

Faagi-antibioottiyhdistelmähoidot mikrobilääkeresistenttien bakteeri-infektioiden hoidossa

Ville Koponen

Luonnontieteiden kandidaatin tutkielma

Turun yliopisto

Biolääketieteen koulutusohjelma

Lääketieteellinen tiedekunta

Biolääketieteen laitos

26.5.2025

*Turun yliopiston laatujärjestelmän mukaisesti tämän julkaisun alkuperäisyys
on tarkastettu Turnitin OriginalityCheck -järjestelmällä.*

Tiivistelmä

Bakteerien kehittyvä kyky suojautua mikrobilääkkeiltä aiheuttaa vuosittain globaalisti merkittävän määrän kuolemia ja taloudellisia kustannuksia lisääntyvien ja vaikeammin hoidettavien bakteeri-infektioiden myötä. Maailmanterveysjärjestö (WHO) arvioi mikrobilääkeresistenttien (AMR) bakteerien olleen osana noin 6,5 miljoonaa kuolemantapausta vuonna 2019. AMR-bakteeri-infektiot aiheuttavat joka vuosi maailmanlaajuisesti kymmenien miljardien eurojen kulut heikentyneen työn tuottavuuden sekä kasvaneiden terveydenhuoltokustannusten vuoksi. Mikrobilääkeresistenssin kehitys vaikeuttaa infektioiden hoitamista nykymenetelmillä ja heikentää muiden hoitojen, kuten leikkausten ja kemoterapian tehokkuutta. Pitkittyneet ja hankaloituneet hoitajaksot johtavat kasvaviin terveydenhuollon kuluihin.

Nykyään bakteeri-infektioita hoidetaan yleisesti antibiooteilla, vaikka antibioottiresistenssin lisääntymisen myötä antibioottien teho infektioiden hoitamisessa on heikentynyt jo vuosikymmeniä. Antibiootit aiheuttavat bakteereille valintapainetta, jonka seurauksena ne voivat kehittyä resistenteiksi hoidoille. Ilmiötä kiihdyttää antibioottien väärinkäyttö ja saamattomuus. AMR-ongelman korjaamiseksi esimerkiksi WHO on sopinut jäsenmaidensa kanssa toimintasuunnitelman, jonka tarkoitus on lievittää ongelmaa muun muassa lisäämällä tietoisuutta ongelmasta sekä tehostamalla antibioottien väärinkäytön valvontaa.

AMR-ongelman ratkaisemiseksi on myös kehitteillä uusia, vaihtoehtoisia hoitomenetelmiä bakteeri-infektioiden hoitamiseen. Näistä vaihtoehtoista bakteriofagit (faagit) ovat luonnollisesti esiintyviä, bakteereita infektoivia viruksia. Faagit infektoivat spesifisesti isäntäbakteerin, monistavat itseään ja lopulta tuhoavat isäntäsolun, vapauttaen uusia faageja ympäristöön. Faageja käytettiin kliinisesti infektioiden hoitamisessa noin sata vuotta sitten, mutta niiden käyttö länsimaissa väheni antibioottien yleistyessä. Faagihoidojen hyödyntäminen kuitenkin jatkui Neuvostoliitossa ja Itä-Euroopassa.

Yhdistämällä tietyt faagit ja antibiootit on mahdollista saavuttaa synergistinen eli toisiaan vahvistava antibakteerinen vaikutus. Faagi-antibioottiyhdistelmähoidot hyödyntävät faagi-antibiootti synergian biologisia mekanismeja tehokkaamman hoitovasteen saavuttamiseksi. Ilmiö on havaittu in vitro -tutkimusten lisäksi eläinkokeissa sekä sataa kliinistä tapausselostusta analysoivassa retrospektiivisessä katsausartikkelissa.

Asiasanat: Mikrobilääkeresistenssi, faagi-antibioottiyhdistelmähoito, bakteeri-infektio, faagi-antibiootti synergia

Lyhenteet

Lyhenne	englanniksi	suomeksi
AMR	antimicrobial resistance	mikrobilääkeresistenssi
PAS	phage-antibiotic synergy	faagi-antibiootti synergia
WHO	World Health Organization	Maailman terveysjärjestö
MRSA	Methicillin-resistant <i>Staphylococcus aureus</i>	metisilliinille resistentti <i>Staphylococcus aureus</i>
dsDNA	double stranded DNA	kaksijuosteinen DNA
RNAP	RNA polymerase	RNA-polymeraasi

Sisällysluettelo

Tiivistelmä	2
Lyhenteet	3
Sisällysluettelo	3
1. Johdanto	4
2. Leviävä mikrobilääkeresistenssi.....	5
2.1 Mikrobilääkeresistenssin kehitys ja vaikutukset.....	5
2.2 Mikrobilääkeresistenssiä aiheuttavat ilmiöt	6
2.3 Nykyhoidot ja rajoitteet	7
3. Bakteriofagit.....	8
3.1 Faagien biologia.....	8
3.1.1 Faagien rakenne ja toiminta	9
3.1.2 Faagien suhde bakteereihin	11
3.2 Faagihoitojen ja faagi-antibioottiyhdistelmähoitojen historia	12
4. Faagi-antibioottiyhdistelmähoidot	14
4.1. Yhdistelmähoidot suhteessa nykyhoitoihin	14
4.2 Faagi-antibiootti synergia	15
4.2.1 Uudelleenherkistyminen antibiootille tai faagille.....	16
4.2.2 Kohdistuminen eri rakenteisiin	16
4.2.3 Muutokset bakteerisolun hajoamisessa ja morfologiassa.....	16
4.2.4 Faagien aikaansaama antibioottien kulkeutuminen biofilmiin	17
4.3 Faagi-antibioottiyhdistelmähoidojen kehittäminen	18
4.4 Tuloksia yhdistelmähoidosta	19
5. Yhteenveto ja johtopäätökset.....	20
Lähdeluettelo	22

1. Johdanto

Antibiootit ovat hyvin yleisesti 1940-luvulta asti käytetty hoitomuoto bakteeri-infektioiden hoidossa. Antibioottien teho infektioiden hoitamisessa on kuitenkin heikentynyt jo vuosikymmeniä mikrobilääkeresistenttien (AMR) bakteerien yleistyessä. Patogeeniset AMR-bakteerit aiheuttavat vuosittain kasvavan määrän infektioita ja kuolemia ihmisillä, eläimillä ja kasveilla. Lisääntyvä globalisaatio ja ihmisen toiminta, varsinkin antibioottien väärinkäyttö, kiihdyttävät AMR-bakteerien leviämistä. Antibiootit aiheuttavat niille altistuville bakteereille valintapainetta, joka johtaa bakteerien mutatoitumiseen. Jokainen bakteereissa tapahtuva mutaatio kohti antibioottiresistenssiä vaikeuttaa infektioiden hoitamista, sekä muiden hoitojen, kuten kemoterapian ja leikkausten onnistumista. AMR on maailmanlaajuinen ja hallitsematon ilmiö. (WHO, 2024).

Mikrobilääkeresistenssistä on tiedetty jo kymmeniä vuosia ja vuonna 2015 Maailman terveysjärjestön (WHO) jäsenvaltiot hyväksyivät maailmanlaajuisen toimintasuunnitelman antibioottiresistenssiä vastaan (engl. Global Action Plan to tackle AMR) (Demerec, 1948). Toimintasuunnitelman tavoitteena on muun muassa ehkäistä tartuntatauteja, vähentää antibioottien väärinkäyttöä sekä mahdollistaa toimiva ja vastuullinen hoito kaikille sitä tarvitseville turvallisilla ja tehokkailla lääkityksillä. Ehkäisevien toimenpiteiden lisäksi AMR-bakteeri-infektioiden hoitamiseen tarvitaan uusia hoitovaihtoehtoja. (WHO, 2015). Uusien antibioottien kehittäminen ei ole rahallisesti kannattavaa, koska patogeeniset bakteerit pystyisivät kehittymään niille resistentteiksi, jolloin uudesta antibiootista tulisi nopeasti turha infektioiden hoidossa. Tämän lisäksi antibioottien määräämisperusteita ja käytön valvomista on tarkennettu. (Fowler ym., 2014; Pirnay ym., 2024).

Antibioottien resistenssiongelman ratkaisuksi on ehdotettu kehitteillä olevia sovelluksia, joita ovat esimerkiksi uudet antimikrobit, isännän puolustuspeptidit, kasveista eristetyt sekundaarimetaboliitit tai fytokemikaalit (Batoni ym., 2021; Parmanik ym., 2022). Edellisten lisäksi bakteriofagihoitoja on pidetty lupaavina vaihtoehtoina varsinkin AMR-bakteeri-infektioiden hoidossa. Bakteriofageja (faagi) käytettiin ennen penisilliinin löytämistä bakteeri-infektioiden hoitamiseen, mutta niiden käyttö väheni, kun antibioottihoidot yleistyivät. Faagihoidojen tutkimus on ollut uudessa kasvussa, koska AMR on levinnyt huomattavasti. Faagit ovat luonnollisesti esiintyviä, itseään monistavia, isäntäspesifejä viruksia, jotka infektoivat ja lopulta tuhoavat isäntäbakteerin. Infektoituneen bakteerin tuhoutuessa uusia faageja vapautuu ympäristöön ja kierto toistuu. (WHO, 2025). Bakteerit voivat kehittää pysyvän antibioottiresistenssin jopa 20 minuutissa, kun taas faagit pystyvät itse kehittymällä kiertämään bakteerin

resistenssimekanismin (Gibson ym., 2018; Santos & Drake, 1994). Koska faagit ovat alatyypispesifejä bakteerien suhteen, ne tarjoavat houkuttelevia mahdollisuuksia lääketieteellisiin sovelluksiin.

Yksi faagien sovellusmahdollisuus on faagi-antibioottiyhdistelmähoidot, joissa faageja käytetään yhdessä nykyään määrättävien antibioottien kanssa bakteeri-infektioiden hoitamiseen. Yhdistelmähoidoilla on osoitettu olevan tehokkaampi antibakteerinen vaikutus kuin jos sen osatekijöitä käytettäisiin yksinään (Torres-Barceló & Hochberg, 2016). Yhdistelmähoidot pohjautuvat faagi-antibiootti synergiaan (PAS), jonka mekanismeja on kuvattu kattavasti kirjallisuudessa (Comeau ym., 2007). Bakteerit voivat esimerkiksi uudelleenherkistyä antibiootille faagi-infektion jälkeen, ja osa faageista kykenee hajottamaan bakteereita nopeammin, kun bakteerit altistuvat subletaalille konsentraatiolle antibioottia. (Diallo & Dublanchet, 2022).

Tässä tutkielmassa syvennyn faagi-antibioottiyhdistelmähoitoon vaihtoehtona mikrobilääkeresistenttien bakteeri-infektioiden hoitamisessa, yhdistelmähoidon mekanismeihin, sekä yhdistelmähoidoilla saavutettuihin kliinisiin tutkimustuloksiin. AMR-bakteeri-infektioiden osuus kuolemantapauksissa kasvaa maailmanlaajuisesti ja siksi on tärkeää löytää ratkaisuja ongelman hidastamiseksi.

2. Leviävä mikrobilääkeresistenssi

2.1 Mikrobilääkeresistenssin kehitys ja vaikutukset

Bakteerien mikrobilääkeresistenssin kehittyminen on pitkään jatkunut ongelma ja ilmiö huomattiin jo antibioottien kliinisen käytön alkuvaiheilla. Ensimmäiset tapaukset toimimattomista hoidoista ja resistenssin aiheuttavista mutaatioista on raportoitu vuonna 1940, kun bakteereista eristettiin beetalaktamaasi-entsyymiä, joka pystyy inaktivoimaan beetalaktamaasi-luokan antibiootteja (Hunt & Kates, 2024). Ilmiön vakavuuteen havahduttiin uudestaan 1980-luvulla, kun mikrobilääkeresistentit kannat, varsinkin metisilliinille resistentti *Staphylococcus aureus* (MRSA), levisivät nopeasti (Summers, 2021). Nykyään mikrobilääkeresistenssi on maailmanlaajuinen ongelma.

