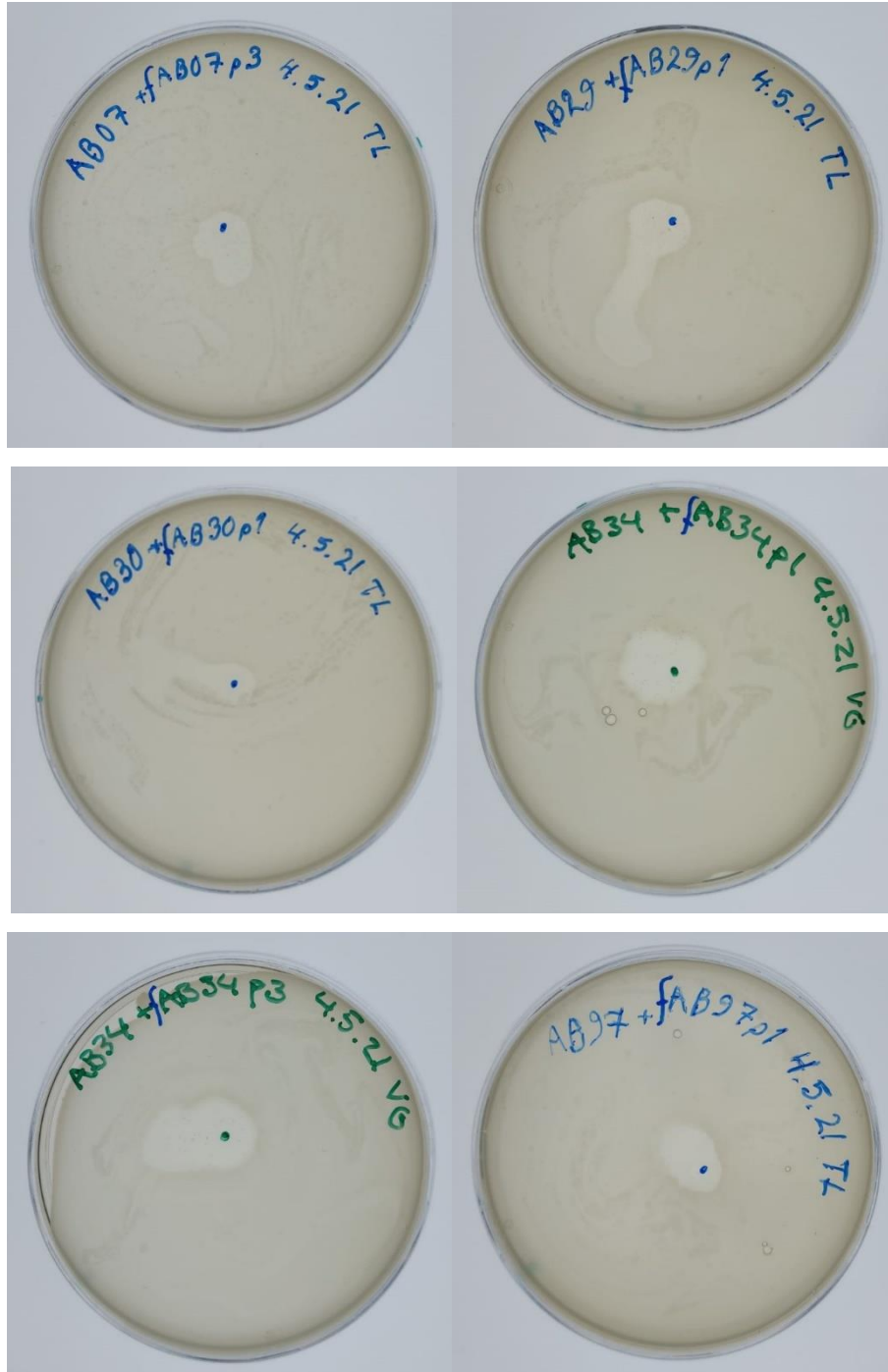
- Blanchard C., Barnett P., Perlmutter J. & Dunman P.M. 2014. Identification of *Acinetobacter baumannii* serum-associated antibiotic efflux pump inhibitors. *Antimicrob Agents Chemother* 58: 6360–6370, doi:10.1128/AAC.03535-14.
- Castledine M., Padfield D., Sierocinski P., Jessica Soria Pascual, Hughes A., Mäkinen L., Friman V.-P., Pirnay J.-P., Merabishvili M., De Vos D. & Buckling A. 2021. Parallel evolution of phage resistance - virulence trade - offs during in vitro and nasal *Pseudomonas aeruginosa* phage treatment. *bioRxiv*, doi:10.1101/2021.09.06.459069.
- Chen L., Kuo S., Chang K., Cheng C., Yu P., Chang C., Chen T. & Tseng C. 2017. Clinical Antibiotic-resistant *Acinetobacter baumannii* Strains with Higher Susceptibility to Environmental Phages than Antibiotic-sensitive Strains. *Scientific Reports* 7: 6319, doi:10.1038/s41598-017-06688-w.
- Dijkshoorn L., Nemec A. & Seifert H. 2007. An increasing threat in hospitals: multidrug-resistant *Acinetobacter baumannii*. *Nature Reviews Microbiology* 5: 939–951, doi:10.1038/nrmicro1789.
- Friman V.-P., Hiltunen T., Jalasvuori M., Lindstedt C., Laanto E., Örmälä A.-M., Laakso J., Mappes J. & Bamford J.K.H. 2011. High Temperature and Bacteriophages Can Indirectly Select for Bacterial Pathogenicity in Environmental Reservoirs. *PLoS One* 6: e17651, doi:http://dx.doi.org/10.1371/journal.pone.0017651.
- Gordillo Altamirano F., Forsyth J., Patwa R., Kostoulias X., Trim M., Subedi D., Archer S., Morris F., Oliveira C., Kielty L., Korneev D., O'Bryan M., Lithgow T., Peleg A. & Barr J. 2020. Bacteriophages targeting *Acinetobacter baumannii* capsule induce antimicrobial resensitization. *bioRxiv*, doi:10.1101/2020.02.25.965590.

