



Inge Salminen

Bakteriofagien eristys sioista eristetyille *Escherichia coli*-kannoille

Metropolia Ammattikorkeakoulu

Laboratorioanalyttikko (AMK)

Laboratorioanalytiikka

Opinnäytetyö

23.10.2022

Tiivistelmä

Tekijä:	Inge Salminen
Otsikko:	Bakteriofagien eristys sioista eristetyille <i>Escherichia coli</i> kannoille
Sivumäärä:	45 sivua + 1 liite
Aika:	23.10.2022
Tutkinto:	Laboratorioanalyttikko (AMK)
Tutkinto-ohjelma:	Laboratorioanalytiikka
Ohjaajat:	Dosentti, FT Saija Kiljunen FM Matti Yläne Lehtori Jarmo Palm

Faagihoido on terapiamuoto, jossa käytetään bakteriofageja eli bakteereita infektoivia viruksia tappamaan patogeenisiä bakteereita. Menetelmä perustuu bakteriofagien luontaiseen kykyyn infektoida spesifisesti tiettyjä bakteerikantoja jättäen potilaan omat solut rauhaan. Faagihoido on tutkittu jo sata vuotta ja antibioottiresistenttien bakteerikantojen yleistyessä hoitomuodosta ollaan entistäkin kiinnostuneempia. Faagihoidoissa onkin paljon positiivisia puolia, joiden takia siitä ollaan niin kiinnostuneita. Faagihoidon yleistymiseen tarvitaan kuitenkin lisää luotettavia tutkimuksia ja kliinistä dataa.

Opinnäytetyö tehtiin Helsingin yliopiston ihmisen mikrobiomit-yksikössä, faagihoidoryhmässä. Tarkoituksena oli etsiä kahdeksalle sioista eristetyille enterotoksigeenisille *Escherichia coli* (ETEC)-kannoille niitä infektoivia bakteriofageja. Bakteriofagit tulisivat porsaiden tartuntaperäisen ripulin hoitamiseen. Usein emästä vieroittaessa porsaat saavat ETEC-tartunnan. Tämä voi johtua ravinnon muutoksen, stressin ja emon vasta-aineiden loppumisen aikaansaamasta vastustuskyvyn heikkenemisestä. Ripuli johtaa kasvun hidastumiseen, joka vaikuttaa lihan tuotantoon. Porsaiden sairastumista on aikaisemmin yritetty hoitaa antibiooteilla ja sinkkioksidilla, nämä hoitomuodot on kuitenkin kielletty Suomessa, mutta niille yritetään löytää korvaavaa hoitoa.

Faageja eristettiin erilaisista vesinäytteistä, ulostenäytteistä ja ympäristönäytteistä. Löytyneet faagit tulevat mahdollisesti hoitokäyttöön, kun niiden genomit on sekvensoitu ja niille on tehty isäntäkirjomääritys. Projektin aikana 103 eri faagieristysnäytettä ja 26 kokoelmista löytynyttä bakteriofagia testattiin 8:aa ETEC-kantaa vastaan. ETEC-kantoja infektoivia bakteriofageja löytyi faagieristysnäytteistä 3 ja olemassa olevista faageista 0.

Avainsanat: *Escherichia coli*, bakteriofagi, faagihoido, faagi, faagieristys

Abstract

Author: Inge Salminen
Title: Isolation of Bacteriophages for *Escherichia coli* Strains Isolated from Pigs
Number of Pages: 45 pages + 1 appendix
Date: 23 October 2022

Degree: Bachelor of Laboratory Services
Degree Programme: Laboratory Sciences
Supervisors: Saija Kiljunen, Docent
Matti Yläne, MSc
Jarmo Palm, Senior Lecturer

Phage therapy uses phages, the bacteria's natural killers to fight against infections. Bacteriophages are viruses that only infect certain bacterial strains leaving the patients microbiota uninfected. This therapy has a lot of positive sides to it and so far, not a lot of negative sides have been found. Still, more quality studies and clinical data are needed for phage therapy to become used as a therapy form.

This thesis work was carried out at Helsinki University human microbiome phage therapy group. The purpose of this thesis study was to find phages for 8 *enterotoxigenic Escherichia coli* (ETEC) strains extracted from swine. ETEC strains often cause diarrhea in piglets after being weaned from their mother. This might occur because stress, change in diet, and lack of antigens from their mother, cause their immune system to suffer. Diarrhea slows growth of the piglets, which affects production of meat. Before this problem was treated with antibiotics and zinc oxide, but now these have been forbidden in Finland. Hence, a new cure is needed.

The phage isolation samples were sewage waters, stool samples and environmental samples. During this project, 103 different phage isolation samples and 26 phages found in the group's collections were tested against the 8 ETEC strains. Three bacteriophages that infected the target strains were found from isolation samples. From the group's collection, 0 bacteriophages infected the 8 ETEC strains.

Keywords: Bacteria, bacteriophage, phage, *Escherichia coli*

Sisällys

Lyhenteet

1	Johdanto	1
2	Bakteriofagit.....	1
3	Escherichia coli.....	4
4	Faagihoido	5
5	Materiaalit ja menetelmät.....	7
5.1	Materiaalit.....	7
5.1.1	Faagieristysnäytteet	7
5.1.2	E. coli kannat ja bakteriofagit	7
5.2	Menetelmät	8
5.2.1	Bakteerien nestekasvatukset	8
5.2.2	OD:n mittaus ja bakteerin tarpeen laskeminen.....	8
5.2.3	Titraus	9
5.2.4	Bakteriofagilysaatti	11
5.2.5	Isäntäkirjomääritys.....	12
5.2.6	Faagieristysnäytteen esikäsittely	13
5.2.7	Faagieristysnäytteen rikastus.....	13
5.2.8	Plakkipuhdistus.....	14
5.2.9	DNA-eristys.....	14
5.2.10	DNA-konsentraation määrittäminen.....	15
5.2.11	Geelielektroforeesi.....	16
5.2.12	Bakteriofagin nimeäminen.....	17
5.2.13	Pakastus	17
6	Tulokset	17
6.1	Olemassa olevien faagien elinkyvyn testaus ja tuotto	17
6.2	Isäntäkirjon testaus	19
6.3	Työssä eristetyt faagit.....	22

6.4	Plakkipuhdistus ja uusien faagien tuotto	23
6.5	DNA-eristys ja geelielektroforeesi	25
6.6	Bakteriofagien nimeäminen ja pakastus	27
7	Pohdinta.....	28
8	Kiitokset	29
	Lähteet	30

Liitteet

Liite 1: Faagieristysnäytteet

Lyhenteet

LB: Lysogeny broth

OD: optical density

EDTA: etyleenidiamiinitetraetikkahappo

TAE: tris-asettaatti-EDTA-puskuri

E. coli: *Escherichia coli*

ETEC: enterotoksigeeninen *Escherichia coli*

1 Johdanto

Antibiottiresistentit bakteerikannat ovat aiheuttaneet maailmanlaajuisen terveysuhan viime vuosikymmenien aikana. Kannat aiheuttavat ongelmia ihmisten lisäksi myös ihmisten kasvattamalle lihakarjalle. Resistenttien bakteerien aiheuttamia infektioita vastaan on yritetty keksiä monenlaisia ratkaisuja, joista yksi on faagihoidot. Tätä hoitomuotoa on tutkittu jo noin 100 vuotta eli kauemmin kuin penisilliini on ollut käytössä. Faagihoidot kehittyvät jatkuvasti ja sen hoitomenetelmiä pyritään saamaan yleisempään käyttöön maailmanlaajuisesti.

Tämä opinnäytetyö tehtiin Helsingin yliopiston, ihmisen mikrobiomit yksikössä, faagihoitoryhmässä. Tarkoituksena oli eristää bakteriofageja kahdeksalle sioista eristetyille enterotoksigeenisille *Escherichia coli* (ETEC) kannalle. ETEC-tartunnat ovat iso ongelma emistään juuri vieroitetuille porsaille. Tartunta aiheuttaa vetistä ripulia 1–2 viikoksi. Tämä saattaa johtaa porsaan nestehukkaan, laihtumiseen ja mahdolliseen kuolemaan [1]. Faageja eristettiin ETEC-kannoille erilaisista jätevesi-, luonnonvesi- ja ympäristönäytteistä. Löytyvät bakteriofagit tulisivat mahdollisesti hoitokäyttöön ja laajentamaan ryhmän faagikokoelmaa.

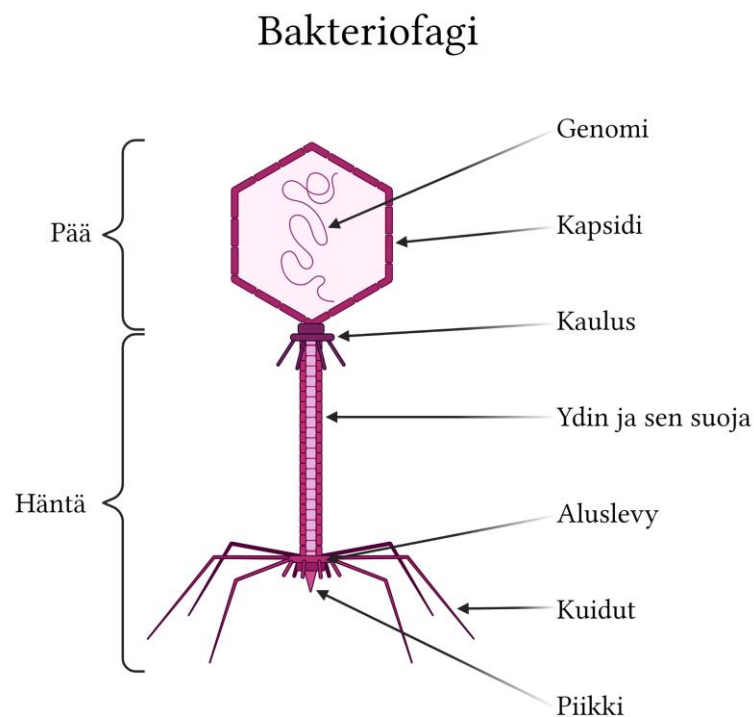
2 Bakteriofagit

Bakteriofagit (faagit) ovat ryhmä viruksia, jotka infektoivat bakteereita. Siitä kuka löysi faagit ensimmäisenä, on ollut kiistaa. Félix d'Herelle (1917) ehti kuitenkin ensimmäiseksi nimetä bakteriofaagin, joka tarkoittaa "bakteerien syöjää" [2]. Hän vei myös faagitutkimusta eteenpäin ja suoritti kokeita muun muassa ihmisten kärsimän punataudin ja kanojen lavantaudin parissa [3].

Evolutionäärisesti bakteriofageja tavataan siellä missä bakteerejakin [4] ja niiden arvioidaankin olevan yhtä vanhoja [5]. Pelkästään vedessä on jo 10^8 faagia/ml ja kaiken kaikkiaan maapallolla on 10^{31} faagia [3]. Faagit ovat iso osa

maailman ekosysteemiä, ne vaikuttavat esimerkiksi merien syanobakteerikantoihin, jotka taas vaikuttavat suuresti globaaliin hiilikiertoon. Jos faagit eivät hajottaisi isoa määrää syanobakteereista joka päivä, syanobakteerit sitoisivat itseensä merkittävän osan ilmakehän hiilestä ja painuisivat merenpohjaan. Tällöin ilman hiilidioksidivarannot kuihtuisivat niin merkittävästi, että kasvihuoneilmiö heikkenisi ja maapallo olisi vaarassa jäätymään [3].