AMR-bakteeri-infektioiden on arvioitu vaikuttavan maailmanlaajuisesti vuosittain noin 5 miljoonaan kuolemantapaukseen sekä aiheuttavan 66 miljardin Yhdysvaltain dollarin (USD) terveydenhoitokulut, joka vastaa 0,7 % kaikista maailman terveystalouksista (McDonnell ym., 2024; WHO, 2023). Bakteeri-infektioiden lisääntymisellä ja niiden hoitojen vaikeutumisella on vaikutus myös muihin hoitoihin. Esimerkiksi

vastustuskykyä heikentävää kemoterapiaa saavat potilaat ja leikkauspotilaat ovat suuremmissa riskissä sairastua vaikeasti hoidettaviin bakteeri-infektioihin, jotka jo itsessään voivat olla este muiden hoitomuotojen saamiselle. Hoitoresistentit bakteeri-infektiot pidentävät hoitoja ja voivat johtaa muiden sairauksien syntyyn tai vammautumiseen (Durkin, 2004). Bakteeri-infektiot aiheuttavat kuluja myös heikentyneen työn tuottavuuden myötä, ja on arvioitu, että AMR-infektiot voivat kustantaa vuoteen 2050 mennessä noin triljoona USD terveydenhoitokuluissa sekä 1–3,4 triljoonaa USD taloudellisten tuotannonvajeiden myötä (WHO, 2023).

Naghavi tutkimusryhmineen (2024) tutki mikrobilääkeresistenssin maailmanlaajuisista kehitystä vuosina 1990-2021, sekä ennusti erilaisia tilannekuvia vuodelle 2050. Tutkimuksen mukaan pelkästään vuonna 2021 AMR-bakteeri-infektiot olivat osana noin 4,71 miljoonaa kuolemantapausta, joista 1,14 miljoonaa oli infektion aiheuttamia. Maailmanlaajuisesti vuosina 1990–2021 alle 5-vuotiaiden mikrobilääkeresistenssin kehityksestä johtuva kuolleisuus laski, mutta yli 5-vuotiaiden kuolleisuus kasvoi. Yli 70-vuotiaiden kuolemat lisääntyivät tarkasteluvälillä yli 80 %. Yleisesti ottaen gram-positiivisten bakteerien infektiot ovat olleet helpommin antibiooteilla hoidettavissa kuin gram-negatiivisten aiheuttamat (Rajput ym., 2024). Naghavin ja muiden tutkimuksessa kuitenkin havaittiin, että kaikista patogeeneista gram-positiivisen MRSA:n osallisuus kuolemantapauksissa lisääntyi eniten, noin 320 000 tapauksesta vuonna 1990 noin 680 000 tapaukseen vuonna 2021. Tutkimuksessa ennustettiin, että kehittämällä uusia gram-negatiivisiin bakteereihin kohdistuvia lääkkeitä voitaisiin pelastaa noin 11 miljoonaa henkeä vuosina 2025–2050, ja keskittämällä AMR-ongelmaan lisää resursseja, noin 92 miljoonaa ihmistä. Tutkimuksen arvioiden mukaan maailmanlaajuinen väestön ikääntyminen ja mikrobilääkeresistenssin kehittyminen johtaisi noin 10 miljoonaan kuolemantapaukseen vuonna 2050. Ikääntyvässä väestössä monisairaus ja immuunipuutokset johtavat lisääntyneeseen riskiin kuolla bakteeri-infektioon. (GBD 2021 Fertility and Forecasting Collaborators, 2024).

2.2 Mikrobilääkeresistenssiä aiheuttavat ilmiöt

Antibioottihoitojen tarkoitus on hidastaa bakteeri-infektioiden etenemistä ja tuhota patogeeniset bakteerit. Antibiootit aiheuttavat bakteereille valintapainetta kehittyä mikrobilääkeresistenteiksi muokkaamalla bakteerien kasvuympäristöä epäsuotuisaksi (Grenni ym., 2018). Kun bakteerit altistuvat antibiooteille alle pienimmän bakteerin kasvua estävän pitoisuuden (engl. minimum inhibitory concentration, MIC), bakteerien mutaationopeus kasvaa. Kiihtynyt mutaationopeus lisää bakteerien todennäköisyyttä kehittää resistenssi vaikuttavia antibiootteja kohtaan. (Andersson & Hughes, 2012). Resistenssi voi ilmetä muun muassa siten, että bakteeri alkaa ilmentämään entsyymiä, joka inaktivoi antibioottia, kuten esimerkiksi

beetalaktamaasia, joka pilkkoo beetalaktaamiantibiootteja (Hunt & Kates, 2024; Yang, 2021). Resistenssigeenit pystyvät leviämään nopeasti bakteerien välillä horisontaalisen geeninsiirron (engl. horizontal gene transfer) avulla. Tämän mekanismin kautta bakteerit voivat saada resistenssigeenejä ympäristöstä löytyvästä geneettisestä materiaalista, vaihtamalla plasmideja muiden bakteerien kanssa, tai profaagien genomista. (Summers, 2021).

Biologisten ilmiöiden lisäksi ihmisen toiminnalla on suuri merkitys AMR:n kehittämisessä. Lisääntyvä antibioottien käyttö, väärinkäyttö ja antibioottien päätyminen ympäristöön ihmisen toimesta kiihdyttävät mikrobilääkeresistenssin kehittymistä (Klein ym., 2024). Keskeytynyt tai väärin otettu antibioottilääkitys ei hoida infektiota kunnolla, vaan aiheuttaa kehon bakteereille epätarkoituksenmukaista valintapainetta. Myös väärin hävitetyt ja teollisuudesta ympäristöön päätyvät antibioottijäämät lisäävät bakteerien valintapainetta luonnossa. Lisääntynyt valintapaine kiihdyttää mikrobilääkeresistenssin muodostumista ja vaikeuttaa infektioiden hoitamista nyky menetelmillä.

2.3 Nykyhoidot ja rajoitteet

Nykyään bakteeri-infektioita hoidetaan yleisesti antibiooteilla. Epäiltäessä bakteeri-infektiota potilaalta otetaan usein näyte bakteeriviljelyä varten. Viljelyssä kestää tyypillisesti 8–12 tuntia, jonka jälkeen bakteeri voidaan tunnistaa biokemiallisella kokeella tai massaspektrometrillä. Biokemiallisella kokeella bakteerikanta tunnistetaan näytteestä löytyvien ainutlaatuisten metaboliittien tai vasta-aineiden sitoutumisen avulla. Massaspektrometrillä bakteerit taas tunnistetaan vertailemalla näytteestä saatuja proteiini- ja rasvaimentymä tietokantoihin. Massaspektrometriä avulla bakteerien tunnistamisesta on tullut tehokkaampaa, koska se on tarkempi ja nopeampi menetelmä kuin biokemialliset kokeet. (Sloan ym., 2017). Bakteerin tunnistuksen jälkeen tehdään tyypillisesti antibioottilääkitysmääritys (engl. antibiotic susceptibility test), jotta hoito voidaan paremmin kohdentaa kyseisen infektion bakteeria kohtaan. Määrityksessä tutkitaan bakteerin herkkyyttä tietyille antibiooteille viljelemällä bakteeria 2–5 päivää eri antibioottien kanssa. (Smith & Kirby, 2019). Määritys vaatii paljon aikaa, eikä sitä ole mahdollista toteuttaa esimerkiksi silloin, kun potilaan tila on vakava ja hoitoa tarvitaan akuutisti. Kiireisissä tapauksissa potilaalle voidaan määrätä laajakirjoisia antibiootteja, jotka toimivat useimpien bakteeri-infektioiden hoitamisessa. Laajakirjoisten antibioottien pitkittynyt käyttö johtaa ennen pitkää resistenttien kantojen muodostumiseen. Antibiootteihin liittyy resistenssin lisäksi siis menetelmällisiä rajoitteita, jotka varsinkin hitauden takia pahentavat resistenssiin liittyvää ongelmaa. (Yang, 2021).

Maailmanterveysjärjestön vuonna 2015 aloittama toimintasuunnitelma AMR-ongelman ratkaisemiseksi on lisännyt paljon tietoisuutta AMR-bakteeri-infektioita ehkäisevästä ja ongelmaa korjaavasta toiminnasta. Ohjelman tulokset ovat kuitenkin olleet vaihtelevia, ja AMR-infektioiden hoitamiseen tarvitaan ennaltaehkäisevän toiminnan lisäksi uusia hoitomuotoja. (World Health Organization, 2021). Nykyiset bakteeri-infektioiden ehkäisyn suositukset perustuvat pitkälti MRSA:n ehkäisyn suosituksiin. Tarkoituksenmukaisella antibioottien määräämisellä, eristämällä infektoidut terveistä sekä seulomalla ja valvomalla MRSA:ta, on tutkitusti saatu vähennettyä MRSA-infektioiden määrää. Vielä ei ole osoitettu samankaltaisten ehkäisymenetelmien tehokkuutta gram-negatiivisten bakteerien aiheuttamien infektioiden vähentämisessä. Koska gram-negatiivisilla bakteereilla on erilainen rakenne kuin gram-positiivisilla bakteereilla, ja gram-negatiivisten bakteerien karbapeneemiresistenssi on levinnyt lähivuosina nopeasti maailmalla, asiaa olisi tärkeä tutkia lisää. (Naghavi ym., 2024).

3. Bakteriofagit

3.1 Faagien biologia

Bakteriofagit eli faagit ovat bakteerisoluja spesifisesti infektoivia viruksia. Faageja löytyy lähes joka paikasta maailmaa, missä niiden isäntäbakteeria esiintyy. Arviolta faagipartikkelien määrä maapallolla on 10^{31} , mikä tarkoittaisi, että millilitrassa merivettä on 10^8 faagipartikkelia. Faageilla on merkittävä ekologinen rooli bakteerien hajotuksessa varsinkin vesistöissä. Bakteerien ja faagien välillä vallitsee koevoluutio, jossa bakteerit yrittävät jatkuvasti kehittyä resistentteiksi niitä infektoiville faageille, kun taas faagit yrittävät kehittyä infektoimaan isäntäkantaansa tehokkaammin. (Abedon, 2021; Summers, 2021; Weitz ym., 2013).

Faagit jaotellaan tyypillisesti niiden morfologian tai elinkierron perusteella. Toiminnallisesti faagit voivat kuulua joko lyyttisiin tai lauhkeisiin (engl. temperate) faageihin. Lyyttiset faagit infektoivat bakteerisolun, monistuvat ja hajottavat isäntäsolun, minkä jälkeen kierto toistuu. Lauhkeat faagit sen sijaan pystyvät lyyttisen kierron lisäksi siirtyä lysogeeniseen kiertoon, jossa itsensä monistamisen sijaan faagigenomi integroidaan osaksi isäntägenomia. Bakteerin genomiin integroitunut faagigenomi eli profaagi kopioituu bakteerin tytärsoluihin isäntäsolun monistuessa, ja profaagi voi siirtyä lyyttiseen kiertoon esimerkiksi isäntäsoluun kohdistuvan stressin seurauksena. Profaagi voi parantaa infektoidun bakteerin kelpoisuutta antamalla sille uusia ominaisuuksia. Bakteeri voin muun muassa saada profagilta antibiootti- tai faagiresistenssin, tai kyvyn ilmentää virulenssitekijöitä. (Duda, 2021; Weitz ym., 2013). Profaageilla on erilaisia mekanismeja vaikeuttaa muiden faagien infektioryityksiä profaagin sisältävään isäntäsoluun. Tällä

on merkitystä faagihoidojen ja faagi-antibioottiyhdistelmähoitojen suunnittelussa, missä käytetään lyyttisiä faageja niiden jatkuvan bakteereita hajottavan kierron takia. (Dedrick ym., 2017; Duda, 2021).