- Hendrix R.W., Smith M.C.M., Burns R.N., Ford M.E. & Hatfull G.F. 1999. Evolutionary relationships among diverse bacteriophages and prophages: All the world's a phage. *Proc Natl Acad Sci USA* 96: 2192, doi:10.1073/pnas.96.5.2192.
- Howard A., O'Donoghue M., Feeney A. & Sleator R.D. 2012. *Acinetobacter baumannii* An emerging opportunistic pathogen. *Virulence* 3: 243–250, doi:10.4161/viru.19700.
- Ketola T., Mikonranta L., Zhang J., Saarinen K., Örmälä-Odegrip A., Friman V., Mappes J. & Laakso J. 2013. Fluctuating Temperature Leads To Evolution Of Thermal Generalism And Preadaptation To Novel Environments. *Evolution* 67: 2936-2944, doi:10.1111/evo.12148.
- Kulkarni S.S., Madalgi R., Ajantha G.S. & Kulkarni R.D. 2017. Identification of genus *Acinetobacter*: Standardization of in-house PCR and its comparison with conventional phenotypic methods. *J Lab Physicians* 9: 279–282, doi:10.4103/0974-2727.214263.
- Luong T., Salabarría A. & Roach D.R. 2020. Phage Therapy in the Resistance Era: Where Do We Stand and Where Are We Going? *Clin Ther* 42: 1659–1680, doi:10.1016/j.clinthera.2020.07.014.
- Oechslin F. 2018. Resistance Development to Bacteriophages Occurring during Bacteriophage Therapy. *Viruses* 10: 351, doi:10.3390/v10070351.
- Peleg A.Y., Seifert H. & Paterson D.L. 2008. *Acinetobacter baumannii*: Emergence of a successful pathogen. *Clin Microbiol Rev* 21: 538–582, doi:10.1128/CMR.00058-07.
- Pope W.H., Jacobs-Sera D., Russell D.A., Peebles C.L., Al-Atrache Z., Alcoser T.A., Alexander L.M., Alfano M.B., Alford S.T., Amy N.E., Anderson M.D., Anderson A.G., Ang A.A.S., Ares M., Jr., Barber A.J., Barker L.P., Barrett J.M., Barshop W.D., Bauerle C.M., Bayles I.M., Belfield K.L., Best A.A., Borjon A., Jr., Bowman C.A., Boyer C.A., Bradley K.W., Bradley V.A., Broadway L.N., Budwal K., Busby K.N., Campbell I.W., Campbell A.M., Carey A., Caruso S.M., Chew R.D., Cockburn C.L., Cohen L.B., Corajod J.M., Cresawn S.G., Davis K.R., Deng L., Denver D.R., Dixon B.R., Ekram S., Elgin S.C.R., Engelsen A.E., English B.E.V., Erb M.L., Estrada C., Filliger L.Z., Findley A.M., Forbes L., Forsyth M.H., Fox T.M., Fritz M.J., Garcia R., George Z.D., Georges A.E., Gissendanner C.R., Goff S., Goldstein R., Gordon K.C., Green R.D., Guerra S.L., Guiney-Olsen K., Guiza B.G., Haghighat L., Hagopian G.V., Harmon C.J., Harmson J.S., Hartzog G.A., Harvey S.E., He S., He K.J., Healy K.E., Higinbotham E.R., Hildebrandt E.N., Ho J.H., Hogan G.M., Hohenstein V.G., Holz N.A., Huang V.J., Hufford E.L., Hynes P.M., Jackson A.S., Jansen E.C., Jarvik J., Jasinto P.G., Jordan T.C., Kasza T., Katelyn M.A., Kelsey J.S., Kerrigan L.A., Khaw D., Kim J., Knutter J.Z., Ko C., Larkin G.V., Laroche J.R., Latif A., Leuba K.D., Leuba S.I., Lewis L.O., Loesser-Casey K., Long C.A., Lopez A.J., Lowery N., Lu T.Q., Mac V., Masters