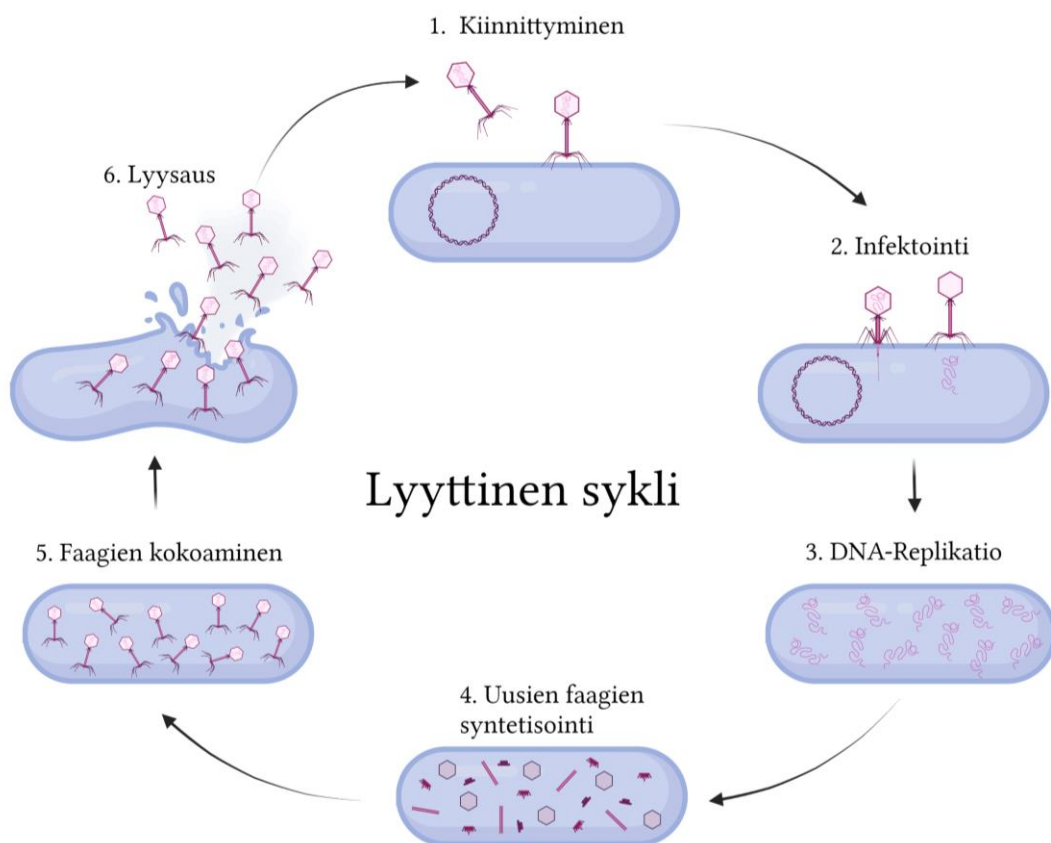
Bakteriofagien morfologia on hyvin kirjavaa ja kaikilla niillä ei ole samoja perusrakenteita. 95 % faageista on kuitenkin hännällisiä ja niillä on sama perusrakenne (kuva 1): pää, joka on muodostunut proteiinista ja sisältää DNA:n sekä häntä, jonka avulla faagi kiinnittyy bakteeriin ja kuljettaa perimän solun sisälle [6].



Kuva 1 Esimerkiksi T4, *Escherichia* virus. Hännällisen bakteriofagin rakenteet [7]. Kuva on tehty BioRender.com.

Bakteriofagit kuten muutkaan virukset eivät kykene replikoitumaan itsekseen, vaan ne vaativat lisääntyäkseen bakteerin [8]. Faagit ovat tosin todella valikoivia isännästään ja ne usein infektoivat vain tietyn bakteerin tiettyä kantaa [9]. Faagi tunnistaa sopivan bakteerisolun reseptorit häntänsä proteiinien avulla, jonka jälkeen se kiinnittyy solun pintaan ja injektioi perimänsä solun sytoplasmaan. Tämän jälkeen faagista riippuen seuraa lyyttinen tai lysogeeninen sykli [10].

Perimän injektio seurauksena faagi ottaa vallan solusta ja käyttää bakteerin proteiinisynteesikoneistoa syntetisoidakseen proteiineja. Faagi käyttää valtaamansa solua syntetisoidakseen rakenneproteiineja ja genomeja uusien faagien rakentamiseksi (kuva 2) [11]. Osat rakentuvat genomien ympärille, minkä jälkeen prosessissa erittynyt entsyymi heikentää bakteerin solukalvoa. Tämä johtaa bakteerisolun hajoamiseen, jolloin 50–200 uutta faagia pääsee vapaaksi.



Jotkin lauhkeat faagit pystyvät valitsemaan lyyttisen ja lysogeenisen syklin väliltä. Tähän vaikuttavat esimerkiksi resurssien ja infektoitavien bakteerien riittävyys. Lysogeenisessä syklissä faagin infektoinnin seurauksena faagin perimä liittyy profaagiksi isäntäsolun genomiin tai on vapaana solussa [13]. Faagin perimä on tällöin inaktiivista ja bakteerisolun jakautuu ilman virustuotantoa. Faagin perimä voi aktivoitua spontaanisti tai ulkoisen stimuloinnin seurauksena. Tästä alkaa tyypillinen lyyttinen sykli, jossa faagi ottaa vallan isäntäsolusta [14].

Bakteerien ja faagien alituisen kanssakäymisen seurauksena faageilla on ollut vaikutusta bakteerien evoluutioon. Esimerkiksi lysogeeninen konversio on tilanne, jossa isäntäsolu saa uuden piirteen lysogeenistä johtuneen geeniekspression seurauksena. Nämä piirteet voivat olla bakteerisolun puolustautumisen, hyökkäyksen tai yleisen selviytymisen kannalta kehittäviä [13].

3 *Escherichia coli*

Escherichia coli eli *E. coli* on bakteeri, jonka kantoja esiintyy harmittomina tasalämpöisten eläinten ja ihmisten suolistossa. Kolonisaatio saadaan usein jo tunteja syntymän jälkeen, mutta se ei kuitenkaan ole välttämätön suoliston kehityksen tai toiminnan kannalta. Kaikki *E. coli* -kannat eivät tosin ole harmittomia, useat niistä aiheuttavat tulehduksia niin ihmisille kuin eläimillekin [15].

E. coli on yksi yleisimmistä tartunnan aiheuttajista ihmisissä ja eläimissä. Se voi aiheuttaa ripulia, oksentelua, virtatientulehduksia tai jopa verenmyrkytyksen [16]. Patogeeniset *E. coli* -kannat omaavat tartuntakarvoja (fimbria), jotka auttavat bakteeria leviämään sille normaalisti epäsuotuisille alueille, kuten virtsateihin [17]. *E. coli* leviää ulosteella saastuneen veden ja ruoan välityksellä. Tartuntojen määrään voidaan vaikuttaa puhtaalla vedellä, hyvillä ruoan käsittelyta-voilla, hygieenisyyden lisäämisellä ja rokotuksilla.

Tässä projektissa kohdekantoina oli kahdeksan eri enterotoksigeenistä *E. coli*-kantaa. Enterotoksiinit aiheuttavat vetistä ripulia, joka kestää keskimäärin 1–5 päivää. Emostaan vasta vieroitetut porsaas ovat erityisen alttiita ETEC-tartunnalle, sillä lisääntynyt stressi ja ravinnon muutos laskevat vastustuskykyä. Tartunta voi johtaa porsaan kasvun hidastumiseen tai jopa kuolemaan [1].

Antibioottien lisääntyneen käytön ja väärinkäytön seurauksena *E. coli* antibioottiresistenssi on yleistynyt, mikä vaikeuttaa tartuntojen hoitoa. Resistenttiyttä esiintyy myös eläimissä, joista resistentit bakteerit voivat siirtyä ihmisiin [16].

4 Faagihoido

Bakteriofagit ovat bakteerien luonnollisia tappajia, niitä on valjastettu ihmisten käyttöön jo noin sata vuotta. Félix d'Herelle huomasi faagien potentiaalın ja käytti niitä onnistuneesti hoitaessaan *Salmonella gallinarum*-infektiota kanoissa. Onnistumisen myötä suoritettiin ensimmäinen ihmiskoe faageilla vuonna 1921. Tämä johti useampiin kliinisiin tutkimuksiin myös ihmisillä ja vaikka alku näytti lupaavalta, tulevat kokeet antoivat ristiriitaisia tuloksia. Penisilliinin löytö ja massatuotanto 1940-luvulla jätti kuitenkin faagihoidon taka-alalle. Neuvostoliitossa, nykyisellä Venäjällä ja Georgiassa, faagihoidoja on tästä huolimatta koko ajan hyödynnetty.

Nykyään antibioottiresistenssin aiheuttaessa hätää myös länsimaat ovat alkaneet kiinnostua faagihoidoista [18]. Jopa 50 % antibioottiresistenteistä *E. coli*-kannoista on resistenttejä kolmannen sukupolven kefalosporiini (3GC) antibiootteja vastaan. 3GC on ryhmä antibiootteja, joka pystyy tappamaan laajasti erilaisia bakteereita. Ne pystyvät tappamaan sekä grampositiivisia, että gramnegatiivisia bakteereita. Resistentin kannan tartunnan aiheuttama kuolleisuus onkin jopa 50 % korkeampi kuin herkän kannan. Resistenttien kantojen aiheuttamat hoitokulut ovat Euroopassa 1,5 miljardia euroa ja kuolemia on n. 25 000 vuositain [19].

Faagihoido perustuu faagien kykyyn infektoida spesifisesti tiettyjä kantoja, jättäen potilaan oman mikrobiston rauhaan [18]. Tällöin potilaan mikrobiota aiheuttaa kilpailua patogeeniselle kannalle, eikä patogeenin ole yhtä helppoa levitä [19]. Faagi tuottaa itseään lisää hajottaessaan bakteerisoluja, mikä vähentää annostuskertoja [18]. Faagihoidojen uskotaan olevan turvallisia tutkimusten ja eläinkokeiden perusteella, eikä faagien ole raportoitu vaikuttavan toksisesti ihmisoluihin. Eläinkokeissa on myös huomattu maksan ja pernan poistavan faageja kehosta, joten ne eivät jää potilaan kehoon [19].

Faagihoidot aloitetaan määrittämällä, mikä bakteerikanta on tartunnan takana ja mitkä faagit infektoivat sitä. Vasta tämän jälkeen voidaan kehittää faagihoidon hoitomenetelmä. Tämä tekee faagihoidojen yleistymisestä haastavaa, sillä hoidot tehdään henkilökohtaisesti jokaiselle potilaalle eikä tuotteita ole helppo tehdä hyllyltä ostettavaksi. Tämä aiheuttaa vaikeuksia myös lääkelainsäädännön kanssa [20], eikä faagihoidoille vielä olekaan hyväksytyjä säännöksiä. Jotta turvallisuus, tehokkuus ja tuotannon laatu voidaan taata, tarvitaan lisää korkealaatuisia tutkimuksia ja kliinistä dataa [18].

Bakteerit pystyvät kehittämään resistenttiyttä antibioottien lisäksi myös faageja kohtaan. Tätä voidaan välttää käyttämällä useasta faagista tehtyä seosta. Mikäli bakteeri kuitenkin kehittää faagiresistenttiyden, se vaikuttaa myös bakteeriin negatiivisesti. Resistentin kannan taudinaiheuttamiskyky usein heikkenee, jolloin ihmisen oma immuunijärjestelmä saa mahdollisuuden tuhota patogeenit [19]. Faageista voisi olla myös hyötyä antibioottien kanssa käytettynä, sillä toisin kuin antibiootit faagit pystyvät tuhoamaan bakteerien tuottamaa biofilmiä [19]. Tämän jälkeen antibiootit pääsisivät vaikuttamaan tehokkaammin.

Tulevaisuudessa faagihoidoja voitaisiin hyödyntää myös matalan- ja keskitulotason maissa. Faagit voisivat olla avuksi ruoan, veden, antibioottiresistentteyden ja huonon hygienian aiheuttamiin bakteeriinfektioihin [20]. On kuitenkin tärkeää pitää huolta, ettei faagihoidon terapiamuotoja käytetä väärin, jotta voidaan välttyä samoilta virheiltä, mitä antibioottien kanssa on tehty [19].