Caudovirales-lahkon faagit ovat yleisesti molekyylibiologian tutkimuksissa käytettyjä faageja, sekä myös lupaava vaihtoehto faagihoidojen sovelluksille. Kyseisen lahkon faagit ovat rakenteeltaan hännällisiä ja kantavat sisällään DNA-kaksoisjuostetta (dsDNA). Elektronimikroskooppien ja geenitekniiikan menetelmien yleistymisen myötä faagien rakenteen ja toiminnan tutkiminen on helpottunut merkittävästi. (Duda, 2021; Piya ym., 2023).

3.1.1 Faagien rakenne ja toiminta

Morfologialtaan erilaisia faageja on paljon erilaisia, vaikka niiden toiminta jakautuukin karkeasti lyyttiseen ja lysogeeniseen kiertoon. Terapeuttisten sovellusten kannalta dsDNA:ta kantavat *Caudovirales*-lahkon faagit ovat merkittäviä. Lahkoon kuuluu sekä lyyttisiä että lauhkeita faageja, joista lyyttiset ovat jatkuvan bakteereita hajottavan kierron takia tutkitumpia hoitotarkoituksiin. *Caudovirales*-lahkon faagille tyypillinen rakenne on ikosahedraalinen kapsidi, johon on kiinnittyneenä kauluksen avulla häntä. Häntä koostuu ytimeä ja sen suojasta. Tyypilliseen rakenteeseen kuuluu lisäksi kauluskarvat, sekä hännän toisessa päässä olevaan aluslevyyn kiinnittyneet lyhyet ja pitkät häntäkarvat. *Caudovirales*-lahko jakautuu edelleen kolmeen heimoon: *Siphoviridae*, *Myoviridae* ja *Podoviridae*, joista kaikilla on omat rakenteelliset ominaispiirteensä. (Duda, 2021).

Myoviridae-heimon T4-faagi on yksi tunnetuimmista faageista. Tämän heimon faagien rakenteen tunnistaa niiden kapsidin keskiosan pidentymästä, sekä kasaan puristuvasta hännästä. *Podoviridae*-heimon faageilla, kuten esimerkiksi T7-faagilla, rakenne on T4:n kaltainen, mutta niiden häntä on huomattavasti lyhyempi. *Siphoviridae*-heimon faageille taas ominaista on pitkä, kasaan puristumaton häntä. λ -faagi on tyypillinen *Siphoviridae*-heimon faagi, jonka tutkimuksissa käytetyllä kannalla ei yleensä ilmene häntäkarvoja, vaikka luonnosta löytyvällä kannalla löytyy. Häntäkarvojen puuttuminen vaikuttaa vain λ -faagin infektionopeuteen. Kaikki edellä mainitut faagit (T4, T7 ja λ) infektoivat *Escherichia coli*-kantoja. T4 ja T7 ovat lyyttisiä faageja, kun taas λ on lauhkea faagi. (Duda, 2021).

Faagin kulkeutuessa ympäristössään, sen kauluskarvat havaitsevat ympäristön olosuhteita ja säätelevät sen mukaan pitkien häntäkarvojen asennoitumista. Häntäkarvojen asennoituminen vaikuttaa suoraan faagin

kykyyn löytää ja kiinnittyä bakteerin kohderakenteeseen. Pitkissä häntäkarvoissa esiintyy paljon vaihtelevuutta faagien välillä, ja niiden morfologia määrittelee faagin mahdolliset kohderakenteet ja isäntäkannat. Pitkillä häntäkarvoilla faagi tunnistaa kohteen ja kiinnittyy isäntäsolun pintaan. (Duda, 2021). Esimerkiksi T4-faagi kiinnittyy pitkien häntäkarvojen avulla bakteerin pinnan lipopolysakkaridiin tai ulkomembraaniproteiiniin (engl. outer membrane protein complex, OmpC). Kiinnittymisen jälkeen lyhyet häntäkarvat avautuvat aluslevyn alta ja yrittävät kiinnittyä kohderakenteeseen. Mikäli lyhyet häntäkarvat kiinnittyvät tarpeeksi vahvasti kohteeseen, faagi kiinnittyy peruuttamattomasti bakteeriin pintaan ja infektoisen. (Duda, 2021; Islam ym., 2019).

Lyhyiden häntäsäikeiden sitoutuminen aiheuttaa suuren rakenteellisen muutoksen aluslevyssä. T4-faagilla aluslevyn muoto muuttuu kuusikulmiosta tähden muotoiseksi. Samalla hännän suoja supistuu ja hännän ydin työntyy bakteerin uloimman kerroksen läpi. Ytimen rautaa sisältävä kärki on naulan muotoinen ja pysähtyy ennen sisempiä kerroksia. Hännästä vapautuvat lysotsyymimolekyylit rei'ittävät peptidoglykaanikerroksen, jolloin ydin siirtyy bakteerin solukalvolle. Solukalvoon muodostuu kanava, jota pitkin dsDNA siirtyy bakteerin sisälle replikoitavaksi. (Duda, 2021).

DNA siirtyy faagin kapsidista tyypillisesti passiivisen diffuusion myötä hännän kautta bakteerin sisälle. Koska kapsidin ei tarvitse avautua infektiossa niin kuin tyypillisillä viruksilla, se voi muodostua erittäin stabiiliksi, minkä takia faagit kestävät hyvin äärimmäisiä olosuhteita ja kemikaaleja. DNA on tiiviisti pakkautunut kestävän kapsidin sisälle ja siirtyy injektiossa bakteeriin kokonaisuutena tai vaiheittain. DNA-injektion yhteydessä faagit voivat siirtää bakteerin sisälle myös proteiineja. Esimerkiksi T4-faagi injektioi DNA:n lisäksi isäntäsolun nukleaaseja ja RNA-polymeraaseja (RNAP) muokkaavia proteiineja. Normaalisti nukleaasit pilkkovat faagigenomia ja ovat yksi bakteerien puolustusmekanismi faagi-infektioita vastaan, mutta muokattuina ne eivät enää toimi. RNAP:n muokkaaminen vähentää niiden sitoutumista bakteerigenomiin ja lisää faagigenomin luentaa. Jotkut faagit injektioivat omia RNAP:tä, jotka replikoivat tehokkaasti vain faagigenomia. (Duda, 2021).

Injektion jälkeen lyyttisten faagien genomi replikoituu, muodostuu uusia faagipartikkeleita ja lopulta lyyttiset entsyymit hajottavat isäntäsolun. Lauhkeilla faageilla, kuten esimerkiksi λ -faagilla, taas isäntäsolun olosuhteet määrittävät, integroituu vai replikoituu faagigenomi bakteerin sisällä. Faagigenomin replikointi tapahtuu usein vaiheittain ja faagien geenit jaetaan aikaisiin ja myöhäisiin geeneihin. Osalla faageista genomiluenta tapahtuu kaskadina, jolloin aikaisten ja myöhäisten geenien luennan välissä

tapahtuu keskivaiheen geenien luentaa. Aikaisten geenien luenta alkaa lähes heti DNA-injektion jälkeen ja tapahtuu tyypillisesti isäntäsolun RNAP:llä. Aikaiset proteiinit usein estävät isäntäsolun faageja pysäyttävät mekanismit sekä bakteerigenomin luennan. Faageilla, joilla DNA injektoidaan vaiheittain, loput genomista siirtyy bakteerisoluun, kun aikaiset proteiinit ilmentyvät. Aikaiset geenit koodaavat lisäksi tekijöitä tai RNAP:tä, jotka mahdollistavat myöhäisten geenien luennan. Tyypillisesti faagipartikkelien rakenteet, rakenteiden kokoamista tukevat kompleksit sekä bakteerisolun hajottavat tekijät ilmentyvät myöhäisistä geeneistä. (Duda, 2021; McAllister & Hinton, 2019).

Kaikkien uusien faagipartikkelien rakenteet ilmentyvät erikseen ennen rakenteiden yhdistämistä. Kun DNA on pakkautunut kapsidiin ja rakenteet yhdistyneet, tukiproteiinit hajotetaan ja kapsideihin lisätään stabiloiva koristelu, minkä seurauksena faagipartikkelit saavuttavat lopullisen muotonsa. Jotta valmiit faagipartikkelit pääsevät vapautumaan, myöhäisiin proteiineihin kuuluvat hajottavat proteiinit rikkovat bakteerin rakenteen. Holiinit kertyvät bakteerin solukalvolle ja muodostavat pieniä kanavia, joita pitkin endolysiinit pääsevät hajottamaan bakteerin soluseinän. Peptidoglykaanikerroksen hajottua, sisäkalvoon kiinnittyneet spaniinit johtavat ulko- ja sisäkalvon yhteensulautumiseen, jolloin ulkokalvon rakenne muuttuu ja uudet faagipartikkelit vapautuvat ympäristöön. (Duda, 2021).

3.1.2 Faagien suhde bakteereihin

Bakteerisolot suojautuvat usealla eri mekanismilla ympäristön, kuten muiden mikrobien ja antimikrobien aiheuttamalta stressiltä. Rakenteellisesti bakteereita suojaa muun muassa effluksipumput, solukalvo sekä soluseinä, joka on erilainen gram-positiivisilla ja -negatiivisilla bakteereilla. Moni bakteeri pystyy sitoutuessaan tuottamaan solunulkoista polymeeristä ainetta, joka muodostaa bakteerien ympärille suojaavan biofilmin. Biofilmi luo fyysisen esteen bakteerien ja ympäristössä esiintyvien aineiden, kuten antibioottien välille, jolloin aineet eivät pääset vaikuttamaan bakteereihin. (Zhou ym., 2015). Lisäksi bakteerit pystyvät reagoimaan ympäristön muutoksiin. Esimerkiksi antibiootille altistuminen voi aktivoida bakteerin stressivasteen (SOS-vaste) ja johtaa solun filamentoitumiseen eli suurentumiseen. Filamentoituminen voi tapahtua antibioottialtistuksessa myös SOS-riippumattomasti ja filamentoitumisen tarkoitus on suojata bakteeria antibiooteilta sekä fagosytoosilta muodostamalla fyysisesti etäisyyttä ja kasvattamalla solun pinta-alaa. (Justice ym., 2008). Bakteerit pystyvät suojautumaan faageilta usealla eri menetelmällä, jotka voidaan jakaa synnynnäiseen (engl. innate) ja hankittuun (engl. adaptive) puolustusjärjestelmään.

Bakteerien synnynnäiseen järjestelmään kuuluvat restriktio-modifikaatiojärjestelmä (engl. restriction-modification systems) sekä abortoiva infektiio. Abortoivassa infektiiossa bakteerin sisäiset molekyylit tunnistavat ja aktivoituvat, kun infektiio on läpäissyt solun muut puolustusmekanismit. Molekyylin aktivoituminen johtaa solun kuolemaan, jolloin infektiio pysähtyy. Tämän hetken käsityksen mukaan myös bakteerien toksiini-antitoksiinijärjestelmät voivat toimia vasteena esimerkiksi faagi-infektion aiheuttamalle stressille. Järjestelmän ylläpito vaatii jatkuvaa antitoksiinien tuottamista, ja isäntäsolun proteiinisynteesin estyessä antitoksiinien tuottaminen pysähtyy ja solu kuolee toksiinien vaikutukseen. Bakteerit voivat lisäksi hyödyntää restriktio-modifikaatiojärjestelmää, jossa usein ilmennetään kahden tyyppisiä entsyymeitä: restriktionukleaaseja sekä metyyli transferaaseja. Restriktionukleaasit tunnistavat ja katkovat spesifisiä DNA-sekvenssejä, kun taas metyyli transferaasit muokkaavat isännän DNA:n vastaavia sekvenssejä suojatakseen sitä genomia pilkkoutumiselta. (Arias ym., 2022).

Bakteerien hankittuun immuniteettiin kuuluu DNA:ta leikkaavat geenisakset (engl. clustered regularly interspaced short palindromic repeats, CRISPR), jotka on yleisesti tunnettu niiden geenitekniikan sovelluksista (Summers, 2021). CRISPR-järjestelmän avulla bakteeri pystyy säilyttämään useita faagigenomeita tunnistavia DNA-juosteita. Näistä DNA-juosteista bakteeri pystyy tuottamaan RNA:ta, joka ohjaa cas-entsyymien pilkkomaan faagigenomin (Arias ym., 2022). Bakteerit pystyvät kehittymään faageille resistenteiksi saamalla mutaatioita pintaproteiineihinsa tai luopumalla niistä. Luopuminen voi johtaa bakteerien parempaan selviytymiseen ja samalla niiden virulenssin heikkenemiseen. (León & Bastías, 2015; Morris ym., 2012).

