

HELSINGIN YLIOPISTO — HELSINGFORS UNIVERSITET — UNIVERSITY OF HELSINKI

Tiedekunta/Osasto — Fakultet/Sektion — Faculty Maatalous-metsätieteellinen tiedekunta		Laitos — Institution — Department Soveltavan kemian ja mikrobiologian laitos	
Tekijä — Författare — Author Henna Asikainen			
Työn nimi — Arbetets titel — Title Reaaliaikaisen PCR-menetelmän pystyttäminen EHEC serotyypin O26, O55, O91, O103, O145 ja O157:H7 sekä virulenssigeenien <i>stx</i> ₁ , <i>stx</i> ₂ ja <i>hlyA</i> havaitsemiseksi			
Oppiaine — Läroämne — Subject Mikrobiologia			
Työn laji — Arbetets art — Level Pro gradu-tutkielma		Aika — Datum — Month and year Syyskuu 2009	
		Sivumäärä — Sidoantal — Number of pages 80 + liitteet 1	
Tiivistelmä — Referat — Abstract			
<p>Työn tarkoituksena oli pystyttää reaaliaikainen PCR-menetelmä enterohemorraagisten <i>Escherichia coli</i> (EHEC) seroryhmien O26, O55, O91, O111, O113, O145 ja O157 sekä H7-antigeenin ja virulenssigeenien <i>stx</i>₁, <i>stx</i>₂ ja <i>hlyA</i> nopeampaa havaitsemista varten. Työssä testattiin menetelmän soveltuvuutta EHEC-bakteerien havaitsemiseen 45 puhdasviljelmäkannan lisäksi myös seitsemästä sekaviljelmästä, joista yksi oli Nokian vesiepidemian vesinäyte. Puhdasviljelmäkannat ja kuusi muuta sekaviljelmää olivat peräisin sairaaloista vuosien 1996-2007 välisenä aikana lähetetyiltä sekaviljelmämaljoilta.</p> <p>EHEC-bakteerit kuuluvat suolistotulehduksia aiheuttaviin <i>E. coli</i>-bakteereihin. Ne ovat suolistotulehduksia aiheuttavista <i>E. coli</i>-ryhmistä tärkein elintarvikkeiden ripulien aiheuttaja Suomessa ja muissa länsimaissa. EHEC-bakteerit leviävät pääasiassa elintarvikkeiden ja juomaveden kautta, vaikkakin alkuperäinen kontaminaatio on aina saanut alkunsa ihmisen tai eläimen ulosteesta. EHEC-infektion voi saada jo 10–100 bakteerista ja sen onkin todettu tarttuneen ihmisestä toiseen. Bakteerin tärkein reservuaari on nautakarjan ja muiden märehtijöiden suolistossa. EHEC-infektioita tavataan yleensä n. 10–20 tapausa vuosittain Suomessa. Suomessa, kuin myös maailmanlaajuisesti, yleisin epidemia aiheuttanut EHEC-kanta on tähän mennessä kuulunut O157:H7-serotyyppiin. Muita tärkeitä epidemioita aiheuttaneita O-seroryhmiä Suomessa ja muualla maailmalla ovat olleet seroryhmät O26, O103, O111 ja O145.</p> <p>EHEC-bakteeri aiheuttaa vesiripulia, mutta potilaat voivat kärsiä myös vatsakivuista ja oksentelusta. Osalla ihmisistä vesiripuli voi muuttua myös veriripuliksi (Hemorrhagic Colitis, HC). Jotkut voivat olla myös oireettomia kantajia. EHEC-bakteerin aiheuttama ripuli voi kehittyä hemolyttis ureeminen oireyhtymä (haemolytic uremic syndrome, HUS- jälkitaudiksi, jonka oireina ovat akuutit munuaisvauriot, mikroangiopaattinen hemolyttinen anemia ja trombosytopenia. Aikuisilla voi esiintyä myös HUS:n tromboottiseksi trombosytopeeniseksi purppuraksi (trombotic thrombocytopenic purpura, TTP) kutsuttua muotoa. HUS:n riskiryhmään kuuluvat alle viisivuotiaat lapset ja vanhukset. EHEC-bakteerin aiheuttama tauti luokitellaan Suomessa yleisvaarallisiin tartuntatauteihin.</p> <p>EHEC-bakteerin virulenssitekijöihin lukeutuu shigatoksiinin tuotto geenien (<i>stx</i>₁- ja <i>stx</i>₂-geenit) lisäksi myös Enterohemolysiinin tuotto geeni (<i>hly</i>-geeni) ja LEE (Locus of Enterocyte Effacement)-patogeenisuus saareke, joka sisältää mm. <i>tir</i>- ja <i>eae</i>-geenit, jotka määräävät proteiineja, joiden välityksellä EHEC-bakteeri kiinnittyy suolen epiteeliin. Shigatoksiineja pidetään oireiden pääasiallisena aiheuttajana.</p> <p>Tässä työssä testattu reaaliaikainen PCR-menetelmä (Real-Time PCR) on uusimpia EHEC-bakteerin tunnistamiseen käytetyistä menetelmistä. Menetelmä hyödyntää fluoresoivia koettimia, jotka toimivat fluoresenssi resonanssilla eli energian siirtymisellä (Fluorescence Resonance Energy Transfer, FRET) kahden fluoresoivan leiman kesken. Menetelmä mahdollistaa PCR-tuotteen analysoimisen monistamisen yhteydessä ja vähentää analysoimisen aikana syntyvän kontaminaatoriskin lisäksi myös turvallisuusriskiä, kun tulosten visualisoinnissa ei tarvitse käyttää karsinogeenista Etidiumbromidia (EtBr).</p> <p>Tässä työssä menetelmällä saadut tulokset olivat toistettavia ja vastasivat aiemmin monialukkeisella PCR-menetelmällä ja agglutinaatiotekniikalla saatuja tuloksia. Sekaviljelmiä testatessa reaaliaikaisen PCR-menetelmän kanssa samanaikaisesti rinnakkain tehty monialukkeinen PCR-menetelmä antoi myös yhtenevät tulokset. Reaaliaikainen PCR-menetelmä osoittautui monialukkeista PCR-menetelmää ja agglutinaatiotekniikkaa huomattavasti nopeammaksi menetelmäksi, joka mahdollistaa nopeamman diagnoosin, joka on tärkeää HUS-jälkitauteja sairastavien potilaiden hoidon kannalta.</p>			
Avainsanat — Nyckelord — Keywords EHEC, Reaaliaikainen PCR, O-seroryhmä, <i>stx</i> ₁ , <i>stx</i> ₂ , <i>hlyA</i>			
Säilytyspaikka — Förvaringsställe — Where deposited Soveltavan mikrobiologian käsikirjasto, Viikin tiedekirjasto			
Muita tietoja — Övriga uppgifter — Further information Työ tehtiin Terveyden ja hyvinvoinninlaitoksen Suolistoinfektio laboratoriossa. Työn ohjaajina toimivat tutkimusprofessori Anja Siitonen, FT Susanna Lukinmaa ja Diplomi biologi (teknillisesti suuntautunut) Taru Kauko.			