5 Materiaalit ja menetelmät

5.1 Materiaalit

5.1.1 Faagieristysnäytteet

Bakteriofagien etsiminen aloitettiin sellaisista sikaloista saaduista uloste- ja ympäristönäytteistä, joissa oli todettu ETEC-kolonisaatiota. Käypien bakteriofagien löytäminen sieltä mistä itse isäntäkantaa esiintyy, on kaikkein todennäköisintä, joten tämä oli hyvä paikka aloittaa. Faagihitoryhmällä oli jo valmiiksi myös 11.6.2021 sikalasta kerättyjä näytteitä, jotka oli toimittanut Claudio Oliviero Helsingin yliopiston eläinlääketieteellisestä tiedekunnasta. Saimme myös kaksi uudempaa sian ulostenäytettä, jotka oli kerätty 6.4.2022. Tuore jätevesinäyte saatiin Joensuusta, Kuhasalon jätevedenpuhdistamolta. Loput näytteet otettiin laboratorion varastoista, niistä suurin osa oli erilaisia jätevesinäytteitä. Näytteiden joukossa oli myös luonnosta kerättyjä vesinäytteitä ja eläinten ulostenäytteitä. Liitteessä 1 on tarkempi listaus eristysnäytteistä.

5.1.2 *E. coli* kannat ja bakteriofagit

E. coli-kannat (taulukko 1), joille pyrittiin eristämään bakteriofageja, olivat suomalaisista sioista eristettyjä. Työn eri vaiheissa käytettiin kantoja myös faagiryhmän omasta bakteerikokoelmasta.

Taulukko 1. Taulukossa on listaus projektissa käytetyistä *Escherichia coli*-kannoista ja niiden tunnisteista.

Ruokaviraston antamat tunnisteet kannoille	Helsingin yliopistossa käytettävät tunnisteet
FIXT 647	#7135
FIXT 648	#7136
FIXT 649	#7137
FIXT 650	#7138
FIXT 780	#7206
FIXT 781	#7207
FIXT 782	#7208
FIXT 783	#7209

Toimitettuja bakterikantoja vastaan testattiin eristysnäytteiden (liite 1) lisäksi myös faagihitoryhmän faagikokoelman *E. coli*-faageja.

5.2 Menetelmät

5.2.1 Bakterien nestekasvatukset

A) kahden tunnin nestekasvatus

2 ml:n mikrosentrifuugiputkeen pipetoitiin 1,3 ml huoneenlämpöistä lysogeny brothia (LB). Bakteria siirrostettiin putkeen silmukalla ja se vorteksoitiin. Seosta inkuboitiin sekoittaen, 37 °C, 2 h. Jotkin kannat kasvavat nopeammin ja toiset hitaammin, pyrittiin saamaan OD:ksi (optical density eli sameus) 0,25–0,99. Kaikista ihanteellisimmin OD olisi 0,5–0,75 (5.2.2).

B) Yön yli nestekasvatus

15 ml putkeen mitattiin 5 ml LB:tä. Bakterikantaa siirrostettiin sauvalla ja vorteksoitiin. Seosta inkuboitiin yön yli sekoituksessa 37 °C:ssa.

5.2.2 OD:n mittaus ja bakterin tarpeen laskeminen

Bakteerinäytteen sameus mitattiin Laxco MicroSpek DSM Micro Cell Density Meter-laitteella [21]. Laitteeseen pipetoitiin 20 µl näytettä, jonka jälkeen mittaus suoritettiin. Kaksoiskerrostitrauksessa tarvittava bakterimäärä laskettiin saadusta tuloksesta (5.2.3, kohta A)

$$45/A_{600} = x \mu\text{l isäntää} [3]$$

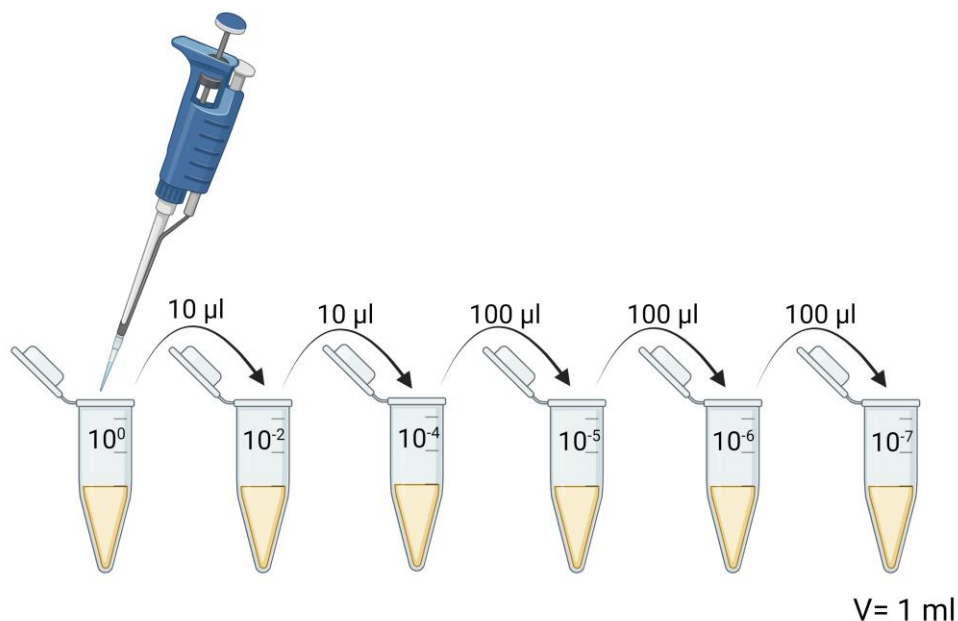
5.2.3 Titraus

Titrausta käytettiin määrittämään bakteriofagin tiitteri, eli kuinka paljon näyte sisältää faageja PFU/ml (plaque forming unit/ml) [22]. Titrausmenetelmiä on kaksi: kaksoiskerros- ja pisaratitraus. Kaksoiskerrostitraus antaa tiitterin, pisaratitrauksella saa määritettyä arvion tiitteristä. Menetelmät perustuvat siihen, miten bakteriofagit hajottavat bakteerisoluja. Lyysauksesta syntyy bakteerimattoon kirkas ”syöty” alue, jota kutsutaan plakiksi [23].

A. Kaksoiskerrostitraus

Ennen kaksoiskerrostitrausta käytettävälle bakteerikannalle tehtiin kahden tunnin nestekasvatus (5.2.1, kohta A) ja siitä määritettiin OD:n perusteella (5.2.2) kantaa pipetoitava määrä.

Faaginäytteestä tehtiin laimennossarja LB:hen (Kuva 3). Yleensä aloitettiin titraamalla laimennokset 10^{-5} – 10^{-7} . Jos näistä laimennoksista ei saatu luettavaa tulosta, tehtiin isompia tai pienempiä laimennoksia.



Kuva 3 Esimerkki laimennossarjasta titrausta varten. Kuva on tehty BioRender.com.

Isäntä ja faagi maljattiin LB pehmytagarissa (sis. 0,4 % agar): faagia pipetoitiin 50 µl pehmytagariin (temperoitu 55 °C:een) ja isäntää absorbanssin avulla laskettu määrä. Seos vorteksoitiin ja kaadettiin maljalle. Maljaa kallisteltiin, jotta seos levittyi maljalle tasaisesti. Titrausmaljojen lisäksi tehtiin myöskin kontrollimalja, jossa faagi on korvattu LB:llä, jota käytettiin laimennoksia tehdessä. Kontrollin avulla varmistetaan, ettei LB ole kontaminoitunut ja vääristä tuloksia. Maljoja inkuboitiin 37 °C:ssa, yön yli.

Seuraavana aamuna maljoilta laskettiin plakkien määrä ja tiitteri määritettiin laskukaavan avulla.

$$\text{Plakkien määrä} * \text{Laimennos} * 20^* = x \text{ PFU/ml}$$

*riippuu faagia pipetoitavasta määrästä, tässä tapauksessa 50 µl.

B. Pisaratitraus

Ennen pisaratitrausta käytettävälle bakteerikannalle tehtiin kahden tunnin neste-
kasvatus (5.2.1, A) ja siitä määritettiin OD:n perusteella (5.2.2) kantaa pipetoi-
tava määrä. Tässä menetelmässä jokaiselle laimennokselle ei tarvita omaa
malja, vaan saman isännän faagit voi pipetoida samalle maljalle.

Softagariin pipetoitiin absorbanssin avulla laskettu määrä isäntää ja se vortek-
soitiin sekä levitettiin maljalle tasaiseksi kerrokseksi. Tämän annettiin jähmettyä
30 min huoneenlämmössä. Faagilaimennoksista (Kohta A) pipetoitiin 5 µl pisa-
roita niille merkityille kohdille maljalla. Kontrolliksi pipetoitiin 5 µl LB:tä. Pisaro-
iden annettiin imeytyä 30 min ennen inkubaatioon siirtämistä. Maljat inkuboitiin
37 °C yön yli. Seuraavana aamuna maljalta voitiin arvioida faagitiitteri ja se,
oliko siinä ylipäätään faagia.

5.2.4 Bakteriofagilysaatti

Bakteriofagilysaatti on isompi määrä nestemäistä faagia, jota pystyy käyttämään sellaisenaan eri testeihin kuten titraukseen (5.2.3) tai DNA eristykseen (5.2.9).

A. Nesteessä

Lysaatin tuottoa varten valmistettiin yön yli nestekasvatus (5.2.1, kohta B). 50 ml putkeen pipetoitiin 10 ml LB:tä, 400 µl yön yli nestekasvatusta ja 20 µl tuotettavaa bakteriofagia. Inkuboitiin 37°C:ssa, sekoituksessa, kunnes bakteerisolot lyysautuivat (3–6 h). Lyysauksen pystyi havaitsemaan nesteen samentumisen (bakteerien kasvun) jälkeen tapahtuvana nesteen kirkastumisena. Nestetuotot sentrifugoitiin (5000 rpm, 10 min) putken pohjaan ja supernatantti suodatettiin 0,22 µm:n filtterillä. Lysaattiin lisättiin 40 % sakkaroosia, niin että sitä oli 8 % liuoksesta [24].

B. Maljalla

Tuottoa varten valmistettiin kaksoiskerrostitraus (5.2.3, kohta A) tuotettavalla bakteriofagilla ja sen isännällä. Usein maljatuotossa samalle faagille tehtiin useampi kaksoiskerrostitraus, jotta lysaattia saatiin enemmän. Titraus pyrittiin tekemään sellaisilla laimennoksilla, että faagi pystyi tuhoamaan bakteerimaton mahdollisimman hyvin ilman bakteerin muodostamaa resistenssiä. Näille maljoille pipetoitiin 3 ml SMG-puskuria (100 mM NaCl, 10 mM MgSO₄, 50 mM Tris-HCl, pH 7,5, 0,01 % gelatiinia), ja inkuboitiin huoneenlämmössä 1–2 h. L-sauvalla kaavittiin maljan pinnalle muodostunut bakteeri/faagimatto yhteen reunaan ja siitä pipetoitiin kaikki neste 15 ml:n putkeen. Tässä vaiheessa kaikki maljat yhdistettiin samaan putkeen. Putkea käännettiin huoneenlämmössä 15–20 min. Putki sentrifugoitiin 5000 rpm, 10 min ja supernatantti suodatettiin 0,22 µm:n ruiskusuodattimella. Lysaattiin lisättiin 40 %:sta sakkaroosia, niin että sitä oli 8 % liuoksesta [24].

5.2.5 Isäntäkirjomääritys

Isäntäkirjomääritys suoritettiin OCelloScope (BioSence Solutions ApS, Denmark) kuoppalevyn lukijalla.

Isäntäkantaa inkuboitii 1,3 ml:ssä LB:tä (10 g/l Tryptone, 5 g/l hiiva ekstrakti, 10 g/l NaCl) n.1 h, 37 °C. Kasvatus standardisoitiin 0,35 A (0,35 / OD = x ml isäntää ja loput LB:tä niin, että yhteistilavuus oli 1 ml). Standardisoitua bakteeriseosta laimennettiin vielä 1:200. Faageista valmistettiin 10⁸ PFU/ml laimennokset [25].

Bakteerilaimennosta pipetoitiin 96-kuoppalevyille pipetointisuunnitelman mukaisesti (kuva 4). Näytekuppiin pipetoitiin 200 µl bakteerilaimennosta ja 10 µl faagia. Näytteiden lisäksi tehtiin negatiivi- (LB) ja positiivikontrollit (tunnettu kanta ja sitä tuhoava faagi). Kaikille tehtiin kolme rinnakkaista ja levyn päälle asetettiin qPCR-kalvo (4titude) ennen ajoa.