Faagit ja bakteerit kehittyvät koevoluutiiossa Punaisen Kuningattaren hypoteesin mukaisesti, jonka mukaan saalistaja-saalissuhteessa elävät organismit pyrkivät jatkuvasti sopeutumaan paremmin toisiaan kohtaan (Morris ym., 2012). Bakteerit yrittävät suojautua faagi-infektioilta, kun taas faagit pyrkivät infektoimaan isäntäsolujansa tehokkaammin. Jotkut faagit ovat kehittyneet niin pitkälle, että ne kykenevät hyödyntämään bakteerien suojausmekanismeja oman elinkiertonsa edistämiseksi (Diallo & Dublanchet, 2022).

3.2 Faagihoidon ja faagi-antibioottiyhdistelmähoitojen historia

Felix Hubert d'Herelle löysi faagit ensimmäisen kerran vuonna 1917. Faagien olemassaoloa kyseenalaistettiin pitkään ja niiden jopa epäiltiin olevan vain monimutkaisia molekyylejä, koska niiden rakennetta oli vaikea selvittää ja eikä niitä voitu luokitella elollisiksi organismeiksi (Çengel, 2023; Summers,

2021). Vuonna 1939 otetut ensimmäiset elektronimikroskooppikuvat paljastivat faagien rakenteen, minkä jälkeen faagit hyväksyttiin virusten kaltaisina mikrobeina.

Faagien löytämisen jälkeen niitä on hyödynnetty muun muassa faagihoidoissa ja faagityypityksessä, jossa tuntematon bakteeri tunnistetaan faagilla, jonka isäntäkirjo tunnetaan entuudestaan (Summers, 2021). Faagihoidoissa faagien tarkoitus on tuhota infektion aiheuttama bakteeri. Faagien käyttöä hoitotarkoitukseen alettiin tutkia pian niiden löytymisen jälkeen, ja niiden tehokkuus osoitettiin nopeasti eläinkokeissa. 1920- ja 1930-luvuilla faagihoitoja tutkittiin paljon ja vuoteen 1940 asti niitä käytettiin onnistuneesti usean tartuntataudin hoitamisessa. Antibioottien ja sulfalääkkeiden löytymisen jälkeen faagihoitojen tutkimukset vähenivät länsimaissa. Uudet lääkkeet olivat laajakirjoisempia, niitä oli helpompi tuottaa ja niiden hoitoteho oli luotettavampi kuin faagihoidoilla. Faagihoitojen käyttöä rajoitti niiden vaihteleva tehon lisäksi puutteellinen ymmärrys faagien biologiasta. (Dublanchet & Fruciano, 2008; Summers, 2021).

Antibioottihoitojen yleistyessä faagihoitojen tutkimus kuitenkin jatkui Neuvostoliitossa, Itä-Euroopassa, Georgiassa ja Brasiliassa (Almeida & Sundberg, 2020). Antibioottien ja faagien yhdistämistä hoidoksi on tutkittu jo vuodesta 1940 asti (Diallo & Dublanchet, 2022). Faagi-antibioottiyhdistelmähoitojen antibakteerinen teho huomattiin nopeasti *in vitro*, eläinkokeissa sekä ihmisillä, kun sulfonamideja yhdistettiin eri faagien kanssa (Macneal ym., 1942; Macneal ym., 1943; Zaytzeff-Jern & Meloney, 1941). Nopeampaa bakteerien hajoamista havaittiin myös muilla faagi-antibioottiyhdistelmillä, kuten esimerkiksi penisilliineillä ja stafylokokkeja infektoivilla faageilla. (Himmelweit, 1945). Yhdistelmähoidolla onnistuttiin hoitamaan yksittäisiä tapauksia endokardiittia, bakteremiaa, osteomyeliittiä, peritoniissia sekä akuutteja pahanlaatuisia stafylokokki-infektioita (Macneal ym., 1943; MacNeal ym., 1945, 1946; Macneal & Blevins, 1945). Faagihoitojen ja yhdistelmähoitojen tutkimus oli kuitenkin vähäistä antibioottien aikakaudella. Mikrobilääkeresistenssin yleistyessä, erityisesti 1980-luvulla MRSA:n nopean leviämisen aikaan, muodostui tarve uusille bakteeri-infektioiden hoitomuodoille. Uusien antibioottien kehittäminen ei ollut enää rahallisesti kannattavaa, koska bakteerit saattaisivat kehittää resistenssin uutta antibioottia vastaan niin nopeasti. Uusien hoitomuotojen tarve johti faageihin perustuvien hoitotutkimusten määrän lisääntymiseen. (Dublanchet & Fruciano, 2008; Summers, 2021).

4. Faagi-antibioottiyhdistelmähoidot

4.1. Yhdistelmähoidot suhteessa nykyhoitoihin

Jotta faagi-antibioottiyhdistelmähoidot tulisivat osaksi nykyisiä tunnustettuja hoitosuosituksia, on välttämätöntä, että niiden tehosta ja turvallisuudesta saadaan tarpeeksi prekliinistä ja kliinistä näyttöä. Yhdistelmähoidoilla voitaisiin hoitaa esimerkiksi diabeettisten haavojen ja palovammojen bakteri-infektioita sekä mikrobilääkeresistenttejä infektioita. Yhdistelmähoidot tehoaisivat todennäköisesti myös infektioihin, joissa esiintyy biofilmiä. (Jokar ym., 2024; Pirnay & Kutter, 2021). Yhdistelmähoidoilla voitaisiin välttyä antibiootteihin liittyviltä ongelmilta ja haittavaikutuksilta. Yhdistelmähoidoissa faagien käyttö mahdollistaa pienempien antibioottimäärien käytön, mikä taas johtaisi antibioottien haittavaikutusten vähenemiseen. Faageilla on kyky monistaa itseään, joten hoitojen määrä ja tiheys mahdollisesti myös pieneneisi. Lisäksi bakteerit kehittävät yhdistelmähoidoille resistenssin paljon hitaammin kuin yksittäiselle antibiootille. (Yang, 2021). Yhdistelmähoidoilla on mahdollisuus jopa uudelleenherkistää bakteerit antibiooteille ja faageille. Uudelleenherkistäminen voisi mahdollistaa tehokkaampien hoitojen hyödyntämisen infektioiden hoitamisessa.

Kirjallisuuden mukaan in vitro - ja in vivo -kokeissa yhdistelmähoitojen teho bakteri-infektioiden karkottamisessa on ollut vaihtelevaa. Ongelmia on esiintynyt prekliinisten tulosten siirtämisessä kliinisiin tutkimuksiin. Tähän on vaikuttanut heikkojen tutkimussuunnitelmien lisäksi biologisen ympäristön muutos siirryttäessä mallista potilaaseen sekä faagien väliset biologiset erot. Polymikrobisessa, eli usean bakteerin muodostavassa ympäristössä yhdistelmähoidon tehokkuutta on hankala ennustaa. Lisäksi jokainen faagi on biologinen yksilö, jonka teho voi vaihdella huomattavasti toisistaan. (Jokar ym., 2024; Yang, 2021). Yhdistelmähoitojen kinetiikasta ja dynamiikasta ei tiedetä vielä kovin paljoa, ja varsinkin hoitoja, joissa käytetään faagicoktailia eli usean faagin yhdistelmää, on vaikeaa mallintaa lukuisten faagien keskenäisten vuorovaikutusten takia (Molina ym., 2022).

Yhdistelmähoitoja varten faageja yleensä rikastetaan eli niiden pitoisuutta kasvatetaan kasvatuksen jälkeen, jotta niiden pitoisuus lopullisessa hoitovalmisteessa on riittävä. Jos faageja on tuotettu endotoksiineja muodostavissa gram-negatiivisissa bakteereissa, niin rikastamisen vaiheessa endotoksiinit väkevöityvät lopputuotteeseen. Endotoksiineita voidaan puhdistaa pois lopputuotteesta esimerkiksi affiniteettikromatografialla ja ultrasuodattamalla (Hietala et al., 2019). Potilaaseen joutuessaan endotoksiinit voivat aiheuttaa immuunijärjestelmän yliaktivoitumisen, mikä voi johtaa sepsikseen jo rikastamista edeltävissä, pienemmissäkin pitoisuuksissa. Tämän takia on tärkeää varmistua faagien

kasvatuskannan turvallisuudesta sekä puhdistusmenetelmien toimivuudesta (Farhana & Khan, 2025). Immuunijärjestelmä voi aktivoitua myös faageja vastaan ja tuottaa faageja neutraloivia vasta-aineita, jolloin yhdistelmähoidon tehokkuus heikkenee. Faageihin kohdistuvat vasta-aineet tyypillisesti katoavat ihmiskehosta vuoden jälkeen yhdistelmähoidon päättymisestä. (Łusiak-Szelachowska ym., 2022).

Faagi-antibioottiyhdistelmiä voidaan kehittää personoidusti tai valmiiksi määritellyiksi hoidoiksi. Valmiiksi määritellyt yhdistelmähoidot ovat faagien ja antibioottien sekoituksia, joissa osatekijät pysyvät samoina ja samoissa suhteissa. Niiden tehoa ei olla tähän mennessä pystytty osoittamaan, kun taas personoiduilla hoidoilla on saatu lupaavia tuloksia (Pirnay ym., 2024). Tapauskohtainen hoitojen kehittäminen on kuitenkin lainsäädännöllisesti hankalaa sekä aikaa ja resursseja kuluttavaa.

Lääkekehityksen lainsäädännön kannalta faagit ovat haastavia, eikä länsimaissa ole yhtään faagia hyödyntävää, myyntiluvan saanutta hoitoa. Jokaiselta lääkkeeltä ja hoidolta vaaditaan riittävä varmuus turvallisuudesta, tehokkuudesta ja toistettavuudesta. Koska jokainen faagi ja siten myös yhdistelmähoito on erilainen, kuuluisi jokaisen yhdistelmähoidon käydä läpi lääkkeitä vaadittu lupamenettely. Yhdysvaltain elintarvike- ja lääkevirasto (engl. Food and Drug Administration, FDA), Yhdysvaltain kansallinen terveystieteiden instituutti (engl. National Institutes of Health, NIH) sekä Euroopan lääkevirasto (engl. European Medicines Agency, EMA) ovat huomanneet yhdistelmähoitoja koskevat lainsäädännölliset ongelmat sekä aloittaneet lainsäädännön valmistelun asian korjaamiseksi. Uudistetut lait mahdollistaisivat yhdistelmähoitojen yksinkertaisemman lupamenettelyn samalla varmistuen, että lainsäädännölliset vaatimukset kuitenkin täyttyvät. Uudistetut lait tulevat todennäköisesti vastaamaan pitkälti tämän hetken biologisten lääkkeiden, kuten vasta-aineiden, säätelyä. (European Medicines Agency, 2023).

4.2 Faagi-antibiootti synergia

Synergia on ilmiö, jossa vaikuttavien tekijöiden yhteisvaikutus on suurempi kuin yksittäisten tekijöiden. Faagi-antibiootti synergian (PAS) myötä faagi-antibioottiyhdistelmähoidoilla voidaan saavuttaa parempi antibakteerinen teho kuin pelkillä faageilla tai antibiooteilla (Torres-Barceló & Hochberg, 2016). Yhdistelmähoidoissa käytetään tyypillisesti matalampia pitoisuuksia antibioottia kuin nykyhoidoissa, jotta synergian vaikutus olisi mahdollisimman suuri. Liian korkeilla pitoisuuksilla antibiootti hajottaa bakteerin ennen kuin faagin tuottamat entsyymit tuhoavat solurakenteen. Faageja ei ehdi muodostumaan yhtä paljon kuin ilman antibioottia, mikäli solun hajoaminen on ennen aikaista. Kirjallisuudessa on kuvattu useita biologisia mekanismeja, joista PAS muodostuu (Diallo & Dublanquet, 2022).