- I.R., McCloud J.J., McDonough M.J., Medenbach A.J., Menon A., Miller R., Morgan B.K., Ng P.C., Nguyen E., Nguyen K.T., Nguyen E.T., Nicholson K.M., Parnell L.A., Peirce C.E., Perz A.M., Peterson L.J., Pferdehirt R.E., Philip S.V., Pogliano K., Pogliano J., Polley T., Puopolo E.J., Rabinowitz H.S., Resiss M.J., Rhyan C.N., Robinson Y.M., Rodriguez L.L., Rose A.C., Rubin J.D., Ruby J.A., Saha M.S., Sandoz J.W., Savitskaya J., Schipper D.J., Schnitzler C.E., Schott A.R., Segal J.B., Shaffer C.D., Sheldon K.E., Shepard E.M., Shepardson J.W., Shroff M.K., Simmons J.M., Simms E.F., Simpson B.M., Sinclair K.M., Sjöholm R.L., Slette I.J., Spaulding B.C., Straub C.L., Stukey J., Sughrue T., Tang T., Tatyana L.M., Taylor S.B., Taylor B.J., Temple L.M., Thompson J.V., Tokarz M.P., Trapani S.E., Troum A.P., Tsay J., Tubbs A.T., Walton J.M., Wang D.H., Wang H., Warner J.R., Weisser E.G., Wendler S.C., Weston-Hafer K., Whelan H.M., Williamson K.E., Willis A.N., Wirtshafter H.S., Wong T.W., Wu P., Yang Y.j., Yee B.C., Zaidins D.A., Zhang B., Zúniga M.Y., Hendrix R.W. & Hatfull G.F. 2011. Expanding the Diversity of Mycobacteriophages: Insights into Genome Architecture and Evolution. *PLOS ONE* 6: e16329, doi:10.1371/journal.pone.0016329.
- Sambrook J., Fritsch E. R. & Maniatis T. 1989. *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*. 2. painos, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Plainview N.Y.
- Schmerer M., Molineux I.J. & Bull J.J. 2014. Synergy as a rationale for phage therapy using phage cocktails. *PeerJ* 2: e590, doi:10.7717/peerj.590.
- Schooley R.T., Biswas B., Gill J.J., Hernandez-Morales A., Lancaster J., Lessor L., Barr J.J., Reed S.L., Rohwer F., Benler S., Segall A.M., Taplitz R., Smith D.M., Kerr K., Kumaraswamy M., Nizet V., Lin L., McCauley M.D., Strathdee S.A., Benson C.A., Pope R.K., Leroux B.M., Picel A.C., Mateczun A.J., Cilwa K.E., Regeimbal J.M., Estrella L.A., Wolfe D.M., Henry M.S., Quinones J., Salka S., Bishop-Lilly K.A., Young R. & Hamilton T. 2017. Development and Use of Personalized Bacteriophage-Based Therapeutic Cocktails To Treat a Patient with a Disseminated Resistant *Acinetobacter baumannii* Infection. *Antimicrob Agents Chemother* 61: 954, doi:10.1128/AAC.00954-17.
- Shen Y. & Loessner M.J. 2021. Beyond antibacterials – exploring bacteriophages as antivirulence agents. *Curr Opin Biotechnol* 68: 166-173, doi:https://doi-org.ezproxy.jyu.fi/10.1016/j.copbio.2020.11.004.
- Van T.D., Dinh Q.D., Vu P.D., Nguyen T.V., Pham C.V., Dao T.T., Phung C.D., Hoang H.T., Tang N.T., Do N.T., Nguyen K.V. & Wertheim H. 2014. Antibiotic susceptibility and molecular epidemiology of *Acinetobacter calcoaceticus-baumannii* complex strains isolated from a referral hospital in northern Vietnam. *J Glob Antimicrob Resist* 2: 318–321, doi:S2213-7165(14)00063-0.
- Vrancianu C.O., Pelcaru C.F., Alistar A., Gheorghe I., Marutescu L., Popa M., Czobor I., Gradisteanu G., Dobre E.G. & Chifiriuc M.C. 2021. Escaping from ESKAPE. Clinical Significance and Antibiotic Resistance Mechanisms in

- Acinetobacter baumannii*: a Review. *Biointerface Res Appl Chem* 11: 8190-8203, doi:10.33263/BRIAC111.81908203.
- Yuan Y., Wang L., Li X., Tan D., Cong C. & Xu Y. 2019. Efficacy of a phage cocktail in controlling phage resistance development in multidrug resistant *Acinetobacter baumannii*. *Virus Res* 272: 197734, doi:<https://doi.org/10.1016/j.virusres.2019.197734>.
- Zhang J., Laakso J., Mappes J., Laanto E., Ketola T., Bamford J.K., Kunttu H. & Sundberg L.R. 2014. Association of colony morphotypes with virulence, growth and resistance against protozoan predation in the fish pathogen *Flavobacterium columnare*. *FEMS Microbiol Ecol* 89: 553-562, doi:10.1111/1574-6941.12356.

LIITE 1: TIPPATESTIT FAAGIEN INFEKTIOKYVYN SELVITTÄMISEKSI



LIITE 2: TIPPATESTIT FAAGIRESISTENSSIN KEHITTÄMISEN SELVITTÄMISEKSI