Tulokset analysoitiin Origin 2021b ohjelmalla.

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	#7138	#7138	#7138	fHe-Eco02	fHe-Eco02	fHe-Eco02	fTu-Eco01	fTu-Eco01	fTu-Eco01	fOu-Eco01	fOu-Eco01	fOu-Eco01
B	fHy-Eco03	fHy-Eco03	fHy-Eco03	ffi-Eco01	ffi-Eco01	ffi-Eco01	pEInt-Eco01	pEInt-Eco01	pEInt-Eco01	pEPyo-Eco02	pEPyo-Eco02	pEPyo-Eco02
C	pMgPio-Eco01	pMgPio-Eco01	pMgPio-Eco01	fEInt-Eco01b	fEInt-Eco01b	fEInt-Eco01b	PK1A wt	PK1A wt	PK1A wt	FBC-Eco01	FBC-Eco01	FBC-Eco01
D	fTa-Eco01	fTa-Eco01	fTa-Eco01	fPo-Eco01	fPo-Eco01	fPo-Eco01	fKu-Eco01	fKu-Eco01	fKu-Eco01	EC2P1	EC2P1	EC2P1
E	EC9P1	EC9P1	EC9P1	EC4P2	EC4P2	EC4P2	EC16P2	EC16P2	EC16P2	LB	LB	LB
F												
G												
H	#6321	#6321	#6321	EC16P2	EC16P2	EC16P2						

Kuva 4 Pipetointisuunnitelma 96-kuoppalevyä varten. Eri bakteriofagit on merkitty karttaan eri väreillä pipetoinnin helpottamiseksi.

5.2.6 Faagieristysnäytteen esikäsittely

Nestemäisen näytteen (esimerkiksi jäteveden) esikäsittely aloitettiin suodatuksella (0,22 µm suodatin). Suodatettuun näytteeseen lisättiin 40 % sakkaroosia, niin että sitä oli 8 % liuoksesta. Jos näyte oli kiinteä sitä, liuotettiin SMG-puskurissa heilutuksessa, yön yli, 4 °C:ssa. Tämän jälkeen näyte sentrifugoitiin, sekä suodatettiin 0,45 µm:n ja 0,22 µm:n suodattimilla. Sakkaroosia lisättiin niin, että sitä oli 8 % liuoksesta.

5.2.7 Faagieristysnäytteen rikastus

Faagieristysnäyte rikastetaan ennen kuin sen titrataan kohdekantoja vastaan. Näin mahdolliset kantoja infektoivat faagit pääsevät lisääntymään näytteessä ja ne on helpompi eristää ja puhdistaa [27].

Rikastus aloitettiin suorittamalla kahden tunnin nestekasvatus (5.2.1, kohta A) bakteerikannalle, jota vastaan etsittiin faagia. Laskettu määrä (5.2.2) bakteeriseosta pipetoitiin 15 ml:n putkeen. Samaan putkeen pipetoitiin myös 1,5 ml esikäsiteltyä (5.2.6) faagieristysnäytettä ja 4,5 ml LB:tä. Seosta inkuboitiin yön yli 37°C:ssa, sekoituksessa, 200 rpm. Seuraavana aamuna putki sentrifugoitiin 5000 rpm, 4°C, 10 min ja supernatantti suodatettiin 0,22 µm:n ruiskusuodattimella. Suodatettuun seokseen lisättiin 40 %:sta sakkaroosia niin, että liuoksessa oli 8 % sakkaroosia. Rikastettu bakteriofagi säilytettiin jääkaapissa [24].

Rikastettu näyte pisaratitrattiin rikastukseen käytetyllä isännällä (5.2.3, kohta B). Titrauksessa käytettiin pieniä laimennoksia 10^0 , 10^{-1} , 10^{-2} . Mikäli seuraavana aamuna maljalla oli plakkeja, näytteestä oli löytynyt bakteriofagi käytetylle bakteerikannalle. Löytyneet plakit kaavittiin mikrosentrifugiputkeen, johon lisättiin 500 µl SMG-puskuria. Putki laitettiin ravistukseen kahdeksi tunniksi huoneenlämpöön, jonka jälkeen näyte sentrifugoitiin 13 000 rpm, 3 min. Supernatantti pipetoitiin uuteen putkeen odottamaan plakkipuhdistusta.

5.2.8 Plakkipuhdistus

Plakkipuhdistus suoritettiin rikastuksessa löytyneelle faagille, jotta voitaisiin varmistua, että löydöksessä on vain yhtä faagia. Tekniikassa kiinnitetään huomiota faagien muodostamien plakkien morfologiaan. Normaalisti faagi muodostaa kooltaan ja ulkonäöltään suhteellisen samannäköisiä plakkeja. Mikäli plakkipuhdistuksen aikana maljoille ilmestyy erinäköisiä plakkeja, on syystä epäillä samassa näytteessä olevan useampaa faagia. Tällöin erinäköisistä plakeista otetaan näytteet ja niillä jatketaan puhdistusta erikseen. On tosin mahdollista, että yksi faagi tekee morfologialtaan erilaisia plakkeja ja lopullinen varmuus saadaan vasta sekvensoinnista.

Puhdistusta varten näyte titrattiin kaksoiskerrosmenetelmällä (5.2.3, kohta A). Pyrittiin löytämään laimennos, missä plakkeja oli maljalla noin 5–20. Seuraavana päivänä vain yksi plakki poimitaan 500 µl:aan SMG-puskuria. Putki vorteksoitiin, jonka jälkeen sen annettiin inkuboitua kääntelyssä huoneenlämmössä tunnin tai yön yli 4 °C:ssa. Plakkipuhdistus suoritettiin ainakin kolme kertaa, käyttäen lähtömateriaalina aina edellisestä puhdistuksesta syntynyttä plakkia. Jos plakkien morfologia vaihteli maljalla vielä kolmannella puhdistuskerralla, puhdistusta jatkettiin vielä muutaman kerran.

5.2.9 DNA-eristys

Tässä projektissa DNA:n eristämiseen käytettiin automatisoitua DNA:n eristyslaitetta Promegalta, "Maxwell RSC". Laitteen kanssa käytettiin sille suunniteltua kittiä "Maxwell RSC Viral Total Nucleic Acid Purification Kit". Käytössä oli valmiiksi ohjelmoidut menetöt ja valmiiksi puhdistusreagensseilla ja paramagneettisilla hiukkasilla täytetyt patruunat [27].

Ennen kuin näytteet voitiin pipetoida laitteen eristettäväksi, ne oli esikäsiteltävä. Faagilysaattia pipetoitiin 400 µl 1,5 ml:n mikrosentrifuugiputkeen, johon lisättiin 1,3 µl DNase I (1U/µl, New England BioLabs in.) ja 4 µl RNase A (1 mg/ml). Tä-

män jälkeen näytteitä inkuboitii +37°C, 30 min. Inkuboinnin jälkeen putkeen lisättiin 16 µl EDTA (0.5 M), 1,2 µl proteaasi K (20 mg/ml) ja 20 µl 10 % SDS. Lopuksi vielä inkuboitii +56°C:ssa, 60 min.

Esikäsitelyyn jälkeen näytteet ajettiin Maxwell-laitteella. Ajoon käytettiin jo valmiiksi asennettua ohjelmaa, joka on tarkoitettu virus DNA:n eristämiseen. DNA eluotui 50 µl:aan Tris-Hcl:lää (10 mM, pH 7,5–8). Ajon jälkeen eluutioputkien ympärille pyörätettiin parafilmiä, jotta näyte ei päässyt haihtumaan. Näyte asetettiin +4°C:seen odottamaan seuraavan päivän DNA-konsentraation määrittystä.

5.2.10 DNA-konsentraation määrittäminen

DNA-eristyksen onnistuneisuus tarkistettiin ensimmäiseksi mittaamalla DNA-konsentraatio näytteestä. Tässä projektissa määrittämisessä käytettiin Qubit 4 Fluorometriä (ThermoFisher Scientific). Laitteen kanssa käytettiin 1X dsDNA BR Assay-kittiä, joka on optimoitu käytettäväksi kyseisen laitteen kanssa [28].

Mittausta varten näytteet esikäsiteltiin ja valmistettiin standardit. Jokaista näytettä ja standardia varten valmistettiin 200 µl käyttöliuosta ja otettiin huomioon 200 µl:n pipetointivara (käyttöliuos ja näytteet, jotka sisältävät sitä oli suojattava valolta). Käyttöliuoksen valmistus: Qubit dsDNA BR-reagenttia pipetoitiin 1 µl + 199 µl Qubit dsDNA BR-puskuria (per näyte). 500 µl putkiin (life technologies, qubit assay tubes) pipetoitiin standardit ja näytteet. Standardiputkiin pipetoitiin 10 µl standardia ja 190 µl käyttöliuosta. Näyteputkiin pipetoitiin 2 µl näytettä ja 198 µl käyttöliuosta. Putkien annettiin inkuboitua huoneenlämmössä ainakin 2 minuuttia.

Näytteet mitattiin ja tulokset kirjattiin ylös, toivottu konsentraatio oli yli 10 ng/µl. Jos konsentraatio olisi ollut alle 10 ng/µl, DNA-eristys olisi suoritettu uudelleen ennen geelielektroforeesia [29].

5.2.11 Geelielektroforeesi

Ennen sekvensointiin lähettämistä DNA:n puhtaus ja eheys määritettiin geelielektroforeesilla. Tämä on tekniikka, jossa DNA, RNA ja proteiinimolekyylejä erotetaan toisistaan koon ja varauksen perusteella [30].

Geelielektroforeesi ajoa varten valmistettiin ensimmäisenä geeli sulattamalla 0,8 g SeaKemLE-agarosia 100 ml:aan 1X TAE -puskuria (24,2 g/l Tris, 2 ml/l 0.5 M EDTA, pH 8, 1,142 ml/l jäätikkää). Seoksen annettiin jäähtyä noin 60 °C asteiseksi. Jäähdytyksen aikana valmisteltiin kelkka teippaamalla sen päädyt kiinni niin, ettei geeli päässyt vuotamaan. Kun seos oli jäähtynyt tarpeeksi, siihen lisättiin 5 µl Midori green -väriainetta (NIPPON Genetics EUROPE). Seuraavaksi geeliseos kaadettiin kelkkaan ja kampa, joka muodostaa kaivot, asetettiin paikoilleen välttämällä ilmakuplia. Geelin annettiin jähmettyä, jota odottaessa valmistettiin näytteet. 1,5 ml:n mikrosentrifuugiputkeen pipetoitiin 150–200 ng faagi-DNA:ta, 1,5 µl 6X DNA -latauspuskuria ja tilavuus säädettiin 10 µl:aan Baxter-vedellä. Jos DNA-näytteet olivat laimeita voitiin tilavuus säätää 15 µl:aan, jolloin 6X DNA -latauspuskuria lisättiin 2,5 µl.

Geelin jähmettyttyä kelkan päistä poistettiin teipit ja kampa vedettiin geelistä varovaisesti pois. Kelkka geeleineen asetettiin altaaseen kaivot negatiivisen navan puolella. Varmistettiin, että altaassa oli tarpeeksi 1X TAE -puskuria peittämään geeli. DNA-kokomarkkeria pipetoitiin 2 µl, joko vasemmalle tai oikealle puolelle näytteitä. Viereisiin kaivoihin pipetoitiin näytteet (10 µl) välttämällä ilmakuplia ja näytteen karkaamista kaivosta. Altaan päälle asetettiin kansi, jonka johdot kiinnitettiin virtalähteeseen. Jännitteeksi asetettiin 50–60 V, sähkövirraksi 60 mA ja ajaksi 1–2 h. Ajon valmistumisen jälkeen geeli siirrettiin kelkasta kuvannuslaitteen (Gel Doc Gel imager) mustalle tarjottimelle ja kuvausmetodiksi valittiin midori green -väriaineelle sopiva ohjelma [29].