4.2.1 Uudelleenherkistyminen antibiootille tai faagille

Useat tutkimukset jo vuodesta 1962 lähtien ovat osoittaneet, että AMR-bakteerin altistuessa faagi-infektioille, bakteeri voi herkistyä uudelleen antibiooteille, joita kohtaan se on aikaisemmin ollut resistentti (Kuva 1C) (Diallo & Dublanchet, 2022; Zilisteanu ym., 1962; Zilişteanu ym., 1969). Lisäksi bakteerien altistaminen antibiooteille voi uudelleenherkistää ne faageille tai jopa täysin palauttaa faagien infektiokyvyn (Neter, 1941). Bakteereilla tapahtuu evolutiivista kompromissia (engl. evolutionary trade-off) eli yhden ominaisuuden kehittyminen johtaa toisen ominaisuuden katoamiseen tai heikkenemiseen. Kun bakteeri kehittää resistenssin antibiootille tai faagille, se todennäköisesti luopuu toisesta resistenssimekanismista, jolloin se uudelleenherkistyy toiselle antibiootille tai faagille. (Chan ym., 2018; Ho ym., 2018).

4.2.2 Kohdistuminen eri rakenteisiin

Faagi-antibioottiyhdistelmähoidossa faagit ja antibiootit voivat kohdistua bakteerin eri rakenteisiin (Kuva 2B), mikä hidastaa bakteerien lisääntymistä ja resistenssin muodostumista. Bakteereille resistentin muodostaminen on vaikeampaa, kun niihin kohdistuu lyhyessä ajassa hyökkäys useaa reittiä pitkin (Manohar ym., 2020; Torres-Barceló & Hochberg, 2016). Samankaltainen ilmiö on havaittu faagikohtaileilla, joissa useat faagit infektoivat samoja bakteereita eri reseptoreiden kautta. Tällöin monilääkeresistenssin (engl. multi-drug resistance) kehittyminen on epätodennäköisempää kuin bakteerien altistuessa yksittäiselle faagikannalle. (Lin ym., 2017; Summers, 2001).

4.2.3 Muutokset bakteerisolun hajoamisessa ja morfologiassa

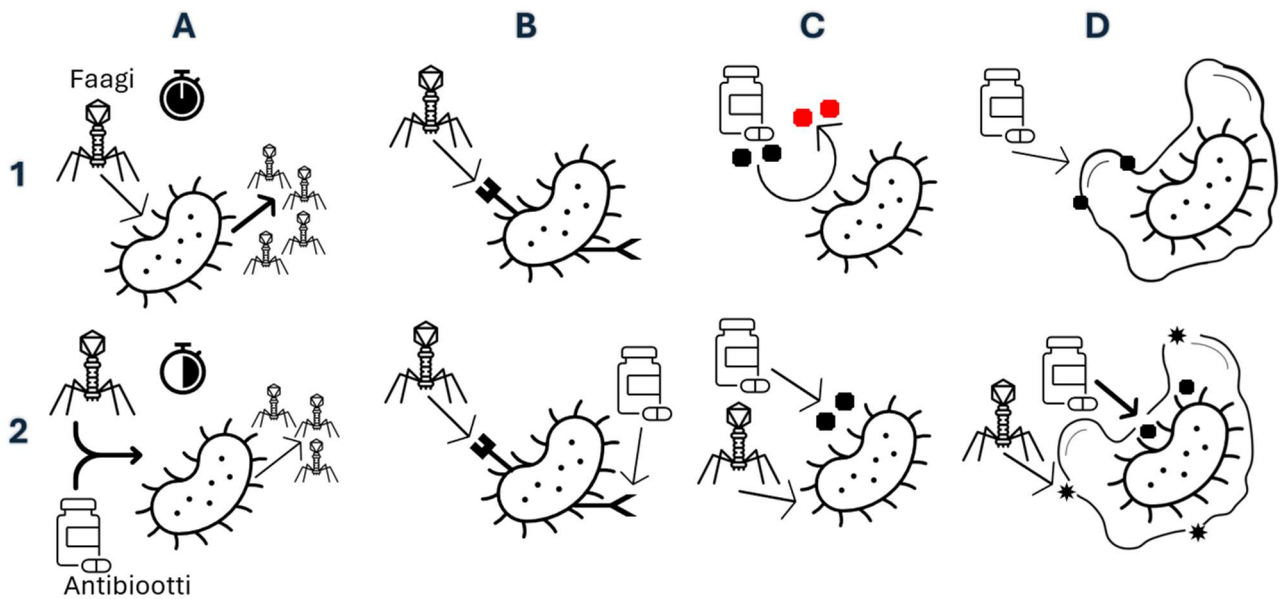
Osa bakteereista kykenee filamentoitumaan altistuessaan antibiootille, pyrkien vähentämään antibiootin vaikutusta. Tutkimuksissa on havaittu, että faagit pystyvät lisääntymään tehokkaammin filamentoituvissa bakteereissa, sekä joko nopeuttamaan tai hidastamaan bakteerin hajoamista (Comeau ym., 2007; M. Kim ym., 2018). Bakteerin hajoamisen nopeus faagi-antibioottiyhdistelmällä on riippuvaista bakteeria infektoivasta faagista, antibiootista, sen pitoisuudesta sekä isäntäbakteerista (Diallo & Dublanchet, 2022; Fothergill ym., 2011; M. Kim ym., 2018). Nopeammalle hajoamiselle ei ole osoitettu tarkkaa mekanismia, mutta Comeau kollegoineen (2007) ovat ehdottaneet, että ilmiö johtuisi siitä, että bakteerin filamentoituminen aiheuttaisi sen peptidoglykaanikerroksessa häiriöitä. Ryhmän hypoteesin mukaan nämä häiriöt herkistävät tiettyjen bakteerien peptidoglykaanikerrokset faagien hajottaville entsyymeille (lysosyymit, holiinit), minkä takia bakteeri hajoaa nopeammin (Kuva 1A). Nopeamman hajoamisen

yhteydessä on havaittu, että bakteereista vapautuu silti lähes yhtä paljon faagipartikkeleita kuin pelkkien faagien hajottaessa bakteerit (Comeau ym., 2007). Tämä havainto viittaa siihen, että uusien faagipartikkelien tuotanto tehostuu, kun isäntäbakteeri altistuu faagi-infektion lisäksi antibiootille.

Tutkittaessa filamentoituvia bakteereita, jotka hajoavat faagien vaikutuksesta yhtä nopeasti kuin faagi-antibioottiyhdistelmän vaikutuksesta, on havaittu, että yhdistelmälle altistuneet bakteerit vapauttavat hajotessaan enemmän faagipartikkeleita (Comeau ym., 2007). Comeau kollegoineen (2007) on ehdottanut, että tehostunut faagien tuotanto johtuu filamentoituvien bakteerien metabolian muutoksista, jotka edistävät faagien määrää esimerkiksi nopeuttamalla faagipartikkelien kasautumista. Kun filamentoituvat bakteerit hajoavat faagi-antibioottiyhdistelmälle hitaammin kuin pelkälle faagille, ilmiön merkitys korostuu. Kim kollegoineen (2018) on ehdottanut, että jotkut filamentoituvat bakteerit hajoavat hitaammin, koska faagien tuottamat holiinit eivät ehdi kertymään yhtä nopeasti bakteerien laajentuneille sisäkalvoille kuin ilman filamentaatiota. Koska bakteerien hajotus hidastuu, myös faagien tuotanto pitkittyy ja lopulta bakteerien hajotessa niistä vapautuu enemmän faagipartikkeleita.

4.2.4 Faagien aikaansaama antibioottien kulkeutuminen biofilmiin

Osa bakteereista pystyy muodostamaan biofilmin, joka suojaa niitä muun muassa antibiooteilta. Faagi-antibioottiyhdistelmähoito toimii biofilmejä vastaan tehokkaammin kuin pelkkä antibiootti tai faagi yksinään (Chaudhry ym., 2017). Faagien tuottamat hajottavat entsyymit, kuten esimerkiksi depolymeraasit ja endolysiinit, hajottavat biofilmin rakennetta, jolloin antibiootit pääsevät vaikuttamaan lähemmäs bakteereita (Kuva 1D) (Łusiak-Szelachowska ym., 2020; Moryl ym., 2023). Yhdistelmähoidolla on onnistuttu hävittämään eri bakteerikantojen tuottama biofilmejä (Morrissette ym., 2020; Necel ym., 2022).



Kuva 1. Faagi-antibiootti synergian mekanismeja. Faagien elinkierto (1A) nopeutuu, kun niiden infektoima bakteeri altistuu subleetaalille konsentraatiolle antibioottia (2A). Kun bakteeriin kohdistuu antibakteerinen vaikutus vain yhtä reittiä pitkin (1B), sen jakautuminen on nopeampaa ja resistenssin kehittyminen todennäköisempää kuin silloin, kun vaikutus tapahtuu usean reitin välityksellä (2B). Antibioottiresistentti bakteeri kykenee inaktivoimaan antibioottimolekyylejä (mustat neliöt, punaiset neliöt kuvaavat inaktivoituja molekyylejä) (1C). Faagi-infektion seurauksena bakteeri ei kykene inaktivoimaan antibioottia ja uudelleenherkistyy sille (2C). Bakteerin tuottama, sitä ympäröivä ja suojaava biofilmi (kupla) heikentää antibioottien (mustat neliöt) vaikutusta bakteeriin (1D). Faagien tuottamat entsyymit (tähdet), esimerkiksi holiiniit ja endolysiiniit, pystyvät hajottamaan biofilmiä, jolloin antibiootit pääsevät lähemmäs bakteeria ja pystyvät tehokkaammin vaikuttamaan bakteeriin (2D). Kuvan elementit eivät ole kooltaan tai määrältään todellisissa suhteissa. Nuolen paksuus rivien 1 ja 2 välillä kuvastaa ilmiön tai vaikutuksen voimakkuutta.

4.3 Faagi-antibioottiyhdistelmähoitojen kehittäminen

Faagi-antibioottiyhdistelmähoitojen kehittäminen kohdistuu tällä hetkellä personoituihin tai valmiiksi määriteltyihin hoitoihin. Personoiduissa hoidoissa käytettävät faagit ja antibiootit määräytyvät vasta infektion aiheuttavan bakteerikannan selvittyä, kun taas valmiiksi määritellyissä hoidoissa faagit ja antibiootit pysyvät samoina. Yhdistelmähoitoissa voidaan hyödyntää faagicoktailia eli usean faagin yhdistelmää, sekä käyttää useaa antibioottia. Valmiiksi määritellyissä hoidoissa käytetään tyypillisesti faagicoktailia, jotta hoitoa voidaan kohdentaa laajempaa bakteerikirjoa vastaan. Yhdistelmähoitoissa faagien määrälle on kuitenkin raja, sillä mitä enemmän hoidot sisältävät faageja ja antibiootteja, sitä vaikeampaa on ennustaa faagien ja antibioottien keskinäisiä vuorovaikutuksia (Molina ym., 2022). Nykyiset prekliiniset mallit eivät pysty tarkasti ennustamaan potilaan infektiotilanteen vuorovaikutuksia, minkä takia on tärkeää kokeilla yhdistelmähoitoa etukäteen potilaalta eristettyä, infektiota aiheuttavaa bakteeria vastaan (M. K. Kim ym., 2024). Faagien infektiotehokkuutta yhdistelmähoitoissa voidaan yrittää parantaa muokkaamalla faagien rakennetta ja harjoittamalla niitä tiettyjä bakteerikantoja vastaan (Dedrick ym., 2019; Eskenazi ym., 2022). Biofilmiä sisältävien bakteeri-infektioiden hoidossa tehokkuutta voidaan parantaa

lisäämällä yhdistelmähoitoon biofilmiä hajottavia entsyymeitä, kuten holiineita (M. K. Kim ym., 2024). Lisäksi yhdistelmähoitojen jakautumista kehossa, stabiilisuutta sekä faagien immunoneutralisaation välttämistä voidaan tehostaa muokkaamalla lopullista valmistetta muun muassa kapseloimalla faagit lipidirakenteeseen. (Malik ym., 2017).