5.2.12 Bakteriofagin nimeäminen

Uusi bakteriofagi oli nimettävä ja tähän on eri laboratorioilla omat säännök-sensä. Helsingin yliopiston faagihoitoryhmässä metodi perustuu näytteen alku-peräpaikkaan ja isäntään, jota käytettiin eristyksessä esim. fHe-Eco01 (f=faagi, He=Helsinki, Eco= *E. coli*). Jos kirjastossa on saman nimisiä faageja, ne erotetaan toisistaan numeron perusteella) [24].

5.2.13 Pakastus

Uudet bakteriofagit pakastettiin faagikokoelmaan. 500 µl:n kierrekorkkisia pakasteputkia varten tulostettiin tarrat, joissa luki faagin nimi, tiitteri, missä ai-neessa se oli säilöty ja milloin se oli säilöty. Jokaista faagia varten tehtiin kolme 20 %:sta glyseroliputkea ja kolme 8 %:sta DMSO putkea. Glyseroliseosta varten 540 µl faagilysaattia ja 160 µl glyserolia (86–88 %) sekoitettiin 1,5 ml:n mikrosentrifuugiputkessa. DMSO-seosta varten 700 µl faagilysaattia ja 60 µl di-metyylisulfoksidia (DMSO) sekoitettiin 1,5 ml:n mikrosentrifuugiputkessa. Kummatkin seokset jaettiin kolmeen 500 µl:n putkeen ja ne säilytettiin -70-asteiseen pakastimeen [24].

6 Tulokset

6.1 Olemassa olevien faagien elinkyvyn testaus ja tuotto

Projekti aloitettiin testaamalla faagikokoelman *E. coli*-faagien kunto valmiista lysaateista. Faageja oli tarkoitus testata kohdekantoja vastaan, joten oli varmistettava, että faagien tiitterit eivät olleet laskeneet säilytyksessä alle $1,0 \cdot 10^8$.

Faagien tiitterit selvitettiin kaksoiskerrostitrauksella (5.2.3, kohta A). Toivottu tiitteri oli vähintään $1,0 \cdot 10^8$, joten käytettiin laimennoksia 10^{-5} , 10^{-6} ja 10^{-7} . Nämä laimennokset valittiin, koska niillä $1,0 \cdot 10^8$ tiitterin plakkien määrä pitäisi olla helposti laskettavissa.

Faagit, joiden tiitteri oli alle 10^8 , oli tuotettava uudestaan. Ensin kokeiltiin neste-tuottoa, koska se vaatii vähiten resursseja ja on nopein suorittaa (5.2.4, kohta

A). Ne faagit, jotka eivät tuottuneet nesteessä, yritettiin tuottaa maljalla. Kaikki faagit eivät useista yrityksistä huolimatta tuottuneet ja ne oli jätettävä jatkoketäuksista, sillä aikaa oli rajallisesti (taulukko 2).

Taulukko 2 Taulukko sisältää faagihitoryhmän *E. coli* infektoivat faagit, niiden tiitterit ja niiden isännät. Taulukkoon on väreillä ilmaistu niiden testausten tulokset.

Phage	Tiitteri	Isäntäkanta
fHe-Eco02	$1,30 \cdot 10^9$	#5506
fTu-Eco01	$8,80 \cdot 10^9$	#5507
fOu-Eco01	$2,0 \cdot 10^9$	#5507
fHy-Eco03	$4,00 \cdot 10^9$	#5509
fFi-Eco01	$3,20 \cdot 10^8$	#5521
fFi-Eco06	$1,26 \cdot 10^{11}$	#5521
fHo-Eco02	$4,0 \cdot 10^9$	#5521
pEInt-Eco01	$7,2 \cdot 10^8$	#6508
pEPyo-Eco02	$4,6 \cdot 10^8$	#6508
pMgPio-Eco01	$1,6 \cdot 10^8$	#6508
fEInt-Eco01b	$7,70 \cdot 10^9$	#6731
fFi-Eco09	N/A	#5517
PK1A wt	$2,40 \cdot 10^9$	#6150
PK1A2 mut	$2,2 \cdot 10^{10}$	#6151
fBC-Eco01	$1,10 \cdot 10^{10}$	#5629
fTa-Eco01	$3,30 \cdot 10^9$	#5506
fTa-Eco03	$6,0 \cdot 10^8$	#5506
fPo-Eco01	$3,00 \cdot 10^{10}$	#5521
fFi-Eco02	$1,00 \cdot 10^{11}$	#5521
fFi-Eco03	N/A	#5521
fKu-Eco01	$4,80 \cdot 10^9$	#5506
EC2P1	$5,20 \cdot 10^9$	#6307
EC9P1	$1,80 \cdot 10^{10}$	#6314
EC4P2	$4,60 \cdot 10^9$	#6309
EC16P2	$1,00 \cdot 10^{11}$	#6321
fIoEco03	N/A	#5517

	Faagilysaatti on ollut vähintään 10^8 , eikä sitä ole tarvinnut tuottaa uudestaan.
	Bakteriofagi tuotettiin uudestaan alhaisen tiitterin vuoksi ja tuotto oli onnistunut.
	Bakteriofagi tuotettiin uudestaan alhaisen tiitterin vuoksi, mutta tuotto ei onnistunut.

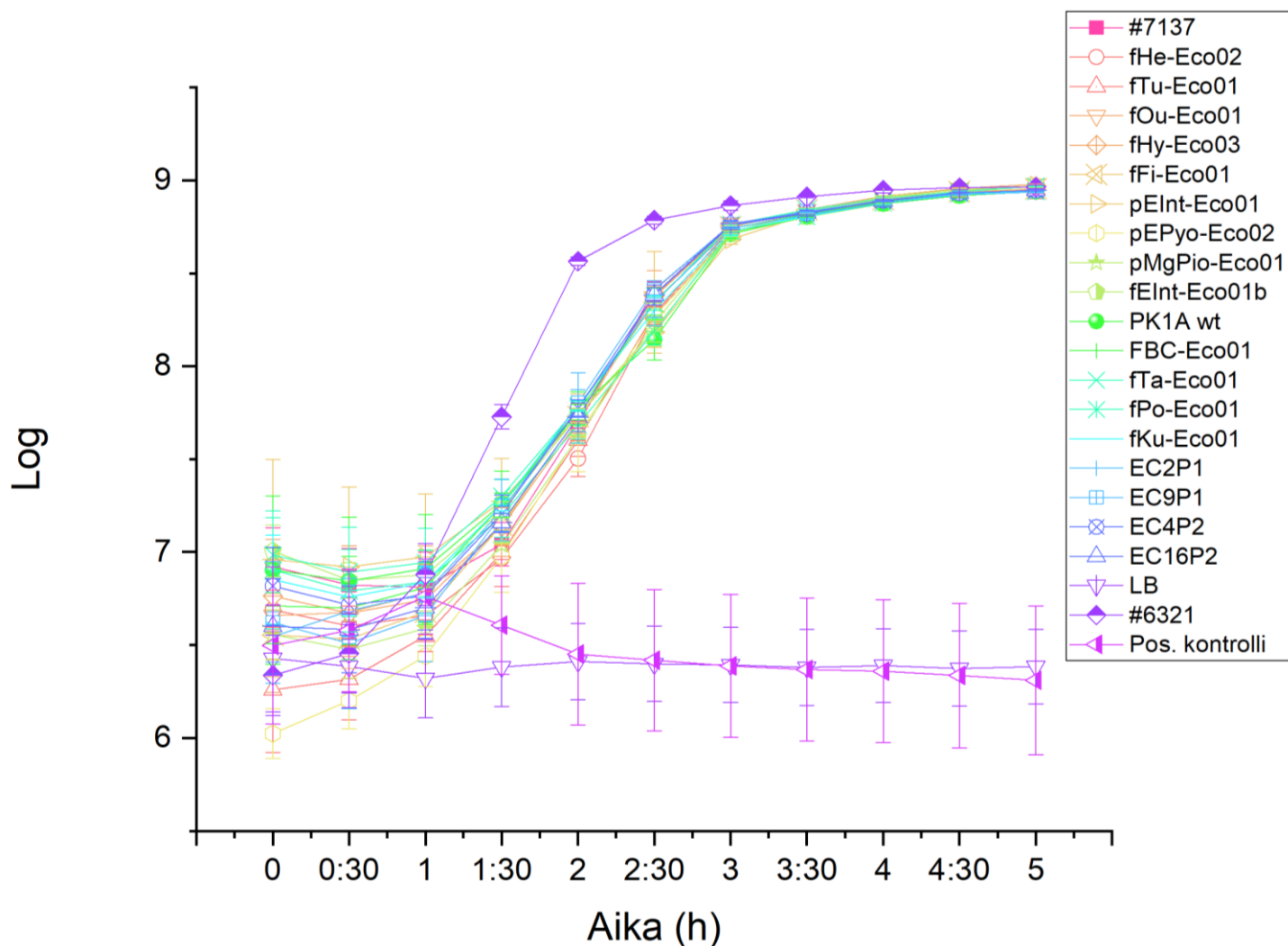
6.2 Isäntäkirjon testaus

Laboratorion kokoelmasta löytyneet bakteriofagit, joiden tiitterit oli varmistettu, testattiin kohdekantoja vastaan. Eli kokeiltiin, infektoiko mikään kokoelman *E. coli*-faageista kohdekantoja. Tähän käytettiin oCelloscope -nimistä laitetta, joka ottaa kuvia soluista ja laskee kuvien perusteella bakteerien kasvukäyrän. Testissä meneteltiin metodin 5.2.5 mukaan. Kaikkia bakteriofageja ei ehditty testata, sillä laite joutui huoltoon. Taulukossa 3 näkyy testattujen faagien tulokset.

Taulukko 1 Taulukossa näkyy faagihoitoryhmän *E. coli* ja infektoivien faagien testaustulokset kohdekantoja vastaan.

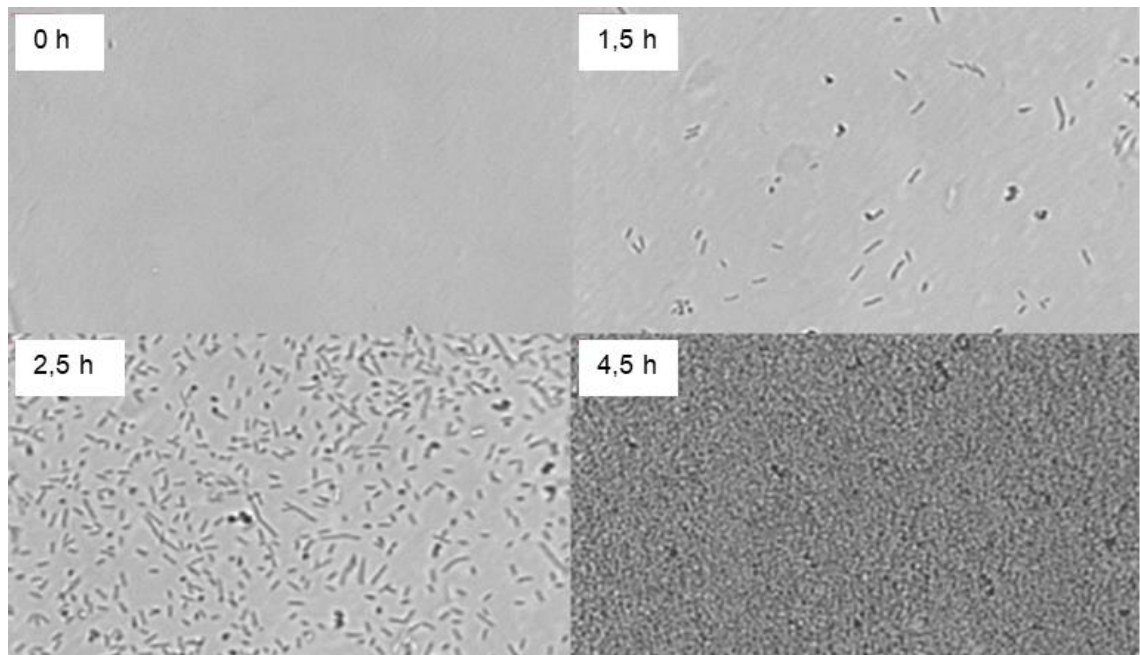
	#7135	#7136	#7137	#7138	#7206	#7207	#7208	#7209		
fHe-Eco02										
fTu-Eco01										
fOu-Eco01										
fHy-Eco03										
fFi-Eco01										
fFi-Eco06										
fHo-Eco02										
pElnt-Eco01										
pEPyo-Eco02										
pMgPio-Eco01										
fElnt-Eco01b										
fFi-Eco09										
PK1A wt										
PK1A2 mut										
fBC-Eco01										
fTa-Eco01										
fTa-Eco03										
fPo-Eco01										
fFi-Eco02										
fFi-Eco03										
fKu-Eco01										
EC2P1										
EC9P1										
EC4P2										Ei testattu laite rikon takia
EC16P2										Ei infektoinut
fJoEco03										Infektoi

Mikään testatuista bakteriofageista ei tappanut kohdekantoja. Kaikkien ajojen tulokset näyttivät samoilta, vain positiivikontrolli (kuoppa, jossa on istäntäkantaa #6321 ja sitä tiedettävästi infektoivaa faagia EC16P2) infektoitui (kuva 5).

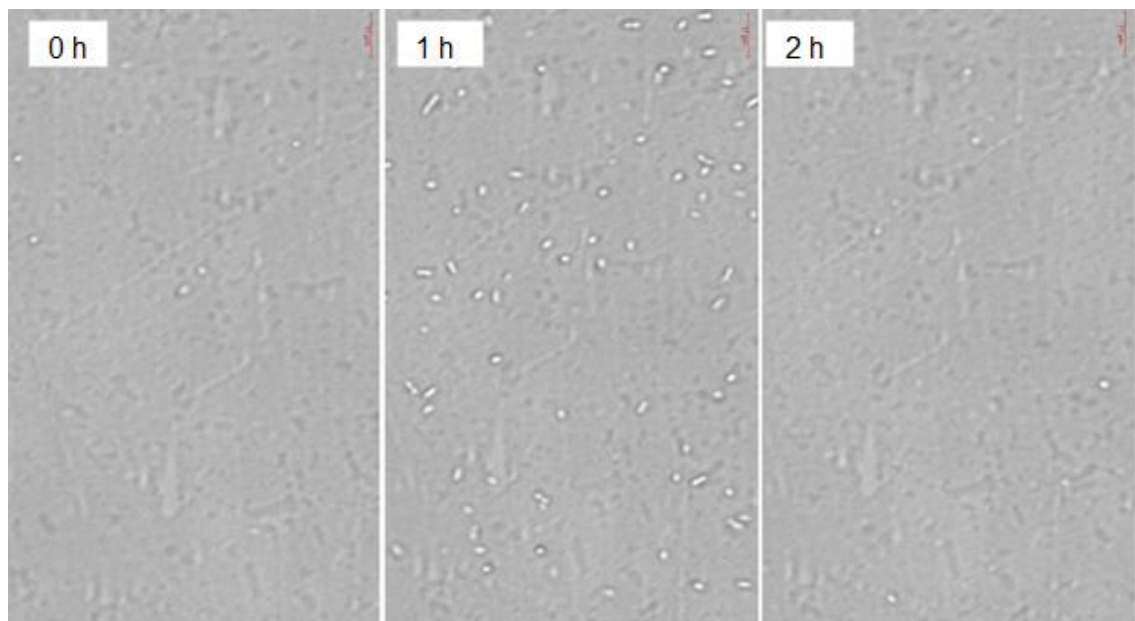


Kuva 5 oCelloscope tulokset. Kohdekantaa #7137 testattiin listassa olevia faageja vastaan. #6321 ja sitä tiedetysti infektoivaa faagia EC16P2 käytettiin positiivisena kontrollina.

OCelloscope ottaa kuvia tehdessään mittauksia. Kuvassa 6 näkyy kuinka bakteeri, joka ei infektoitu kasvaa valtoimenaan. Kuvan 5 kaaviossa kaikki paitsi LB ja positiivisen kontrollin käyrät vastaavat tätä tilannetta. Kuva 7 vastaa positiivisen kontrollin käyrää (kuva 5), jossa bakteeri on aluksi lähtenyt kasvuun, mutta bakteriofagit ovat lopulta infektoineet ja tuhonneet bakteerisolut. Tämä tilanne vastaisi myös, jos jokin kokoelman faageista olisi infektoinut kohdekan-toja.



Kuva 6 oCelloscopen ottamia kuvia mittauksen eri ajankohdilta. *E. coli*-kanta #7138 kun faagi ei infektoi sitä.



Kuva 7 oCelloscopen ottamia kuvia mittauksen eri ajankohdilta. *E. coli*-kanta #6321 infektoituu faagilla EC16p2. Tätä paria käytettiin positiivisena kontrollina.

Koska mikään laboratorion kokoelmasta löytyneistä faageista ei infektoinut si-oista eristettyjä *E. coli*-kantoja, bakteriofageja alettiin etsiä muualta.

6.3 Työssä eristetyt faagit

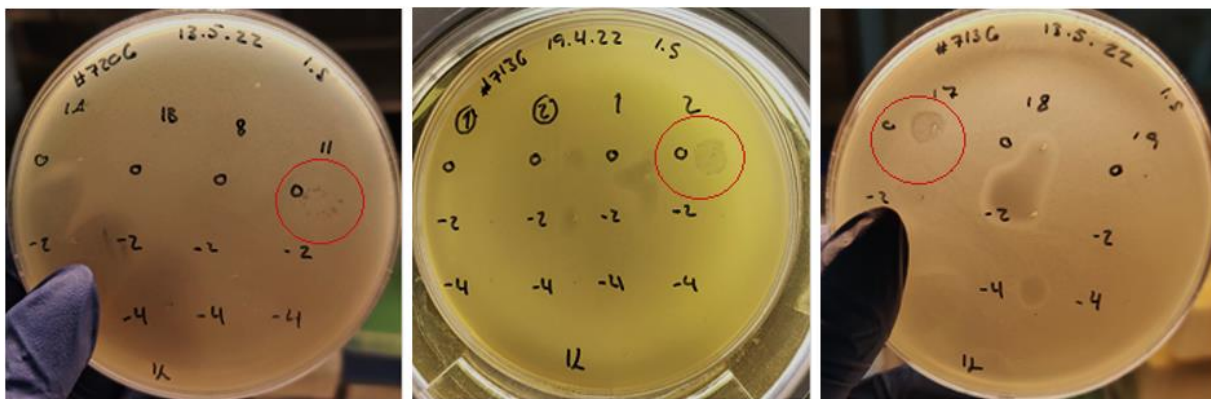
Projektin seuraavassa vaiheessa kohdekantoja infektoivia bakteriofageja etsittiin erilaisista vesi-, luonto- ja ulostenäytteistä (Lista näytteistä liitteessä 1). Näytteiden paljouden takia osa niistä yhdistettiin ajan ja resurssien säästämiseksi.

Rikastus (5.2.7) suoritettiin jokaiselle näytteelle/poolille, jokaisella kohdekannalla. Tässä tapauksessa kantoja oli 8 ja näytteitä/pooleja oli yhteensä 27 ja rikastuksia tehtiin siis 216. Rikastetut näytteet titrattiin pisaramenetelmällä (5.2.3, kohta B) käyttäen samaa kantaa kuin rikastuksessa oli käytetty. Kolmesta eri näytteestä löytyi kohdekantaa infektoiva bakteriofagi (taulukko 4).

Taulukko 4. Löydetyt faagit, mitä isäntää ne infektoivat ja niiden alkuperä.

Löydetyin faagin väliaikainen nimi	Isäntäkanta	Mistä näytteestä faagi on löytynyt
Faagi 1	#7136	Emakon uloste
Faagi 2	#7136	Pooli 17
Faagi 3	#7206	Pooli 11

Syntyneet plakit (kuva 8) poimittiin mikrosentrifuugiputkiin ja niille suoritettiin viisi plakkipuhdistus sykliä.



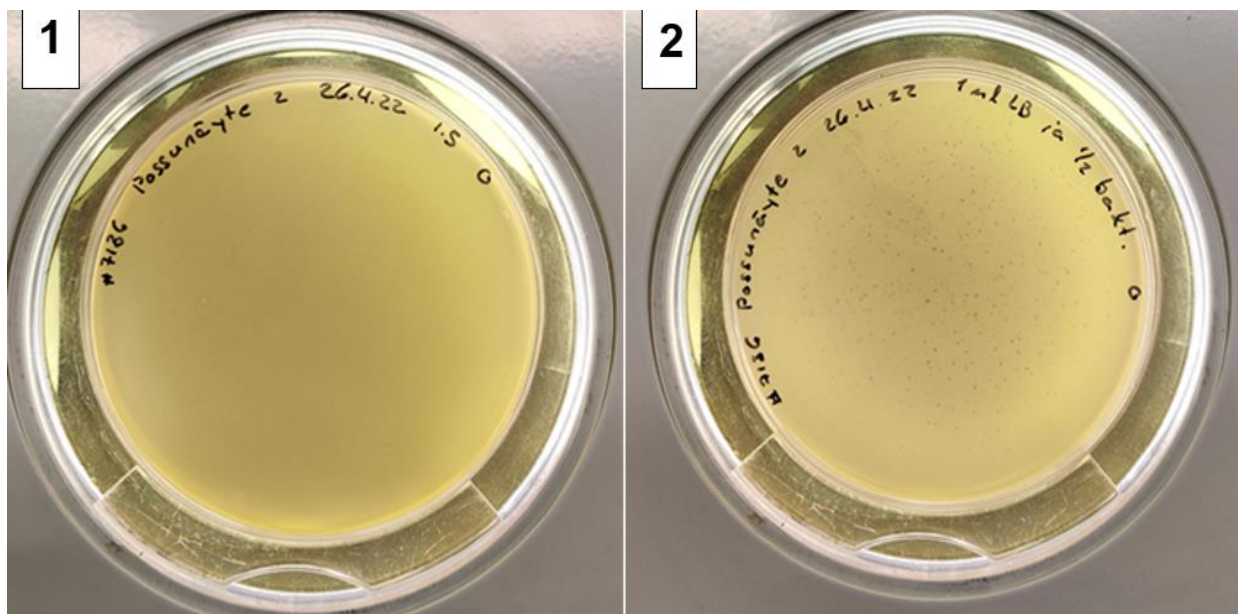
Kuva 8 Kuvassa kolme maljaa, joilta faagit löytyivät. Plakit on ympyröity punaisilla ympyröillä.

6.4 Plakkipuhdistus ja uusien faagien tuotto

Jotta voitiin varmistua, että rikastusten pisaratitrauksista kaavituista plakkirykelmissä oli vain yhtä faagia, suoritettiin plakkipuhdistus (5.2.8).

Ensimmäistä puhdistusta (5.2.8) suoritettaessa huomattiin, että kaksi löytyneistä faageista (kannalle #7136 löytyneet Faagi 1 ja Faagi 2) muodostivat todella pieniä plakkeja. Tästä voitiin arvioida, että kyseisiä faageja saattaisi olla vaikeaa käsitellä jatkossa, joten plakkien kokoa kasvatettiin onnistuneesti muokkaamalla maljausolosuhteita. Isäntäkantaa laimentamalla bakteerit pysyvät pidempään eksponentiaalisessa kasvuvaiheessa, jolloin faagit ehtivät kasvaa kauemmin.

Maljalla 1 (kuva 9) faagi on titrattu normaalisti ilman plakkikoon manipuloimista, ja siitä syntyneet plakit ovat niin pieniä, etteivät ne näy kuvassa. Maljalla 2 (kuva 9) plakkien kokoa on manipuloitu. Plakkien koko on huomattavasti isompi, ja ne näkyvät jopa kuvassa.



Kuva 9. Maljalla 1 on ilman plakkikoon manipulointia suoritettu plakkipuhdistustitraus (0 laimennos). Maljalla 2 on plakkipuhdistustitraus, jossa plakkien kokoa on manipuloitu (laimennos 0). Kummallakin maljalla on isäntä #7136 ja löydetty faagi "Faagi 1B".