Lääkevalmistajat suosivat valmiiksi määriteltyjen yhdistelmähoitojen kehittämistä, koska niitä voitaisiin tuottaa ja myydä suoraviivaisemmin. Lisäksi lääketieteellisuutta koskevat lait ovat rakentuneet kemiallisten lääkeainemolekyylien ympärille, minkä takia muuttumattomien hoitojen kaupallistaminen on helpompaa kuin personoitujen hoitojen. Kim ja kollegoiden (2024) tutkimuksessa tutkittiin menetelmää, jolla voitaisiin toistettavasti kehittää tehokkaita faagi-antibioottiyhdistelmähoitoja. Ryhmä loi menetelmällä kolme yhdistelmähoitoa, joiden tehokkuus oli vähintään 96 % kliinisiä *P. aeruginosa* -kantoja (153) vastaan. Menetelmä toimi myös biofilmissä, kliinisissä *S. aureus* -kannoissa, kliinisten *S. aureus* - ja *P. aeruginosa* -kantojen yhteiskasvuissa, sekä *in vivo* hiirien tuoreiden haavojen hoidossa. Ryhmä jakoi samaa isäntää infektoivat faagit niiden kohderakenteen perusteella komplementaarisiin ryhmiin (engl. complementarity groups). Tutkimuksessa havaittiin, että jos saman ryhmän faageja käytettiin ja *P. aeruginosa* kehittyi resistenssi yhtä vastaan, niin resistenssi koski myös muita saman ryhmän faageja, eli bakteerille kehittyi ristiresistenssi (engl. cross-resistance). Menetelmä perustui siihen, että yhdistämällä useita faageja, joilla on ei-päällekkäisiä reseptorivastaavuusluokkia, (engl. Non-redundant receptor complementary group" voidaan kehittää tehokkaita yhdistelmähoitoja. Faagicoktailien havaittiin myös estävän resistenssin muodostumista bakteereissa. Tutkimuksessa havaittiin spesifisiä vuorovaikutuksia komplementaari-ryhmien sisällä sekä niiden vuorovaikuttaessa tiettyjen antibioottien kanssa. Esimerkiksi tyyppin IV pili -faagit toimivat toistuvasti synergistisesti betalaktaamien ja aminoglykosidien kanssa.

Nykymenetelmillä personoitujen yhdistelmähoitojen kehittäminen kestää kauan, koska yhdistelmähoitoa kokeillaan infektiota aiheuttavaa bakteeria kohtaan, ennen hoidon antamista potilaalle. Personoitujen yhdistelmähoitojen kehittäminen on lisäksi työlästä, kallista ja vaatii kattavat faagikirjastot hoitojen laatimiseen. Personoiduilla yhdistelmähoidoilla odotetaan kuitenkin saavutettavan parempia hoitovasteita kuin valmiiksi määritetyillä hoidoilla. (Chan ym., 2013).

4.4 Tuloksia yhdistelmähoidosta

Faagi-antibioottiyhdistelmähoidoista löytyy melko vähän hoidon toimivuutta tukevaa kliinistä tutkimusta. Yhdistelmähoitojen tehokkuus varsinkin mikrobilääkeresistenttejä bakteeri-infektioita vastaan on pystytty

osoittamaan osassa *in vitro* - sekä *in vivo* -kokeita. (Luo ym., 2022; Necel ym., 2022). Tulokset ovat yleisesti kuitenkin olleet vaihtelevia, koska jokainen erilainen yhdistelmähoito on käytännössä oma hoitonsa. Yhdistelmähoitojen tutkimuksia on toteutettu, mutta ne ovat usein epäonnistuneet huonon tutkimussuunnitelman takia. Kokeissa on esimerkiksi käytetty epästabiileja faagivalmisteita, jotka ovat menettäneet tehonsa säilytyksen aikana, tai jätetty kokeilematta infektoiko annettu faagi potilaalta eristettyä bakteerikantaa (Abedon, 2019; Jault ym., 2019). Faagit infektoivat bakteereita spesifisesti, eikä pelkän infektiota aiheuttavan bakteerilajin selvittäminen riitä. Siksi on tärkeää selvittää tarkka bakteerikanta ja kokeilla etukäteen, mitkä faagit kyseistä kantaa pystyvät infektoimaan. (Pirnay & Kutter, 2021). Onnistuneita yksittäistapauksia personoidun yhdistelmähoidon käytöstä on kuitenkin kuvattu useita (Pirnay ym., 2024).

Pirnayn ja kollegoiden (2024) katsausartikkelissa koottiin dataa sadasta vakavaa bakteeri-infektiota sairastavasta potilaasta, joita hoidettiin faagihoidolla tai faagi-antibioottiyhdistelmähoidolla. Artikkeleihin koottujen tulosten mukaan yhdistelmähoidot olivat turvallisia ja tehokkaita alahengitystie-, iho-, pehmytkudos- ja luuinfektioiden hoitamisessa. Kaikilla hoidoilla saatiin aikaan 77,2 % kliinisen oirekuvan parantuminen ja infektio hävitettiin 61,3 % tapauksissa. Ilman samanaikaista antibioottikuuria faagihoito hävitti infektion 70 % (odds ratio = 0,3) pienemmällä todennäköisyydellä, eli yhdistelmähoito toimi paremmin infektion karkottamisessa. Yhdistelmähoitoa saaneista 90 % (9/10) potilaista havaittiin PAS hoidonmäärityksessä *in vitro*. Infektion aiheuttanut bakteeri kehittyi faagiresistentiksi 43,8 % (7/16) pelkkää faagihoitoa saaneilla potilailla. Osassa faagiresistenssin kehittäneistä bakteereista havaittiin heikentyneitä virulenssia ja antibiooteille uudelleenherkistymistä. Immuunineutralisointia havaittiin 38,5 % (5/13) tapauksista ja hoitoon liittyviä lieviä sivuvaikutuksia 7 % (7/100) potilaalla. Artikkeleissä osoitetaan, että personoidut faagi-antibioottiyhdistelmähoidot ovat turvallisia. Artikkelin kuvaamien tapausten mukaan yhdistelmähoitoja onnistuttiin käyttämään myös preadaptoiduilla faageilla sekä mukauttamalla keskeneräistä hoitoa.

5. Yhteenveto ja johtopäätökset

Mikrobilääkeresistentit bakteeri-infektiot on kasvava, maailmanlaajuinen ongelma, joka johtaa vuosittain miljooniin kuolemantapauksiin (Naghavi ym., 2024). Ongelman ratkaisemiseksi tarvitaan infektioita ehkäisevien toimien lisäksi uusia hoitovaihtoehtoja. Faageihin pohjautuvia hoitoja tutkittiin jo ennen antibiootteja, ja faagien ainutlaatuiset ominaisuudet tekevät niistä lupaavan vaihtoehdon bakteeri-infektioiden hoitamisessa. Toisin kuin antibiootit, faagit tuhoavat bakteereita spesifisesti, joten ne

aiheuttavat vähemmän sivuvaikutuksia kehon mikrobistolle. Vaikka joissain tapauksissa on havaittu, että ihmisen immuunipuolustus kykenee neutraloimaan faageja, niiden on kuitenkin osoitettu olevan yleisesti turvallisia. (Uyttebroek ym., 2022). Kehon muodostamat vasta-aineet faageja kohtaan myös usein poistuvat vuoden sisällä annetusta faagihoidosta (Łusiak-Szelachowska ym., 2022). Faagit kykenevät monistumaan ja mutatoitumaan, mikä voi mahdollistaa harvemmin annettavan hoidon. Bakteerit voivat jopa uudelleenherkistyä faageille ja antibiooteille faagi-antibioottiyhdistelmälle altistuessaan. Yhdistämällä faagit ja antibiootit voidaan saavuttaa synergistinen antibakteerinen vaikutus. (Diallo & Dublanche, 2022).

Yhdistelmähoidoilla on tulevaisuudessa mahdollisuus olla osa yleisiä hoitosuosituksia, varsinkin AMR-bakteeri-infektioiden hoitamisessa. Tällä hetkellä yhdistelmähoitoja rajoittaa niiden tehoa ja turvallisuutta tukevien kliinisten tutkimusten puute. Tämä johtuu osittain vaillinaisista tutkimussuunnitelmista sekä vaikeudesta siirtää yhdistelmähoitoista saatuja prekliinisiä tuloksia kliiniselle puolelle. Yhdistelmähoidoilla on kuitenkin onnistuttu hoitamaan yksittäisiä potilaita, jotka ovat sairastaneet vaikeasti hoidettavia bakteeri-infektioita (Pirnay ym., 2024). Yhdistelmähoitoista saatujen prekliinisten tulosten ennustettavuus kliinisiin tilanteisiin on hankalaa, koska mallien pitäisi huomioida faagien, bakteerien, antibioottien sekä biofilmien vuorovaikutukset potilaissa. Lukuisten huomioitavien vuorovaikutusten takia myös valmiiksi määriteltujen yhdistelmähoitojen kehittäminen on monimutkaista.

Lisääntyvä faagitutkimus on helpottanut vuorovaikutusten ennustamista ja hoitojen kehittämistä (M. K. Kim ym., 2024). Perustutkimusta tarvitaan sekä valmiiksi määritettyjen että personoitujen yhdistelmähoitojen kehittämiseen. Tähän mennessä suoritetuissa kokeissa eri faagien ja antibioottien yhdistelmiä on kokeiltu potilaalta eristettyä bakteerikantaa vastaan, kunnes sopiva yhdistelmä on löytynyt. Tällä tavalla yksilöllistetyn hoidon määrittäminen on kallista ja työlästä. Nykyinen lääkehoitoja koskeva lainsäädäntö edellyttää tällä hetkellä jokaiselta eri yhdistelmähoidolta tarvittavat tehokkuuden ja turvallisuuden tutkimukset, jotta hoito voidaan yleisesti hyväksyä. Onneksi kasvavat faagikirjastot, faagien muokkaaminen ja perustutkimuksesta saatava tieto tarjoavat personoitujen hoitojen kehittämiseksi uusia, tehokkaampia reittejä (Dedrick ym., 2019; Eskenazi ym., 2022). Faageihin liittyvä lainsäädäntö on kehityksen alla, mikä on merkittävää yhdistelmähoitojen kehityksen kannalta. Yhdistelmähoitot vaikuttavat lupaavalta keinolta hillitä kasvavaa AMR-ongelmaa (European Medicines Agency, 2023).