Puhdistussyklien yhteydessä huomattiin, että Faagi 1:n joka infektoi kantaa #7136, plakeissa näkyi morfologialtaan kahta erilaista plakkia. Maljalta otettiin pieni ja iso plakki erikseen omille puhdistussykleille. Useamman puhdistuskierroksen jälkeen ei morfologian perusteella osattu sanoa, ovatko plakit samaa faagia vai eivät, joten niitä kohdeltiin eri faageina (Faagi 1A ja Faagi 1B). Sekvensoinnissa selviää, ovatko ne eri faageja.

Löydetystä bakteriofageista tuotettiin faagilysaatit nestemenetelmällä (5.2.4). Tuotossa faagina käytettiin viimeisimmästä plakkipuhdistussyklistä kerättyä plakkia. Tuotettu faagi pisaratitrattiin (5.2.3, kohta B) tuoton onnistuneisuuden määrittämiseksi. Kaikki faagit antoivat vahvat plakit laimennoksella 10^{-4} . Koska tuotot olivat onnistuneita, ne kaksoiskerrostitrattiin (5.2.3, kohta A) tiitterin määrittämiseksi. Kaksoiskerrostitrausten tulokset (Taulukko 5) olivat suurimmaksi osaksi hyviä (toivottu tiitteri vähintään 10^8).

Taulukko 5. Löydettyjen faagien tiitterit.

Bakteriofagi	Tiitteri (PFU/ml)
Faagi 1A	6,8E+9
Faagi 1B	4,4E+9
Faagi 2	1,2E+10
Faagi 3	Epästabiili

Faagi 3 oli pisaratitrauksen jälkeen heikentynyt huomattavasti vain muutaman päivän aikana. Faagi titrattiin uudelleen, jotta voitiin varmistua, ettei titrauksessa ollut tapahtunut virhettä. Tulokset olivat toisen titrauksen jälkeen kuitenkin samat, joten todettiin tämän faagin olleen epästabiili. Tämä faagi ei jatkanut projektin seuraavaan vaiheeseen, sillä epästabiilit bakteriofagit eivät ole hoitokäytössä käyttökelpoisia. Kaikki muut faagit jatkoivat DNA-eristykseen.

6.5 DNA-eristys ja geelielektroforeesi

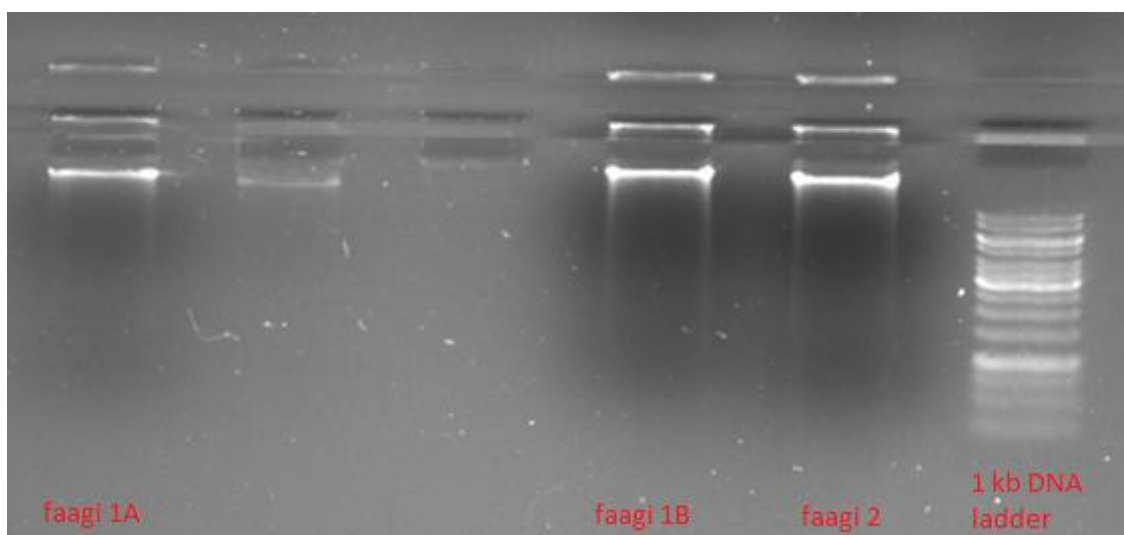
DNA -eristyksessä (5.2.9) käytettiin Promegan automatisoitua DNA:n eristyslaitetta "Maxwell RSC". Sen kanssa käytettiin kittiä "Maxwell RSC Viral Total Nucleic Acid Purification Kit". Seuraavana päivänä selvitettiin DNA:n konsentraatio (5.2.10).

DNA-eristys oli onnistunut (taulukko 6) ja kaikkien näytteiden konsentraatio oli yli 10 ng/μl. Seuraavaksi kaikille näytteille suoritettiin geelielektroforeesi puhtauden ja eheyden määrittämiseksi.

Taulukko 6. Löydettyjen bakteriofagien eristysvaiheen DNA-konsentraatiot.

Näyte	DNA:n konsentraatio (ng/μl)
Faagi 1A	15,4
Faagi 1B	13,5
Faagi 2	29,9

Kuvassa 10 näkyy geelielektroforeesin tulokset. DNA oli yhtenä juovana, eikä se ollut hajonnut. Tulosten perusteella näytteet vaikuttivat tarpeeksi laadukkailta sekvensointiin. Näytteet lähetettiin sekvensoitavaksi ulkopuoliselle laboratoriolle, joten niiden tulokset eivät ehdi tähän opinnäytetyöhön.



Kuva 10 Geelistä otettu kuva. Faagi 1A DNA:ta on pipetoitu 150,4 ng, Faagia 1B 130,5 ng ja Faagia 2 290,9 ng. Ajo suoritettiin yhdessä tunnissa 60V ja 60mA. 1 kb:n kokomarkkeri on Thermo Scientific:in valmistama.

6.6 Bakteriofagien nimeäminen ja pakastus

Sekvensointia ja pakastusta ennen löytyneet bakteriofagit oli nimettävä (5.2.12 (taulukko 7)).

Taulukko 7. Löydettyjen bakteriofagien nimeämistapa.

Näyte	Mikä virus	Alkuperä	Mitä isäntää faagi infektoi	Monesko saman niminen faagi	Lopullinen nimi
Faagi 1A	Faagi= f	Sian uloste= Pf	<i>E. coli</i> = Eco	01	fPf-Eco01
Faagi 1B	Faagi= f	Sian uloste= Pf	<i>E. coli</i> = Eco	02	fPf-Eco02
Faagi 2	Faagi= f	Benin= Ben	<i>E. coli</i> = Eco	01	fBen-Eco01

Näytteiden nimeämisen jälkeen loput DNA-eristyksestä jääneestä materiaalista lähetettiin sekvensoitavaksi ja faagilysaatti pakastettiin ryhmän faagikokoelmaan.

7 Pohdinta

Faagihoidon kehittämiseksi on tärkeää laajentaa bakteriofagikokeita, jotta mahdollisimman monia bakterikantoja tappavia viruksia olisi nopeasti hyödynnettävissä. Tämän opinnäytetyön aiheena oli etsiä uusia faageja tietyille sioista eristetyille ETEC-kannoille. Toiveena oli löytää hoitokeino porsaiden ETEC-tartunnasta johtuvaan ripuliin. Löydetyillä kolmella lupaavalla faagilla on mahdollisesti faagihoidon lupaavia ominaisuuksia, mutta varmuus asiasta selviää vasta sekvensoinnissa. Valitettavasti sekvensoinnin tulokset eivät ehdi tämän opinnäytetyön tuloksiin.

Bakteriofageja voi löytää paikoista, joissa esiintyy bakteereja, kuten luonnosta, eläimistä ja vesistöistä [31]. Tässä projektissa lähdettiin liikkeelle sian uloste ja sikalan karsinoista kerätyistä näytteistä. Tämä oli luonnollinen paikka alkaa etsimään bakteriofageja sioista eristetyille bakterikannoille. Sillä siellä missä tiettyä bakterikantaa esiintyy, on iso mahdollisuus löytää sitä infektoivaa faagia. fPf-Eco01- ja fPf-Eco02 -faagit eristettiin emakon ulostenäytteestä. Kummankin faagin nestekasvatuksesta tuotettuna tiitteri oli 10^9 , mikä on faagihoidon kannalta hyvä, ja mikäli sekvensoinnista selviää faagien olevan lyyttisiä, ne ovat faagihoidon kelpaavia.

Bakteriofagit lisääntyvät ylenmääräisesti, jotta niillä on olisi mahdollisimman hyvät mahdollisuudet levitä ja löytää sopivia bakterisoluja infektoitavaksi [32]. Tämän takia sikakantoja infektoivia bakteriofageja voidaan etsiä myös paikoista, joissa on mahdollisia sikakontakteja, esimerkiksi sellaisten alueiden jätevesistä, joissa ihmiset ovat kontaktissa sikojen kanssa. Tästä johtuen sikalanäytteiden lisäksi faageja etsittiin myös luonnonvesi-, jätevesi- ja ympäristönäytteistä. fBen-Eco01 oli beniniläisestä sairaalajätevedestä löytynyt faagi. Tämä faagi oli helposti tuottava ja siitä oli helppo eristää DNA:ta. Faagi vaikuttaa helpolta käsitellä, mikä on iso etu faagihoidossa. Beninissä ihmiset elävät lähempänä kotieläimiään eikä hygienia ole samalla tasolla kuin länsimaissa. Faagi on mahdollisesti päätenyt beniniläisen sairaalan jätevedeen ihmisen kautta (beniniläisillä on mahdollisesti erilaiset suolistobakteerit kuin esim. pohjoismaissa) tai sian ulosteen kanssa kontaktissa olleen potilaan kautta.

Helsinkiläisistä jätevesistä ei ollut todennäköistä löytää sikakantaa infektoivaa faagia, sillä helsinkiläiset ovat harvoin kontaktissa sikojen kanssa, mutta “Faagi 3” kuitenkin löytyi. Kyseisen faagin tiitteri laski muutamassa päivässä rajusti, eivätkä epästabiilit faagit ole hyödyllisiä faagihoidoissa. Tästä syystä tämä faagi jätettiin pois jatkotutkimuksista.

Jatkossa lisää kyseisiä kantoja infektoivia bakteriofageja olisi etsittävä sellaisista näytteistä, joissa on mahdollisia sikakontakteja, esimerkiksi sellaisen kylän tai kaupungin jätevesistä, joissa on sikaloita.

Opinnäytetyön aikana käytettiin jo valmiiksi pystytettyjä menetelmiä ja tuloksia voidaan pitää luotettavina. Löydettyjen faagien tutkimusta jatketaan ryhmässä myöhemmin. Mikäli myöhemmin tehtävässä sekvensoinnissa selviää löydettyjen bakteriofagien olevan faagihoitoihin kelvollisia, näitä kolmea löydettyä faagia voidaan käyttää niiden isäntäkantojen (ETEC-kantojen) hoitoon sikatiloilla.

8 Kiitokset

Haluaisin kiittää lämpimästi kaikkia opinnäytetyötäni tukeneita henkilöitä, etenkin Saija Kiljusta, Matti Ylännettä, Sheetal Patpatiaa ja toki koko faagitreapian ryhmää. Kiitos mahdollisuuksista, kärsivällisyydestä ja antamastanne avusta!

Haluaisin kiittää myös dosentti Kaisa Haukkaa ja professori Anu Kanteletta Helsingin yliopistolta, jotka ovat keränneet ja toimittaneet beniniläiset vesinäytteet. ETEC-kannat on saatu Ruokavirastolta, jossa yhteyshenkilönä toimi Mia Biström, ja ne on toimittanut Claudio Oliviero. Kiitän myös Sophie Gholadzea georgialaisesta vesinäytteestä.