Lähdeluettelo

- Abedon, S. T. (2019). Phage-Antibiotic Combination Treatments: Antagonistic Impacts of Antibiotics on the Pharmacodynamics of Phage Therapy? *Antibiotics*, *8*(4), Article 4.
<https://doi.org/10.3390/antibiotics8040182>
- Abedon, S. T. (2021). General Ecology of Bacteriophages. In *Encyclopedia of Virology* (pp. 314–321). Elsevier.
<https://doi.org/10.1016/B978-0-12-809633-8.20955-2>
- Almeida, G. M. de F., & Sundberg, L.-R. (2020). The forgotten tale of Brazilian phage therapy. *The Lancet Infectious Diseases*, *20*(5), e90–e101. [https://doi.org/10.1016/S1473-3099\(20\)30060-8](https://doi.org/10.1016/S1473-3099(20)30060-8)
- Andersson, D. I., & Hughes, D. (2012). Evolution of antibiotic resistance at non-lethal drug concentrations. *Drug Resistance Updates: Reviews and Commentaries in Antimicrobial and Anticancer Chemotherapy*, *15*(3), 162–172. <https://doi.org/10.1016/j.drup.2012.03.005>
- Arias, C. F., Acosta, F. J., Bertocchini, F., Herrero, M. A., & Fernández-Arias, C. (2022). The coordination of anti-phage immunity mechanisms in bacterial cells. *Nature Communications*, *13*(1), 7412.
<https://doi.org/10.1038/s41467-022-35203-7>
- Batoni, G., Maisetta, G., & Esin, S. (2021). Therapeutic Potential of Antimicrobial Peptides in Polymicrobial Biofilm-Associated Infections. *International Journal of Molecular Sciences*, *22*(2), Article 2.
<https://doi.org/10.3390/ijms22020482>
- Çengel, Y. A. (2023). Eighteen distinctive characteristics of life. *Heliyon*, *9*(3), e13603.
<https://doi.org/10.1016/j.heliyon.2023.e13603>
- Chan, B. K., Abedon, Stephen T., & Loc-Carrillo, C. (2013). Phage Cocktails and the Future of Phage Therapy. *Future Microbiology*, *8*(6), 769–783. <https://doi.org/10.2217/fmb.13.47>
- Chan, B. K., Turner, P. E., Kim, S., Mojibian, H. R., Eleftheriades, J. A., & Narayan, D. (2018). Phage treatment of an aortic graft infected with *Pseudomonas aeruginosa*. *Evolution, Medicine, and Public Health*, *2018*(1), 60–66. <https://doi.org/10.1093/emph/eoy005>

- Chaudhry, W. N., Concepción-Acevedo, J., Park, T., Andleeb, S., Bull, J. J., & Levin, B. R. (2017). Synergy and Order Effects of Antibiotics and Phages in Killing *Pseudomonas aeruginosa* Biofilms. *PLOS ONE*, *12*(1), e0168615. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0168615>
- Comeau, A. M., Tétart, F., Trojet, S. N., Prère, M.-F., & Krisch, H. M. (2007). Phage-Antibiotic Synergy (PAS): Beta-lactam and quinolone antibiotics stimulate virulent phage growth. *PloS One*, *2*(8), e799. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0000799>
- Dedrick, R. M., Guerrero-Bustamante, C. A., Garlena, R. A., Russell, D. A., Ford, K., Harris, K., Gilmour, K. C., Soothill, J., Jacobs-Sera, D., Schooley, R. T., Hatfull, G. F., & Spencer, H. (2019). Engineered bacteriophages for treatment of a patient with a disseminated drug-resistant *Mycobacterium abscessus*. *Nature Medicine*, *25*(5), 730–733. <https://doi.org/10.1038/s41591-019-0437-z>
- Dedrick, R. M., Jacobs-Sera, D., Bustamante, C. A. G., Garlena, R. A., Mavrich, T. N., Pope, W. H., Reyes, J. C. C., Russell, D. A., Adair, T., Alvey, R., Bonilla, J. A., Bricker, J. S., Brown, B. R., Byrnes, D., Cresawn, S. G., Davis, W. B., Dickson, L. A., Edgington, N. P., Findley, A. M., ... Hatfull, G. F. (2017). Prophage-mediated defence against viral attack and viral counter-defence. *Nature Microbiology*, *2*(3), 1–13. <https://doi.org/10.1038/nmicrobiol.2016.251>
- Demerec, M. (1948). Origin of Bacterial Resistance to Antibiotics. *Journal of Bacteriology*, *56*(1), 63–74. <https://doi.org/10.1128/jb.56.1.63-74.1948>
- Diallo, K., & Dublanquet, A. (2022). Benefits of Combined Phage–Antibiotic Therapy for the Control of Antibiotic-Resistant Bacteria: A Literature Review. *Antibiotics*, *11*(7), 839. <https://doi.org/10.3390/antibiotics11070839>
- Dublanquet, A., & Fruciano, E. (2008). Brève histoire de la phagothérapie. *Médecine et Maladies Infectieuses*, *38*(8), 415–420. <https://doi.org/10.1016/j.medmal.2008.06.016>
- Duda, R. L. (2021). Tailed Double-Stranded DNA Phages. In *Encyclopedia of Virology* (pp. 45–52). Elsevier. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-809633-8.21230-2>
- Durkin, M. (2004). CONTROL OF INFECTIOUS CAUSES OF CHILDHOOD DISABILITY IN DEVELOPING COUNTRIES. In *The Infectious Etiology of Chronic Diseases: Defining the Relationship, Enhancing the*

Research, and Mitigating the Effects: Workshop Summary. National Academies Press (US).

<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK83707/>

Eskenazi, A., Lood, C., Wubbolts, J., Hites, M., Balarjishvili, N., Leshkasheli, L., Askilashvili, L., Kvachadze, L., van Noort, V., Wagemans, J., Jayankura, M., Chanishvili, N., de Boer, M., Nibbering, P., Kutateladze, M., Lavigne, R., Merabishvili, M., & Pirnay, J.-P. (2022). Combination of pre-adapted bacteriophage therapy and antibiotics for treatment of fracture-related infection due to pandrug-resistant *Klebsiella pneumoniae*. *Nature Communications*, *13*(1), 302. <https://doi.org/10.1038/s41467-021-27656-z>

Farhana, A., & Khan, Y. S. (2025). Biochemistry, Lipopolysaccharide. In *StatPearls*. StatPearls Publishing.

<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK554414/>

Fothergill, J. L., Mowat, E., Walshaw, M. J., Ledson, M. J., James, C. E., & Winstanley, C. (2011). Effect of Antibiotic Treatment on Bacteriophage Production by a Cystic Fibrosis Epidemic Strain of *Pseudomonas aeruginosa*. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, *55*(1), 426–428.

<https://doi.org/10.1128/aac.01257-10>

Fowler, T., Walker, D., & Davies, S. C. (2014). The risk/benefit of predicting a post-antibiotic era: Is the alarm working? *Annals of the New York Academy of Sciences*, *1323*(1), 1–10.

<https://doi.org/10.1111/nyas.12399>

GBD 2021 Fertility and Forecasting Collaborators. (2024). Global fertility in 204 countries and territories, 1950–2021, with forecasts to 2100: A comprehensive demographic analysis for the Global Burden of Disease Study 2021. *The Lancet*, *403*(10440), 2057–2099.

[https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(24\)00550-6](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(24)00550-6)

Gibson, B., Wilson, D. J., Feil, E., & Eyre-Walker, A. (2018). The distribution of bacterial doubling times in the wild. *Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences*, *285*(1880), 20180789.

<https://doi.org/10.1098/rspb.2018.0789>

Grenni, P., Ancona, V., & Barra Caracciolo, A. (2018). Ecological effects of antibiotics on natural ecosystems: A review. *Microchemical Journal*, *136*, 25–39. <https://doi.org/10.1016/j.microc.2017.02.006>

- Hietala, V., Horsma-Heikkinen, J., Carron, A., Skurnik, M., & Kiljunen, S. (2019). The Removal of Endo- and Enterotoxins From Bacteriophage Preparations. *Frontiers in Microbiology*, *10*.
<https://doi.org/10.3389/fmicb.2019.01674>
- Himmelweit, F. (1945). COMBINED ACTION OF PENICILLIN AND BACTERIOPHAGE ON STAPHYLOCOCCI. *The Lancet*, *246*(6361), 104–105. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(45\)91422-X](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(45)91422-X)
- Ho, K., Huo, W., Pas, S., Dao, R., & Palmer, K. L. (2018). *Loss of function mutations in epaR confer resistance to phage NPV1 infection in Enterococcus faecalis OG1RF*. <https://doi.org/10.1101/301929>
- Hunt, D., & Kates, O. S. (2024). A Brief History of Antimicrobial Resistance. *AMA Journal of Ethics*, *26*(5), 408–417. <https://doi.org/10.1001/amajethics.2024.408>
- Islam, M. Z., Fokine, A., Mahalingam, M., Zhang, Z., Garcia-Doval, C., van Raaij, M. J., Rossmann, M. G., & Rao, V. B. (2019). Molecular anatomy of the receptor binding module of a bacteriophage long tail fiber. *PLoS Pathogens*, *15*(12), e1008193. <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1008193>
- Jault, P., Leclerc, T., Jennes, S., Pirnay, J. P., Que, Y.-A., Resch, G., Rousseau, A. F., Ravat, F., Carsin, H., Floch, R. L., Schaal, J. V., Soler, C., Fevre, C., Arnaud, I., Bretaudeau, L., & Gabard, J. (2019). Efficacy and tolerability of a cocktail of bacteriophages to treat burn wounds infected by *Pseudomonas aeruginosa* (PhagoBurn): A randomised, controlled, double-blind phase 1/2 trial. *The Lancet Infectious Diseases*, *19*(1), 35–45. [https://doi.org/10.1016/S1473-3099\(18\)30482-1](https://doi.org/10.1016/S1473-3099(18)30482-1)
- Jokar, J., Abdulabbas, H. T., Javanmardi, K., Mobasher, M. A., Jafari, S., Ghasemian, A., Rahimian, N., Zarenezhad, A., & Soltani Hekmat, A. (2024). Enhancement of bactericidal effects of bacteriophage and gentamicin combination regimen against *Staphylococcus aureus* and *Pseudomonas aeruginosa* strains in a mice diabetic wound model. *Virus Genes*, *60*(1), 80–96. <https://doi.org/10.1007/s11262-023-02037-4>
- Justice, S. S., Hunstad, D. A., Cegelski, L., & Hultgren, S. J. (2008). Morphological plasticity as a bacterial survival strategy. *Nature Reviews Microbiology*, *6*(2), 162–168.
<https://doi.org/10.1038/nrmicro1820>

- Kim, M., Jo, Y., Hwang, Y. J., Hong, H. W., Hong, S. S., Park, K., & Myung, H. (2018). Phage-Antibiotic Synergy via Delayed Lysis. *Applied and Environmental Microbiology*, *84*(22), e02085-18.
<https://doi.org/10.1128/AEM.02085-18>
- Kim, M. K., Chen, Q., Echterhof, A., Pennetzdorfer, N., McBride, R. C., Banaei, N., Burgener, E. B., Milla, C. E., & Bollyky, P. L. (2024). A blueprint for broadly effective bacteriophage-antibiotic cocktails against bacterial infections. *Nature Communications*, *15*(1), 9987. <https://doi.org/10.1038/s41467-024-53994-9>
- Klein, E. Y., Impalli, I., Poleon, S., Denoel, P., Cipriano, M., Van Boeckel, T. P., Pecetta, S., Bloom, D. E., & Nandi, A. (2024). Global trends in antibiotic consumption during 2016–2023 and future projections through 2030. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, *121*(49), e2411919121.
<https://doi.org/10.1073/pnas.2411919121>
- León, M., & Bastías, R. (2015). Virulence reduction in bacteriophage resistant bacteria. *Frontiers in Microbiology*, *6*. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2015.00343>
- Lin, D. M., Koskella, B., & Lin, H. C. (2017). Phage therapy: An alternative to antibiotics in the age of multi-drug resistance. *World Journal of Gastrointestinal Pharmacology and Therapeutics*, *8*(3), 162–173.
<https://doi.org/10.4292/wjgpt.v8.i3.162>
- Luo, J., Xie, L., Liu, M., Li, Q., Wang, P., & Luo, C. (2022). Bactericidal Synergism between Phage YC#06 and Antibiotics: A Combination Strategy to Target Multidrug-Resistant *Acinetobacter baumannii* In Vitro and In Vivo. *Microbiology Spectrum*, *10*(4), e00096-22. <https://doi.org/10.1128/spectrum.00096-22>
- Łusiak-Szelachowska, M., Międzybrodzki, R., Rogóż, P., Weber-Dąbrowska, B., Żaczek, M., & Górski, A. (2022). Do Anti-Phage Antibodies Persist after Phage Therapy? A Preliminary Report. *Antibiotics*, *11*(10), Article 10. <https://doi.org/10.3390/antibiotics11101358>
- Łusiak-Szelachowska, M., Weber-Dąbrowska, B., & Górski, A. (2020). Bacteriophages and Lysins in Biofilm Control. *Virologica Sinica*, *35*(2), 125–133. <https://doi.org/10.1007/s12250-019-00192-3>
- Macneal, W. J., & Blevins, A. (1945). Bacteriological Studies in Endocarditis. *Journal of Bacteriology*, *49*(6), 603–610. <https://doi.org/10.1128/jb.49.6.603-610.1945>

- MacNeal, W. J., Filak, L., & Blevins, A. (1946). Conjoined action of penicillin and bacteriophages. *The Journal of Laboratory and Clinical Medicine*, 31(9), 974–981.
<https://doi.org/10.5555/uri:pii:0022214346900030>
- MacNeal, W. J., FRISBEE, F. C., & BLEVINS, A. (1943). RECOVERIES FROM STAPHYLOCOCCIC MENINGITIS FOLLOWING BACTERIOPHAGE THERAPY. *Archives of Otolaryngology*, 37(4), 507–525.
<https://doi.org/10.1001/archotol.1943.00670030519005>
- MacNeal, W. J., Poindexter, C. A., & Marty, F. N. (1945). Apparent arrest of staphylococcal endocarditis. *American Heart Journal*, 29(3), 403–408. [https://doi.org/10.1016/0002-8703\(45\)90344-9](https://doi.org/10.1016/0002-8703(45)90344-9)
- Macneal, W. J., Spence, M. J., & Blevins, A. (1942). Cure of Experimental Staphylococcal Meningitis.*. *Proceedings of the Society for Experimental Biology and Medicine*, 50(1), 176–179.
<https://doi.org/10.3181/00379727-50-13737>
- Malik, D. J., Sokolov, I. J., Vinner, G. K., Mancuso, F., Cinquerrui, S., Vladislavljevic, G. T., Clokie, M. R. J., Garton, N. J., Stapley, A. G. F., & Kirpichnikova, A. (2017). Formulation, stabilisation and encapsulation of bacteriophage for phage therapy. *Advances in Colloid and Interface Science*, 249, 100–133. <https://doi.org/10.1016/j.cis.2017.05.014>
- Manohar, P., Loh, B., Athira, S., Nachimuthu, R., Hua, X., Welburn, S. C., & Leptihn, S. (2020). Secondary Bacterial Infections During Pulmonary Viral Disease: Phage Therapeutics as Alternatives to Antibiotics? *Frontiers in Microbiology*, 11. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2020.01434>
- McAllister, W., & Hinton, D. M. (2019). Lytic Transcription. In *Encyclopedia of Virology* (pp. 69–76). Elsevier.
<https://doi.org/10.1016/B978-0-12-809633-8.20951-5>
- McDonnell, A., Countryman, A., Laurence, T., Gulliver, S., Drake, T., Edwards, S., Kenny, C., Lamberti, O., Morton, A., Shafira, A., Smith, R., & Guzman, J. (2024). *Forecasting the fallout from AMR: Economic impacts of antimicrobial resistance in humans – A report from the EcoAMR series*. World Organisation for Animal Health and World Bank.
<https://doi.org/10.20506/ecoAMR.3539>

- Molina, F., Menor-Flores, M., Fernández, L., Vega-Rodríguez, M. A., & García, P. (2022). Systematic analysis of putative phage-phage interactions on minimum-sized phage cocktails. *Scientific Reports*, *12*(1), 2458. <https://doi.org/10.1038/s41598-022-06422-1>
- Morris, J. J., Lenski, R. E., & Zinser, E. R. (2012). The Black Queen Hypothesis: Evolution of Dependencies through Adaptive Gene Loss. *mBio*, *3*(2), e00036-12. <https://doi.org/10.1128/mBio.00036-12>
- Morrisette, T., Kebriaei, R., Lev, K. L., Morales, S., & Rybak, M. J. (2020). Bacteriophage Therapeutics: A Primer for Clinicians on Phage-Antibiotic Combinations. *Pharmacotherapy: The Journal of Human Pharmacology and Drug Therapy*, *40*(2), 153–168. <https://doi.org/10.1002/phar.2358>
- Moryl, M., Różalski, A., de Figueiredo, J. A. P., & Palatyńska-Ulatowska, A. (2023). How Do Phages Disrupt the Structure of *Enterococcus faecalis* Biofilm? *International Journal of Molecular Sciences*, *24*(24), Article 24. <https://doi.org/10.3390/ijms242417260>
- Naghavi, M., Vollset, S. E., Ikuta, K. S., Swetschinski, L. R., Gray, A. P., Wool, E. E., Robles Aguilar, G., Mestrovic, T., Smith, G., Han, C., Hsu, R. L., Chalek, J., Araki, D. T., Chung, E., Raggi, C., Gershberg Hayoon, A., Davis Weaver, N., Lindstedt, P. A., Smith, A. E., ... Murray, C. J. L. (2024). Global burden of bacterial antimicrobial resistance 1990–2021: A systematic analysis with forecasts to 2050. *The Lancet*, *404*(10459), 1199–1226. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(24\)01867-1](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(24)01867-1)
- Necel, A., Bloch, S., Topka-Bielecka, G., Janiszewska, A., Łukasiak, A., Nejman-Faleńczyk, B., & Węgrzyn, G. (2022). Synergistic Effects of Bacteriophage vB_Eco4-M7 and Selected Antibiotics on the Biofilm Formed by Shiga Toxin-Producing *Escherichia coli*. *Antibiotics*, *11*(6), Article 6. <https://doi.org/10.3390/antibiotics11060712>
- Neter, E. (1941). Inhibitory Effect of Sulfamido Compounds upon Development and Growth of Phage-Resistant Bacteria. *Proceedings of the Society for Experimental Biology and Medicine*, *47*(1), 20–23. <https://doi.org/10.3181/00379727-47-13024>
- Parmanik, A., Das, S., Kar, B., Bose, A., Dwivedi, G. R., & Pandey, M. M. (2022). Current Treatment Strategies Against Multidrug-Resistant Bacteria: A Review. *Current Microbiology*, *79*(12), 388. <https://doi.org/10.1007/s00284-022-03061-7>

- Pirnay, J.-P., Djebara, S., Steurs, G., Griselain, J., Cochez, C., De Soir, S., Glonti, T., Spiessens, A., Vanden Berghe, E., Green, S., Wagemans, J., Lood, C., Schrevels, E., Chanishvili, N., Kutateladze, M., De Jode, M., Ceysens, P.-J., Draye, J.-P., Verbeken, G., ... Merabishvili, M. (2024). Personalized bacteriophage therapy outcomes for 100 consecutive cases: A multicentre, multinational, retrospective observational study. *Nature Microbiology*, *9*(6), 1434–1453. <https://doi.org/10.1038/s41564-024-01705-x>
- Pirnay, J.-P., & Kutter, E. (2021). Bacteriophages: It's a medicine, Jim, but not as we know it. *The Lancet Infectious Diseases*, *21*(3), 309–311. [https://doi.org/10.1016/S1473-3099\(20\)30464-3](https://doi.org/10.1016/S1473-3099(20)30464-3)
- Piya, D., Nolan, N., Moore, M. L., Hernandez, L. A. R., Cress, B. F., Young, R., Arkin, A. P., & Mutalik, V. K. (2023). Systematic and scalable genome-wide essentiality mapping to identify nonessential genes in phages. *PLOS Biology*, *21*(12), e3002416. <https://doi.org/10.1371/journal.pbio.3002416>
- Rajput, P., Nahar, K. S., & Rahman, K. M. (2024). Evaluation of Antibiotic Resistance Mechanisms in Gram-Positive Bacteria. *Antibiotics*, *13*(12), Article 12. <https://doi.org/10.3390/antibiotics13121197>
- Santos, M. E., & Drake, J. W. (1994). Rates of Spontaneous Mutation in Bacteriophage T4 Are Independent of Host Fidelity Determinants. *Genetics*, *138*(3), 553–564.
- Sloan, A., Wang, G., & Cheng, K. (2017). Traditional approaches versus mass spectrometry in bacterial identification and typing. *Clinica Chimica Acta*, *473*, 180–185. <https://doi.org/10.1016/j.cca.2017.08.035>
- Smith, K. P., & Kirby, J. E. (2019). Rapid Susceptibility Testing Methods. *Clinics in Laboratory Medicine*, *39*(3), 333–344. <https://doi.org/10.1016/j.cll.2019.04.001>
- Summers, W. C. (2001). Bacteriophage Therapy. *Annual Review of Microbiology*, *55*(Volume 55, 2001), 437–451. <https://doi.org/10.1146/annurev.micro.55.1.437>
- Summers, W. C. (2021). History of Virology: Bacteriophages. In *Encyclopedia of Virology* (pp. 3–9). Elsevier. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-809633-8.20950-3>
- Torres-Barceló, C., & Hochberg, M. E. (2016). Evolutionary Rationale for Phages as Complements of Antibiotics. *Trends in Microbiology*, *24*(4), 249–256. <https://doi.org/10.1016/j.tim.2015.12.011>

- Uyttebroek, S., Chen, B., Onsea, J., Ruythooren, F., Debaveye, Y., Devolder, D., Spriet, I., Depypere, M., Wagemans, J., Lavigne, R., Pirnay, J.-P., Merabishvili, M., Munter, P. D., Peetermans, W. E., Dupont, L., Gerven, L. V., & Metsemakers, W.-J. (2022). Safety and efficacy of phage therapy in difficult-to-treat infections: A systematic review. *The Lancet Infectious Diseases*, 22(8), e208–e220.
[https://doi.org/10.1016/S1473-3099\(21\)00612-5](https://doi.org/10.1016/S1473-3099(21)00612-5)
- Weitz, J. S., Poisot, T., Meyer, J. R., Flores, C. O., Valverde, S., Sullivan, M. B., & Hochberg, M. E. (2013). Phage–bacteria infection networks. *Trends in Microbiology*, 21(2), 82–91.
<https://doi.org/10.1016/j.tim.2012.11.003>
- World Health Organization. (2016). *Global action plan on antimicrobial resistance*. WHO.
<https://www.who.int/publications/i/item/9789241509763>
- World Health Organization. (2024, September 19). *Antimicrobial resistance*. WHO Europe.
<https://www.who.int/europe/news-room/fact-sheets/item/antimicrobial-resistance>
- World Health Organization. (2024) Bacterial Priority Pathogens List 2024: Bacterial Pathogens of Public Health Importance, to Guide Research, Development, and Strategies to Prevent and Control Antimicrobial Resistance (1st ed). (2024). World Health Organization.
- World Health Organization. (2025, February 17). *Bacteriophages and their use in combating antimicrobial resistance*. WHO Europe. <https://www.who.int/europe/news-room/fact-sheets/item/bacteriophages-and-their-use-in-combating-antimicrobial-resistance>
- Yang, T.-C. (2021). Bacteriophage: Therapeutics and Diagnostics Development. In *Encyclopedia of Virology* (pp. 252–258). Elsevier. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-814515-9.00012-6>
- Zaytzeff-Jern, H., & Meleney, F. L. (1941). Studies in bacteriophage VI: The effect of sulfapyridine and sulfanilamide on staphylococci and B. Coli and their respective bacteriophages. *The Journal of Laboratory and Clinical Medicine*, 26(11), 1756–1767.
<https://doi.org/10.5555/uri:pii:S0022214341901154>
- Zhou, G., Shi, Q.-S., Huang, X.-M., & Xie, X.-B. (2015). The Three Bacterial Lines of Defense against Antimicrobial Agents. *International Journal of Molecular Sciences*, 16(9), 21711–21733.
<https://doi.org/10.3390/ijms160921711>

Zilișteanu, C., Mintzer-Morgenstern, L., & Ionesco-Dorohoi, T. (1969). [Changes of sensitivity to bacteriophages in some strains of Enterobacteriaceae under the influence of chloramphenicol].

Archives Roumaines De Pathologie Experimentales Et De Microbiologie, 28(2), 615–627.

Zilisteanu, C., Olinici, N., & Mintzer, L. (1962). [Influence of bacteriophages on the antibiotic sensitivity of certain strains of Escherichia coli and Klebsiella. Study “in vitro” Preliminary note]. *Archives*

Roumaines De Pathologie Experimentales Et De Microbiologie, 21, 301–307.