Lähteet

1. Intestinal challenge with enterotoxigenic *Escherichia coli* in pigs, and nutritional intervention to prevent postweaning diarrhea. Artikkel. ScienceDirect. <<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S2405654517300951?via%3Dihub>>. Luettu 10.10.2022.
2. Bacteriophage. Verkkoaineisto. Britannica. <<https://www.britannica.com/science/bacteriophage>>. Luettu 1.8.2022.
3. William C Summers. 2021. History of Virology: Bacteriophages. Encyclopedia of Virology, 4th edition. Elsevier.
4. Bakteriofagiterapia antibioottiresistenttien bakteeriinfektioiden hoidossa. Kandidaattitutkielma. Oulun yliopisto. <Bakteriofagiterapia antibioottiresistenttien bakteeriinfektioiden hoidossa>. Luettu 16.8.2022
5. Bacteriophage. Verkkoaineisto. ScienceDirect. <https://www.sciencedirect.com/topics/biochemistry-genetics-and-molecular-biology/bacteriophage>>. Luettu 16.8.2022.
6. Bacteriophage. Verkkoaineisto. ScienceDirect. <<https://www.sciencedirect.com/topics/medicine-and-dentistry/bacteriophage>>. Luettu 1.8.2022.
7. Bakteriofagit bakteeri-infektioiden hoidossa. Kandidaattitutkielma. <<http://jultika.oulu.fi/files/nbnfioulu-201804271551.pdf>>. Luettu 3.9.2022
8. Phage 101. Verkkoaineisto. UC San Diego Health. <<https://health.ucsd.edu/news/topics/phage-therapy/pages/phage-101.aspx>>. Luettu 16.8.2022
9. Bacteriophage. Verkkoaineisto. National Library of Medicine. <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/29630237/>>. Luettu 16.8.2022.

10. Bacteriophages. Verkkoaineisto. Khan Academy. <<https://www.khanacademy.org/science/biology/biology-of-viruses/virus-biology/a/bacteriophages>>. Luettu 16.8.2022.
11. Lytic vs Lysogenic. Artikkel. TechnologyNetworks. <<https://www.technologynetworks.com/immunology/articles/lytic-vs-lysogenic-understanding-bacteriophage-life-cycles-308094>>. Luettu 16.8.2022
12. Bacteriophage resistance mechanisms. Artikkel. Nature reviews microbiology. <<https://www.nature.com/articles/nrmicro2315>>. Luettu 3.9.2022
13. Keith E Shearwin, Jia Q Truong. 2021. Lysogeny. Encyclopedia of Virology, 4th edition. Elsevier.
14. Bacteriophage: Structure, Replication, Uses. Verkkoaineisto. microbeOnline. <<https://microbeonline.com/bacteriophage-structure-replication-use/>>. Luettu 16.8.2022.
15. Escherichia coli – an overview. Verkkoaineisto. Cambridge Core. <<https://www.cambridge.org/core/journals/epidemiology-and-infection/article/escherichia-coli-an-overview/CE2AB07CF9676E6492B755299D5E387C>>. Luettu 22.8.2022
16. Escherichia coli in Europe: An Overview. Artikkel. MDPI. <<https://www.mdpi.com/1660-4601/10/12/6235/htm>>. Luettu 22.8.2022
17. Pathogenic Escherichia coli. Verkkoaineisto. Nature reviews microbiology. <<https://www.nature.com/articles/nrmicro818.pdf>>. Luettu 22.8.2022.
18. Teng-Chieh Yang. 2021. Bacteriophage: Therapeutics and Diagnostics Development. Encyclopedia of Virology, 4th edition. Elsevier

19. PHAGE THERAPY BACK TO THE FUTURE!. Artikkele. <http://www.globalhealthdynamics.co.uk/wp-content/uploads/2015/05/17_GA-BARD.pdf>. Luettu 27.8.2022.
20. The Unique Role That WHO Could Play in Implementing Phage Therapy to Combat the Global Antibiotic Resistance Crisis. Artikkele. Frontiers. <<https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fmicb.2020.01982/full>>. Luettu 27.8.2022.
21. Laxco MicroSpek DSM Micro Cell Density Meter. Verkkoaineisto. Cole-Parmer. <<https://www.coleparmer.co.uk/i/laxco-microspek-dsm-micro-cell-density-meter-photometer/3945912>>. Luettu 25.3.2022.
22. Titering. Verkkoaineisto. PhagesDB.org. <<https://phagesdb.org/media/workflow/protocols/pdfs/PDF-Tbox-4titering.pdf>>. Luettu 25.3.2022.
23. Bacteriophage Plaque Assay: Principle, procedure, results. Verkkoaineisto. Microbeonline. <<https://microbeonline.com/phage-plaque-assay-principle-procedure-results/>>. Luettu 12.9.2022
24. Isolation of new phages. 2020. Yrityksen sisäinen dokumentti. Helsingin yliopiston ihmisen mikrobiomit yksikkö, faagihitoryhmä.
25. OCelloScope. Verkkoaineisto. BioSence Solutions. <[oCelloScope-technology.pdf \(biosensesolutions.dk\)](#)>. Luettu 31.3.2022.
26. Phages in nature. National Library of Medicine. <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3109452/>>. Luettu 3.6.2022.
27. Bacteriophage isolation using enrichment cultures. Verkkoaineisto. protocols.io. <<https://www.protocols.io/view/Bacteriophage-isolation-using-enrichment-cultures-4r3l28b4l1y9/v1>>. Luettu 12.9.2022.

28. Maxwell RSC Instrument. Verkkoaineisto. Promega.
<<https://fi.promega.com/products/lab-automation/automated-dna-rna-extraction-purification-maxwell/maxwell-rsc-instrument/?catNum=AS4500>>.
Luettu 3.7.2022.aw
29. Qubit 4 Fluorometer. Verkkoaineisto. ThermoFisher. <https://www.thermo-fisher.com/fi/en/home/industrial/spectroscopy-elemental-isotope-analysis/molecular-spectroscopy/fluorometers/qubit/qubit-fluorometer.html>.
Luettu 3.7.2022.
30. The analysis of new phages. Yrityksen sisäinen dokumentti. Helsingin yliopiston ihmisen mikrobiomit yksikön, faagihoidoryhmä.
31. Standard Operating Procedure. Yrityksen sisäinen dokumentti. Helsingin yliopiston ihmisen mikrobiomit yksikkö, faagihoidoryhmä.
32. Bacteriophage Fact Sheet. Verkkaineisto. Morgridge institute for research. <<https://morgridge.org/community/teaching-learning/virology-immunology/factsheets/bacteriophage-fact-sheet/>>. Luettu 3.6.2022

Faagieristysnäytteet

Taulukko 1 Taulukko sisältää listauksen faagieristysnäytteistä. Keltaisella on korostettu niitä näytteitä, joista on löytynyt kohdekantoja infektoivia bakteriofageja.

	Näyte	Näytteenotto pv.
Ei poolatut näytteet	Joensuu, Kuhasalon jätevedenpuhdistamo	31.3.2022
	Possun uloste, Huone 1	11.6.2021
	Emakon uloste	11.6.2021
	Possun uloste, huone 2	11.6.2021
	Ympäristönäyte, Huone 1	11.6.2021
	Ympäristönäyte, Huone 2	11.6.2021
	Sian uloste	6.4.2022
	Sian uloste	6.4.2022
Pool 1	Sairaalan viemäriverinäyte A, syöpätautien klinikka	15.4.2016
	Sairaalan viemäriverinäyte, Peijas	14.4.2016
	Sairaalan viemäriverinäyte, Lohjan sairaala	13.4.2016
Pool 2	Meilahden jätevesi	N/A
	Meilahti, kolmiosairaalaa, jätevesi	12.1.2022
	Sairaala jätevesi, Peijas	13.1.2022
Pool 3	Sairaalan viemäriveresi, Porvoon sairaala	13.4.2016
	Jätevesinäyte, Peijas	11.6.2019
	Jorvin sairaalan jätevesinäyte	4.6.2019
	Jorvin jätevesinäyte	17.1.2022
Pool 1A	Mutaista sadevettä, hiekkatieltä, lammikosta. Viikki	13.9.2021
	Pitkään seissyttä vettä ojasta. Viikki	13.9.2021
	Pieni sadevesi puro. Viikki	13.9.2021
	Mutaista vettä mutaisesta ojasta. Viikki	13.9.2021
Pool 1B	Hevosien lanta, Leppävaara	21.5.2021
	Jäniksen jätös, Leppävaara	21.5.2021
	Hevosien lanta pellolla, Leppävaara	30.5.2021

Liite 1

Pool 6	FH1 Kolmiosairaan pääviemäri	20.1.2020
	FH2 Meilahden sairaalan pääviemäri	20.1.2020
	FH3 Uusi lasten sairaala pääviemäri	20.1.2020
	FH4 Keski-Suomen keskussairaalan pääviemäri	20.1.2020
Pool 7	FH5 Keski-Suomen keskussairaalan syöpätaudit/hematologia/leukakirurgian poliklinikka	20.1.2020
	FH6 Keski-Suomen keskussairaalan Päivystys/Päiväsairaala	20.1.2020
	FH7 Turun yliopistollisen keskussairaalan pääviemäri	23.1.2020
Pool 8	FH8 Turun yliopistollisen keskussairaalan pääviemäri	23.1.2020
	FH9 Lapin keskussairaala, H-osa viemäriä	28.1.2020
	FH10 Lapin keskussairaala, G-osa viemäriä	28.1.2020
Pool 9	Libyalainen jätevesi 1	3.5.2018
	Libyalainen jätevesi 2	3.5.2018
	Jätevesi Oulu	kesäkuu.17
	Mtkvari, Tbilisi, Georgia, joki vesi	12.2.2021
Pool 10	Jätevesi, Turku	kesäkuu.17
	Jätevesi, Helsinki	kesäkuu.17
	Jäteveden puhdistamolta otettu näyte, Helsinki	17.8.2017
Pool 11	Jätevesi, Helsinki	17.8.2017
	Jätevesi, Helsinki	17.8.2017
	Jätevesi, Helsinki	17.8.2017
Pool 12	Luonnonvesinäyte 1	24.8.2015
	Luonnonvesinäyte 2	24.8.2015
	Luonnonvesinäyte 3	24.8.2015
Pool 13	Vesinäyte 1, Tuomarinkylä	21.9.2015
	Vesinäyte 2, Pukinmäki	21.9.2015
	Sairaalajätevesi mix	26.7.2016
	Hevoslantanäyte	21.9.2015

Liite 1

Pool 14	Jätevesi mix	23.5.2018
	Sairaalavesi mix	23.5.2018
	Luonnonvesi pool	18.10.2016
	Ho-vesinäyte pool	18.10.2016
Pool 15	Benin, Hospital	25..2019
	Benin, Hospital	25.11.2019
	Benin, E61	6.12.2019
	Benin, BSE94	6.12.2019
	Benin, BSE 100	9.12.2019
	Benin, E44	5.12.2019
	Benin, E59	6.12.2019
	Benin, E60	6.12.2019
	Benin, E79	6.12.2019
	Benin, BH63	12.12.2019
Pool 16	Benin, E89	6.12.2019
	Benin, E74	6.12.2019
	Benin, BCE8	12.12.2019
	Benin BSE	N/A
	Benin, BH52	9.12.2019
	Benin, BH58	11.12.2019
	Benin, BH59	11.12.2019
	Benin, BH60	12.12.2019
	Benin, BH61	12.12.2019
	Benin, BH62	12.12.2019
Pool 17	Benin, BH44	9.12.2019
	Benin, BH45	9.12.2019
	Benin, BH46	9.12.2019
	Benin, BH47	9.12.2019
	Benin, BH48	31.12.2019
	Benin, BH49	9.12.2019
	Benin, BH50	10.12.2019
	Benin, BH33	29.11.2019
	Benin, BH34	29.11.2019
	Benin, BH35	30.11.2019

Liite 1

Pool 18	Benin, BH36	30.11.2019
	Benin, BH37	30.11.2019
	Benin, BH38	30.11.2019
	Benin, BH39	30.11.2019
	Benin, BH11	28.11.2019
	Benin, BH12	28.11.2019
	Benin, BH27	29.11.2019
	Benin, BH28	29.11.2019
	Benin, BH05	28.11.2019
	Benin, BH29	29.11.2019
Pool 19	Benin, BCE1	12.12.2019
	Benin, E88	6.12.2019
	Benin, BH30	29.11.2019
	Benin, BH31	29.11.2019
	Benin, BH01	28.11.2019
	Benin, BH01	27.11.2019
	Benin, BH03	28.11.2019
	Benin, BH06	28.11.2019
	Benin, BH07	28.11.2019
	Benin, BH09	28.11.2019